

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202192233 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.11.11

(51) Int. Cl. C12N 15/113 (2010.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.02.11

(54) МОЛЕКУЛЫ ГИДОВОЙ РНК Cas12a И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 62/804,591

(32) 2019.02.12

(33) US

(86) PCT/IB2020/051089

(87) WO 2020/165768 2020.08.20

(71) Заявитель:
УНИВЕРСИТА' ДЕЛЪИ СТУДИ
ДИ ТРЕНТО (IT); КАТОЛИКЕ
УНИВЕРСИТЕЙТ ЛЕВЕН (BE)

(72) Изобретатель:

Петрис Джанлука, Мауле Джулия
(IT), Карлон Марианн (BE), Казини
Антонио, Черезето Анна (IT)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Сконструированные молекулы гидовой РНК (гРНК) Cas12a, которые можно использовать, например, для коррекции аномального сплайсинга РНК, являющегося результатом мутаций в последовательности геномной ДНК, и предотвращения включения экзонов в зрелую мРНК.

A1

202192233

202192233

A1

МОЛЕКУЛЫ ГИДОВОЙ РНК CAS12A И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

1. ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] По настоящей заявке испрашивается приоритет по временной заявке США № 62/804591, поданной 12 февраля 2019 года, содержание которой включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

2. СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0002] Настоящая заявка включает список последовательностей, поданный в электронном виде в формате ASCII и включенный, таким образом, в качестве ссылки в полном объеме. Указанная копия ASCII создана 10 февраля 2020 года, названа ALA-002WO_SL.txt и имеет размер 135245 байт.

3. УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] Генетические мутации отвечают за множество дефектов, нарушений и заболеваний. Известно, что более 16000 мутаций в диапазоне от изменений одной пары нуклеотидов до крупных хромосомных дефектов вносят вклад по меньшей мере в 6000 разных состояний. Мышечная дистрофия Дюшена, бета-талассемия, гемофилия, серповидноклеточная анемия, боковой амиотрофический склероз, семейная гиперхолестеринемия, кистозный фиброз, синдром Ашера II типа являются лишь несколькими из множества хорошо известных заболеваний, вызванных генетическими мутациями.

[0004] Кистозный фиброз (CF) является летальным аутосомно-рецессивным нарушением, наследуемым приблизительно 1 на 2500 новорожденных. CF является результатом мутаций в гене регулятора трансмембранной проводимости при муковисцидозе (CFTR), экспрессирующимся в апикальной мембране всех эпителиальных клеток и, таким образом, поражающим многие органы. Главной причиной смертности среди пациентов с CF является бактериальная инфекция дыхательных путей, провоцирующая хроническое заболевание легких и, в конечном итоге, дыхательную недостаточность.

[0005] Существующее лечение CF не приводит к излечению, ограничиваясь только уменьшением клинических симптомов, например, воздействием на хронические бактериальные инфекции или облегчением блокады дыхательных путей. Неблагоприятные эффекты ограниченного количества генетических мутаций CFTR можно уменьшать с использованием недавно разработанных низкомолекулярных соединений, таких как корректоры и потенциаторы CFTR. Однако успех лечения потенциаторами сильно зависит от остаточного белка CFTR, зачастую являющегося очень низким и высоко вариабельным среди пациентов. Кроме того, облегчение симптомов с использованием существующего лечения приводит лишь к временному облегчению у индивидуумов, страдающих CF; пациента необходимо подвергать повторным циклам дискомфорта и лечения с последующими краткими периодами облегчения. Кроме того,

существующее лечение связано с побочными эффектами, которые могут усиливаться при повторном введении.

[0006] Несмотря на недавнее развитие генной терапии, небольшой прогресс был достигнут в отношении излечения CF и других генетических заболеваний. В случае CF существующая генная терапия зависит от доставки, как правило, через легкие, функциональной копии гена CFTR пациенту в попытке компенсировать дефектный ген CFTR. Такая терапия в лучшем случае не эффективна, будучи затрудненной плохой трансдукции легких, транзиторными и низкими уровнями экспрессии генов, быстрым оборотом эпителиальных клеток легких и симптомами заболевания, сохраняющимися, когда экспрессия вводимого гена CFTR падает ниже терапевтически эффективного уровня.

[0007] Мутации в гене USH2A могут вызывать синдром Ашера II типа. Синдром Ашера II типа отличается потерей слуха и зрения. Варианты лечения синдрома Ашера II типа. Существующее лечение синдрома Ашера II типа не является излечивающим. Фактически существующее лечение включает помощь при потере слуха и зрения. Таким образом, сохраняется существенная потребность в новом лечении и излечении кистозного фиброза, синдрома Ашера II типа и других генетических заболеваний, таких как мышечная дистрофия Дюшена, гемофилия и боковой амиотрофический склероз.

4. СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0008] Настоящее изобретение относится к молекулам гидовой РНК (гРНК) Cas12a, сконструированным так, чтобы содержать нацеливающую последовательность и петлевой домен. Молекулы гРНК Cas12a по изобретению в комбинации с белками Cas12a можно использовать, например, для коррекции или модификации аномального сплайсинга молекулы пре-мРНК посредством редактирования последовательности геномной ДНК, кодирующей пре-мРНК. Настоящее изобретение частично основано на обнаружении того, что аллель-специфическую репарацию сплайсинговых мутаций в гене CFTR можно осуществлять с использованием отдельных гРНК Cas12a, нацеленных на область вокруг сплайсинговых мутаций. Неожиданно, обнаружено, что эффективная коррекция ошибок сплайсинга, являющихся результатом сплайсинговых мутаций в гене CFTR, не требует делеции или коррекции самой мутации при использовании гРНК Cas12a, как представлено в настоящем описании. Фактически, не желая быть связанными какой-либо теорией, полагают, что коррекции сплайсинга можно достигать посредством делеции нуклеотидов в регулирующих сплайсинг элементах или вблизи регулирующих сплайсинг элементов, близких к мутации, а не коррекции мутации. Делеция нуклеотидов может приводить к удалению или инактивации регулирующих сплайсинг элементов вблизи мутации, хотя в некоторых случаях делеции можно подвергать саму мутацию. Кроме того, неожиданно обнаружено, что стратегия использования одной гРНК Cas12a для репарации сплайсинговых мутаций превосходит общепринятый подход с использованием Cas9 в комбинации с огРНК для индуцирования генетической делеции. Поход редактирования генома, пример которого приведен в отношении гена CFTR, можно использовать для

коррекции дефектов сплайсинга в различных других генах, ассоциированных с генетическими заболеваниями, а также восстановления экспрессии функционального белка, например, посредством проскока экзонов, имеющих вредные мутации, такие как преждевременные стоп-кодоны.

[0009] Таким образом, настоящее изобретение относится к молекулам гРНК Cas12a, нацеленным на геномные последовательности, кодирующие мутантные участки сплайсинга. Как показано на фиг. 1 и фиг. 2, каждая из молекул гРНК Cas12a по изобретению содержит (а) протоспейсерный домен, содержащий нацеливающую последовательность, и (b) петлевой домен. Как дополнительно показано на фиг. 1 и фиг. 2, нацеливающая последовательность соответствует целевому домену в последовательности геномной ДНК, и целевой домен является смежным с протоспейсер-смежным мотивом (РАМ), распознаваемым белком Cas12a. Целевой домен может находиться, например, в последовательности геномной ДНК эукариоты, например, млекопитающего. Предпочтительно, целевой домен находится в геномной последовательности человека. Геномная последовательность человека может находиться в гене, ассоциированном с генетическим заболеванием, например, гене регулятора трансмембранной проводимости при муковисцидозе (CFTR).

[0010] В некоторых аспектах гРНК Cas12a имеют нацеливающую последовательность, соответствующую целевому домену, включающему участок сплайсинга (например, как схематически показано на фиг. 1А и 2А), или расположенному близко к участку сплайсинга (например, как схематически показано на фиг. 1В и 2В).

[0011] Участок сплайсинга может являться, например, криптическим участком сплайсинга, активируемым или встраиваемым в результате мутации в геномной ДНК. Мутация в геномной ДНК может находиться в целевом домене (например, как схематически показано на фиг. 1А и 1В) или вблизи целевого домена (например, как схематически показано на фиг. 2А и 2В).

[0012] Сплайсинг молекул пре-мРНК по криптическим участкам сплайсинга может приводить к фенотипу заболевания, и снижение активности криптического участка сплайсинга в результате редактирования геномной ДНК с помощью гРНК Cas12a в комбинации с белком Cas12a может восстанавливать нормальный сплайсинг. Например, мутации CFTR 3272-26A>G, 3849+10kbC>T, IVS11+194A>G и IVS19+11505C>G приводят к кистозному фиброзу, и гРНК Cas12a по изобретению можно использовать для восстановления нормального сплайсинга CFTR.

[0013] Включение мутацию в нацеливающую последовательность может сделать возможным аллель-специфическое расщепление геномной ДНК. Протоспейсерный домен большинства белков Cas12a, как правило, имеет длину 23 нуклеотида, и, в связи с этим, специфического расщепления хромосомы, содержащей мутацию (в противоположность аллелю дикого типа), можно достигать посредством выбора целевого домена, находящегося на расстоянии 1-23 нуклеотида от последовательности РАМ Cas12a.

[0014] Альтернативно, участок сплайсинга может являться каноническим участком сплайсинга. Снижение активности канонического участка сплайсинга посредством редактирования геномной ДНК с помощью гРНК Cas12a в комбинации с белком Cas12a можно использовать, например, для стимуляции проскока экзона в гене, имеющем вредную мутацию (например, мутацию, например, в экзоне, приводящую к образованию укороченного белка). Как правило, мутация будет находиться вне целевого домена. С помощью проскока экзона можно достигать продукции измененного, но все еще возможно функционального белка. Например, мутации в экзоне 50 гена DMD могут вызывать преждевременное укорочение белка дистрофина, кодируемого геном, но проскок экзона 51 может восстанавливать рамку считывания и экспрессию функционального белка дистрофина (см. Amoasii et al., 2017, *Science Translational Medicine*, 9(418):eaan8081). гРНК Cas12a по изобретению можно использовать, например, для редактирования гена DMD, имеющего мутации в экзоне 50 таким образом, что экзон 51 подвергается проскоку, таким образом, происходит восстановление экспрессии функционального белка дистрофина.

[0015] Активность участка сплайсинга можно снижать с использованием гРНК Cas12a, сконструированной таким образом, что после встраивания гРНК и белка Cas12a в клетку, содержащую геномную последовательность, белок Cas12a расщепляет геномную ДНК вблизи участка сплайсинга (например, до 15 нуклеотидов от участка сплайсинга). Инсерционно-делеционные мутации, встраиваемые во время репарации расщепленной геномной ДНК, могут снижать активность участка сплайсинга (частично или полностью). Зная, что последовательность РАМ распознается конкретным белком Cas12a (например, TTTV в случае AsCas12a), что белок Cas12a расщепляет (например, после 19-го основания после последовательности РАМ на цепи, содержащей последовательность целевого домена и после 23-го основания после последовательности РАМ на комплементарной цепи в случае AsCas12a), и зная положение участка сплайсинга относительно последовательности РАМ в геномной ДНК, можно выбирать нацеливающую последовательность таким образом, что после встраивания гРНК и белка Cas12a в клетку, содержащую геномную последовательность, Cas12a будет расщеплять геномную ДНК на расстоянии до 15 нуклеотидов от участка сплайсинга.

[0016] В некоторых вариантах осуществления гРНК Cas12a содержат нацеливающую последовательность, соответствующую целевому домену, смежному с последовательностью РАМ Cas12a, находящемуся в пределах 40 нуклеотидов (например, от 4 до 38 нуклеотидов) от участка сплайсинга, кодируемого последовательностью геномной ДНК.

[0017] Примеры признаков геномной ДНК, которая может являться целевой, и примеры признаков молекул гРНК по изобретению описаны в разделах 6.2 и 6.3 и пронумерованных вариантах осуществления 1-283 ниже. Примеры белков Cas12a, которые можно использовать в комбинации с гРНК по изобретению, описаны в разделе 6.4 ниже.

[0018] Настоящее изобретение также относится к нуклеиновым кислотам, кодирующим гРНК по изобретению, и клеткам, содержащим нуклеиновые кислоты. Признаки примеров нуклеиновых кислот, кодирующих гРНК, и примеры клеток описаны в разделе 6.5 и пронумерованных вариантах осуществления 284-287 и 302-305 ниже.

[0019] Настоящее изобретение также относится к системам и частицам, содержащим гРНК Cas12a по изобретению. Примеры систем и частиц описаны в разделе 6.6 и пронумерованных вариантах осуществления 296-301 ниже.

[0020] Настоящее изобретение также относится к способам применения гРНК, систем и частиц по изобретению для изменения клеток. Способы по изобретению можно использовать, например, для лечения индивидуумов, имеющих генетическое заболевание, например кистозный фиброз или мышечную дистрофию. Примеры способов изменения клеток описаны в разделе 6.7 и пронумерованных вариантах осуществления 306-376 ниже.

5. КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0021] Следует понимать, что фигуры представляют собой примеры и не ограничивают объем настоящего изобретения. Фиг. 1-6 являются иллюстрациями, не всегда представленными в масштабе.

[0022] На фиг. 1A-1B показаны гРНК Cas12a, имеющие нацеливающие последовательности, соответствующие целевым доменам в последовательностях геномной ДНК, имеющих мутации в целевых доменах, где геномная ДНК кодирует участок сплайсинга в целевом домене (фиг. 1A) или вне целевого домена (фиг. 1B). В геномной ДНК последовательности РАМ указаны как заштрихованные сеткой секции; целевые домены указаны как секции в точку; мутации указаны звездочкой (*); участки сплайсинга указаны двунаправленными стрелками. В гРНК петлевые домены указаны точечными линиями; протоспейсерные домены, содержащие нацеливающие последовательности, указаны пунктирными линиями.

[0023] На фиг. 2A-2B показаны гРНК Cas12a, имеющие нацеливающие последовательности, соответствующие целевым доменам в последовательностях геномной ДНК, имеющих мутации вне целевых доменов, где геномная ДНК кодирует участок сплайсинга в целевом домене (фиг. 2A) или вне целевого домена (фиг. 2B). В геномной ДНК последовательности РАМ указаны как заштрихованные сеткой секции; целевые домены указаны как секции в точку; мутации указаны звездочкой (*); участки сплайсинга указаны двунаправленными стрелками. В гРНК петлевые домены указаны точечными линиями; протоспейсерные домены, содержащие нацеливающие последовательности, указаны пунктирными линиями.

[0024] На фиг. 3A-3B показаны гРНК Cas12a, нацеленные на криптоические 3'-участки сплайсинга. На фиг. 3A показаны гРНК Cas12a, нацеленные на криптоический 3'-участок сплайсинга, находящийся выше канонического 3'-участка сплайсинга. Сплайсинг по криптоическому 3'-участку сплайсинга, а не каноническому 3'-участку сплайсинга приводит к более длинной, чем нормальная, последовательности экзона в зрелой мРНК. Дополнительные нуклеотиды более длинной, чем нормальная, последовательности экзона

показаны на рисунке светлой штриховкой, а нуклеотиды нормальной последовательности экзона показаны на фигуре темной штриховкой. Последовательность РАМ (или комплементарная ей) выделена рамкой. Мутации указаны полужирным шрифтом с подчеркиванием. На фигуре показаны SEQ ID NO: 294-296 и 295, соответственно, в порядке появления. На фиг. 3В показаны гРНК Cas12a, нацеленные на криптоический 3'-участок сплайсинга, находящийся выше криптоического 5'-участка сплайсинга. Сплайсинг по криптоическому 3'-участку сплайсинга и криптоическому 5'-участку сплайсинга приводит к включению последовательности псевдоэкзона в зрелую мРНК. Нуклеотиды псевдоэкзона показаны на фигуре светлой штриховкой. Последовательность РАМ (или комплементарная ей) выделена рамкой. Мутации показаны полужирным шрифтом с подчеркиванием. Как показано схематически в верхней и нижней частях фиг. 1А-1В, гРНК можно конструировать для таргетинга любой цепи геномной ДНК. На фигуре показаны SEQ ID NO: 297, 295, 298 и 295, соответственно, в порядке появления.

[0025] На фиг. 4 показаны гРНК Cas12a, нацеленные на канонический 3'-участок сплайсинга. Нуклеотиды экзона показаны на фигуре светлой штриховкой. Последовательность РАМ (или комплементарная ей) выделена рамкой. Снижение активности канонического 3'-участка сплайсинга посредством редактирования геномной ДНК с использованием Cas12a и гРНК Cas12a, нацеленных на канонический 3'-участок сплайсинга, можно использовать для предотвращения включения экзона в зрелую мРНК. Как показано схематически в верхней и нижней частях фигуры, гРНК можно конструировать для таргетинга любой цепи геномной ДНК. На фигуре показаны SEQ ID NO: 299, 295, 300 и 295, соответственно, в порядке появления.

[0026] На фиг. 5А-5В показаны гРНК Cas12a, нацеленные на криптоические 5'-участки сплайсинга. На фиг. 5А показаны гРНК Cas12a, нацеленные на криптоический 5'-участок сплайсинга, находящийся ниже криптоического 3'-участка сплайсинга. Сплайсинг по криптоическому 3'-участку сплайсинга и криптоическому 5'-участку сплайсинга приводит к включению псевдоэкзона в зрелую мРНК. Нуклеотиды псевдоэкзона показаны на фигуре светлой штриховкой. Последовательность РАМ (или комплементарная ей) выделена рамкой. Мутации показаны полужирным шрифтом с подчеркиванием. На фигуре показаны SEQ ID NO: 301 и 302, соответственно, в порядке появления. На фиг. 5В показаны гРНК Cas12a, нацеленные на криптоический 5'-участок сплайсинга, находящийся ниже канонического 5'-участка сплайсинга. Сплайсинг по криптоическому 5'-участку сплайсинга, а не каноническому 5'-участку сплайсинга, приводит к более длинному, чем нормальный, экзону. Дополнительные нуклеотиды более длинного, чем нормальный, экзона показаны на фигуре светлой штриховкой, и нуклеотиды нормального экзона показаны на фигуре темной штриховкой. Последовательность РАМ (или комплементарная ей) выделена рамкой. Мутации показаны полужирным шрифтом с подчеркиванием. Как показано схематически в верхней и нижней частях фиг. 5А-5В, гРНК можно конструировать для таргетинга любой цепи геномной ДНК. На фигуре показаны SEQ ID NO: 303 и 304, соответственно, в порядке появления.

[0027] На фиг. 6 показаны гРНК Cas12a, нацеленные на канонический 5'-участок сплайсинга. Нуклеотиды экзона показаны на фигуре светлой штриховкой. Последовательность РАМ (или комплементарная ей) выделена рамкой. Снижение активности канонического 5'-участка сплайсинга посредством редактирования геномной ДНК с Cas12a и гРНК, нацеленными на канонический 5'-участок сплайсинга, может предотвращать включение экзона в зрелую мРНК. Как показано схематически в верхней и нижней частях фигуры, гРНК можно конструировать для таргетинга любой цепи геномной ДНК. На фигуре показаны SEQ ID NO: 305 и 304, соответственно, в порядке появления.

[0028] На фиг. 7 показана схема минигенов CFTR, содержащих последовательность приблизительно 1,3 т.п.н., соответствующую области CFTR, тянущейся от экзона 19 до экзона 20 дикого типа (pMG3272-26WT) или 3272-26A>G-мутантного (pMG3272-26A>G). Экзоны показаны рамками, интроны показаны как линии; ожидаемые сплайсированные транскрипты приведены справа в соответствии с наличием или отсутствием мутации 3272-26 A>G. На нижней панели показана нуклеотидная последовательность и границы интрон-экзон вблизи мутации 3272-26A>G (указана полужирным шрифтом) и целевые положения срРНК (подчеркнуты, при этом РАМ обозначена более толстым подчеркиванием). На фигуре показаны SEQ ID NO: 306 и 307, соответственно, в порядке появления.

[0029] На фиг. 8А-8В показана валидация сплайсинга интрона 19 в моделях минигенов CFTR pMG3272-26WT и pMG3272-26A>G. Фиг. 8А: Профиль сплайсинга моделей минигенов CFTR дикого типа (pMG3272-26WT) и мутантного CFTR (pMG3272-26A>G), трансфицированных в клетки HEK293Т, при электрофорезе в агарозном геле продуктов РТ-ПЦР. Черной стрелкой указан аномальный сплайсинг; белой стрелкой указан корректный сплайсинг. Фиг. 8В: хроматограмма секвенирования по Сэнгеру продуктов сплайсинга минигена с фиг. 8А. Вертикальными линиями указаны границы между экзонами. На фигуре показаны SEQ ID NO: 308 и 309, соответственно, в порядке появления.

[0030] На фиг. 9А-9D показана коррекция измененного сплайсинга интрона 19 в модели минигена CFTR 3272-26A>G посредством редактирования ДНК с помощью AsCas12a. Фиг. 9А: Профиль сплайсинга, анализируемый посредством РТ-ПЦР в клетках HEK293/pMG3272-26A>G с последующей обработкой контролем AsCas12a-срРНК (Ctr) или специфический для мутации 3272-26A>G (+11 и -2). Черной стрелкой указан аномальный сплайсинг; белой стрелкой указан корректный сплайсинг. Репрезентативные данные для n=2 независимых экспериментов. Фиг. 9В: Процентные доли корректного сплайсинга, измеренного посредством денситометрии, как на фиг. 9А. Фиг. 9С: эффективность редактирования, анализируемая посредством TIDE в клетках, обработанных, как на фиг. 9А. Данные представляют собой средние значения $\pm$ SEM для n=2 независимых экспериментов. Фиг. 9D: Инсерционно-делеционные мутации, запускаемые AsCas12a-срРНК+11. Локус 3272-26A>G из клеток, отредактированный с

использованием *crPНК*+11, амплифицировали, клонировали в остов минигена и секвенировали по Сэнгеру (34 разных клон, левая панель) или анализировали, как на фиг. 9А, для визуализации профиля сплайсинга. *pMG3272-26WT* и *pMG3272-26A>G* использовали в качестве референсов. На фигуре показаны SEQ ID NO: 310-338, соответственно, в порядке появления.

[0031] На фиг. 10А-10С показана целевая специфичность редактирования *AsCas12a-crPНК*+11. Эффективность редактирования посредством анализа TIDE в клетках HEK293/*pMG3272-26WT* или HEK293/*pMG3272-26A>G* (фиг. 10А) и клетках Сасо-2 (фиг. 10В) после лентивирусной трансдукции *Cas12a-crPНК*+11 или +11/*wt*, как указано. Данные представляют собой средние значения $\pm$ SEM для $n=2$ независимых экспериментов. Фиг. 10С: анализ GUIDE-seq *crPНК*+11. На фигуре показаны SEQ ID NO: 339 и 340, соответственно, в порядке появления.

[0032] На фиг. 11А-Д показан профиль репарации после расщепления *AsCas12a-crPНК*+11. Фиг. 11А-С: Спектр инсерционно-делеционных мутаций по результатам анализа TIDE для клеток HEK293/*pMG3272-26A>G* после редактирования *AsCas12a-crPНК*+11 для $n=3$ независимых экспериментов. Фиг. 11Д: Электрофорез в агарозном геле продуктов РТ-ПЦР, где показан профиль сплайсинга отредактированных участков, клонированных в плазмиду минигена и трансфицированных в клетки HEK293Т.

[0033] На фиг. 12А-В показан неизмененный сплайсинг CFTR WT после редактирования ДНК *AsCas12a-crPНК*+11 или *crPНК*+11/*wt*. Анализ продуктов РТ-ПЦР после редактирования *AsCas12a-crPНК*+11 или +11/*wt* в минигене HEK293/*pMG3272-26WT* или *A>G* (фиг. 12А) и в клетках Сасо-2 (фиг. 12В), имеющих последовательность CFTR WT. Клетки трансдуцировали с помощью лентивирусных векторов, несущих *AsCas12a-crPНК*+11 или +11/*wt*, и подвергали селекции с помощью пуромицина в течение 10 дней. Изображения являются типичными для двух независимых экспериментов.

[0034] На фиг. 13А-Н показан анализ редактирования генома *AsCas12a-crPНК*+11 в 3272-26A>G-мутантных органоидах пациента с CF. Фиг. 13А: Анализ профиля сплайсинга посредством РТ-ПЦР в органоидах 3272-26A>G после лентивирусной трансдукции (14 дней) контроля *AsCas12a-crPНК* (Ctr), или специфического для мутации 3272-26A>G (+11), или с использованием кДНК CFTR. Черной стрелкой указан аномальный сплайсинг; белой стрелкой указан корректный сплайсинг. Процентные доли аномального сплайсинга (% инсерции 25 нуклеотидов (н.) в мРНК) измеряли посредством хроматографического анализа расщепления. Фиг. 13В: Эффективность редактирования в органоидах 3272-26A>G, измеряемая посредством анализа T7E1 после лентивирусной трансдукции, как на фиг. 13А. Фиг. 13С: Глубокое секвенирование целевого локуса CFTR после трансдукции *AsCas12a-crPНК*+11 органоидов 3272-26A>G (среднее для $n=2$ независимых экспериментов). На фигуре показаны SEQ ID NO: 310 и 341-354, соответственно, в порядке появления. Фиг. 13Д: Процент ридов глубокого секвенирования отредактированных и неотредактированных аллелей 3272-26A>G или WT с фиг. 13С. Фиг. 13Е: Схема CFTR-

зависимого набухания в моделях органоидов. Фиг. 13F: Репрезентативные изображения конфокальной микроскопии меченых кальцеином органоидов 3272-26A>G до (T=0 мин) и после (T=60 мин) анализа форсколин-индуцированного набухания (FIS). Масштабная линейка=200 мкм. Фиг. 13G: Количественный анализ площади органоидов после лентивирусной трансдукции AsCas12a-срPHK Ctr, AsCas12a-срPHK+11 или с использованием кДНК CFTR, как указано. Каждая точка соответствует средней площади органоида, анализируемой в каждой лунке (количество органоидов на лунку: 25-300) для 4 независимых экспериментов. Фиг. 13H: Кратное изменение площади органоидов до (T=0 мин) и после (T=60 мин) анализа FIS, каждая точка соответствует среднему увеличению площади органоидов, анализируемых в каждой лунке (количество органоидов на лунку: 25-300) для n=4 независимых экспериментов. Данные представляют собой средние значения $\pm$ SD. **P<0,01, ****P<0,0001, n.s. не значимо.

[0035] На фиг. 14A-14D показан сплайсинг CFTR и функциональная характеристика 3272-26A>G-мутантных органоидов пациентов с CF после редактирования генома с помощью AsCas12a-срPHK+11. Фиг. 14A: Хроматограмма продуктов RT-ПЦР с фиг. 3A. На верхней панели показана смешанная популяция транскриптов мРНК органоидов 3272-26A>G/4218insT, на нижней панели показаны транскрипты после редактирования AsCas12a-срPHK+11 в этих органоидах. Последовательность справа от вертикальной линии соответствует площади хроматограммы после соединения экзон 19-экзон 20. На фигуре показаны SEQ ID NO: 355 и 356, соответственно, в порядке появления. Фиг. 14B-14C: Хроматографический анализ деконволюции использовали для оценки количества мутантного сплайсинга (включение +25 н. из интрона 19) до (фиг. 14B) и после (фиг. 14C) расщепления AsCas12a-срPHK+11. Фиг. 14D: Анализ FIS для n=4 независимых экспериментов; каждая линия соответствует одной лунке (n=25-300). Данные представляют собой средние значения $\pm$ SD.

[0036] На фиг. 15 показана схема минигенов CFTR дикого типа (pMG3849+10kbWT) и 3849+10KbC>T (pMG3849+10kbC>T), несущих экзон 22, части интрона 22, включающие мутацию 3849+10KbC>T, и экзон 23 гена CFTR. Экзоны показаны в виде рамок, а интроны - в виде линий; ожидаемые сплайсированные транскрипты показаны справа в соответствии с наличием или отсутствием мутации 3849+10kbC>T. На нижней панели показана нуклеотидная последовательность вблизи мутации 3849+10kbC>T (указано полужирным шрифтом) и целевого положения AsCas12a-срPHK+14 (подчеркнуто, при этом РАМ (СТТТ) подчеркнуто темнее). На фигуре показаны SEQ ID NO: 357 и 358, соответственно, в порядке появления.

[0037] На фиг. 16A-16B показана валидация сплайсинга интрона 22 в моделях минигенов CFTR pMG3849+10kbWT и pMG3849+10kbC>T. Фиг. 16A: Профиль сплайсинга моделей минигенов CFTR дикого типа (pMG3849+10kbWT) и мутантного CFTR (pMG3849+10kbC>T), трансфицированных в клетки HEK293T, по результатам анализа электрофореза в агарозном геле продуктов RT-ПЦР. Черной стрелкой указан аномальный сплайсинг; белой стрелкой указан корректный сплайсинг; "Δ" указан продукт

альтернативного сплайсинга. ФИГ. 16В: Хроматограмма секвенирования по Сэнгеру продуктов сплайсинга минигенов с фиг. 16А. Вертикальными линиями показаны границы между экзонами. На фигуре показаны SEQ ID NO: 359 и 360, соответственно, в порядке появления.

[0038] На фиг. 17А-17С показана коррекция дефекта сплайсинга 3849+10kbC>T посредством редактирования AsCas12a-срPHK+14 в модели минигена и органоидах, полученных из кишечника пациента-человека. Фиг. 17А: Профиль сплайсинга, анализируемый посредством RT-ПЦР в клетках HEK293/pMG3849+10kbC>T после обработки контрольным AsCas12a-срPHK (Ctr) или специфическим для мутации 3272-26A>G (+14). Черной стрелкой указан аномальный сплайсинг; белой стрелкой указан корректный сплайсинг; "Δ" указан артефакт сплайсинга минигена. Фиг. 17В: Клетки Сасо-2, лентивирусно трансдуцированные с использованием AsCas12a-срPHK+14 или +14/wt, анализировали на редактирование в интроне 22 CFTR с помощью анализа редактирования SYNTHEGO ICE. Данные представляют собой средние значения ±SEM для n=2 независимых экспериментов. Фиг. 17С: Анализ GUIDE-seq срPHK+14.

[0039] На фиг. 18А-18С показана коррекция дефекта сплайсинга 3849+10kbC>T посредством редактирования AsCas12a-срPHK+14 в модели минигена и органоидах, полученных из кишечника пациента-человека. Фиг. 18А: органоиды 3849+10Kb C>T, полученные из кишечника пациента, подвергали лентивирусной трансдукции с использованием контрольного AsCas12a-срPHK (Ctr) или срPHK+14 и анализировали на редактирование интрона 22 посредством SYNTHEGO ICE. Фиг. 18В: Конфокальные изображения меченых кальцеином органоидов 3849+10KbC>T, трансдуцированных с использованием кДНК AsCas12a-срPHK+14 или CFTR. Масштабная линейка 200 мкм. Фиг. 18С: Количественный анализ площади органоидов, как на фиг. 18В; каждая точка соответствует средней площади органоидов, анализируемых в каждой лунке (количество органоидов на лунку: 3-30). Данные представляют собой средние значения ±SD. **P<0,01, n.s. не значимо.

[0040] На фиг. 19 показано AsCas12a-редактирование органоидов CFTR 3849+10kbC>T. Анализ SYNTHEGO ICE редактирования AsCas12a-срPHK+14 в образцах органоидов. Прогнозируемые исходы репарации приведены с их избыточностью. На фигуре показаны SEQ ID NO: 361-376, 375, 377-384, 362-364, 370, 385, 380, 379, 368, 369, 386, 372, 387, 384, 373, 371, 388, 381, 389 и 390, соответственно, в порядке появления.

[0041] На фиг. 20А-20Н показана коррекция SpCas9-огPHK дефекта сплайсинга 3849+10kb в модели минигена и органоидов, полученных из пациентов с CF. Фиг. 20А: Скрининг пар SpCas9-огPHK в pMG3849+10kbC>T, трансфицированном в клетки HEK293Т. Продукты RT-ПЦР анализировали посредством электрофореза в агарозном геле. "Δ" указаны продукты альтернативного сплайсинга pMG3849+10kbWT или C>T. Фиг. 20В: Анализ электрофореза в агарозном геле направленных делеций в pMG3849+10kbC>T после расщепления пар SpCas9-огPHK. Фиг. 20С: продукты RT-ПЦР, и фиг. 20D: направленные делеции в клетках Сасо-2, трансдуцированных с

использованием лентивирусных векторов SpCas9-огРНК и после 10 дней селекции пурамицином. Фиг. 20Е: Редактирование в органоидах пациента, анализируемых посредством электрофореза в агарозном геле. Фиг. 20F: Конфокальные изображения меченых кальцеином органоидов CF 3849+10kbC>T в T=0 мин, трансдуцированных с использованием 0,25, 0,5 или 1 RTU SpCas9-огРНК-95/+119. Масштабная линейка=200 мкм. Фиг. 20G: Количественный анализ стационарной площади органоидов; каждая точка соответствует средней площади органоидов из одной лунки (n=3-30). Данные представляют собой средние значения $\pm$ SD. **P<0,01, ****P<0,0001. Фиг. 20H: Анализ GUIDE-seq гРНК-95 и гРНК+119. На фигуре показаны SEQ ID NO: 391-404 и 396, соответственно, в порядке появления.

[0042] На фиг. 21А-21G показан функциональный скрининг гРНК SpCas9 и AsCas12a на коррекцию сплайсинга минигена 3272-26А>G. Фиг. 21А-21В: Скрининг SpCas9-огРНК (фиг. 21А) и AsCas12a-срРНК (фиг. 21В) на основе стабильности для восстановления корректного профиля сплайсинга минигена CFTR 3272-26А>G. Нуклеазы и гРНК, отдельные или в паре, трансфицировали в клетки HEK293Т с использованием рMG3272-26А>G. Продукты РТ-ПЦР анализировали посредством электрофореза в агарозном геле. рMG3272-26WT использовали в качестве референса корректного сплайсинга интрона 19. Фиг. 21С и фиг. 21D: Анализ электрофореза в агарозном геле направленной делеции в минигене 3272-26А>G после расщепления с помощью SpCas9-огРНК (фиг. 21С) и AsCas12a-срРНК (фиг. 21D), измеряемого посредством ПЦР. Более крупная полоса соответствует нередктированным последовательностям минигена, меньшая полоса соответствует ожидаемому продукту делеции. Фиг. 21Е: Электрофорез в агарозном геле продуктов РТ-ПЦР. Фиг. 21F: Электрофорез в агарозном геле продуктов ПЦР направленной делеции для пар SpCas9-огРНК, выбранных из приведенных на фиг. 21В. в клетках HEK293, имеющих стабильную геномную интеграцию минигена 3272-26А>G (клетки HEK293/рMG3272-26А>G). Фиг. 21G: хроматограмма секвенирования по Сэнгеру корректного сплайсинга интрона 19 для 3272-26А>G-интегрированного минигена после редактирования AsCas12a-срРНК+11 с фиг. 9А. Вертикальная линия соответствует границам между экзонами 19-20. На фигуре показана SEQ ID NO: 405.

[0043] На фиг. 22А-22D показаны частичные последовательности плазмид, соответствующие минигенам. Фиг. 22А: рMG3272-26А>GWT (SEQ ID NO: 406). Фиг. 22В: рMG3272-26А>G (SEQ ID NO: 407). Фиг. 22С: рMG3849+10kbWT (SEQ ID NO: 408). Фиг. 22D: рMG3849+10kbC>T (SEQ ID NO: 409).

[0044] Фиг. 23 является схемой моделей минигенов USH2A, используемых для имитации сплайсинга USH2A в примере 11. Минигены включают экзон 40 и экзон 41 USH2A, а также часть интрона 40, дающего начало псевдоэкзону 40 (PE40) в присутствии мутации с.7595-2144А>G. Белковые метки встраивали на 5'- и 3'-концы конструкции, чтобы способствовать экспрессии, регулируемой сильным конститутивным промотором CMV. Продукты сплайсинга на минигенах дикого типа и мутантных минигенах показаны внизу фигуры.

[0045] Фиг. 24 является типичным агарозным гелем, на котором показаны продукты сплайсинга для минигенов USH2A дикого типа и мутантных минигенов USH2A, определяемых посредством RT-ПЦР после трансфекции клеток HEK293 с использованием двух минигенов, полученных в примере 11. Транскрипт, получаемый с помощью мутантного минигена, является более крупным из-за включения PE40.

[0046] На фиг. 25 схематически показаны целевые домены гидовой РНК Cas12a для редактирования псевдоэкзона 40 (PE40) USH2A (пример 11). PE40 выделен светло-серым цветом. Также указано положение мутации с.7595-2144A>G. На фигуре показаны SEQ ID NO: 410 и 411, соответственно, в порядке появления.

[0047] На фиг. 26A-26D показана коррекция сплайсинга USH2A посредством Cas12a в транзиторно трансфицированных клетках HEK293 (пример 11). Фиг. 26A: Типичный агарозный гель, на котором показан анализ RT-ПЦР продуктов сплайсинга, полученных после транзиторной трансфекции HEK293 с использованием AsCas12a в комбинации указанных гРНК и минигенов USH2A дикого типа или мутантных минигенов USH2A, как указано. Клетки, трансфицированные с использованием вектора, кодирующего AsCas12a и нецелевую рандомизированную гРНК, приведены в качестве контроля. Нижняя полоса соответствует корректно сплайсированным продуктам, в то время как верхняя полоса включает аномальный PE40. NTC: безматричный контроль. Фиг. 26B: Процентная доля продуктов корректного сплайсинга, полученных через 6 дней после котрансфекции HEK293 с использованием минигенов дикого типа и мутантных минигенов вместе с AsCas12a, и указанных гРНК, полученных посредством денситометрического анализа с фиг. 26A. Данные представляют собой средние значения $\pm$ SEM для $n=2$ биологически независимых исследований. Фиг. 26C: Типичный агарозный гель, где показан анализ RT-ПЦР продуктов сплайсинга, полученных после транзиторной трансфекции HEK293 с использованием LbCas12a в комбинации указанных гРНК и минигенов USH2A дикого типа или мутантных минигенов USH2A, как указано. Клетки, трансфицированные с использованием вектора, кодирующего LbCas12a и нецелевую рандомизированную гРНК, приведены в качестве контроля. Нижняя полоса соответствует корректно сплайсированным продуктам, в то время как верхняя полоса включает аномальный PE40. NTC: безматричный контроль. Фиг. 26D: Процентная доля продуктов корректного сплайсинга, образующихся через 6 дней после котрансфекции HEK293 с использованием минигенов дикого типа и мутантных минигенов вместе с LbCas12a и указанными гРНК, полученная посредством денситометрического анализа данных Фиг. 26C. Данные представляют собой средние значения $\pm$ SEM для $n=2$ биологически независимых исследований.

[0048] На фиг. 27A-27C показана коррекция сплайсинга USH2A посредством LbCas12a в клонах HEK293, стабильно экспрессирующих минигены USH2A. Фиг. 27A: Типичный агарозный гель, где показаны профили сплайсинга, определенные посредством RT-ПЦР минигена USH2A дикого типа в стабильном клоне 1 HEK293 и мутантного минигена USH2A в стабильных клонах 4 и 6 HEK293 через 10 дней после трансдукции с

использованием лентивирусных векторов, экспрессирующих LbCas12a вместе с гидом 1 или гидом 3, как указано. Фиг. 27В: Уровни продуктов корректного сплайсинга, измеряемые посредством денситометрии на данных с фиг. 27А, полученных через 10 дней после трансдукции клонов 4 и 6 НЕК293, стабильно экспрессирующих мутантный миниген USH2A, с использованием лентивирусных векторов, кодирующих LbCas12a, вместе с гидом 1 или гидом 3. Фиг. 27С: Образование инсерционно-делеционной мутации через 10 дней после трансдукции клонов НЕК293, стабильно экспрессирующих минигены USH2A дикого типа или мутантные минигены USH2A, с использованием лентивирусных векторов, кодирующих LbCas12a и указанные гРНК, что измеряют посредством анализа TIDE. Данные в отношении клона НЕК293, несущего встроенный миниген дикого типа (клон 1), приведены для оценки аллельной специфичности каждой гРНК в этих условиях исследования. На фиг. 27В и фиг. 27С данные представляют собой средние значения SEM для $n=2$ биологически независимых исследований.

[0049] На фиг. 28А-28D показаны профили инсерционно-делеционных мутаций, генерируемых LbCas12a на минигене USH2A с.7595-2144А>G (пример 11). Профили инсерционно-делеционных мутаций, вычисленные из ридов секвенирования по Сэнгеру, полученных из клонов 4 и 6 НЕК293 с.7595-2144А>G USH2A после трансдукции с использованием лентивирусных векторов, кодирующих LbCas12a и гид 1 (фиг. 28А-ФИГ. 28В) или гид 3 (фиг. 28С-фиг. 28D), как показано на фиг. 27. Анализы хроматограмм осуществляли с использованием веб-инструмента Synthego ICE и наблюдали только инсерционно-делеционные мутации с вычисленной частотой 1% или выше. При наличии, мутация с.7595-2144А>G выделена кругом. На фиг. 28А показаны SEQ ID NO: 412-428; на фиг. 28В показаны SEQ ID NO: 412, 413, 416, 429, 414, 424, 418, 430, 431, 428, 420, 432, 433, 419, 421, 415 и 434; на фиг. 28С показаны SEQ ID NO: 435-449; и на фиг. 28D показаны SEQ ID NO: 435, 437, 436, 439, 440, 438, 441, 442, 444 и 450-453, все, соответственно, в порядке появления.

6. ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0050] Настоящее изобретение относится к молекулам гидовой РНК (гРНК) Cas12a, которую в комбинации с белками Cas12a можно использовать, например, для коррекции аномального сплайсинга РНК, являющегося результатом мутаций в последовательности геномной ДНК или, в качестве другого примера, для предотвращения включения экзона в зрелую мРНК (например, где проскок экзона будет предпочтительным).

[0051] В одном из аспектов гРНК по изобретению конструируют так, чтобы она содержала протоспейсерный домен, содержащий нацеливающую последовательность, и петлевой домен. Нацеливающая последовательность соответствует целевому домену в последовательности геномной ДНК, и целевой домен является смежным в отношении протоспейсер-смежного мотива (РАМ) белка Cas12a.

[0052] Примеры признаков геномной ДНК, на которую можно нацеливать, и примеры признаков молекул гРНК по изобретению описаны в разделах 6.2 и 6.3. Примеры

белков Cas12a, которые можно использовать в комбинации с гРНК по изобретению, описаны в разделе 6.4.

[0053] Настоящее изобретение также относится к нуклеиновым кислотам, кодирующим гРНК по изобретению, и клеткам-хозяевам, содержащим нуклеиновые кислоты. Признаки примеров нуклеиновых кислот, кодирующих гРНК, и примеров клеток-хозяев описаны в разделе 6.5.

[0054] Настоящее изобретение также относится к системам и частицам, содержащим гРНК Cas12a по изобретению. Примеры систем и частиц описаны в разделе 6.6.

[0055] Настоящее изобретение также относится к способам применения гРНК, систем и частиц по изобретению для изменения клеток. Способы по изобретению можно использовать, например, для лечения генетического заболевания. Примеры способов изменения клеток описаны в разделе 6.7.

6.1. Определение

[0056] Термин "смежный" в отношении двух нуклеотидных последовательностей (например, целевого домена и PAM) означает, что две нуклеотидные последовательности находятся рядом друг с другом без промежуточных нуклеотидов между двумя последовательностями.

[0057] Термин "белок Cas12a" относится к белку Cas12a дикого типа или сконструированному белку Cas12a. Белки Cas12a также обозначают в этой области как белки Cpf1.

[0058] Термин "соответствует" в отношении нацеливающей последовательности и целевого домена означает, что нацеливающая последовательность комплементарна комплементу целевого домена с не более чем 3 ошибочными спариваниями нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления нацеливающая последовательность комплементарна комплементу целевого домена с не более чем 2 ошибочными спариваниями нуклеотидов. В других вариантах осуществления нацеливающая последовательность комплементарна комплементу целевого домена с не более чем 1 ошибочным спариванием нуклеотида. В других вариантах осуществления нацеливающая последовательность комплементарна комплементу целевого домена без ошибочных спариваний нуклеотидов.

[0059] Термин "разрушенный" по отношению к области последовательности геномной ДНК означает, что область изменена посредством инсерционно-делеционной мутации.

[0060] Термин "инсерционно-делеционные мутации" в контексте настоящего изобретения относится к инсерциям и делециям в последовательности геномной ДНК, встроенным во время репарации (например, посредством нехомологичного соединения концов или гомологичной репарации) последовательности геномной ДНК, расщепленной белком Cas12a.

[0061] Термин "петлевой домен" является компонентом гРНК Cas12a по изобретению, содержащим структуру стебель-петля, распознаваемую белком Cas12a. Петлевые домены могут содержать нуклеотидную последовательность природной последовательности стебель-петля, распознаваемой белком Cas12a, или могут содержать сконструированную нуклеотидную последовательность, образующую структуру стебель-петля, распознаваемую белком Cas12a. См., например, Zetsche et al., 2015, Cell 163:759-771.

[0062] Термин "мутация" в контексте настоящего изобретения относится к изменению последовательности геномной ДНК дикого типа. Мутация может являться изменением в одном или более нуклеотидах (например, однонуклеотидным полиморфизмом (SNP)), делецией или инсерцией относительно последовательности геномной ДНК дикого типа. Мутация, являющаяся делецией или инсерцией может являться, например, делецией или инсерцией от 1 до 10^6 нуклеотидов (например, от 1 до 10^5 нуклеотидов, от 1 до 10^4 нуклеотидов, от 1 до 10^3 нуклеотидов, от 1 до 100 нуклеотидов или от 1 до 10 нуклеотидов).

[0063] Термин "протоспейсерный домен" относится к области молекулы гРНК Cas12a, содержащей нацеливающую последовательность. Протоспейсерный домен иногда обозначают как сРНК.

[0064] Термин "протоспейсер-смежный мотив (РАМ)" в контексте настоящего изобретения относится к последовательности геномной ДНК, как правило, длиной четыре нуклеотида, находящейся в 5'-направлении относительно целевого домена в последовательности геномной ДНК и необходимой для расщепления геномной ДНК белком Cas12a, распознающим РАМ. Примером последовательности РАМ является TTTV, являющаяся последовательностью РАМ для AsCas12a и LbCas12a дикого типа.

[0065] В рамках изобретения термин "участок сплайсинга" относится к соединению интрон/экзон в молекуле предшественника мРНК (пре-мРНК). Участок сплайсинга может являться 5'-участком сплайсинга (также обозначаемым как донорный участок сплайсинга), являющийся участком сплайсинга, локализованным на 5'-конце интрона, или 3'-участком сплайсинга (также обозначаемым как акцепторный участок сплайсинга), являющимся участком сплайсинга, локализованным на 3'-конце интрона. Сплайсинг пре-мРНК по каноническому участку сплайсинга обозначают в настоящем описании как нормальный сплайсинг. Сплайсинг пре-мРНК, происходящий по криптическому участку сплайсинга, обозначают в настоящем описании как аномальный сплайсинг. Криптические участки сплайсинга могут присутствовать в молекулах пре-мРНК дикого типа, но, как правило, являются неактивными или используются только на низких уровнях, если они не активированы посредством мутации. Криптические участки сплайсинга также можно получать с помощью мутации.

[0066] Термин "целевой домен" относится к последовательности геномной ДНК, являющейся мишенью расщепления белком Cas12a.

[0067] Термин "нацеливающая последовательность" относится к области молекулы гРНК Cas12a, соответствующей целевому домену.

[0068] Термин "дикий тип" по отношению к последовательности геномной ДНК относится к последовательности геномной ДНК, преобладающей у биологического вида, например, *Homo sapiens*.

6.2. Последовательности геномной ДНК для редактирования генома

[0069] гРНК Cas12a по изобретению можно конструировать для таргетинга, в комбинации с белком Cas12a, эукариотических геномных последовательностей, таких как геномные последовательности млекопитающего. Предпочтительно, геномные последовательности-мишени являются геномными последовательностями человека. Интересующие геномные последовательности, как правило, являются геномными последовательностями, кодирующими мутантный ген, экспрессия которого приводит к фенотипу заболевания. Например, фенотип заболевания может являться фенотипом заболевания, являющимся результатом мутации, вызывающей аномальный сплайсинг пре-мРНК, или фенотип заболевания, являющийся результатом мутации в экзоне (например, мутации, приводящей к встраиванию стоп-кодона в мРНК, кодируемую геномной последовательностью).

[0070] Примеры последовательностей геномной ДНК, которые могут являться мишенью, включают варианты генов регулятора трансмембранной проводимости при муковисцидозе (CFTR) (например, ассоциированные с кистозным фиброзом), варианты генов дистрофина (DMD) (например, ассоциированные с мышечными дистрофиями, такими как мышечная дистрофия Дюшена или мышечная дистрофия Беккера), варианты генов бета-субъединицы гемоглобина (HBB) (например, ассоциированные с бета-талассемией), варианты генов бета-цепи фибриногена (FGB) (например, ассоциированные с афибриногенемией), варианты генов супероксиддисмутазы 1 (SOD1) (например, ассоциированные с боковым амиотрофическим склерозом), варианты генов хиноид-дигидроптеридинредуктазы (QDPR) (например, ассоциированные с дефицитом дигидроптеридинредуктазы), варианты генов альфа-галактозидазы (GLA) (например, ассоциированные с болезнью Фабри), варианты генов рецептора липопротеинов низкой плотности (LDLR) (например, ассоциированные с семейной гиперхолестеринемией), варианты генов BRCA1-взаимодействующего белка 1 (BRIP1) (например, ассоциированные с анемией Фанкони), варианты генов фактора свертывания IX (F9) (например, ассоциированные с гемофилией B), варианты генов центросомального белка 290 кДа (CEP290) (например, ассоциированные с врожденным амаврозом Лебера), варианты генов коллагена типа II, альфа 1 (COL2A1) (например, ассоциированные с синдромом Стиклера), варианты генов ушерина (USH2A) (например, ассоциированные с синдромом Ашера II типа) и варианты генов кислой альфа-глюкозидазы (AAG) (например, ассоциированные с гликогенозом типа II). Примеры целевых доменов в разных вариантах этих генов (которые можно использовать для конструирования гРНК Cas12a, представленных в настоящем описании) описаны в разделе 6.3.4.

6.2.1. Протоспейсер-смежные мотивы (PAM)

[0071] Одним из ограничений использования систем CRISPR в целом (например, CRISPR-Cas9 и CRISPR-Cas12a) является требование для целевого домена находиться в непосредственной близости с последовательностью PAM (например, быть смежным с последовательностью PAM). Белки Cas12a генерируют ступенчатые разрывы при расщеплении геномной ДНК; в случае AsCas12a и LbCas12a расщепление ДНК геномной последовательности-мишени происходит после 19-го основания после последовательности PAM на цепи, содержащей последовательность целевого домена и после 23-го основания после последовательности PAM на комплементарной цепи. Таким образом, конструирование гРНК Cas12a ограничено локализацией и доступностью последовательностей PAM в геномной ДНК. Однако, сконструированы варианты Cas12a, распознающие последовательности PAM, отличающиеся от последовательностей PAM, распознаваемых белками дикого типа Cas12a (см. раздел 6.4), увеличивая количество последовательностей геномной ДНК, которые потенциально могут являться мишенью для редактирования с помощью Cas12a.

[0072] PAM, распознаваемый AsCas12a и LbCas12a, представляет собой TTTV, где V является A, C или G, в то время как PAM FnCas12 представляет собой NTTN, где N является любым нуклеотидом. Получены сконструированные белки Cas12a, распознающие альтернативные последовательности PAM, например распознающие один или более из TYCV, где Y является C или T, и V является A, C или G; CCCC; ACCC; TATV, где V является A, C или G; и RATR. Белки Cas12a, распознающие эти последовательности PAM, описаны в разделе 6.4.

6.2.2. Участки сплайсинга

[0073] гРНК Cas12a по изобретению нацелены на последовательности геномной ДНК, расположенные близко к участку сплайсинга или включающие участок сплайсинга, кодируемые геномной ДНК. Участок сплайсинга должен находиться в непосредственной близости к последовательности PAM Cas12a таким образом, что геномная ДНК может расщепляться белком Cas12a. Например, гРНК Cas12a можно конструировать таким образом, что после встраивания гРНК и белка Cas12a в клетку, содержащую геномную последовательность, Cas12a расщепляет геномную ДНК до 15 нуклеотидов (например, до 10 нуклеотидов или 10-15 нуклеотидов) от участка сплайсинга, кодируемого геномной ДНК. Инсерционно-делеционные мутации, образующиеся во время репарации расщепленной геномной ДНК, могут вызывать снижение (например, частичное или полное) активности участка сплайсинга и, таким образом, изменение сплайсинга пре-мРНК, кодируемой геномной ДНК. Участок сплайсинга может являться криптическим участком сплайсинга (например, участком, приводящим к фенотипу заболевания) или каноническим участком сплайсинга (например, выше экзона, содержащего вызывающую заболевание мутацию). Участок сплайсинга (криптический или канонический) может являться 5'-участком сплайсинга или 3'-участком сплайсинга. Участки сплайсинга более подробно описаны в разделе 6.3.2.

6.3. Гидовая РНК Cas12a

[0074] В одном из аспектов настоящее изобретение относится к сконструированной молекуле гидовой РНК (гРНК) Cas12a, содержащей протоспейсерный домен, содержащий нацеливающую последовательность, и петлевой домен. Нацеливающая последовательность соответствует целевому домену в последовательности геномной ДНК, и целевой домен является смежным с протоспейсер-смежным мотивом (РАМ) белка Cas12a.

[0075] В некоторых аспектах гРНК Cas12a содержат нацеливающую последовательность, соответствующую целевому домену, включающему участок сплайсинга (схематически показан на фиг. 1) или расположенному близко к участку сплайсинга (схематически показан на фиг. 2).

[0076] Участок сплайсинга может являться, например, криптическим участком сплайсинга, активированным или встроенным в результате мутации в геномной ДНК. Сплайсинг молекул пре-мРНК в криптических участках сплайсинга может приводить к фенотипу заболевания, и снижение активности криптического участка сплайсинга посредством редактирования геномной ДНК с помощью гРНК Cas12a в комбинации с белком Cas12a может восстанавливать нормальный сплайсинг. Включение мутации в нацеливающей последовательности (например, где мутация находится на расстоянии 1-23 нуклеотида от последовательности РАМ Cas12a) может делать возможным аллель-специфическое расщепление геномной ДНК. В некоторых вариантах осуществления гРНК содержит нацеливающую последовательность, соответствующую целевому домену, содержащему мутацию, находящуюся на расстоянии от 1 до 20 нуклеотидов, от 1 до 15 нуклеотидов, от 1 до 10 нуклеотидов, от 1 до 5 нуклеотидов, от 5 до 15 нуклеотидов, от 10 до 20 нуклеотидов или от 15 до 23 нуклеотидов от последовательности РАМ.

[0077] Альтернативно, участок сплайсинга может являться каноническим участком сплайсинга. Снижение активности канонического участка сплайсинга посредством редактирования геномной ДНК с помощью гРНК Cas12a в комбинации с белком Cas12a можно использовать, например, для вызывания проскока экзона в гене, содержащем вредные мутации (например, мутацию, приводящую к встраиванию стоп-кодона или иначе влияющую на открытую рамку считывания). С помощью проскока экзона можно достигать продукции измененного, но, возможно, все равно функционального белка.

[0078] Геномная ДНК может подвергаться редактированию вблизи участка сплайсинга (например, таким образом, что активность участка сплайсинга снижают частично или полностью) с использованием гРНК Cas12a, сконструированной таким образом, что после встраивания гРНК и белка Cas12a в клетку, содержащую геномную последовательность, белок Cas12a расщепляет геномную ДНК через до 15 нуклеотидов от участка сплайсинга (например, до 10 нуклеотидов или 10-15 нуклеотидов от участка сплайсинга).

[0079] Когда белок Cas12a расщепляет геномную ДНК, это приводит к образованию ступенчатых разрывов. Например, белки AsCas12a и LbCas12a расщепляют

геномную ДНК после 19-го основания после последовательности РАМ на цепи, содержащей последовательности целевого домена, и после 23-го основания после последовательности РАМ на комплементарной цепи. Следует понимать, что в контексте выражения "белок Cas12a расщепляет геномную ДНК через до 15 нуклеотидов от участка сплайсинга, кодируемого геномной ДНК" и схожих фраз (например, перечисления различных количеств нуклеотидов), этот подсчет нуклеотидов следует осуществлять от липкого конца, ближайшего к участку сплайсинга. Кроме того, следует понимать, что выражение "белок Cas12a расщепляет геномную ДНК через до 15 нуклеотидов от участка сплайсинга, кодируемого геномной ДНК" и схожие фразы включают варианты осуществления, в которых белок Cas12a расщепляет геномную ДНК по участку сплайсинга. Таким образом, выражение "белок Cas12a расщепляет геномную ДНК через до 15 нуклеотидов от участка сплайсинга, кодируемого геномной ДНК" включает варианты осуществления, в которых белок Cas12a расщепляет геномную ДНК по участку сплайсинга, через 1 нуклеотид от участка сплайсинга, через 2 нуклеотида от участка сплайсинга, через 3 нуклеотида от участка сплайсинга, через 4 нуклеотида от участка сплайсинга, через 5 нуклеотидов от участка сплайсинга, через 6 нуклеотидов от участка сплайсинга, через 7 нуклеотидов от участка сплайсинга, через 8 нуклеотидов от участка сплайсинга, через 9 нуклеотидов от участка сплайсинга, через 10 нуклеотидов от участка сплайсинга, через 11 нуклеотидов от участка сплайсинга, через 12 нуклеотидов от участка сплайсинга, через 13 нуклеотидов от участка сплайсинга, через 14 нуклеотидов от участка сплайсинга или через 15 нуклеотидов от участка сплайсинга.

[0080] Зная о последовательности РАМ, распознаваемой конкретным белком Cas12a (например, TTTV в случае AsCas12a), о том, где расщепляет белок Cas12a (например, через 19 и 23 нуклеотидов после РАМ в случае AsCas12a), о положении участка сплайсинга относительно последовательности РАМ в геномной ДНК, можно выбирать нацеливающую последовательность таким образом, что после встраивания гРНК и белка Cas12a в клетку, содержащую геномную последовательность, белок Cas12a будет расщеплять геномную ДНК через до 15 нуклеотидов от участка сплайсинга. Например, при конструировании гРНК для использования с белком AsCas12a участок сплайсинга может находиться после 4-38 нуклеотида после последовательности TTTV.

[0081] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к гРНК Cas12a, нацеливающая последовательность которых соответствует целевому домену, смежному с последовательностью РАМ, находящейся в пределах 40 нуклеотидов (например, от 4 до 38 нуклеотидов, от 5 до 35 нуклеотидов, от 5 до 25 нуклеотидов, от 5 до 15 нуклеотидов, от 5 до 10 нуклеотидов, от 10 до 35 нуклеотидов, от 10 до 25 нуклеотидов, от 10 до 20 нуклеотидов, от 10 до 15 нуклеотидов, от 15 до 35 нуклеотидов, от 15 до 25 нуклеотидов, от 20 до 35 нуклеотидов, от 20 до 30 нуклеотидов или от 25 до 35 нуклеотидов) от участка сплайсинга.

[0082] гРНК Cas12a по изобретению, как правило, имеют длину 40-44 нуклеотида (например, 40 нуклеотидов, 41 нуклеотид, 42 нуклеотида или 43 нуклеотида), но также

предусмотрены гРНК другой длины. Например, удлинение 5'-конца гРНК (например, как описано в Park et al., 2018, Nature Communications, 9:3313) можно использовать для повышения эффективности редактирования генома. Кроме того, гРНК Cas12a по изобретению, необязательно, можно химически модифицировать, что можно использовать, например, для повышения стабильности гРНК в сыворотке (см., например, Park et al., 2018, Nature Communications, 9:3313).

6.3.1. Протоспейсерные домены

[0083] гРНК по изобретению содержат протоспейсерный домен, содержащий нацеливающую последовательность. В некоторых вариантах осуществления последовательность протоспейсерного домена и нацеливающая последовательность являются одинаковыми. В других вариантах осуществления последовательность протоспейсерного домена и нацеливающая последовательность отличаются (например, если протоспейсерный домен содержит один или более нуклеотидов в 5'- и/или 3'-направлении относительно нацеливающей последовательности).

[0084] В некоторых вариантах осуществления протоспейсерный домен может иметь длину от 17 до 26 нуклеотидов (например, 17-20 нуклеотидов, 17-23 нуклеотида, 20-26 нуклеотидов или 20-24 нуклеотида). В некоторых вариантах осуществления протоспейсерный домен имеет длину 17 нуклеотидов. В других вариантах осуществления протоспейсерный домен имеет длину 18 нуклеотидов. В других вариантах осуществления протоспейсерный домен имеет длину 19 нуклеотиды. В других вариантах осуществления протоспейсерный домен имеет длину 20 нуклеотидов. В других вариантах осуществления протоспейсерный домен имеет длину 21 нуклеотид. В других вариантах осуществления протоспейсерный домен имеет длину 22 нуклеотида. В других вариантах осуществления протоспейсерный домен имеет длину 23 нуклеотида. В других вариантах осуществления протоспейсерный домен имеет длину 24 нуклеотида. В других вариантах осуществления протоспейсерный домен имеет длину 25 нуклеотидов. В других вариантах осуществления протоспейсерный домен имеет длину 26 нуклеотидов.

[0085] Нацеливающая последовательность соответствует целевому домену в последовательности геномной ДНК. Предпочтительно, отсутствуют ошибочные спаривания между нацеливающей последовательностью и комплементом целевого домена, хотя предусмотрены варианты осуществления с небольшим количеством ошибочных спариваний (например, 1 или 2). В некоторых вариантах осуществления нацеливающая последовательность может иметь длину от 17 до 26 нуклеотидов (например, 20-24 нуклеотида). В некоторых вариантах осуществления нацеливающая последовательность имеет длину 17 нуклеотидов. В других вариантах осуществления нацеливающая последовательность имеет длину 18 нуклеотидов. В других вариантах осуществления нацеливающая последовательность имеет длину 19 нуклеотидов. В других вариантах осуществления нацеливающая последовательность имеет длину 20 нуклеотидов. В других вариантах осуществления нацеливающая последовательность имеет длину 21 нуклеотид. В других вариантах осуществления нацеливающая

последовательность имеет длину 22 нуклеотида. В других вариантах осуществления нацеливающая последовательность имеет длину 23 нуклеотида. В других вариантах осуществления нацеливающая последовательность имеет длину 24 нуклеотида. В других вариантах осуществления нацеливающая последовательность имеет длину 25 нуклеотидов. В других вариантах осуществления нацеливающая последовательность имеет длину 26 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления последовательность протоспейсерного домена и нацеливающая последовательность являются одинаковыми.

[0086] Нацеливающая последовательность, необязательно, может соответствовать целевому домену, содержащему мутацию (например, однонуклеотидный полиморфизм). В некоторых вариантах осуществления гРНК Cas12a по изобретению содержит нацеливающую последовательность, соответствующую целевому домену, содержащему мутацию от 1 до 23 нуклеотидов в 3'-направлении от последовательности PAM Cas12a (например, от 1 до 20 нуклеотидов, от 1 до 15 нуклеотидов, от 1 до 10 нуклеотидов, от 1 до 5 нуклеотидов, от 5 до 15 нуклеотидов, от 10 до 20 нуклеотидов или от 15 до 23 нуклеотида от последовательности PAM Cas12a). гРНК Cas12a, содержащие нацеливающую последовательность, соответствующую целевому домену, содержащему мутацию, могут иметь аллельную специфичность таким образом, что комплекс Cas12a/гРНК Cas12a может преимущественно расщеплять мутантный аллель по сравнению с аллелем дикого типа, что, таким образом, приводит к редактированию генома только по мутантному аллелю.

[0087] Не желая быть связанными какой-либо теорией, полагают, что делеция, коррекция или другое изменение мутации во время репарации геномной ДНК после расщепления может не снижать активность участка сплайсинга. Таким образом, гРНК по изобретению могут являться эффективными в снижении активности участка сплайсинга, даже если встраивание гРНК и белка Cas12a в клетку, содержащую геномную последовательность, не приводит к делеции, коррекции или другому изменению мутации. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления после встраивания гРНК по изобретению и белка Cas12a в популяцию клеток, содержащих геномную последовательность, расщепление геномной ДНК белком Cas12a может не приводить к делеции, коррекции или иному изменению мутации во всех из образующихся инсерционно-делеционных мутаций. Например, мутация может подвергаться делеции, коррекции или иному изменению в 50% или менее (например, от 10% до 50%, от 10% до 40%, от 10% до 30% или от 10% до 20%) образующихся инсерционно-делеционных мутаций.

6.3.2. Участки сплайсинга

6.3.2.1. Криптические участки сплайсинга

[0088] Криптический участок сплайсинга является неканоническим участком сплайсинга, обладающим потенциалом взаимодействия со сплайсосомой. Мутации (например, мутации участка сплайсинга) в ДНК, кодирующей мРНК, или ошибки во время транскрипции могут приводить к образованию или активировать криптический

участок сплайсинга в части транскрипта, которая, как правило, не подвергается сплайсингу. Образование или активация криптического участка сплайсинга может приводить к аномальному сплайсингу и, в некоторых случаях, фенотипу заболевания. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления гРНК Cas12a по изобретению нацелены на криптический участок сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления целевой домен включает криптический участок сплайсинга. В других вариантах осуществления целевой домен не включает криптический участок сплайсинга. Криптический участок сплайсинга может являться криптическим 5'-участком сплайсинга или криптическим 3'-участком сплайсинга.

[0089] В некоторых вариантах осуществления криптический участок сплайсинга является участком, образованным или активированным в результате мутации в последовательности геномной ДНК. Мутация может являться, например, однонуклеотидным полиморфизмом, инсерцией (например, от 1 до 10 нуклеотидов или от 1 до 100 нуклеотидов) или делецией (например, от 1 до 10 нуклеотидов или от 1 до 100 нуклеотидов). В некоторых вариантах осуществления мутация является однонуклеотидным полиморфизмом.

[0090] После встраивания гРНК Cas12a и белка Cas12a в клетку, содержащую последовательность геномной ДНК, кодирующую криптический участок сплайсинга, геномную ДНК можно редактировать таким образом, что восстанавливается нормальный сплайсинг. Например, если гРНК Cas12a встраивают с белком Cas12a в популяцию клеток, имеющих последовательность геномной ДНК (например, *in vitro*), нормальный сплайсинг можно восстанавливать в части клеток, например, по меньшей мере 10% клеток (например, от 10% до 20% клеток), по меньшей мере 20% клеток (например, от 20% до 30% клеток), по меньшей мере 30% клеток (например, от 30% до 40% клеток), по меньшей мере 40% клеток (например, от 40% до 50% клеток), по меньшей мере 50% клеток (например, от 50% до 60% клеток), по меньшей мере 60% клеток (например, от 60% до 70% клеток) или по меньшей мере 70% клеток (например, от 70% до 80% клеток или от 70% до 90% клеток). Не желая быть связанными какой-либо теорией, полагают, что восстановление нормального сплайсинга даже в меньшинстве клеток может быть предпочтительным для лечения некоторых генетических заболеваний, таких как CF, семейная гиперхолестеринемия типа 2, спинальная мышечная атрофия, гемофилия и мышечная дистрофия Дюшена. Например, полагают, что в случае индивидуума с CF восстановление нормального сплайсинга всего в 10% клеток легких индивидуума будет достаточным для облегчения симптомов у пациента.

6.3.2.1.1. Криптические 3'-участки сплайсинга

[0091] Криптический участок сплайсинга, являющийся мишенью гРНК по изобретению, может являться криптическим 3'-участком сплайсинга, например, участком сплайсинга, образующимся или активированным в результате мутации. Криптические 3'-участки сплайсинга могут находиться, например, выше канонического 3'-участка сплайсинга или выше криптического 5'-участка сплайсинга.

[0092] Если криптоический 3'-участок сплайсинга находится выше канонического 3'-участка сплайсинга, сплайсинг по криптоическому 3'-участку сплайсинга, а не каноническому 3'-участку сплайсинга приводит к элонгированному экзону (схематически показанному на фиг. 3А). Нормальный сплайсинг можно восстанавливать посредством снижения активности криптоического 3'-участка сплайсинга.

[0093] Если криптоический 3'-участок сплайсинга находится выше криптоического 5'-участка сплайсинга, сплайсинг по криптоическому 3'-участку сплайсинга и криптоическому 5'-участку сплайсинга приводит к включению псевдоэкзона в зрелую мРНК (схематически показано на фиг. 3В). Нормальный сплайсинг можно восстанавливать посредством снижения активности криптоического 3'-участка сплайсинга таким образом, что псевдоэкзон проскакивается во время сплайсинга пре-мРНК.

[0094] Снижения активности криптоического 3'-участка сплайсинга можно достигать, например, посредством разрушения участка сплайсинга, разрушения участка ветвления выше криптоического 3'-участка сплайсинга (обозначаемого в настоящем описании как "участок ветвления криптоического 3'-участка сплайсинга"), или разрушения полипиримидинового тракта выше криптоического 3'-участка сплайсинга (обозначаемого в настоящем описании как "полипиримидиновый тракт криптоического 3'-участка сплайсинга"). Таким образом, снижения активности криптоического 3'-участка сплайсинга можно достигать с использованием гРНК Cas12a, нацеленной, например, на участок сплайсинга, участок ветвления или полипиримидиновый тракт.

6.3.2.1.2. Криптоические 5'-участки сплайсинга

[0095] Криптоический участок сплайсинга, являющийся мишенью гРНК по изобретению, может являться криптоическим 5'-участком сплайсинга, например, образующимся или активированным в результате мутации. Криптоические 5'-участки сплайсинга могут находиться, например, ниже криптоического 3'-участка сплайсинга или ниже канонического 5'-участка сплайсинга.

[0096] Если криптоический 5'-участок сплайсинга находится ниже криптоического 3'-участка сплайсинга, сплайсинг по криптоическому 3'-участку сплайсинга и криптоическому 5'-участку сплайсинга приводит к включению псевдоэкзона в зрелую мРНК (схематически показано на фиг. 5А). Если криптоический 5'-участок сплайсинга находится ниже канонического 5'-участка сплайсинга, сплайсинг по криптоическому 5'-участку сплайсинга, а не каноническому 5'-участку сплайсинга, приводит к образованию экзона длиннее нормального в зрелой мРНК (схематически показано на фиг. 5В). В обоих случаях нормальный сплайсинг можно восстанавливать посредством снижения активности криптоического 5'-участка сплайсинга.

[0097] Снижения активности криптоического 5'-участка сплайсинга можно достигать, например, посредством разрушения криптоического 5'-участка сплайсинга или окружающей последовательности (например, от трех нуклеотидов в 5'-направлении от криптоического участка сплайсинга до восьми нуклеотидов в 3'-направлении от криптоического 5'-участка сплайсинга).

6.3.2.2. Канонические участки сплайсинга

[0098] гРНК Cas12a по изобретению может быть нацелена на канонический участок сплайсинга. Целевой канонический участок сплайсинга может являться каноническим 3'-участком сплайсинга или каноническим 5'-участком сплайсинга.

[0099] Снижение активности канонического 3'-участка сплайсинга или канонического 5'-участка сплайсинга можно использовать для вызывания проскока экзона. Таргетинг канонического 3'-участка сплайсинга схематически показан на фиг. 4, а таргетинг канонического 5'-участка сплайсинга схематически показан на фиг. 6. Проскок экзона можно использовать, например, для проскока экзона, содержащего вредную мутацию. Проскок экзона можно использовать, например, для восстановления рамки считывания в молекуле мРНК, например, пре-мРНК DMD, содержащей мутацию в экзоне, вызывающую преждевременное укорочение белка дистрофина.

[0100] Снижения активности канонического 3'-участка сплайсинга можно достигать, например, посредством разрушения участка сплайсинга, разрушения участка ветвления выше канонического 3'-участка сплайсинга (обозначаемого в настоящем описании как "участок ветвления канонического 3'-участка сплайсинга"), или разрушения полипиримидинового тракта выше канонического 3'-участка сплайсинга (обозначаемого в настоящем описании как "полипиримидиновый тракт канонического 3'-участка сплайсинга"). Снижения активности канонического 5'-участка сплайсинга можно достигать, например, посредством разрушения канонического 5'-участка сплайсинга или окружающей последовательности (например, от трех нуклеотидов в 5'-направлении от канонического участка сплайсинга до восьми нуклеотидов в 3'-направлении от канонического 5'-участка сплайсинга).

6.3.3. Петлевые домены

[0101] Cas12a является эндонуклеазой, направленной одиночной гРНК, где гРНК содержит один петлевой домен, содержащий последовательность прямого повтора, например, петлевой домен длиной 20 нуклеотидов. Белки Cas12a распознают гРНК Cas12a с помощью комбинации структурных и последовательность-специфических признаков петлевого домена. Петлевые домены гРНК по изобретению, как правило, имеют длину по меньшей мере 16 нуклеотидов, например, 16-20 нуклеотидов, 16-18 нуклеотидов, 18-20 нуклеотидов, 16 нуклеотидов, 17 нуклеотидов, 18 нуклеотидов, 19 нуклеотидов или 20 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления петлевой домен имеет длину 20 нуклеотидов. Как правило, петлевой домен будет находиться в 5'-направлении протоспейсерного домена гРНК Cas12a.

[0102] Петлевые домены могут содержать последовательность стебель-петля, ассоциированную с белком Cas12a дикого типа или его вариантом. См., например, Zetsche, et. al, 2015, Cell, 163:759-771, включенную в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме, где описаны последовательности стебель-петля различных петлевых доменов, способных связываться с белками Cas12a. Примеры петлевых доменов включают петлевые домены, содержащие нуклеотидную последовательность, выбранную

из UCUACUGUUGUAGA (SEQ ID NO: 1), UCUACUGUUGUAGAU (SEQ ID NO: 2), UCUGCUGUUGCAGA (SEQ ID NO: 3), UCUGCUGUUGCAGAU (SEQ ID NO: 4), UCCACUGUUGUGGA (SEQ ID NO: 5), UCCACUGUUGUGGAU (SEQ ID NO: 6), CCUACUGUUGUAGG (SEQ ID NO: 7), CCUACUGUUGUAGGU (SEQ ID NO: 8), UCUACUAUUGUAGA (SEQ ID NO: 9), UCUACUAUUGUAGAU (SEQ ID NO: 10), UCUACUGCUGUAGAU (SEQ ID NO: 11), UCUACUGCUGUAGAUU (SEQ ID NO: 12), UCUACUUUCUAGAU (SEQ ID NO: 13), UCUACUUUCUAGAUU (SEQ ID NO: 14), UCUACUUUGUAGA (SEQ ID NO: 15), UCUACUUUGUAGAU (SEQ ID NO: 16), UCUACUUGUAGA (SEQ ID NO: 17) и UCUACUUGUAGAU (SEQ ID NO: 18).

[0103] В некоторых вариантах осуществления петлевой домен содержит или состоит из нуклеотидной последовательности, выбранной из UAAUUUCUACUGUUGUAGAU (SEQ ID NO: 19), AGAAAUGCAUGGUUCUCAUGC (SEQ ID NO: 20), AAAAUUACCUAGAAUUGGU (SEQ ID NO: 21), GGAUUUCUACUUUUGUAGAU (SEQ ID NO: 22), AAAUUUCUACUUUUGUAGAU (SEQ ID NO: 23), CGCGCCACGCGGGGCGCGAC (SEQ ID NO: 24), UAAUUUCUACUCUUGUAGAU (SEQ ID NO: 25), GAAUUUCUACUAUUGUAGAU (SEQ ID NO: 26), GAAUCUCUACUCUUUGUAGAU (SEQ ID NO: 27), UAAUUUCUACUUUGUAGAU (SEQ ID NO: 28), AAAUUUCUACUGUUUGUAGAU (SEQ ID NO: 29), GAAUUUCUACUUUUGUAGAU (SEQ ID NO: 30), UAAUUUCUACUAAGUGUAGAU (SEQ ID NO: 31), UAAUUUCUACUAUUGUAGAU (SEQ ID NO: 32), UAAUUUCUACUUCGGUAGAU (SEQ ID NO: 33) и UAAUUUCUACUAUUGUAGAU (SEQ ID NO: 32). В некоторых вариантах осуществления петлевой домен содержит или состоит из UAAUUUCUACUCUUGUAGAU (SEQ ID NO: 25), являющейся последовательностью петлевого домена, ассоциированной с AsCas12a. В некоторых вариантах осуществления петлевой домен содержит или состоит из UAAUUUCUACUAAGUGUAGAU (SEQ ID NO: 31), являющейся последовательностью петлевого домена, ассоциированной с LbCas12a.

[0104] Дополнительные последовательности стебель-петля, ассоциированные с белками Cas12a и которые можно использовать в петлевых доменах гРНК Cas12a по изобретению, описаны в Feng, et. al, 2019, Genome Biology, 20:15, включенной в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. Примеры нуклеотидных последовательностей, описанных в Feng, et. al, 2019, Genome Biology, 20:15 и которые можно включать в петлевых доменах гРНК Cas12a по изобретению включают AUUUCUACUAGUGUAGAU (SEQ ID NO: 34), AUUUCUACUGUGUGUAGA (SEQ ID NO: 35), AUUUCUACUAUUGUAGAU (SEQ ID NO: 36) и AUUUCUACUUUGGUAGAU (SEQ ID NO: 37).

[0105] Также можно использовать петлевые домены, имеющие нуклеотидную последовательность, варьирующуюся относительно описанных выше нуклеотидных последовательностей. Например, можно использовать мутации в последовательности

петлевого домена, сохраняющие дуплекс РНК петлевого домена. См., например, Zetsche, et. al, 2015, Cell, 163:759-771.

6.3.4. Примеры целевых доменов и гРНК Cas12a

[0106] гРНК Cas12a, содержащие нацеливающие последовательности, соответствующие целевым доменам в различных генах, можно конструировать, как представлено в настоящем описании. Например, целевой домен может находиться в варианте гена CFTR, варианте гена DMD, варианте гена HBB, варианте гена FGB, варианте гена SOD1, варианте гена QDPR, варианте гена GLA, варианте гена LDLR, варианте гена BRIP1, варианте гена F9, варианте гена CEP290, варианте гена COL2A1, варианте гена USH2A или варианте гена GAA. Описанные ниже целевые домены можно использовать, например, для конструирования гРНК Cas12a по изобретению (например, гРНК Cas12a, содержащей нацеливающую последовательность, соответствующую описанному ниже целевому домену, и петлевой домен, как описано в разделе 6.3.3). Такие гРНК Cas12a можно использовать, например, вместе с соответствующим белком Cas12a для восстановления нормального сплайсинга мРНК. Дополнительные подробности, касающиеся специфических мутаций, описанных в этом разделе, можно найти в базе данных DBASS (www.dbass.org.uk).

[0107] В некоторых вариантах осуществления целевой домен находится в гене CFTR, например, гене CFTR, содержащем мутацию 3272-26A>G, мутацию 3849+10kbC>T, мутацию IVS11+194A>G или мутацию IVS19+11505C>G. Мутация 3272-26A>G вызывает аномальный сплайсинг в криптическом 3'-участке сплайсинга, в то время как каждая из мутаций 3849+10kbC>T, мутации IVS11+194A>G и мутации IVS19+11505C>G вызывает аномальный сплайсинг по криптическому 5'-участку сплайсинга. Каждая из этих мутаций ассоциирована с кистозным фиброзом.

[0108] Пример гРНК Cas12a для редактирования гена CFTR, содержащего мутацию 3272-26A>G, может содержать нацеливающую последовательность, соответствующую целевому домену, содержащему или состоящему из последовательности CATAGAAAACACTGCAAATAACA (SEQ ID NO: 38).

[0109] Пример гРНК Cas12a для редактирования гена CFTR, содержащего мутацию 3849+10kbC>T, может содержать нацеливающую последовательность, соответствующую целевому домену, содержащему или состоящему из последовательности AGGGTGTCTTACTCACCATTTTA (SEQ ID NO: 39).

[0110] Пример гРНК Cas12a для редактирования гена CFTR, содержащего мутацию IVS11+194A>G, может содержать нацеливающую последовательность, соответствующую целевому домену, содержащему или состоящему из последовательности TACTTGAGATGTAAGTAAGGTТА (SEQ ID NO: 40). Другой пример гРНК Cas12a для редактирования гена CFTR, содержащего мутацию IVS11+194A>G, может содержать нацеливающую последовательность, соответствующую целевому домену, содержащему или состоящему из последовательности ATAGTAACCTTACTTACATCTCA (SEQ ID NO: 41).

[0111] Пример гРНК Cas12a для редактирования гена CFTR, содержащего мутацию IVS19+11505C>G, может содержать нацеливающую последовательность, соответствующую целевому домену, содержащему или состоящему из последовательности AAATTCCATCTTACCAATTCTAA (SEQ ID NO: 42). Другой пример гРНК Cas12a для редактирования гена CFTR, содержащего мутацию IVS19+11505C>G, может содержать нацеливающую последовательность, соответствующую целевому домену, содержащему или состоящему из последовательности AACGTTAAAATTCCATCTTACCA (SEQ ID NO: 43).

[0112] В других вариантах осуществления целевой домен находится в гене DMD, например, гене DMD, содержащем мутацию IVS9+46806C>T, мутацию IVS62+62296A>G, мутацию IVS1+36947G>A, мутацию IVS1+36846G>A, мутацию IVS2+5591T>A или мутацию IVS8-15A>G. Каждая из мутаций IVS1+36947G>A, мутации IVS1+36846G>A, мутации IVS2+5591T>A и мутации IVS8-15A>G вызывает аномальный сплайсинг по криптическому 3'-участку сплайсинга, в то время как каждая из мутаций IVS9+46806C>T и мутации IVS62+62296A>G вызывает аномальный сплайсинг по криптическому 5'-участку сплайсинга. Каждая из этих мутаций ассоциирована с мышечной дистрофией.

[0113] Пример гРНК Cas12a для редактирования гена DMD, содержащего мутацию IVS9+46806C>T, может содержать нацеливающую последовательность, соответствующую целевому домену, содержащему или состоящему из последовательности TGACCTTTGGTAAGTCATCTAAT (SEQ ID NO: 44). Другой пример гРНК Cas12a для редактирования гена DMD, содержащего мутацию IVS9+46806C>T, может содержать нацеливающую последовательность, соответствующую целевому домену, содержащему или состоящему из последовательности CCTTTGTGACCTTTGGTAAGTCA (SEQ ID NO: 45).

[0114] Пример гРНК Cas12a для редактирования гена DMD, содержащего мутацию IVS62+62296A>G, может содержать нацеливающую последовательность, соответствующую целевому домену, содержащему или состоящему из последовательности TTGATCACATAACAAGGTCAGTT (SEQ ID NO: 46). Другой пример гРНК Cas12a для редактирования гена DMD, содержащего мутацию IVS62+62296A>G, может содержать нацеливающую последовательность, соответствующую целевому домену, содержащему или состоящему из последовательности ATCACATAACAAGGTCAGTTTAT (SEQ ID NO: 47). Другой пример гРНК Cas12a для редактирования гена DMD, содержащего мутацию IVS62+62296A>G, может содержать нацеливающую последовательность, соответствующую целевому домену, содержащему или состоящему из последовательности AGTTATGATAAACTGACCTTGTT (SEQ ID NO: 48). Другой пример гРНК Cas12a для редактирования гена DMD, содержащего мутацию IVS62+62296A>G, может содержать нацеливающую последовательность, соответствующую целевому домену, содержащему или состоящему из последовательности TGATAAACTGACCTTGTTATGTG (SEQ ID NO: 49).

[0115] Пример гРНК Cas12a для редактирования гена DMD, содержащего мутацию IVS1+36947G>A, может содержать нацеливающую последовательность, соответствующую целевому домену, содержащему или состоящему из последовательности TCTTCCTTGGTTTTGCAGCTTCT (SEQ ID NO: 50). Другой пример гРНК Cas12a для редактирования гена DMD, содержащего мутацию IVS1+36947G>A, может содержать нацеливающую последовательность, соответствующую целевому домену, содержащему или состоящему из последовательности TTGGTTTTGCAGCTTCTCGAGTT (SEQ ID NO: 51). Другой пример гРНК Cas12a для редактирования гена DMD, содержащего мутацию IVS1+36947G>A, может содержать нацеливающую последовательность, соответствующую целевому домену, содержащему или состоящему из последовательности CTCTTTCTCTTCCTTGGTTTTGC (SEQ ID NO: 52).

[0116] Пример гРНК Cas12a для редактирования гена DMD, содержащего мутацию IVS2+5591T>A, может содержать нацеливающую последовательность, соответствующую целевому домену, содержащему или состоящему из последовательности CTTGTTTCTCTACATAGGTTGAA (SEQ ID NO: 53).

[0117] Пример гРНК Cas12a для редактирования гена DMD, содержащего мутацию IVS8-15A>G, может содержать нацеливающую последовательность, соответствующую целевому домену, содержащему или состоящему из последовательности TCCTCTCTATCCACCTCCCCCAG (SEQ ID NO: 54). Другой пример гРНК Cas12a для редактирования гена DMD, содержащего мутацию IVS8-15A>G, может содержать нацеливающую последовательность, соответствующую целевому домену, содержащему или состоящему из последовательности CCTCCCCCAGACCCTTCTCTGCA (SEQ ID NO: 55). Другой пример гРНК Cas12a для редактирования гена DMD, содержащего мутацию IVS8-15A>G, может содержать нацеливающую последовательность, соответствующую целевому домену, содержащему или состоящему из последовательности CCCCTCCTCTCTATCCACTCCCC (SEQ ID NO: 56). Другой пример гРНК Cas12a для редактирования гена DMD, содержащего мутацию IVS8-15A>G, может содержать нацеливающую последовательность, соответствующую целевому домену, содержащему или состоящему из последовательности CCTCCTCTCTATCCACCTCCCC (SEQ ID NO: 57).

[0118] Пример гРНК Cas12a для редактирования с целью вызывания проскока экзона 51 в гене DMD, содержащем мутацию в экзоне 50 DMD, может содержать нацеливающую последовательность, соответствующую целевому домену, содержащему или состоящему из последовательности CAAAAACCCAAAATATTTTAGCT (SEQ ID NO: 58). Другой пример гРНК Cas12a для вызывания проскока экзона 51 гена DMD, содержащего мутацию в экзоне 50 DMD, может содержать нацеливающую последовательность, соответствующую целевому домену, содержащему или состоящему из последовательности CTTTTTGCAAAAACCCAAAATAT (SEQ ID NO: 59). Другой пример гРНК Cas12a для вызывания проскока экзона 51 гена DMD, содержащего мутацию

в экзоне 50 DMD, может содержать нацеливающую последовательность, соответствующую целевому домену, содержащему или состоящему из последовательности TTTTGGCAAAAACCCAAAATATT (SEQ ID NO: 60). Другой пример гРНК Cas12a для вызывания проскока экзона 51 гена DMD, содержащего мутацию в экзоне 50 DMD, может содержать нацеливающую последовательность, соответствующую целевому домену, содержащему или состоящему из последовательности TGTCACCAGAGTAACAGTCTGAG (SEQ ID NO: 61). Другой пример гРНК Cas12a для вызывания проскока экзона 51 гена DMD, содержащего мутацию в экзоне 50 DMD, может содержать нацеливающую последовательность, соответствующую целевому домену, содержащему или состоящему из последовательности GCTCCTACTCAGACTGTTACTCT (SEQ ID NO: 62).

[0119] В других вариантах осуществления целевой домен находится в гене HBB, например, гене HBB, содержащем мутацию IVS2+645C>T, мутацию IVS2+705T>G или мутацию IVS2+745C>G. Каждая из этих мутаций вызывает аномальный сплайсинг по криптическому 5'-участку сплайсинга и ассоциирована с бета-талассемией.

[0120] Пример гРНК Cas12a для редактирования гена HBB, содержащего мутацию IVS2+645C>T, может содержать нацеливающую последовательность, соответствующую целевому домену, содержащему или состоящему из последовательности TGGGTAAAGGTAATAGCAATATC (SEQ ID NO: 63). Другой пример гРНК Cas12a для редактирования гена HBB, содержащего мутацию IVS2+645C>T, может содержать нацеливающую последовательность, соответствующую целевому домену, содержащему или состоящему из последовательности TATGCAGAGATATTGCTATTACC (SEQ ID NO: 64). Другой пример гРНК Cas12a для редактирования гена HBB, содержащего мутацию IVS2+645C>T, может содержать нацеливающую последовательность, соответствующую целевому домену, содержащему или состоящему из последовательности СТАТТАССТТААСССAGAAATTA (SEQ ID NO: 65). Другой пример гРНК Cas12a для редактирования гена HBB, содержащего мутацию IVS2+645C>T, может содержать нацеливающую последовательность, соответствующую целевому домену, содержащему или состоящему из последовательности CAGAGATATTGCTATTACСТТАА (SEQ ID NO: 66).

[0121] Пример гРНК Cas12a для редактирования гена HBB, содержащего мутацию IVS2+705T>G, может содержать нацеливающую последовательность, соответствующую целевому домену, содержащему или состоящему из последовательности TGCATATAAATTGTAACCTGAGGT (SEQ ID NO: 67). Другой пример гРНК Cas12a для редактирования гена HBB, содержащего мутацию IVS2+705T>G, может содержать нацеливающую последовательность, соответствующую целевому домену, содержащему или состоящему из последовательности AATTGTAACCTGAGGTAAGAGGTT (SEQ ID NO: 68). Другой пример гРНК Cas12a для редактирования гена HBB, содержащего мутацию IVS2+705T>G, может содержать нацеливающую последовательность, соответствующую целевому домену, содержащему или состоящему из последовательности

AAACCTCTTACCTCAGTTACAAT (SEQ ID NO: 69). Другой пример гРНК Cas12a для редактирования гена HBB, содержащего мутацию IVS2+705T>G, может содержать нацеливающую последовательность, соответствующую целевому домену, содержащему или состоящему из последовательности GCAATATGAAACCTCTTACCTCA (SEQ ID NO: 70).

[0122] Пример гРНК Cas12a для редактирования гена HBB, содержащего мутацию IVS2+745C>G, может содержать нацеливающую последовательность, соответствующую целевому домену, содержащему или состоящему из последовательности СТААТАGСAGСТАСААТССAGGT (SEQ ID NO: 71).

[0123] В других вариантах осуществления целевой домен находится в гене FGB, например, гене FGB, содержащем мутацию IVS6+13C>T. Эта мутация вызывает аномальный сплайсинг по криптическому 5'-участку сплайсинга и ассоциирована с афибриногенемией. Пример гРНК Cas12a для редактирования гена FGB, содержащего мутацию IVS6+13C>T, может содержать нацеливающую последовательность, соответствующую целевому домену, содержащему или состоящему из последовательности TTTTGCATACCTGTTCGTTACCT (SEQ ID NO: 72). Другой пример гРНК Cas12a для редактирования гена FGB, содержащего мутацию IVS6+13C>T, может содержать нацеливающую последовательность, соответствующую целевому домену, содержащему или состоящему из последовательности AAATAGAATGATTTTATTTTGCA (SEQ ID NO: 73).

[0124] В других вариантах осуществления целевой домен находится в гене SOD1, например, гене SOD1, содержащем мутацию IVS4+792C>G. Эта мутация вызывает аномальный сплайсинг по криптическому 5'-участку сплайсинга и ассоциирована с боковым амиотрофическим склерозом. Пример гРНК Cas12a для редактирования гена SOD1, содержащего мутацию IVS4+792C>G, может содержать нацеливающую последовательность, соответствующую целевому домену, содержащему или состоящему из последовательности TGGTAAGTTACACTAACCTTAGT (SEQ ID NO: 74).

[0125] В других вариантах осуществления целевой домен находится в гене QDPR, например, гене QDPR, содержащем мутацию IVS3+2552A>G. Эта мутация вызывает аномальный сплайсинг по криптическому 5'-участку сплайсинга и ассоциирована с дефицитом дигидроптеридинредуктазы. Пример гРНК Cas12a для редактирования гена QDPR, содержащего мутацию IVS3+2552A>G,, может содержать нацеливающую последовательность, соответствующую целевому домену, содержащему или состоящему из последовательности TCATCTGTAAAATAAGAGTAAAA (SEQ ID NO: 75).

[0126] В других вариантах осуществления целевой домен находится в гене GLA, например, гене GLA, содержащем мутацию IVS4+919G>A. Эта мутация вызывает аномальный сплайсинг по криптическому 5'-участку сплайсинга и ассоциирована с болезнью Фабри. Пример гРНК Cas12a для редактирования гена GLA, содержащего мутацию IVS4+919G>A, может содержать нацеливающую последовательность,

соответствующую целевому домену, содержащему или состоящему из последовательности CCATGTCTCCCCACTAAAGTGTA (SEQ ID NO: 76).

[0127] В других вариантах осуществления целевой домен находится в гене LDLR, например, гене LDLR, содержащем мутацию IVS12+11C>G. Эта мутация вызывает аномальный сплайсинг по криптическому 5'-участку сплайсинга и ассоциирована с семейной гиперхолестеринемией. Пример гРНК Cas12a для редактирования гена LDLR, содержащего мутацию IVS12+11C>G, может содержать нацеливающую последовательность, соответствующую целевому домену, содержащему или состоящему из последовательности AGGTGTGGCTTAGGTACGAGATG (SEQ ID NO: 77).

[0128] В других вариантах осуществления целевой домен находится в гене BRIP1, например, гене BRIP1, содержащем мутацию IVS11+2767A>T. Эта мутация вызывает аномальный сплайсинг по криптическому 5'-участку сплайсинга и ассоциирована с анемией Фанкони. Пример гРНК Cas12a для редактирования гена BRIP1, содержащего мутацию IVS11+2767A>T, может содержать нацеливающую последовательность, соответствующую целевому домену, содержащему или состоящему из последовательности TAAAATTCTTACATACCTTTGAA (SEQ ID NO: 78).

[0129] В других вариантах осуществления целевой домен находится в гене F9, например, гене F9, содержащем мутацию IVS5+13A>G. Эта мутация вызывает аномальный сплайсинг по криптическому 5'-участку сплайсинга и ассоциирована с гемофилией В. Пример гРНК Cas12a для редактирования гена F9, содержащего мутацию IVS5+13A>G, может содержать нацеливающую последовательность, соответствующую целевому домену, содержащему или состоящему из последовательности AAAAATCTTACTCAGATTATGAC (SEQ ID NO: 79). Другой пример гРНК Cas12a для редактирования гена F9, содержащего мутацию IVS5+13A>G, может содержать нацеливающую последовательность, соответствующую целевому домену, содержащему или состоящему из последовательности TTAAAAAATCTTACTCAGATTA (SEQ ID NO: 80).

[0130] В других вариантах осуществления целевой домен находится в гене CEP290, например, гена CEP290, содержащего мутацию IVS26+1655A>G. Эта мутация вызывает аномальный сплайсинг по криптическому 5'-участку сплайсинга и ассоциирована с врожденным амаврозом Лебера. Пример гРНК Cas12a для редактирования гена CEP290, содержащего мутацию IVS26+1655A>G, может содержать нацеливающую последовательность, соответствующую целевому домену, содержащему или состоящему из последовательности AGTTGTAATTGTGAGTATCTCAT (SEQ ID NO: 81).

[0131] В других вариантах осуществления целевой домен находится в гене COL2A1, например, гена COL2A1, содержащего мутацию IVS23+135G>A. Эта мутация вызывает аномальный сплайсинг по криптическому 3'-участку сплайсинга и ассоциирована с синдромом Стиклера. Пример гРНК Cas12a для редактирования гена COL2A1, содержащего мутацию IVS23+135G>A, может содержать нацеливающую

последовательность, соответствующую целевому домену, содержащему или состоящему из последовательности TCCATCCACACCGCAGGGAGAG (SEQ ID NO: 82).

[0132] В других вариантах осуществления целевой домен находится в гене USH2A, например, гене USH2A, содержащем мутацию IVS40-8C>G, мутацию IVS66+39C>T или мутацию с.7595-2144A>G. Мутация IVS40-8C>G вызывает аномальный сплайсинг по криптическому 3'-участку сплайсинга и ассоциирована с синдромом Ашера II типа. Мутация IVS66+39C>T ассоциирована с синдромом Ашера и вызывает аномальный сплайсинг по криптическому 5'-участку сплайсинга. Мутация с.7595-2144A>G является глубокой интронной мутацией, ассоциированной с синдромом Ашера II типа, и вызывает аномальный сплайсинг по криптическому 5'-участку сплайсинга и криптическому 3'-участку сплайсинга.

[0133] Пример гРНК Cas12a для редактирования гена USH2A, содержащего мутацию IVS40-8C>G, может содержать нацеливающую последовательность, соответствующую целевому домену, содержащему или состоящему из последовательности TGGATTTATTTTAGTTTACAGAA (SEQ ID NO: 83). Другой пример гРНК Cas12a для редактирования гена USH2A, содержащего мутацию IVS40-8C>G, может содержать нацеливающую последовательность, соответствующую целевому домену, содержащему или состоящему из последовательности TTTTAGTTTACAGAACCTGGACC (SEQ ID NO: 84). Другой пример гРНК Cas12a для редактирования гена USH2A, содержащего мутацию IVS40-8C>G, может содержать нацеливающую последовательность, соответствующую целевому домену, содержащему или состоящему из последовательности CAAGAGGTCTGACTTTCTGGATT (SEQ ID NO: 85). Другой пример гРНК Cas12a для редактирования гена USH2A, содержащего мутацию IVS40-8C>G, может содержать нацеливающую последовательность, соответствующую целевому домену, содержащему или состоящему из последовательности AGAGGTCTGACTTTCTGGATTTA (SEQ ID NO: 86). Другой пример гРНК Cas12a для редактирования гена USH2A, содержащего мутацию IVS40-8C>G, может содержать нацеливающую последовательность, соответствующую целевому домену, содержащему или состоящему из последовательности GGTCTGTAAACTAAAATAAATC (SEQ ID NO: 87).

[0134] Пример гРНК Cas12a для редактирования гена USH2A, содержащего мутацию IVS66+39C>T, может содержать нацеливающую последовательность, соответствующую целевому домену, содержащему или состоящему из последовательности TATGTCTGTACACATACCTTGTT (SEQ ID NO: 88). Другой пример гРНК Cas12a для редактирования гена USH2A, содержащего мутацию IVS66+39C>T, может содержать нацеливающую последовательность, соответствующую целевому домену, содержащему или состоящему из последовательности ATATGTCTGTACACATACCTTGTT (SEQ ID NO: 89).

[0135] Пример гРНК Cas12a для редактирования гена USH2A, содержащего мутацию с.7595-2144A>G, может содержать нацеливающую последовательность,

соответствующую целевому домену, содержащему или состоящему из последовательности ТТАААGATGATCTCTTACCTTGG (SEQ ID NO: 90). Другой пример гРНК Cas12a для редактирования гена USH2A, содержащего мутацию с.7595-2144A>G, может содержать нацеливающую последовательность, соответствующую целевому домену, содержащему или состоящему из последовательности CCAAGGTAAGAGATCATCTTTAA (SEQ ID NO: 91). Другой пример гРНК Cas12a для редактирования гена USH2A, содержащего мутацию с.7595-2144A>G, может содержать нацеливающую последовательность, соответствующую целевому домену, содержащему или состоящему из последовательности AAATTGAACACCTCTCCTTTCCC (SEQ ID NO: 92). Другой пример гРНК Cas12a для редактирования гена USH2A содержащего мутацию с.7595-2144A>G, может содержать нацеливающую последовательность, соответствующую целевому домену, содержащему или состоящему из последовательности AAGATGATCTCTTACCTTGGGAA (SEQ ID NO: 93). Последовательности, определенные в этом абзаце, можно использовать для редактирования гена USH2A вблизи криптоического 5'-участка сплайсинга.

[0136] Другой пример гРНК Cas12a для редактирования гена USH2A, содержащего мутацию с.7595-2144A>G, может содержать нацеливающую последовательность, соответствующую целевому домену, содержащему или состоящему из последовательности AGCTGCTTTCAGCTTCCTCTCCAG (SEQ ID NO: 94). Другой пример гРНК Cas12a для редактирования гена USH2A, содержащего мутацию с.7595-2144A>G, может содержать нацеливающую последовательность, соответствующую целевому домену, содержащему или состоящему из последовательности TGGAGAGGAAGCTGAAAGCAGCT (SEQ ID NO: 95). Другой пример гРНК Cas12a для редактирования гена USH2A, содержащего мутацию с.7595-2144A>G, может содержать нацеливающую последовательность, соответствующую целевому домену, содержащему или состоящему из последовательности TGTGATTCTGGAGAGGAAGCTGA (SEQ ID NO: 96). Другой пример гРНК Cas12a для редактирования гена USH2A, содержащего мутацию с.7595-2144A>G, может содержать нацеливающую последовательность, соответствующую целевому домену, содержащему или состоящему из последовательности ACTTGTGTGATTCTGGAGAGGAA (SEQ ID NO: 97). Последовательности, определенные в этом абзаце, можно использовать для редактирования гена USH2A вблизи криптоического 3'-участка сплайсинга.

[0137] В других вариантах осуществления целевой домен находится в гене GAA, например, гене GAA, содержащем мутацию IVS1-13T>G или мутацию IVS6-22T>G. Обе эти мутации вызывают аномальный сплайсинг по криптоическим 3'-участкам сплайсинга и ассоциированы с гликогенозом типа II.

[0138] Пример гРНК Cas12a для редактирования гена GAA, содержащего мутацию IVS1-13T>G, может содержать нацеливающую последовательность, соответствующую целевому домену, содержащему или состоящему из последовательности TGCTGAGCCCGCTTGCTTCTCCC (SEQ ID NO: 98). Другой пример гРНК Cas12a для

редактирования гена GAA, содержащего мутацию IVS1-13T>G, может содержать нацеливающую последовательность, соответствующую целевому домену, содержащему или состоящему из GCCTCCCTGCTGAGCCCGCTTGC (SEQ ID NO: 99). Другой пример гРНК Cas12a для редактирования гена GAA, содержащего мутацию IVS1-13T>G, может содержать нацеливающую последовательность, соответствующую целевому домену, содержащему или состоящему из TCCCGCCTCCCTGCTGAGCCCGC (SEQ ID NO: 100).

[0139] Пример гРНК Cas12a для редактирования гена GAA, содержащего мутацию IVS6-22T>G, может содержать нацеливающую последовательность, соответствующую целевому домену, содержащему или состоящему из последовательности TCCTCCCTCCCTCAGGAAGTCGG (SEQ ID NO: 101). Другой пример гРНК Cas12a для редактирования гена GAA, содержащего мутацию IVS6-22T>G, может содержать нацеливающую последовательность, соответствующую целевому домену, содержащему или состоящему из AAGGCTCCCTCCCTCCCTCA (SEQ ID NO: 102). Другой пример гРНК Cas12a для редактирования гена GAA, содержащего мутацию IVS6-22T>G, может содержать нацеливающую последовательность, соответствующую целевому домену, содержащему или состоящему из TCCCTCAGGAAGTCGGCGTTGGC (SEQ ID NO: 103).

6.4. Белки Cas12a

[0140] белки Cas12a выделены из ряда видов бактерий, например, *Alicyclobacillus acidoterrestris*, *Bacillus thermoamylovorans*, *Lachnospiraceae bacterium* (например, LbCas12a, референсная последовательность NCBI WP_051666128.1), *Acidaminococcus* sp. BV3L6 (например, AsCas12a, референсная последовательность NCBI WP_021736722.1), *Arcobacter butzleri* L348 (например, AbCas12a, GeneBank ID: JAIQ01000039.1), *Agathobacter rectalis* штамм 2789STDY5834884 (например, ArCas12a, GeneBank ID: CZAJ01000001.1), *Bacteroidetes oraltaxon* штамм 274 штамм F0058 (например, BoCas12a, GeneBank ID: NZ_GG774890.1), *Butyrivibrio* sp. NC3005 (например, BsCas12a, GeneBank ID: NZ_AUKC01000013.1), филум-кандидат WS6 бактерии GW2011_GWA2_37_6 US52_C0007 (например, C6Cas12a, GeneBank ID: LBTH01000007.1), *Helcococcus kunzii* ATCC 51366 (например, HkCas12a, GeneBank ID: JH601088.1/AGEI01000022.1), *Lachnospira pectinoschiza* штамм 2789STDY5834836 (например, LpCas12a, GeneBank ID: CZAK01000004.), *Oribacterium* sp. NK2B42 (например, OsCas12a, GeneBank ID: NZ_KE384190.1), *Pseudobutyrvibrio ruminis* CF1b (например, PrCas12a, GeneBank ID: NZ_KE384121.1), *Proteocatella sphenisci* DSM 23131 (например, PsCas12a, GeneBank ID: NZ_KE384028.1), *Pseudobutyrvibrio xylanivorans* штамм DSM 10317 (например, PxCas12a, GeneBank ID: FMWK01000002.1), *Sneathia amnii* штамм SN35 (например, SaCas12a, GeneBank ID: CP011280.1), *Francisella novicida* и *Leptotrichia shahii*. Белок Cas12a, используемый в системах, частицах и способах по изобретению может являться, например, белком Cas12a дикого типа, например AsCas12a, LbCas12a или другим белком Cas12a дикого типа, представленным в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления белок Cas12a является AsCas12a. В других вариантах осуществления белок Cas12a является LbCas12a.

[0141] Успех редактирования генома с помощью систем CRSIPR-Cas основан по меньшей мере частично на специфичности белка Cas к последовательности-мишени с наименьшими нецелевыми эффектами, например, редактированием нецелевой ДНК. Белки Cas12a можно конструировать так, чтобы они проявляли повышенную специфичность относительно белков дикого типа, например, посредством встраивания одной или более мутаций в аминокислотных остатках, участвующих в регуляции контакта белка Cas12a с остовом ДНК целевой или нецелевой ДНК. Снижение аффинности связывания белка Cas12a к ДНК может улучшать точность белка Cas12a в результате повышения способности белка Cas12a отличать нецелевые последовательности ДНК. В некоторых вариантах осуществления белок Cas12a, используемый в системах, частицах и способах по изобретению, например, может являться сконструированным белком Cas12a, например, сконструированным LbCas12a или сконструированным AsCas12a, содержащим одну или более замен аминокислот по сравнению с белком дикого типа.

[0142] Примеры сконструированных белков LbCas12a описаны в публикации патентной заявки США № 2018/0030425, содержание которой включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. Сконструированные белки LbCas12a могут включать, в качестве неограничивающих примеров, аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 (соответствующую референсной последовательности NCBI WP_051666128.1) или SEQ ID NO: 10 из патентной заявки США № 2018/0030425, необязательно, содержащей мутации, например, замену нативной аминокислоты другой аминокислотой, например, аланином, глицином или серином, в одном или более положениях в последовательности SEQ ID NO:10 из патентной заявки США № 2018/0030425, например, в положении S186, например, в положении N256, например, в положении N260, например, в положении K272, например, в положении K349, например, в положении K514, например, в положении K591, например, в положении K897, например, в положении Q944, например, в положении K945, например, в положении K948, например, в положении K984 или, например, в положении S985, или любой их комбинации, или в положениях, аналогичных таковым в SEQ ID NO: 1 из патентной заявки США № 2018/0030425, например, в положении S202, например, в положении N274, например, в положении N278, например, в положении K290, например, в положении K367, например, в положении K532, например, в положении K609, например, в положении K915, например, в положении Q962, например, в положении K963, например, в положении K966, например, в положении K1002 или, например, в положении S1003 SEQ ID NO: 1 из патентной заявки США № 2018/0030425; или любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления сконструированный LbCas12a содержит мутации G532R/K595R и G532R/K538V/Y542R.

[0143] Примеры сконструированных белков AsCas12a описаны в публикации патентной заявки США № 2018/0030425, содержание которой включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. Сконструированные белки AsCas12a включают, в качестве неограничивающих примеров, аминокислотную последовательность

SEQ ID NO: 2 (соответствующую референсную последовательность NCBI WP_021736722.1) или SEQ ID NO: 8 из патентной заявки США № 2018/0030425, необязательно, содержащей мутации, например, замену нативной аминокислоты другой нативной аминокислотой, например, аланином, глицином или серином, в одном или более положениях в последовательности SEQ ID NO: 2 из патентной заявки США № 2018/0030425, например, в положении N178, например, в положении S186, например, в положении N278, например, в положении N282, например, в положении R301, например, в положении T315, например, в положении S376, например, в положении N515, например, в положении K523, например, в положении K524, например, в положении K603, например, в положении K965, например, в положении Q1013, например, в положении Q1014 или, например, в положении K1054 SEQ ID NO: 2, или их комбинации.

[0144] Дополнительные сконструированные белки LbCas12a и белки AsCas12a описаны в публикации патентной заявки США № 2019/0010481, содержание которой включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. Такие сконструированные белки Cas12a могут содержать, например, аминокислотную последовательность, являющуюся по меньшей мере на 80% или по меньшей мере 95% идентичной аминокислотной последовательности LbCas12a дикого типа или AsCas12a дикого типа. Сконструированные белки Cas12a могут включать одну или более из мутаций, описанных в публикации патентной заявки США № 2019/0010481.

[0145] Сконструированные белки Cas12a могут представлять собой слитый белок, например, содержащий гетерологичный функциональный домен, например, домен активации транскрипции, сайленсер транскрипции или домен репрессии транскрипции, фермент, модифицирующий состояние метилирования ДНК, фермент, модифицирующий субъединицу гистона, дезаминазу, модифицирующую цитозинового основания ДНК, дезаминазу, модифицирующую аденозиновые основания ДНК, фермент, домен или пептид, ингибирующий или повышающий эндогенную репарацию ДНК или пути эксцизионной репарации (BER), или биологический соединитель, как описано в публикации патентной заявки США № 2019/0010481.

[0146] Успех редактирования генома посредством систем CRISPR-Cas также основан по меньшей мере частично от специфичности белка Cas в отношении его последовательностей PAM. Белки LbCas12a и AsCas12a дикого типа распознают последовательность PAM TTTV, где V является A, C или G. Сконструированные белки AsCas12a, содержащие мутации S542R/K607R (RR Cas12a) и S542R/K548V/N552R (RVR Cas12a), описаны в Gao et al., 2017, Nat Biotechnol., 35(8):789-792, и имеют измененные специфичности PAM по сравнению с Cas12a дикого типа. В таблице 1 приведены последовательности PAM, распознаваемые различными белками Cas12a. См. также Feng, et. al, 2019, Genome Biology, 20:15.

Таблица 1		
Белок Cas12a	Последовательность PAM	

LbCas12a WT и AsCas12a WT	TTTV	V=A, C или G
FnCas12 WT	NTTN	N=A, G, C, или T
RR Cas12a	TYCV	Y=C или T; V=A, C или G
RR Cas12a	CCCC	
RR Cas12a	ACCC	
RVR Cas12a	TATV	V=A, C или G
RVR Cas12a	RATR	R=G или A
HkCas12a	TCTN	N=A, G, C или T
ArCas12a; BsCas12a; HkCas12a; LpCas12a; PrCas12a; PxCas12a.	TTTN или TTN	N=A, G, C или T
HkCas12a	YYN	Y=C или T; N=A, G, C или T
HkCas12a	YTN	Y=C или T; N=A, G, C или T
HkCas12a	TYYN	Y=C или T; N=A, G, C или T

6.5. Нуклеиновые кислоты и клетки-хозяева

[0147] Настоящее изобретение относится к нуклеиновым кислотам (например, ДНК или РНК), кодирующим гРНК Cas12a по изобретению. Нуклеиновая кислота, кодирующая гРНК Cas12a, может являться, например, плазмидой или вирусным геномом (например, геномом лентивируса, ретровируса, аденовируса или аденоассоциированного вируса, модифицированного так, чтобы кодировать гРНК Cas12a). Плазмиды могут являться, например, плазмидами для продукции вирусных частиц, например, лентивирусных частиц, или плазмидами для размножения кодирующей гРНК Cas12a последовательности в бактериальных (например, *E. coli*) или эукариотических (например, дрожжи) клетках.

[0148] В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая гРНК, может дополнительно кодировать белок Cas12a, например, белок Cas12a, описанный в разделе 6.4. Примером плазмиды, которую можно использовать для кодирования гРНК Cas12a по изобретению и белка Cas12a, является pY108 lentiAsCas12a (плазмида Addgene № 84739), кодирующая AsCas12a. Специалистам в этой области будет понятно, что плазмиды, кодирующие белок Cas12a, можно модифицировать так, чтобы они кодировали другой белок Cas12a, например, вариант Cas12a, как описано в разделе 6.4, или белок Cas12a из другого биологического вида, такого как *Lachnospiraceae bacterium* или *Francisella novicida*.

[0149] Нуклеиновые кислоты, кодирующие белок Cas12a, можно подвергать оптимизации кодонов, например, если по меньшей мере один нераспространенный кодон или менее распространенный кодон заменяют кодоном, распространенным в клетке-хозяине. Например, кодон-оптимизированная нуклеиновая кислота может направлять синтез оптимизированной матричной мРНК, например, оптимизированной для экспрессии в системе экспрессии млекопитающего.

[0150] Нуклеиновые кислоты по изобретению, например, плазмиды, могут содержать один или более регуляторных элементов, таких как промоторы, энхансеры и другие элементы контроля экспрессии (например, сигналы терминации транскрипции, такие как сигналы полиаденилирования и поли-U-последовательности). Такие регуляторные элементы описаны, например, в Goeddel, 1990, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. Регуляторные элементы включают элементы, направляющие конститутивную экспрессию нуклеотидной последовательности во многих типах клетки-хозяина, и элементы, направляющие экспрессию нуклеотидной последовательности только в некоторых клетках-хозяевах (например, тканеспецифические регуляторные последовательности). Тканеспецифический промотор может направлять экспрессию, главным образом, в желаемой интересующей ткани, такой как мышца, нейрон, кость, кожа, кровь, некоторые органы (например, печень, поджелудочная железа), или в конкретных типах клеток (например, лимфоцитах). Регуляторные элементы также могут направлять экспрессию с зависимостью по времени, например, в зависимости от клеточного цикла или стадии развития, и могут быть ткане- или клеточно-специфическими или не быть таковыми. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота по изобретению содержит один или более промоторов pol III (например, 1, 2, 3, 4, 5 или более промоторов pol III), один или более промоторов pol II (например, 1, 2, 3, 4, 5 или более промоторов pol II), один или более промоторов pol I (например, 1, 2, 3, 4, 5 или более промоторов pol I) или их комбинации, например, для отдельной экспрессии гРНК Cas12a и белка Cas12a. Неограничивающие примеры промоторов pol III включают промоторы U6 и H1. Неограничивающие примеры промоторов pol II включают ретровирусный промотор LTR вирус саркомы Рауса (RSV) (необязательно, с энхансером RSV), промотор цитомегаловируса (CMV) (необязательно, с энхансером CMV) (см., например, Boshart et al, Cell, 1985, 41:521-530), промотор SV40, промотор дигидрофолатредуктазы, промотор β -актина, промотор фосфоглицеринкиназы (PGK) и промотор EF1 α . Примеры энхансерных элементов включают WPRE; энхансеры CMV; сегмент R-U5' в LTR HTLV-I; энхансер SV40; и последовательность интрона между экзонами 2 и 3 β -глобина кролика. Специалисты в этой области следует понимать, что дизайн экспрессирующего вектора может зависеть от таких факторов как выбор клетки-хозяина, желаемого уровня экспрессии и т.д.

[0151] Настоящее изобретение также относится к клетке-хозяину, содержащей нуклеиновую кислоту по изобретению.

[0152] Такие клетки-хозяева можно использовать, например, для получения вирусных частиц, кодирующих гРНК Cas12a по изобретению и, необязательно, белок Cas12a. Клетки-хозяева также можно использовать для получения везикул, содержащих гРНК Cas12a и, необязательно, белок Cas12a (например, посредством адаптации способов, описанных в Montagna et al., 2018, *Molecular Therapy: Nucleic Acids*, 12:453-462, для получения везикул, содержащих гРНК Cas12a и белок Cas12a, а не огРНК Cas9 и белок Cas9). Примеры клеток-хозяев включают эукариотические клетки, например, клетки млекопитающих. Примеры клеток-хозяев млекопитающих включают линии клеток человека, такие как BHK-21, BSRT7/5, VERO, WI38, MRC5, A549, HEK293, HEK293T, Caco-2, B-50 или любые другие клетки HeLa, HepG2, Saos-2, HuH7 и линии клеток HT1080. Клетки-хозяева могут являться сконструированными клетками-хозяевами, например, клетками-хозяевами, сконструированными для экспрессии ДНК-связывающего белка, такого как репрессор (например, TetR), для регуляции продукции вируса или везикул (см. Petris et al., 2017, *Nature Communications*, 8:15334).

[0153] Клетки-хозяева также можно использовать для размножения кодирующих последовательностей гРНК Cas12a по изобретению. Клетка-хозяин может являться эукариотой или прокариотой и включает, например, дрожжи (такие как *Pichia pastoris* или *Saccharomyces cerevisiae*), бактерии (такие как *E. coli* или *Bacillus subtilis*), клетки насекомых Sf9 (такие как инфицированные бакуловирусом клетки SF9) или клетки млекопитающих (такие как эмбриональные клетки почки человека (HEK), клетки яичника китайского хомяка, клетки HeLa, клетки 293 человека и клетки обезьян COS-7).

6.6. Системы, частицы и клетки, содержащие гРНК Cas12a

[0154] Настоящее изобретение также относится к системам, содержащим гРНК Cas12a по изобретению и белок Cas12a. системы могут содержать рибонуклеопротеиновые частицы (RNP), в которых гРНК Cas12a, как представлено в настоящем описании, комплексирована с белком Cas12a. Белок Cas12a может являться, например, белком Cas12a, описанным в разделе 6.4. Системы по изобретению дополнительно могут содержать геномную ДНК, комплексированную с гРНК Cas12a и белком Cas12a. Таким образом, настоящее изобретение относится к системе, содержащей гРНК Cas12a по изобретению, содержащей нацеливающую последовательность, геномную ДНК, содержащую соответствующий целевой домен и РАМ Cas12a, и белок Cas12a, распознающий РАМ, все из которых комплексированы друг с другом.

[0155] Системы по изобретению могут существовать в клетке (находится ли клетка *in vivo*, *ex vivo* или *in vitro*) или вне клетки.

[0156] Настоящее изобретение также относится к частицам, содержащим гРНК Cas12a по изобретению. Частицы дополнительно могут содержать белок Cas12a, например, белок Cas12a, описанный в разделе 6.4. Примеры частиц включают липосомы, везикулы и наночастицы золота. В некоторых вариантах осуществления частица содержит только один вид гРНК.

[0157] Настоящее изобретение также относится к клеткам и популяциям клеток (например, популяции, содержащей 10 или более, 50 или более, 100 или более, 1000 или более или 100000 тысяч или более клеток), содержащих гРНК Cas12a по изобретению. Такие клетки и популяции дополнительно могут содержать белок Cas12a. В некоторых вариантах осуществления такие клетки и популяции выделяют, например, из клеток, не содержащих гРНК Cas12a.

[0158] Популяции клеток по изобретению могут являться клетками, в которых происходит редактирование генома системами по изобретению, или клетками, в которых компоненты системы по изобретению экспрессируются, но редактирование генома не происходит, или их комбинацией. Популяция клеток может содержать, например, популяцию, в которой по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60% или по меньшей мере 70% клеток подвергаются редактированию генома системой по изобретению.

[0159] В системах, частицах, клетках и популяциях клеток по изобретению, содержащих белок Cas12a, белок Cas12a должен быть белком Cas12a, способным распознавать РАМ, смежный с целевым доменом, которому соответствует нацеливающая последовательность гРНК Cas12a. Например, если последовательность РАМ, смежная целевому домену, является TTTV, белок Cas12a может являться, например, AsCas12a дикого типа или LbCas12a дикого типа. В качестве другого примера, если последовательность РАМ является TYCV, CCCC или ACCC, белок Cas12a может являться RR AsCas12a. В качестве другого примера, если последовательность РАМ является TATV или RATR, белок Cas12a может являться RVR AsCas12a.

6.7. Способы изменения клетки

[0160] Настоящее изобретение также относится к способам изменения клетки, включающим приведение клетки в контакт с системой или частицей по изобретению.

[0161] Клетку можно приводить в контакт с системой или частицей по изобретению или кодирующими нуклеиновыми кислотами *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*.

[0162] Приведение клетки в контакт с системой или частицей по изобретению может приводить к редактированию геномной ДНК клетки таким образом, что активность участка сплайсинга, кодируемого геномной ДНК снижена. Снижение активности участка сплайсинга может снижать аномальный сплайсинг и восстанавливать нормальный сплайсинг в клетке, например, если участок сплайсинга является криптическим участком сплайсинга, или способствовать проскоку экзона, например, если участок сплайсинга является каноническим участком сплайсинга.

[0163] В рамках изобретения термин "приведение в контакт" относится к приведению клетки в контакт напрямую с собранной системой или частицей по изобретению, посредством встраивания в клетку одного или более компонентов системы по изобретению (или кодирующей нуклеиновой кислоты, экспрессирующейся в клетке таким образом, что система собирается *in situ*), например, посредством встраивания одной или более кодирующих плазмид в клетку или приведение клетки в контакт с одной или

более вирусными частицами, которые могут подвергаться захвату клеткой, или их комбинации. Если компоненты системы встраивают в виде нуклеиновых кислот, предпочтительно, в нее включают контрольные элементы, позволяющие нуклеиновым кислотам экспрессироваться и собираться в систему по изобретению в клетке.

[0164] Таким образом, приведение клетки в контакт с системой по изобретению может включать, например, встраивание системы в клетку способом физической доставки, способом векторной доставки (например, плазмиды или вируса) или способом невирусной доставки. Примеры способов физической доставки включают микроинъекцию (например, посредством инъекции плазмиды кодирующей гРНК Cas12a и белок Cas12a, в клетку, инъекции гРНК Cas12a и мРНК, кодирующей белок Cas12a, в клетку или инъекции RNP, содержащей гРНК Cas12a и белок Cas12a, в клетку), электропорацию (например, для встраивания плазмиды, кодирующей гРНК Cas12a и белок Cas12a, в клетку или для встраивания мРНК, кодирующей белок Cas12a и гРНК Cas12a, в клетку) и гидродинамическую доставку (например, с использованием инъекции под высоким давлением для встраивания плазмиды, кодирующей гРНК Cas12a и белок Cas12a, в клетку или RNP, содержащей гРНК Cas12a и белок Cas12a, в клетку). Примеры способов вирусной доставки включают приведение клетки в контакт с вирусом, кодирующим гРНК Cas12a и белок Cas12a (например, аденоассоциированным вирусом, аденовирусом или лентивирусом). Примеры способов невирусной доставки включают приведение клетки в контакт с частицей, содержащей систему, например, частицу как описано в разделе 6.6. Различные способы доставки гРНК Cas12a и белка Cas12a в интересующую клетку или ткань описаны в патенте США № 9790490, содержание которой включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. См. также, Lino et al., 2018, *Drug Delivery*, 25(1):1234-1257, где приведен обзор нескольких способов *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo* для доставки систем CRISPR/Cas9 в клетки *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo*. Такие способы можно адаптировать для доставки гРНК Cas12a и белков Cas12a по изобретению (например, посредством замены системой Cas12a по изобретению гРНК Cas9 и белка Cas9).

[0165] Клетки могут происходить из индивидуума, имеющего генетическое заболевание (например, стволовой клетки), или их можно получать из индивидуума, имеющего генетическое заболевание (например, индуцированная плюрипотентная стволовая клетка (iPS), полученная из клетки индивидуума).

[0166] Например, клетка может являться клеткой человека, содержащей мутацию в гене CFTR, например, мутацию 3272-26A>G, мутацию 3849+10kbC>T, мутацию IVS11+194A>G или мутацию IVS19+11505C>G. Примеры гРНК для встраивания в систему, которые можно использовать для коррекции указанных выше мутаций, описаны в разделе 6.3.4.

[0167] В качестве другого примера, клетка может являться клеткой человека, имеющей мутацию в гене DMD, например, мутацию IVS9+46806C>T, мутацию IVS62+62296A>G, мутацию IVS1+36947G>A, мутацию IVS2+5591T>A, или мутацию IVS8-15A>G, или мутацию в экзоне 50. Примеры гРНК для встраивания в систему,

которые можно использовать для коррекции указанных выше мутаций, описаны в разделе 6.3.4.

[0168] В качестве другого примера, клетка может являться клеткой человека, имеющей мутацию в гене HBB, например, мутацию IVS2+645C>T, мутацию IVS2+705T>G или мутацию IVS2+745C>G. Примеры гРНК для встраивания в систему, которые можно использовать для коррекции указанных выше мутаций, описаны в разделе 6.3.4.

[0169] В качестве другого примера, клетка может являться клеткой человека, имеющей мутацию в гене FGB, например, мутацию IVS6+13C>T, мутацию IVS4+792C>G или мутацию IVS3+2552A>G. Примеры гРНК для встраивания в систему, которые можно использовать для коррекции указанных выше мутаций, описаны в разделе 6.3.4.

[0170] В качестве другого примера, клетка может являться клеткой человека, имеющей мутацию в гене GLA, например, мутацию IVS4+919G>A. Примеры гРНК для встраивания в систему, которые можно использовать для коррекции указанных выше мутаций, описаны в разделе 6.3.4.

[0171] В качестве другого примера, клетка может являться клеткой человека, имеющей мутацию в гене LDLR, например, мутацию IVS12+11C>G. Примеры гРНК для встраивания в систему, которые можно использовать для коррекции указанных выше мутаций, описаны в разделе 6.3.4.

[0172] В качестве другого примера, клетка может являться клеткой человека, имеющей мутацию в гене BRIP1, например, мутацию IVS11+2767A>T. Примеры гРНК для встраивания в систему, которые можно использовать для коррекции указанных выше мутаций, описаны в разделе 6.3.4.

[0173] В качестве другого примера, клетка может являться клеткой человека, имеющей мутацию в гене F9, например, мутацию IVS5+13A>G. Примеры гРНК для встраивания в систему, которые можно использовать для коррекции указанных выше мутаций, описаны в разделе 6.3.4.

[0174] В качестве другого примера, клетка может являться клеткой человека, имеющей мутацию в гене CEP290, например, мутацию IVS26+1655A>G. Примеры гРНК для встраивания в систему, которые можно использовать для коррекции указанных выше мутаций, описаны в разделе 6.3.4.

[0175] В качестве другого примера, клетка может являться клеткой человека, имеющей мутацию в гене COL2A1, например, мутацию IVS23+135G>A. Примеры гРНК для встраивания в систему, которые можно использовать для коррекции указанных выше мутаций, описаны в разделе 6.3.4.

[0176] В качестве другого примера, клетка может являться клеткой человека, имеющей мутацию в гене USH2A, например, мутацию IVS40-8C>G, мутацию IVS66+39C>T или мутацию c.7595-2144A>G. Примеры гРНК для встраивания в систему, которые можно использовать для коррекции указанных выше мутаций, описаны в разделе 6.3.4.

[0177] В качестве другого примера, клетка может являться клеткой человека, имеющей мутацию в гене GAA, например, мутацию IVS1-13T>G или мутацию IVS6-22T>G. Примеры гРНК для встраивания в систему, которые можно использовать для коррекции указанных выше мутаций, описаны в разделе 6.3.4.

[0178] Приведение клетки в контакт с системой или частицей по изобретению можно осуществлять *in vitro*, *ex vivo* или можно осуществлять *in vivo* (например, для лечения индивидуума, имеющего генетическое заболевание, нуждающегося в лечении такого заболевания). При осуществлении *in vitro* или *ex vivo* способы по изобретению дополнительно могут включать стадию введения приведенной в контакт клетки индивидууму, например для лечения индивидуума, нуждающегося в лечении генетического заболевания.

[0179] Систему можно вводить с помощью любого подходящего носителя для доставки. Примеры носителей для доставки включают вирусы (лентивирус, аденовирус) и частицы (наносферы, липосомы, квантовые точки, наночастицы, микрочастицы, нанокapsулы, везикулы, частицы полиэтиленгликоля, гидрогели и мицеллы).

[0180] Примеры вирусных средств доставки могут включать аденоассоциированный вирус (AAV), лентивирус, ретровирус, аденовирус, вирус простого герпеса I или II, парвовирус, вирус ретикулоэндотелиоза и/или другие типы вирусных векторов, например, с использованием составов и доз из патента США № 8454972 (составы, дозы для аденовируса), патент США № 8404658 (составы, дозы для AAV) и патент США № 5846946 (составы, дозы для ДНК-плазмид) и из клинических испытаний и публикаций, касающихся клинических испытаний, включающих лентивирус, AAV и аденовирус. Вирусы могут инфицировать и трансдуцировать клетка *in vivo*, *in vitro* или *ex vivo*.

[0181] Вирусные средства доставки также можно использовать в способах доставки *ex vivo* и *in vitro* и трансдуцированные клетки можно вводить индивидууму, нуждающемуся в терапии. В случае использования *ex vivo* и *in vitro* трансдуцированные клетки могут являться стволовыми клетками, полученными (например, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, образующиеся из фибробластов) из индивидуума, нуждающегося в терапии.

[0182] Альтернативно, носители для доставки могут являться частицами. Системы доставки на основе частиц по изобретению можно предоставлять в любой форме, включая, в качестве неограничивающих примеров, твердые средства, полутвердые средства, эмульсии или коллоидные частицы. Следует понимать, что в настоящем описании ссылки на частицы или наночастицы могут быть взаимозаменяемыми, при необходимости. Можно одновременно доставлять мРНК белка Cas12a и гРНК Cas12a с использованием частиц или липидных оболочек; например, гРНК Cas12a и белок Cas12a, например, в виде комплекса, можно доставлять с помощью частицы, как описано в Dahlman et al., WO2015089419 A2 и процитированных в ней документов.

[0183] Доставку гРНК Cas12a и белка Cas12a можно осуществлять с помощью липосом. Липосомы являются сферическими везикулярными структурами, состоящими из уни- или мультиламеллярного липидного бислоя, окружающего внутренние водные компартменты, и относительно герметичного внешнего липофильного фосфолипидного бислоя. Липосомы привлекли значительное влияние в качестве носителей для доставки лекарственных средств, т.к. они являются бисовместимыми, нетоксичными, с помощью них можно доставлять гидрофильные и липофильные молекулы лекарственных средств, защищать их карго от деградации ферментами плазмы и транспортировать их нагрузку через биологические мембраны и гематоэнцефалитический барьер (BBB). Липосомы можно получать из нескольких разных типов липидов; однако, фосфолипиды являются наиболее общепотребительными для получения липосом в качестве носителей для лекарственных средств. Хотя образование липосом является спонтанным, если липидную пленку смешивают с водным раствором, его также может быть формировать, прилагая силу в форме встряхивания с использованием гомогенизатора, ультразвукового устройства или экструдера (см. обзор, например, в Spuch and Navarro, 2011, *Journal of Drug Delivery*, vol. 2011, Article ID 469679, doi:10.1155/2011/469679).

[0184] В случае введения индивидууму системы, носители для доставки и трансдуцированные клетки можно вводить внутривенно, парентерально, интраперитонеально, подкожно, посредством внутримышечной инъекции, трансдермально, интраназально, чрезслизисто, посредством прямой инъекции, стереотаксической инъекции, с помощью инфузионных систем-мининасосов, посредством конвекции, катетеров или другими способами доставки в клетку, ткань или орган нуждающегося в этом индивидуума. Такую доставку можно осуществлять посредством однократной дозы или многократных доз.

[0185] Такая доза может дополнительно содержать, например, носитель (воду, физиологический раствор, этанол, глицерин, лактозу, сахарозу, фосфат кальция, желатин, декстран, агар, пектин, арахисовое масло, сезамовое масло и т.д.), дилуент, фармацевтически приемлемый носитель (например, фосфатно-солевой буфер), фармацевтически приемлемый эксципиент и/или другие соединения, известный в этой области. Подробное обсуждение фармацевтически приемлемых эксципиентов доступно в REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Mack Pub. Co., N.J. 1991), включенной в настоящее описание в качестве ссылки.

[0186] Определение частоты введения входит в объем навыков практикующего специалиста в области медицины или ветеринарии (например, лечащего врача, ветеринара) в зависимости от общепринятых факторов, включая возраст, пол, общее состояние здоровья, другие состояния пациента или индивидуума и конкретного заболевания, состояния или симптомов, подвергаемых лечению.

[0187] Конкретные типы клеток и способы доставки для использования в способах по изобретению можно выбирать, например, в зависимости от конкретного гена, подлежащего редактированию. Например, DMD является генетическим нарушением,

отличающимся прогрессирующей дегенерацией и слабостью мышц и вызванным дефектами сплайсинга, инактивирующими белок дистрофин. Рекомбинантный AAV, геном которого сконструирован так, чтобы кодировать гРНК по изобретению, подходящие для коррекции дефектов сплайсинга в гене дистрофина (такие как гРНК, примеры последовательностей которых приведены в примере 7) под контролем промоторов мышечной креатинкиназы и десмина, которые могут достигать высоких уровней экспрессии в скелетных мышцах (см., например, Naso et al., 2017, BioDrugs. 31(4): 317-334), их можно вводить внутримышечно индивидуумам, страдающим DMD. Ниже приведены иллюстративные варианты осуществления для использования молекул гРНК по изобретению для лечения индивидуумов, страдающих кистозным фиброзом.

6.7.1. Примеры способов лечения индивидуумов, имеющих кистозный фиброз

[0188] Кистозный фиброз поражает эпителиальные клетки, и в некоторых вариантах осуществления клетка, приводимая в контакт в способе, может являться эпителиальной клеткой из индивидуума, имеющего мутацию CFTR, например, легочной эпителиальной клеткой, например, бронхиальной эпителиальной клеткой или альвеолярной эпителиальной клеткой. Приведение в контакт можно осуществлять *ex vivo* и приведенную в контакт клетку можно возвращать в организм индивидуума после стадии приведения в контакт. В других вариантах осуществления стадию приведения в контакт можно осуществлять *in vivo*.

[0189] Клетки из индивидуума, имеющего кистозный фиброз, можно собирать, например, из эпидермиса, легочного дерева, гепатобилиарного тракта, желудочно-кишечного тракта, репродуктивной системы или другого органа. В варианте осуществления клетку перепрограммируют в индуцированную плюрипотентную стволовую (iPS) клетку. В варианте осуществления клетка iPS дифференцируется в эпителий дыхательных путей, легочный эпителий, субмукозные железы, субмукозные протоки, эпителий желчных протоков, эпителий желудочно-кишечного тракта, клетки вирсунгова протока, эпителий репродуктивной системы, клетки придатка яичка и/или клетки гепатобилиарного тракта, например, клетки Клара, например, реснитчатые клетки, например, бокаловидные клетки, например, базальные клетки, например, ацинарные клетки, например, бронхоальвеолярная стволовая клетка, например, клетки эпителия легких, например, клетки назального эпителия, например, клетки эпителия трахеи, например, клетки эпителия бронхов, например, энтероэндокринные клетки, например, клетки бруннеровой железы, например, эпителия придатка яичка. В варианте осуществления ген CFTR в клетке корректируют способом, представленным в настоящем описании. В варианте осуществления клетку вводят обратно в соответствующую локацию в организме индивидуума, например, дыхательные пути, легочное дерево, систему желчных протоков, желудочно-кишечный тракт, поджелудочную железу, гепатобилиарный тракт и/или репродуктивную систему.

[0190] В некоторых вариантах осуществления аутологичную стволовую клетку можно обрабатывать *ex vivo*, подвергать дифференцировке в эпителий дыхательных путей,

эпителий легких, субмукозные железы, субмукозные протоки, эпителий желчных протоков, эпителий желудочно-кишечного тракта, клетки вирсунгова протока, эпителий репродуктивной системы, клетки придатка яичка и/или клетки гепатобилиарного тракта, например, клетки Клара, например, реснитчатые клетки, например, бокаловидные клетки, например, базальные клетки, например, ацинарные клетки, например, бронхоальвеолярная стволовая клетка, например, клетки эпителия легких, например, клетки назального эпителия, например, клетки эпителия трахеи, например, клетки эпителия бронхов, например, энтероэндокринные клетки, например, клетки бруннеровой железы, например, эпителия придатка яичка, и трансплантировать индивидууму. В других вариантах осуществления гетерологичную стволовую клетку можно обрабатывать *ex vivo* и подвергать дифференцировке в эпителий дыхательных путей, эпителий легких, субмукозные железы, субмукозные протоки, эпителий желчных протоков, эпителий желудочно-кишечного тракта, клетки вирсунгова протока, эпителий репродуктивной системы, клетки придатка яичка и/или клетки гепатобилиарного тракта, например, клетки Клара, например, реснитчатые клетки, например, бокаловидные клетки, например, базальные клетки, например, ацинарные клетки, например, бронхоальвеолярная стволовая клетка, например, клетки эпителия легких, например, клетки назального эпителия, например, клетки эпителия трахеи, например, клетки эпителия бронхов, например, энтероэндокринные клетки, например, клетки бруннеровой железы, например, эпителия придатка яичка, и трансплантировать индивидууму.

[0191] В некоторых вариантах осуществления способ, представленный в настоящем описании, включает введение гРНК Cas12a и белка Cas12a (или одной или более нуклеиновых кислот, кодирующих гРНК Cas12a и белок Cas12a) индивидууму, имеющему кистозный фиброз, посредством ингаляции, например, с помощью небулайзера. В других вариантах осуществления способ, представленный в настоящем описании, включает введение гРНК Cas12a и белка Cas12a (или одной или более нуклеиновых кислот, кодирующих гРНК Cas12a и белок Cas12a) посредством внутривенного введения. В некоторых вариантах осуществления способ, представленный в настоящем описании, включает введение гРНК Cas12a и белка Cas12a (или одной или более нуклеиновых кислот, кодирующих гРНК Cas12a и белок Cas12a) посредством интрапаренхиматозной инъекции в ткань легкого. В других вариантах осуществления способ, представленный в настоящем описании, включает введение гРНК Cas12a и белка Cas12a (или одной или более нуклеиновых кислот, кодирующих гРНК Cas12a и белок Cas12a) посредством интрапаренхиматозной, внутриальвеолярной, внутрибронхиальной, интратрахеальной инъекции в трахею, бронхиальное дерево и/или альвеолы. В некоторых вариантах осуществления способ, представленный в настоящем описании, включает введение гРНК Cas12a и белка Cas12a (или одной или более нуклеиновых кислот, кодирующих гРНК Cas12a и белок Cas12a) посредством внутривенной, интрапаренхиматозной или другой прямой инъекции или введения в любую из следующих локаций: систему воротной вены, паренхиму печени, поджелудочную железу,

вирсунгов проток, желчный проток, тощую кишку, подвздошную кишку, двенадцатиперстную кишку, желудок, верхние отделы кишечника, нижние отделы кишечника, желудочно-кишечный тракт, придаток яичка или репродуктивную систему.

[0192] В некоторых вариантах осуществления гРНК Cas12a и белок Cas12a (или одну или более нуклеиновых кислот, кодирующих гРНК Cas12a и белок Cas12a) вводят, например, индивидууму, имеющему кистозный фиброз, посредством AAV, например, с помощью небулайзера, или с помощью назального спрея или ингаляции, с ускорителями абсорбции или без них. В некоторых вариантах осуществления гРНК Cas12a и белок Cas12a (или одну или более нуклеиновых кислот, кодирующих гРНК Cas12a и белок Cas12a) вводят, например, индивидууму, с помощью вируса Сендай, аденовируса, лентивируса или другой модифицированной или немодифицированной вирусной частицы для доставки.

[0193] В некоторых вариантах осуществления гРНК Cas12a и белок Cas12a (или одну или более нуклеиновых кислот, кодирующих гРНК Cas12a и белок Cas12a) вводят, например, индивидууму, с помощью небулайзера или компрессорного небулайзера, назального спрея или ингаляции. В некоторых вариантах осуществления гРНК Cas12a и белок Cas12a (или одну или более нуклеиновых кислот, кодирующих гРНК Cas12a и белок Cas12a) составляют в аэрозольной катионной липосоме, липидной наночастице, липоплексе, нелипидном полимерном комплексе или сухом порошке, например, для введения с помощью небулайзера, с ускорителями абсорбции или без них.

[0194] В некоторых вариантах осуществления гРНК Cas12a и белок Cas12a (или одну или более нуклеиновых кислот, кодирующих гРНК Cas12a и белок Cas12a) вводят, например, индивидууму, имеющему кистозный фиброз, с помощью липосомы GL67A. GL67A описана, например, в www.cfgenetherapy.org.uk/clinical/article/GL67A_pGM169__Our_first_clinical_trial_product; Eastman et al., 1997, Hum Gene Ther. 8(6):765-73.

6.8. Примеры

6.8.1. Пример 1: Коррекция сплайсинговой мутации CFTR 3272-26A>G в клетках посредством CRISPR-Cas12a

[0195] Мутация CFTR 3242-26A>G является точечной мутацией, создающей новый акцепторный участок сплайсинга, вызывающий аномальное включение 25 нуклеотидов в экзон 20 гена CFTR. Образующаяся мРНК содержит сдвиг рамки считывания CFTR, что приводит к преждевременному стоп-кодону и последующей экспрессии укороченного, нефункционального белка CFTR. Исследовали стратегию редактирования генома с использованием AsCas12a в комбинации с различными гРНК Cas12a для коррекции сплайсинговой мутации.

6.8.1.1. Материалы и способы

6.8.1.1.1. Олигонуклеотиды: гидовая РНК

[0196] Конструировали гРНК AsCas12a, нацеленные на ген CFTR, имеющий сплайсинговую мутацию 3272-26A>G, с протоспейсерными доменами,

соответствующими, без ошибочного спаривания, целевым доменам, приведенным в таблице 2. Каждую гРНК конструировали так, чтобы она содержала петлевой домен, состоящий из последовательности UAAUUUCUACUCUUGUAGAU (SEQ ID NO: 25). В этом примере гРНК обозначают по их протоспейсерным доменам, например, сpРНК+11.

Таблица 2				
Название*	Целевой домен[^]	SEQ ID NO:	Целевой домен и окружающая геномная последовательность[#]	SEQ ID NO:
-77	TGATATGATTATTCT AATTTAGT	104	acaTTTGTGATATGATTATTCTAA TTTAGTctt	110
-56	GTCTTTTTTCAGGTAC AAGATATT	105	taaTTTAGTCTTTTTTCAGGTACAA GATATTatg	111
-27	ATAATATCTTGTAC CTGAAAAAG	106	taaTTTCATAATATCTTGTACCTG AAAAAGact	112
-11	TGTTATTTGCAGTGT TTTCTATG	107	gtgTTTATGTTATTTGCAGTGT TCTATGgaa	113
-2	CAGTGTTTTCTATG GAAATATTT	108	ttaTTTGCAGTGTTTTCTATGGAA ATATTTcac	114
+11	CATAGAAAACACTG CAAATAACA	38	ataTTTCCATAGAAAACACTGCA AATAACAtaa	115
+11/wt	CATAGAAAACATTG CAAATAACA	109	ataTTTCCATAGAAAACATTGCA AATAACAtaa	116
*значение указывает на расстояние последовательности РАМ от мутации; + или - указывает на положение целевого домена до или после мутации, соответственно; ^ мутация 3272-26A>G выделена полужирным шрифтом; # последовательность РАМ подчеркнута; строчными буквами указаны нуклеотиды вокруг целевого домена				

6.8.1.1.2. Другие олигонуклеотиды

[0197] Конструировали и получали олигонуклеотиды для ПЦР, РТ-ПЦР, клонирования, сайт-специфического мутагенеза и секвенирования. Эти олигонуклеотиды приведены в таблице 3.

Таблица 3	
Праймеры для ПЦР и сайт-специфического мутагенеза CFTR 3272-26A>G	
Олигонуклеотиды для клонирования минигена*	SEQ ID NO:

Праймер 1f	KpnI-AgeI exon 18-19 hCFTR for	ATggtaccggtgaccttctgcctcTTACCATATTTG ACTTCATCCAGTTG	117
Праймер 2f	TM exon 18 exon 19 hCFTR for	ttaccatatttgacttcaccagTTGTTATTAATTGTG ATTGGAGCTATAG	118
Праймер 3r	Exon 20 hCFTR rev	TGtAgaattcttaggatccctcgcCTGTTGTAAAA TGGAAATGAAGGTAACAG	119
Олигонуклеотиды для сайт-специфического мутагенеза			
Праймер 4mf	MUT 3272-26 A>G for	ATGGTCTCAgTGTTTTCTATGGAAATAT TTCAC	120
Праймер 5mr	MUT 3272-26 A>G rev	ATGGTCTCaacAcTGCAAATAACATAAAC ACAAAATG	121
Олигонуклеотиды для RT-ПЦР и ПЦР			
Праймер 6r	Oligo-BGH rev	TAGAAGGCACAGTCGAGG	122
Праймер 2f	TM exon 18 exon 19 hCFTR for	ttaccatatttgacttcaccagTTGTTATTAATTGTG ATTGGAGCTATAG	118
Праймер 3r	Exon 20 hCFTR rev	TGtAgaattcttaggatccctcgcCTGTTGTAAAA TGGAAATGAAGGTAACAG	119
Олигонуклеотиды для глубокого секвенирования			
Праймер 7f	DS 3272-26 A>G for	tcgtcggcagcgtcagatgtgtataagagacagGCTTGTA ACAAGATGAGTGAAAATTGGA	123
Праймер 8r	DS 3272-26 A>G rev	gtctcgtgggctcggagatgtgtataagagacagATATCT ATTCAAAGAATGGCACCAGTGT	124
*for=прямой; rev=обратный; последовательности экзонов указаны прописными буквами; последовательности интронов указаны строчными буквами			

6.8.1.1.3. Получение плазмид минигена WT и плазмид минигена для мутации 3272-26A>G CFTR

[0198] Плазмидные модели минигенов получали для имитации профиля сплайсинга гена CFTR, соответствующего области, включающей экзоны 19, 20 и интрон 19. Плазмида pMG3272-26WT содержала аллель дикого типа; плазмида pMG3272-26A>G содержала мутантный аллель (см. фиг. 7).

[0199] Миниген дикого типа, соответствующий локусу CFTR 3272-26, клонировали в плазмиду pcDNA3 (Invitrogen®). Праймеры 1f, 2f и 3r использовали для ПЦР-амплификации ДНК CFTR последовательности дикого типа экзонов 19, 20 и интрона 19 из генома клеток HEK293T. Амплифицированную ДНК клонировали в плазмиду pcDNA3 (Invitrogen®) для получения плазмиды pMG3272-26WT, содержащей аллель дикого типа экзонов 19, 20 и интрона 19. Праймеры 4mf и 5mr использовали для осуществления сайт-

специфического мутагенеза минигена дикого типа, находящегося в pMG3272-26WT, для получения мутации 3272-26A>G, создавая плазмиду pMG3272-26A>G.

[0200] Последовательности, кодирующие гидовую РНК, клонировали в коммерчески доступную плазмиду, pY108 lentiAsCas12a (плазмиду Addgene № 84739), с использованием участков рестрикции BsmBI, как описано ранее (Shalem, O., et al., 2014, Science, 343:84-87). Плазмиды на основе лентивирусов позволяют одновременно доставлять РНК-направленный белок Cas12a и гРНК в клетки-мишени в одной вирусной частице (см. фиг. 22А и фиг. 22В).

6.8.1.1.4. Линии клеток

[0201] Клетки колоректальной аденокарциномы человека (Caco-2), эмбриональные клетки почки человека HEK293Т и клетки HEK293 получали в American Type Culture Collection.

6.8.1.1.5. Трансфекция

[0202] Получали клетки Caco-2, HEK293Т и HEK293, стабильно экспрессирующие pMG3272-26WT (линию клеток HEK293/pMG3272-26WT) или 3272-26A>G (линию клеток HEK293/pMG3272-26A>G). Клетки культивировали в модифицированной по способу Дульбекко среде Игла (DMEM; Life Technologies), дополненной 10% эмбриональной телячьей сывороткой (FBS; Life Technologies), 10 ед./мл антибиотиков (PenStrep, Life Technologies) и 2 мМ L-глутамина при 37°C во влажной камере с 5% CO₂.

[0203] Клетки высевали в количестве $1,5 \times 10^5$ клеток/лунку в 24-луночные планшеты и трансфицировали с использованием 100 нг Bgl-II-линеаризованных плазмид минигена pMG3272-26WT или pMG3272-26A>G, комплексированных с полиэтиленимином (PEI), и 700 нг плазмиды pY108 lentiAsCas12a, кодирующей и белок AsCas12a, и последовательности гРНК. Через 16 часов инкубации меняли среду для культивирования клеток. Селекцию осуществляли, воздействуя 10 мкг/мл пуромицина на трансфицированные клетки Caco-2; трансфицированные клетки HEK293Т или HEK293 подвергали селекции, воздействуя на них 2 мкг/мл пуромицина. Интеграцию плазмиды проверяли добавлением 500 мкг/мл G418, добавляемого через приблизительно 48 часов после трансфекции. Клоны отдельных клеток выделяли и охарактеризовывали по экспрессии конструкций минигенов. Трансфицированные клетки собирали через три дня после трансфекции.

6.8.1.1.6. Получение лентивирусных векторов

[0204] Лентивирусные частицы продуцировали в клетках HEK293Т при 80% конфлюэнтности в чашках 10 см. Десять мкг вектора для переноса - плазмиды pY108 lentiAsCas12a, 3,5 мкг VSV-G и 6,5 мкг упаковывающей плазмиды Δ8.91 трансфицировали в клетки с использованием PEI. После инкубации в течение ночи среду заменяли полной DMEM. Супернатант, содержащий вирусные частицы, собирали через 48 часов и фильтровали через фильтр PES 0,45 мкм. Лентивирусные частицы концентрировали и очищали посредством ультрацентрифугирования в течение 2 часов при 4°C и $150000 \times g$ с 20% сахарозной подушкой. Осадки лентивирусных частиц ресуспендировали в OptiMEM

и хранили аликвоты при -80°C . Титры вектора измеряли в единицах обратной транскриптазы (RTU) способом SG-PERT (см. Casini, A., et al., 2015, J. Virol. 89:2966-2971).

6.8.1.1.7. Трансдукция

[0205] Для исследования трансдукции клетки HEK293/pMG3272-26WT, HEK293/pMG3272-26A>G и Сасо-2 высевали при плотности 3×10^5 клеток/лунку в 12-луночные планшеты. После инкубации в течение ночи клетки трансдуцировали с использованием 3 RTU лентивирусных векторов. Через сорок восемь часов клетки подвергали селекции пурамицином (2 мкг/мл в случае клеток HEK293 или 10 мкг/мл в случае клеток Сасо-2) и собирали через 10 дней после трансдукции.

6.8.1.1.8. Анализ транскрипта

[0206] Профиль сплайсинга, характерный для мутантных минигенов или минигенов дикого типа в трансфицированных клетках HEK293T, измененных или корректных, соответственно, оценивали посредством RT-ПЦР и анализа секвенирования (см. Beck, S., et al., 1999, Hum. Mutat., 14:133-144).

[0207] РНК выделяли из собранных клеток с использованием реагента TRIzol™ (Invitrogen®) и ресуспендировали в DEPC-ddH₂O. кДНК получали из 500 нг РНК с использованием обратной транскриптазы RevertAid (Thermo Scientific) по инструкциям производителя. Целевые области амплифицировали посредством ПЦР с использованием высокоточной ДНК-полимеразы Phusion (Thermo Fisher).

6.8.1.1.9. Детекция индуцированных нуклеазами геномных мутаций

[0208] Геномную ДНК выделяли с использованием раствора для экстракции ДНК QuickExtract (Epicentre) и амплифицировали целевой locus посредством ПЦР с использованием высокоточной ДНК-полимеразы Phusion (Thermo Fisher). Для оценки любых инсерционно-делеционных мутаций, являющихся результатом расщепления единичной гРНК, очищенные продукты ПЦР секвенировали и анализировали с использованием TIDE (см. праймеры 7f и 8r в таблице 3; Brinkman, E.K., et al., 2014, Nucleic Acids Res., 42: 1-8) или программного обеспечения SYNTHGO ICE (см. Hsiau, T., et al., 2018, bioRxiv, Jan. 20, 1-14). В некоторых исследованиях редактирование ДНК также измеряли с использованием анализа эндонуклеазы T7 1 (T7E1) (New England BioLabs) по инструкциям производителя и как описано ранее (см. Petris, G., et al., 2017, Nat. Commun. 8:1-9).

6.8.1.1.10. GUIDE-seq

[0209] Приблизительно 2×10^5 клеток HEK293T трансфицировали с использованием реагента для трансфекции Lipofectamine 3000 (Invitrogen) с использованием 1 мкг плазмиды lenti Cas12a pY108 и 10 пмоль dsODN, сконструированных по оригинальному протоколу GUIDE-seq (см. Tsai, S. Q., et al., 2015, Nat. Biotechnol., 33:187-198). Через день после трансфекции клетки открепляли и подвергали селекции с помощью 2 мкг/мл пурамицина. Через четыре дня после трансфекции клетки собирали и выделяли геномную ДНК с использованием набора DNeasy Blood and Tissue (Qiagen) по инструкциям

производителя. Выделенную геномную ДНК обрабатывали ультразвуком и расщепляли силой сдвига до средней длины 500 п.н. с использованием ультразвукового устройства Bioruptor Pico (Diagenode). Получение библиотеки, секвенирование и анализ осуществляли способами, известными специалистам в этой области (см., например, Montagna, C., et al., 2018, *Mol. Ther. Nucleic Acids*, 12:453-462; Casini, A., et al., 2018, *Nat. Biotechnol.*, 36:265-271).

6.8.1.1.11. Направленное глубокое секвенирование

[0210] Интересующий локус (3272-26A>G/4218insT) амплифицировали из геномной ДНК, выделенной из трансфицированных клеток через 14 дней после трансдукции с помощью lentiAsCas12a-срРНК +11 или контроля (CTR) с использованием высокоточной полимеразы Phusion (Thermo Scientific) и праймеров 7f и 8r. Ампликоны индексировали посредством ПЦР с использованием индексов Nextera (Illumina), количественно анализировали с помощью набора Qubit dsDNA High Sensitivity Assay (Invitrogen), объединяли в почти эквимоллярных концентрациях и секвенировали с помощью системы Illumina Miseq с использованием циклов V3-150 набора Illumina Miseq (один рид - 150 п.н.). Необработанные данные секвенирования (файлы FASTQ) анализировали с использованием онлайн-инструмента CRISPResso (см. Pinello, L., et al., 2016, *Nat. Biotechnol.*, 34:695-697; размер окна =3, качество минимального среднего рида (шкала phred33) =30, качество минимальной одной п.н. (шкала phred33) =10).

6.8.1.2. Результаты

[0211] Профиль сплайсинга рMG3272-26A>G оценивали после котрансфекции со сконструированными гРНК. Повышенные уровни корректно сплайсированного продукта являлись результатом редактирования посредством AsCas12a в комбинации с различными гРНК (фиг. 21B). Анализ делеций, индуцированных парами гРНК, показал, что AsCas12a не приводил к образованию делеций (фиг. 21D).

[0212] Для дальнейшей валидации активности AsCas12a с выбранными гРНК в более физиологическом контексте хроматина, тестировали коррекцию сплайсинга интрона 19 CFTR в клетках HEK293, стабильно трансфицированных с использованием минигена рMG3272-26A>G (HEK293/3272-26A>G). AsCas12a-срРНК+11 приводила к образованию многочисленных корректных транскриптов, >60%, с трансгена рMG3272-26A>G (фиг. 9A-B и фиг. 21G) и эффективности редактирования ДНК (приблизительно 70%; фиг. 9C).

[0213] Анализ TIDE интегрированных минигенов после редактирования с использованием AsCas12a-срРНК+11 позволил определить гетерогенную совокупность делеций (фиг. 11A-C). Редактированные варианты клонировали в миниген рMG3272-26A>G для анализа полученных продуктов сплайсинга. Анализ последовательности редактированных участков показал высокую частоту 18-нуклеотидной делеции, которую также можно наблюдать при хроматографической деконволюции (фиг. 11A-C) вместе с персистированием мутации 3272-26A>G (фиг. 9D). Примечательно, что анализ сплайсинга показал, что частая 18-нуклеотидная делеция (9/34 клонов) полностью восстанавливала

корректный сплайсинг (фиг. 9D и фиг. 11D). Большинство оставшихся отредактированных участков встречались с низкой частотой (1/34 клонов) и приводили к корректному сплайсингу; в нескольких случаях определяли дополнительный продукт транскрипции (фиг. 11D). В совокупности, AsCas12a в комбинации с одиночной гРНК (имеющей протоспейсерный домен *cr*РНК+11) приводили к небольшим делециям выше мутации 3272-26A>G в модели минигена и восстановлению эффективности при дефекте сплайсинга CF. Приблизительно 70% анализируемых событий редактирования вносили вклад в эффективное восстановление нормального сплайсинга в клетках.

[0214] Подавляющее большинство пациентов CF являются компаундными гетерозиготами по мутации 3272-26A>G. В связи с этим, важно оценивать потенциальные нецелевые эффекты AsCas12a-*cr*РНК+11, например, потенциальную модификацию в аллеле дикого типа. Расщепляющие свойства AsCas12a-*cr*РНК+11 анализировали в стабильных линиях клеток, экспрессирующих *p*MG3272-26WT или *p*MG3272-26A>G (клетках HEK293/3272-26WT и HEK293/3272-26A>G, соответственно). Как показано на фиг. 10A, эффективность расщепления *cr*РНК+11 снижалась с приблизительно 80%, определяемых для HEK293/3272-26A>G, до менее чем 7,5% для HEK293/3272-26WT. Таким образом, целевой эффект AsCas12a-*cr*РНК+11, т.е. эффект мутации 3272-26A>G, соответствовал по меньшей мере 10-кратному дифференциальному расщеплению по сравнению с аллелем дикого типа или нецелевым аллелем. В реципрокных исследованиях с использованием *cr*РНК+11/*wt*, нацеленной на последовательность CFTR 3272-26WT, AsCas12a демонстрировал высокую эффективность расщепления (приблизительно 90%) в клетках HEK293/3272-26WT и низкую частоту образования инсерционно-делеционных мутаций (менее 15%) в клетках HEK293/3272-26A>G (фиг. 10A). В совокупности, эти исследования показали высокую аллельную дискриминацию в случае AsCas12a с выбранной гРНК, имеющей протоспейсерный домен *cr*РНК+11.

[0215] Специфичность AsCas12a-*cr*РНК+11, вводимой с помощью лентивирусных векторов, в отношении интрона дикого типа дополнительно подтверждали в эпителиальных клетках Caco-2, эндогенно экспрессирующих ген CFTR дикого типа. Длительная экспрессия нуклеаз (через 10 дней после трансдукции), которая, как показано, в значительной степени способствует неспецифическому расщеплению (Petris, G., et al., 2017, *Nat. Commun.* 8:1-9), не приводила к какому-либо неспецифическому редактированию CFTR выше фоновых уровней TIDE (приблизительно 1%; см. Brinkman, E. K., et al., 2014, *Nucleic Acids Res.* 42:1-8); в то время как AsCas12a-*cr*РНК+11/*wt* приводила к эффективному редактированию гена CFTR (более 80%; фиг. 10B).

[0216] Для исключения изменений сплайсинга после потенциального расщепления интронов дикого типа оценивали профиль сплайсинга в клетках HEK293/3272-26WT и Caco-2. Не наблюдали значительных изменений после обработки AsCas12a в комбинации с *cr*РНК+11/*wt* или *cr*РНК+11 (фиг. 12A-B).

[0217] Специфичность редактирования AsCas12a-*cr*РНК+11 также тестировали в терминах нецелевого расщепления посредством полногеномного исследования с

помощью GUIDE-seq (Nissim-Rafinia, M. et al., 2000, Hum. Mol. Genet. 9:1771-1778, Kashima, T. et al., 2007, Hum. Mol. Genet. 16, 3149-3159). Нецелевое профилирование редактирования генома AsCas12a-срPHK+11 в клетках HEK293/3272-26A>G (Tsai, S. Q., et al., 2015, Nat. Biotechnol. 33:187-198; Kleinstiver, B. P., et al., 2016, Nat. Biotechnol. 34:869-874) показало очень высокую специфичность, о чем свидетельствует исключительное редактирование локуса 3272-26A>G CFTR, в то время как неспецифическое расщепление во втором аллеле или любых других геномных локусах определить не смогли (фиг. 10C).

6.8.2. Пример 2: Коррекция сплайсинговой мутации 3272-26A>G в органоидах посредством CRISPR-Cas12a

[0218] Органоиды человека представляют собой почти физиологическую модель для трансляционных исследований (Fatehullah, A., et al., 2016, Nat. Cell Biol., 18:246-254). Кишечные органоиды пациентов с CF являются полезными инструментами для оценки активности и функционального восстановления CFTR (Dekkers, J. F., et al., 2013, Nat. Med., 19:939-945; Dekkers, J. F., et al., 2016, Sci. Transl. Med. 8:344ra84; Sato, T., et al., 2011, Gastroenterology, 141:1762-1772).

[0219] Исследовали потенциал спасения фенотипа CF с помощью AsCas12a-срPHK+11 на кишечных органоидах человека, являющихся компаундными гетерозиготами по мутации 3272-26A>G (3272-26A>G/4218insT).

6.8.2.1. Материалы и способы

6.8.2.1.1. Культивирование и трансдукция кишечных органоидов человека

[0220] Культивировали кишечные органоиды людей с кистозным фиброзом, как определено, являющихся компаундными гетерозиготами по сплайсинговой мутации 3272-26A>G (3272-26A>G/4218insT; n=1, CF-86) (см. Dekkers, J. F., et al., 2013, Nat. Med., 19:939-945).

[0221] Культивируемые органоиды разделяли на отдельные клетки с использованием трипсин-ЭДТА 0,25% (Gibco). Приблизительно $3-4 \times 10^4$ отдельные клетки ресуспендировали с 25 мкл лентивирусных векторов (0,25-1 RTU) и инкубировали в течение 10 мин при 37°C (см. Vidovic, D., et al., 2016, Am. J. Respir. Crit. Care Med., 193:288-298). К клеткам и раствору вектора добавляли равный объем матригеля (Corning) и смесь высевали в 96-луночный планшет. После полимеризации каплю матригеля при 37°C в течение 7 минут клетки покрывали 100 мкл полной среды для культивирования органоидов (Dekkers, J. F., et al., 2013, Nat. Med., 19:939-945), содержащей 10 мкМ ингибитора Rock (Y-27632 2HCl, Sigma Aldrich, Y0503), на три дня для обеспечения оптимального разрастания отдельных стволовых клеток (см. Sato, T., et al., 2011, Gastroenterology, 141:1762-1772). Среду заменяли каждые 2-3 дня до дня анализа органоидов.

6.8.2.1.2. Анализ форсколин-индуцированного набухания (FIS) и анализ активности CFTR в кишечных органоидах

[0222] Через четырнадцать дней после трансдукции с использованием вирусного вектора органоиды инкубировали в течение 30 минут с 0,5 мкМ кальцеина зеленого

(Invitrogen, C3-100MP) и анализировали посредством конфокальной микроскопии живых клеток с 5-кратным объективом (LSM800, Zeiss; программное обеспечение Zen Blue, версия 2.3). Площадь стационарного состояния органоидов определяли посредством вычисления абсолютной площади (плоскость $\mu\text{м}^2$) каждого органоида с использованием программного обеспечения ImageJ с помощью алгоритма Analyse Particle. Частицы органоидов с площадью менее 1500 $\mu\text{м}^2$ считали дефектными и исключали из анализа. Данные усредняли для каждого отдельного эксперимента и строили коробчатую диаграмму, соответствующую средним значениям $\pm\text{SD}$.

[0223] Анализ FIS осуществляли посредством стимуляции органоидов 5 мкМ форсколина. Эффект форсколина в отношении органоидов анализировали посредством конфокальной микроскопии живых клеток при 37°C в течение 60 мин, при этом получали одно изображение каждые 10 мин. Площадь каждого органоида (плоскость $\mu\text{м}^2$) в каждый момент времени вычисляли с использованием ImageJ, как описано выше. Статистический анализ осуществляли с помощью одностороннего дисперсионного анализа (ANOVA) в GraphPad Prism версии 6. Различия размера органоидов считали статистически значимыми при $P < 0,05$.

6.8.2.2. Результаты

[0224] Профиль сплайсинга интрона 19 CFTR в обработанных контрольной *срПНК* и необработанных органоидах демонстрировал два варианта транскрипта (фиг. 13А); различия размера и количества вариантов соответствуют гетерозиготности по мутации 3272-26А>G в органоидах и полученным ранее данным (Beck, S., et al., 1999, *Hum. Mutat.* 14:133-144). При лентивирусной доставке *AsCas12a-срПНК+11* наблюдали почти полное исчезновение измененного продукта сплайсинга, генерируемого аллелем 3272-26А>G (+25 н.), что свидетельствует об эффективной коррекции аномального сплайсинга интрона 19 (фиг. 13А и фиг. 14А-В). Ряд инсерционно-делеционных мутаций, индуцированных *AsCas12a-срПНК+11*, оцениваемых с помощью анализа эндонуклеазы T7 I, демонстрировал приблизительно 30% редактирование локуса CFTR (фиг. 13В), что соответствует наблюдаемому восстановленному сплайсингу (фиг. 13А).

[0225] При анализе глубокого секвенирования определяли 40,25% инсерционно-делеционных мутаций в локусе CFTR (39,77% в аллеле 3272-26А>G и 0,48% в другом аллеле, фиг. 13С), таким образом, подтверждая высокую эффективность редактирования *AsCas12a-срПНК+11*, наблюдаемого в анализе эндонуклеазы T7 I (фиг. 13В). Дальнейший анализ последовательности показал, что 84,9% ридов секвенирования, включающих мутацию 3272-26А>G, содержали делеции переменной длины, в то время как риды секвенирования, соответствующие аллелю дикого типа (3272-26WT), содержали только 0,9% инсерционно-делеционных мутаций, что, таким образом, свидетельствует о 94-кратной аллельной дискриминации (фиг. 13D).

[0226] В соответствии с предыдущими сообщениями (van Overbeek, M., et al., 2016, *Mol. Cell*, 63, 63:633-646), и несмотря на наблюдаемую гетерогенность редактирования, события репарации в органоидах пациентов были в значительной степени схожи с

наблюдаемыми в модели pMG3272-26A>G, при этом 18-нуклеотидная делеция представляла собой наиболее часто наблюдаемую репарацию (ср. фиг. 13C и фиг. 9D). Примечательно, что эта 18-нуклеотидная делеция, а также большинство других описанных инсерционно-делеционных мутаций (с частотой выше 0,5% от всех событий репарации ДНК (фиг. 13C)) приводили к коррекции сплайсинга при клонировании в модели pMG3272-26 (фиг. 9D).

[0227] Образование просвета в кишечных органоидах (набухание) зависит от активности анионного канала CFTR (Dekkers, J. F., et al., 2013, Nat. Med. 19, 939-945; схематически показано на фиг. 13E), и, таким образом, его можно использовать для измерения восстановления функции CFTR после редактирования генома AsCas12a-срПНК+11. Через четырнадцать дней после введения AsCas12a-срПНК+11 органоиды пациентов демонстрировали увеличенную в 2,5 раз площадь просвета по сравнению с просветом в контрольных и необработанных образцах, что свидетельствует о восстановлении функции канала после репарации аллеля CFTR 3272-26A>G (фиг. 13F-G). Примечательно, что не наблюдали значимых различий размера органоидов в случае обработки AsCas12a-срПНК+11 или трансдукции кДНК CFTR WT (фиг. 13G), что дополнительно свидетельствует о значительной эффективности системы AsCas12a-срПНК+11 для редактирования генотипа и реверсирования фенотипа мутации 3272-26A>G.

[0228] Другим анализом, используемым для оценки активности CFTR, является анализ форсколин-индуцированного набухания (FIS) (Dekkers, J. F., et al., 2013, Nat. Med., 19, 939-945; фиг. 13F-H). В соответствии с исследованиями набухания органоидов (фиг. 13G), анализ FIS показал увеличение площади AsCas12a-редактированных органоидов в 2,8 раз, аналогично результатам, полученным при лентивирусной доставке кДНК CFTR WT (фиг. 13H и фиг. 14C).

[0229] Модификации AsCas12a-срПНК+11 дефекта 3272-26A>G в органоидах CFTR приводили к эффективной репарации дефекта сплайсинга интрона 19, что приводило к полному восстановлению эндогенного белка CFTR.

6.8.3. Пример 3: Коррекция сплайсинговой мутации CFTR 3849+10KbC>T в клетках посредством CRISPR-Cas12a

[0230] При мутации 3849+10kbC>T в CFTR образуется новый донорный участок сплайсинга внутри интрона 22 гена CFTR, что приводит к инсерции нового криптического экзона из 84 нуклеотидов, приводящей к стоп-кодону в рамке считывания и последующей продукции укороченного нефункционального белка CFTR. Исследовали стратегию редактирования генома с использованием AsCas12a в комбинации с различными гРНК Cas12a для коррекции сплайсинговой мутации.

6.8.3.1. Материалы и способы

6.8.3.1.1. Олигонуклеотиды: гидовая РНК

[0231] Конструировали гРНК AsCas12a, нацеленную на ген CFTR, имеющий сплайсинговую мутацию 3849+10KbC>T, с протоспейсерными доменами,

соответствующими, без ошибочного спаривания, целевым доменам, приведенным в таблице 4. Также конструировали гРНК AsCas12a, нацеленную на последовательность дикого типа. Каждую гРНК конструировали так, чтобы она имела петлевой домен, состоящий из последовательности UAAUUUCUACUCUUGUAGAU (SEQ ID NO: 25). В этом примере гРНК обозначают в соответствии с их протоспейсерными доменами, например, сРНК+14.

Таблица 4				
Название*	Целевой домен[^]	SEQ ID NO:	Целевой домен и окружающая геномная последовательность[#]	SEQ ID NO:
+14	AGGGTGTCTTACTC ACCATTTTA	39	tcc <u>TTTC</u> AGGGTGTCTTACTCACC ATTTTAata	125
+14/wt	AGGGTGTCTTACTC GCCATTTTA	454	tcc <u>TTTC</u> AGGGTGTCTTACTCGCC ATTTTAata	126
*значение указывает на расстояние последовательности РАМ от мутации; + указывает на положение целевого домена до мутации; ^положение мутации 3849+10KbC>T выделено более крупным полужирным шрифтом; # РАМ подчеркнута; строчными буквами указаны нуклеотиды вокруг целевого участка				

6.8.3.1.2. Другие олигонуклеотиды

[0232] Конструировали и получали олигонуклеотиды для ПЦР, РТ-ПЦР, клонирования, сайт-специфического мутагенеза и секвенирования. Эти олигонуклеотиды приведены в таблице 5.

Таблица 5			
Праймеры для ПЦР и сайт-специфического мутагенеза для CFTR 3849+10KbC>T			
Олигонуклеотиды для клонирования минигена			SEQ ID NO:
Праймер 9f	XhoI ex 22 CFTR for1	ATATctcgagATGCGATCTGTGAGCCGA GTCTTTAA	127
Праймер 10f	BsmBI_int22_ne w ex for2	tacgtctcATAtATTCAGTGGGTATAAGCA GCATATTCTC	128
Праймер 11f	BamHI- BsmBI_ex 23 for3	tatggatccagatcgctctcgAAAGGTCAGTGATA AAGGAAGTCTGCAT	129
Праймер 12r	int22 BsmBI- BamHI rev1	tatggatccagatcgctctcgATATAGGTTTCAGGA CTCTGCAAATTAAATTTC	130
Праймер 13r	new ex_BsmBI rev2	atcgtctctCTTtAGGCTTCTCAGTGATCTG TTGAATAAG	131

Праймер 14r	ex 23_NotI rev3	atagtgcggccgcCTGTGGTATCACTCCAAA GGCTTTC	132
Олигонуклеотиды для сайт-специфического мутагенеза			
Праймер 15mf	MUT 3849 10kb C-T for	CCATCTGTTGCAGTATTAATAATGGtGA GTAAGACACCCTGAAAGG	133
Праймер 16mr	MUT 3849 10kb C-T rev	CCTTTCAGGGTGTCTTACTCaCCATTTT AATACTGCAACAGATGG	134
Олигонуклеотиды для RT-ПЦР			
Праймер 17	T7F2 (x pCI)	TACTTAATACGACTCACTATAGGCTA GCCTCG	135
Праймер 9f	XhoI ex 22 CFTR for1	ATATctcgagATGCGATCTGTGAGCCGA GTCTTTAA	127
Праймер 10f	BsmBI_int22_ne w ex for2	tacgtctcATAAtATTCAGTGGGTATAAGCA GCATATTCTC	128
Праймер 13r	new ex_BsmBI rev2	atcgtctctCTTtAGGCTTCTCAGTGATCTG TTGAATAAG	131
Праймер 14r	ex 23_NotI rev3	atagtgcggccgcCTGTGGTATCACTCCAAA GGCTTTC	132
Олигонуклеотиды для ПЦР для анализа TIDE			
Праймер 18f	CFTR 10kb int 22 for	CTGCTTTCTCCATTTGTAGTCTCTTG	136
Праймер 19r	CFTR 10kb int 22 rev	TGCTGGTAATGCATGATATCTGACAC	137
*for=прямой; rev=обратный; последовательности экзонов указаны прописными буквами; последовательности интронов указаны строчными буквами			

6.8.3.1.3. Получение плазмид WT и плазмид минигена для мутации 3849+10KbC>T CFTR

[0233] Плазмидные модели минигенов получали для имитации профиля сплайсинга гена CFTR, соответствующего области, включающей экзоны 22, 23 и части интрона 22. Плазмида pMG3849+10kbWT содержала дикого типа аллель; плазмида pMG3849+10kbC>T содержала мутантный аллель (фиг. 15).

[0234] Миниген дикого типа, соответствующий локусу CFTR3849+10kb, клонировали в плазмиду pcDNA3 (Invitrogen). Праймеры 9f, 10f, 11f, 12r, 13r и 14r использовали для ПЦР-амплификации ДНК CFTR последовательности дикого типа экзонов 22, 23 и части интрона 22 из генома клеток НЕК293Т. Амплифицированную ДНК

клонировали в плазмиду pcDNA3 для получения плазмиды pMG3849+10kbWT, содержащей аллель дикого типа экзонов 22, 23 и части интрона 22. Праймеры 15mf и 16mr использовали для осуществления сайт-специфического мутагенеза минигена дикого типа, находящегося в pMG3849+10kbWT, для получения мутации 3849+10kbC>T, создавая плазмиду pMG3849+10kbC>T.

[0235] Последовательности, кодирующие гидовую РНК (таблица 4) клонировали в коммерчески доступную плазмиду для получения pY108 lentiAsCas12a (плазмида Addgene № 84739) с использованием участков рестрикции BsmBI, как описано выше (см. фиг. 22C и фиг. 22D).

6.8.3.1.4. Линии клеток

[0236] Клетки колоректальной аденокарциномы человека (Caco-2), эмбриональные клетки почки человека HEK293T и клетки HEK293 получали в American Type Culture Collection.

6.8.3.1.5. Трансфекция

[0237] Клетки Caco-2, HEK293T и HEK293, стабильно экспрессирующие pMG3849+10kbWT (линия клеток HEK293/pMG3849+10kbWT) или 3849+10kbC>T (линия клеток HEK293/pMG3849+10kbC>T), подготавливали и культивировали, как описано в примере 1.

[0238] Клетки высевали в количестве $1,5 \times 10^5$ клеток/лунку в 24-луночные планшеты и трансфицировали с использованием 100 нг Bgl-II-линеаризованных плазмид минигена pMG3849+10kbWT или pMG3849+10kbC>T, комплексированных с полиэтиленимином (PEI), и 700 нг плазмиды pY108 lentiAsCas12a, кодирующей и нуклеазу Cas, и последовательности гРНК. Культивирование, трансфекцию и селекцию клеток по интеграции плазмиды осуществляли, как описано в примере 1. Клоны отдельных клеток выделяли и охарактеризовывали по экспрессии конструкции минигена. Трансфицированные клетки собирали через три дня после трансфекции.

6.8.3.1.6. Получение лентивирусных векторов

[0239] Лентивирусные частицы продуцировали в клетках HEK293T, как описано в примере 1.

6.8.3.1.7. Трансдукция

[0240] Для исследования трансдукции клетки HEK293/pMG3849+10kbWT, HEK293/pMG3849+10kbC>T и Caco-2 высевали при плотности 3×10^5 клеток/лунку в 12-луночные планшеты и трансдуцировали, как описано в примере 1.

6.8.3.1.8. Анализ транскрипта

[0241] Профиль сплайсинга, характерный для мутантных минигенов или минигенов дикого типа, измененных или корректных, соответственно, оценивали посредством RT-ПЦР и анализа секвенирования в трансфицированных клетках HEK293T (см. Beck, S., et al., 1999, Hum. Mutat., 14:133-144). РНК выделяли и амплифицировали целевые области посредством RT-ПЦР, как описано выше. Олигонуклеотиды приведены в таблице 5.

6.8.3.1.9. Детекция индуцированных нуклеазами геномных мутаций

[0242] Выделяли геномную ДНК и амплифицировали целевой локус посредством ПЦР, как описано в примере 1. Очищенные продукты ПЦР секвенировали и анализировали с использованием TIDE (см. праймеры 18f и 19r в таблице 4; Brinkman, E.K., et al., 2014, *Nucleic Acids Res.*, 42: 1-8) или программного обеспечения SYNTHEGO ICE (см. Hsiau, T., et al., 2018, *bioRxiv*, Jan. 20, 1-14). В некоторых исследованиях редактирование ДНК также измеряли с использованием анализа эндонуклеазы T7 1 (T7E1) (New England BioLabs) по инструкциям производителя и как описано ранее (см. Petris, G., et al., 2017, *Nat. Commun.* 8:1-9).

6.8.3.1.10. GUIDE-seq

[0243] Приблизительно 2×10^5 клеток HEK293T трансфицировали с использованием реагента для трансфекции Lipofectamine 3000 (Invitrogen) с использованием 1 мкг плазмиды lenti Cas12a pY108 и 10 пмоль dsODN, сконструированных по оригинальному протоколу GUIDE-seq (см. Tsai, S. Q., et al., 2015, *Nat. Biotechnol.*, 33:187-198). Культивирование клеток, выделение геномной ДНК и расщепление силой сдвига, конструирование библиотек, секвенирование и анализ осуществляли способами, известными специалистам в этой области (см. пример 1; также Montagna, C., et al., 2018, *Mol. Ther. Nucleic Acids*, 12:453-462; Casini, A., et al., 2018, *Nat. Biotechnol.*, 36:265-271).

6.8.3.1.11. Направленное глубокое секвенирование

[0244] Интересующий локус 3849+10Kb C>T/F508 амплифицировали из геномной ДНК, выделенной из кишечных органоидов человека через 14 дней после трансдукции с помощью lentiAsCas12a-срPHK +14 или контроля (CTR) с использованием высокоточной полимеразы Phusion (Thermo Scientific) и праймеров 18f и 19r. Ампликоны индексировали посредством ПЦР, количественно анализировали, объединяли, секвенировали с помощью системы Illumina Miseq и анализировали необработанные данные секвенирования (файлы FASTQ), как описано в примере 1.

6.8.3.2. Результаты

[0245] Модель минигена, содержащая экзон 22, часть интрона 22 и экзон 23 (pMG3849+10kbWT и pMG3849+10kbC>T; см. фиг. 15), успешно имитировала дефект сплайсинга CFTR (фиг. 16A-B). Редактирование с использованием AsCas12a-срPHK+14 позволяло корректировать нарушение сплайсинга 3849+10kbC>T в модели минигена (фиг. 17A). Лентивирусная трансдукция AsCas12a-срPHK+14 в клетки Caco-2 приводила к инсерционно-делеционным мутациям с почти фоновыми уровнями (3,5%) в гене CFTR дикого типа. В отличие от этого, AsCas12a-срPHK+14/wt, нацеленный на последовательность дикого типа в той же области, приводила к приблизительно 70% редактирования CFTR. Эти данные свидетельствуют о специфичности AsCas12a-срPHK+14 в отношении мутантного аллеля (фиг. 17B).

[0246] Для дальнейшей верификации специфичности AsCas12a-срPHK+14 и исследования полногеномной нецелевой активности осуществляли анализ GUIDE-seq в клетках HEK293T. В исследовании наблюдали полное отсутствие ридов

последовательности в локусе CFTR или любом другом нецелевом участке; все 631 рид секвенирования, соответствующий спонтанным разрывам ДНК, свидетельствовали о корректном осуществлении анализа GUIDE-seq (фиг. 17C).

6.8.4. Пример 4: Коррекция сплайсинговой мутации CFTR 3849+10KbC>T в органоидах посредством CRISPR-Cas12a

[0247] Исследовали потенциал спасения фенотипа CF с помощью AsCas12a-срРНК+14 в кишечных органоидах человека, являющихся компаундными гетерозиготами по мутации 3849+10kbC>T (3849+10kbC>T/ΔF508).

6.8.4.1. Материалы и способы

6.8.4.1.1. Культивирование и трансдукция кишечных органоидов человека

[0248] Культивировали кишечные органоиды людей с кистозным фиброзом, как определено, являющихся компаундными гетерозиготами по мутации 3849+10Kb C>T (3849+10Kb C>T/F508, n=1, CF-110) (см. Dekkers, J. F., et al., 2013, Nat. Med., 19:939-945). Культивируемые органоиды обрабатывали и трансдуцировали, как описано выше в примере 2.

6.8.4.1.2. Анализ форсколин-индуцированного набухания (FIS) и анализ активности CFTR в кишечных органоидах

[0249] Через четырнадцать дней после трансдукции с использованием вирусного вектора органоиды инкубировали в течение 30 минут с 0,5 мкМ кальцеина зеленого (Invitrogen, C3-100MP) и анализировали посредством конфокальной микроскопии живых клеток с 5-кратным объективом (LSM800, Zeiss; программное обеспечение Zen Blue, версия 2.3). Площадь стационарного состояния органоидов определяли посредством вычисления абсолютной площади (плоскость x_{y} , $\mu\text{м}^2$) каждого органоида с использованием программного обеспечения ImageJ с помощью алгоритма Analyse Particle. Частицы органоидов с площадью менее 3000 $\mu\text{м}^2$ считали дефектными и исключали из анализа. Данные усредняли для каждого отдельного эксперимента и строили коробчатую диаграмму, соответствующую средним значениям $\pm\text{SD}$. Анализ FIS осуществляли посредством стимуляции органоидов, и анализ осуществляли посредством конфокальной микроскопии живых клеток и статистический анализ осуществляли, как описано выше.

6.8.4.2. Результаты

[0250] Эффективной и точной коррекции дефекта сплайсинга CFTR 3849+10kbC>T достигали с использованием AsCas12a в комбинации с одиночной аллель-специфической срРНК в органоидах пациента. Lentивирусная доставка AsCas12a-срРНК+14 приводила к 31% инсерционно-делеционных мутаций в локусе CFTR (фиг. 18A и фиг. 19), что приводило к восстановлению набухания органоида, сравнимому со спасением, наблюдаемым после добавления кДНК гена CFTR дикого типа (фиг. 18B-C).

6.8.5. Пример 5: Сравнение редактирования CRISPR-Cas9 и CRISPR-Cas12a сплайсинговой мутации CFTR 3272-26A>G в клетках

[0251] CRISPR-Cas9 является общепринятой системой выбора для редактирования генома, и интерес представляет сравнение способности системы SpCas9, в которой

используют множество огРНК, с системой AsCas12a, в которой используют одиночные гРНК, редактировать мутацию CFTR 3272-26A>G.

6.8.5.1. Материалы и способы

[0253] Конструировали огРНК SpCas9, нацеленные на ген CFTR, имеющий сплайсинговую мутацию 3272-26A>G. Целевые домены приведены в таблице 6.

Таблица 6				
Название*	Целевой домен[^]	SEQ ID NO:	Целевой домен и окружающая геномная последовательность #	SEQ ID NO:
-88	AATCATATCACAATGTCAT	138	aatAATCATATCACAATGTCAT <u>TTGG</u> tta	146
-62	GTACCTGAAAAAGACTAAAT	139	cttGTACCTGAAAAAGACTAAAT <u>TTAG</u> aat	147
-52	ATAATATCTTGTACCTGAA	140	ttcATAATATCTTGTACCTGAA <u>AAAG</u> act	148
-47	ATTCTAATTTAGTCTTTTC	141	attATTCTAATTTAGTCTTTTC <u>AGG</u> tac	149
-0	TTTTGTGTTTATGTTATTTG	142	acaTTTTGTGTTTATGTTATTTG <u>GCAG</u> tgt	150
+9	CTGCCTGTGAAATATTTCCA	143	ctcCTGCCTGTGAAATATTTCCA <u>ATAG</u> aaa	151
+10	GTTATTTGCAGTGTTTCTA	144	tatGTTATTTGCAGTGTTTCTA <u>ATGG</u> aaa	152
+22	TTTTCTATGGAAATATTTCA	145	gtgTTTTCTATGGAAATATTTCA <u>ACAG</u> gca	153
*значение указывает на расстояние последовательности РАМ от мутации; + или - указано положение целевого домена до или после мутации, соответственно; ^положение мутации 3272-26A>G выделено полужирным шрифтом; # РАМ подчеркнута; строчными буквами указаны нуклеотиды вокруг целевого участка				

[0253] Последовательности, кодирующие огРНК, клонировали в плазмиду lentiCRISPR v1 (плазида Addgene № 49535), экспрессирующую SpCas9, с использованием участков рестрикции BsmBI. Продукцию лентивирусных частиц, трансдукцию и анализ редактирования гена CFTR осуществляли, как описано в примере 1.

6.8.5.2. Результаты

[0254] Профиль сплайсинга pMG3272-26A>G оценивали после котрансфекции со сконструированными огРНК в комбинации с SpCas9 (фиг. 21A). Наблюдали повышенный

уровень корректного продукта сплайсинга с использованием SpCas9 с по меньшей мере 4 парами оgРНК (фиг. 21А). Анализ делеций, индуцированных парами оgРНК, показал, что полосу вырезала SpCas9 (фиг. 21С), в отличие от результатов, наблюдаемых для AsCas12a (фиг. 21D).

[0255] Неожиданно, когда тестировали коррекцию сплайсинга интрона 19 CFTR в клетках HEK293, стабильно трансфицированных с использованием минигена pMG3272-26A>G (HEK293/3272-26A>G), все пары SpCas9-оgРНК не могли корректировать дефект сплайсинга, что позволяет предположить неэффективное расщепление на хромосомном уровне (фиг. 21Е-F). В отличие от этого, AsCas12a-срРНК+11 приводила к образованию множества корректных транскриптов, >60%, с трансгена pMG3272-26A>G (фиг. 9А-В и фиг. 21G) и эффективному редактированию ДНК (приблизительно 70%; фиг. 9С), четко свидетельствующему о лучших свойствах AsCas12a.

6.8.6. Пример 6: Сравнение редактирования CRISPR-Cas9 и CRISPR-Cas12a сплайсинговой мутации CFTR 3849+10KbC>T в клетках и органоидах

[0256] Сравнивали способность системы SpCas9, в которой используют множество оgРНК, с системой AsCas12a, в которой используют одиночные гРНК, редактировать мутацию CFTR 3849+10KbC>T в клетках и органоидах.

6.8.6.1. Материалы и способы

[0257] Конструировали оgРНК SpCas9, нацеленные на ген CFTR, имеющий сплайсинговую мутацию 3849+10KbC>T. Целевые домены приведены в таблице 7.

Таблица 7				
Название*	Целевой домен	SEQ ID NO:	Целевой домен и окружающая геномная последовательность[#]	SEQ ID NO:
-95	ATTCAATTATAATC ACCTTG	154	aagATTCAATTATAATCACCT TGTGGatc	160
-99	AACTGAAATTTAG ATCCACA	155	gtcAACTGAAATTTAGATCCA CAAGGtga	161
-143	CTTGATTTCTGGAG ACCACA	156	catCTTGATTTCTGGAGACCA CAAGGtaa	162
+34	GAAAGGAAATGTT CTATTCA	157	cttGAAAGGAAATGTTCTATT CATGGtac	163
+119	CACCTCCTCCCTGA GAATGT	158	atgCACCTCCTCCCTGAGAAT GTTGGatc	164
+125	TTGATCCAACATTC TCAGGG	159	atcTTGATCCAACATTCTCAG GGAGGagg	165
*значение указывает на расстояние последовательности PAM от мутации; + или -				

указано положение целевого домена до или после мутации, соответственно; # РАМ подчеркнута; строчными буквами указаны нуклеотиды вокруг целевого участка

[0258] Последовательности, кодирующие огРНК, клонировали в плазмиду lentiCRISPR v1 (плазмида Addgene № 49535). Продукцию лентивирусных частиц, трансдукцию, клеточные исследования редактирования гена CFTR и исследования органоидов осуществляли, как описано в примерах 3 и 4.

6.8.6.2. Результаты

[0259] Более общепринятую стратегию делеции мутации 3849+10kbC>T посредством SpCas9 с использованием двух огРНК осуществляли в клетках HEK293 и Caco-2 (фиг. 20A-D). Выбранные пары огРНК приводили к различным направленным делециям после расщепления парами SpCas9-огРНК, при этом % делеции находился в диапазоне от 21% до 56% в клетках HEK293T и 35% до 70% в клетках Caco-2.

[0260] В полученных из пациента органоидов огРНК-95/+119, по-видимому, представляет собой лучшую пару огРНК для достижения эффективной делеции интрона и коррекции сплайсинга. Не смотря на это, в органоидах пациента делеция до 33% локуса CFTR 3849+10kb индуцировала увеличение области органоидов, которая является значимо меньшей, чем площадь, измеряемая после лентивирусной доставки кДНК CFTR дикого типа (фиг. 20E-G). Кроме того, хотя совокупность огРНК конструировали *in silico* для минимизации нецелевой активности Cas9 (Doench, J. G., et al., 2016, Nat. Biotechnol., 34:184-191), анализ GUIDE-seq огРНК+119 показал 11 нежелательных нецелевых участков на всем протяжении генома (фиг. 20H).

[0261] В отличие от этого, коррекции дефекта сплайсинга CFTR 3849+10kbC>T эффективно и точно достигали с использованием AsCas12a в комбинации с одной аллель-специфической срРНК в органоидах пациента (пример 4), аналогично репарации сплайсинга варианта 3272-26A>G (пример 2). Стратегия AsCas12a оказалась лучше общепринятой SpCas9-индуцированной генетической делеции, достигаемой в комбинации с многочисленными огРНК.

6.8.7. Пример 7: Коррекция мутации CEP290 IVS26+1655A>G посредством CRISPR-Cas12a

6.8.7.1. Материалы и способы

6.8.7.1.1. Дизайн гРНК

[0262] Мутация CEP290 IVS26+1655A>G ассоциирована с врожденным амаврозом Лебера (LCA). Конструировали молекулу гРНК Cas12a, имеющую нацеливающую последовательность, соответствующую целевому домену в гене CEP290, имеющем мутацию IVS26+1655A>G (таблица 8), без ошибочно спаренных оснований между нацеливающей последовательностью и комплементом целевого домена. Петлевой домен в 5'-направлении относительно целевого домена в молекуле гРНК Cas12a, состоит из последовательности UAAUUUCUACUCUUGUAGAU (SEQ ID NO: 25).

Таблица 8

Ген (ассоциированное заболевание)	Частичная последовательность гена	SEQ ID NO:	PAM и целевой домен	SEQ ID NO:
СЕР290 (IVS26+1655A>G) (врожденный амавроз Лебера)	GAGCCACCGCACCTG GCCCCAGTTGTAATT/g tga(a>g)tatctcatatccctat tggcagtgtc	<u>166</u>	<u>CCCCAGTT</u> GTAATTgtg agtatctcat	167
Последовательность PAM подчеркнута; нуклеотиды экзона показаны прописными буквами; интрон нуклеотиды показаны строчными буквами; мутация показана полужирным шрифтом				

[0263] Используя стандартную сборку способом Golden Gate, последовательность ДНК, кодирующую гРНК Cas12a, клонировали в плазмиду pY108 lentiAsCas12a, сконструированную так, чтобы кодировать RR AsCas12a, для получения плазмиды, кодирующей RR AsCas12a и гРНК Cas12a. Также получали плазмиду pY108 lentiAsCas12a, кодирующую RR AsCas12a и рандомизированную укороченную гРНК, для использования в качестве контроля.

6.8.7.1.2. Получение минигена

[0264] ПЦР с использованием праймеров, локализованных в интронах 25 (прямой GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTCGGCCGCTCTTTCTCAAAAGTGGC) (SEQ ID NO: 168) и 27 (обратный GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGCTTGGTGGGGTTAAGTACAGG) (SEQ ID NO: 169) СЕР290 осуществляют на геномной ДНК от здорового индивидуума и продукт ПЦР клонируют в вектор pDONR с использованием системы Gateway. С помощью сайт-специфического мутагенеза мутацию с.2991+1655A>G встраивают с использованием праймеров mut for (CACCTGGCCCCAGTTGTAATTGTGAGTATCTCATACCTATCCC) (SEQ ID NO: 170) и mut rev (GGGATAGGTATGAGATACTCACAATTACAAGTGGGGCCAGGTG) (SEQ ID NO: 171). Оба вектора pDONR (мутантный и дикого типа (WT)) секвенировали и клонировали в принимающий вектор pCi-Neo-Rho-Splicing, позволяющий клонировать интересующий фрагмент СЕР290 между экзонами 3 и 5 RHO под контролем предраннего промотора цитомегаловируса, как описано ранее (Shafique, S. et al., 2014, PLoS One, 9:e100146), получая конструкции минигенов pMG СЕР290 WT IVS26+1655A или pMG СЕР290 LCA IVS26+1655A>G, как описано в Garanto, et al., 2015, Int J Mol Sci, 16(3):5285-5298.

6.8.7.1.3. Культивирование клеток

[0265] Клетки HEK293T и HEK293 получали из American Type Culture Collection (ATCC; www.atcc.org). Клетки HEK293T и клетки HEK293, стабильно экспрессирующие pMG СЕР290 WT IVS26+1655A или pMG СЕР290 LCA IVS26+1655A>G, культивировали

в модифицированной по способу Дульбекко среде Игла (DMEM; Life Technologies), дополненной 10% эмбриональной телячьей сыворотки (FBS; Life Technologies), 10 ед./мл антибиотиков (PenStrep, Life Technologies) и 2 mM L-глутамина при 37°C во влажной камере с 5% CO₂.

[0266] Фибробласты пациента IVS26, как описано в Burnight, et al., 2014, Gene Ther. 21:662-672 и Maeder et al., 2019, Nature Medicine, doi: 10.1038/s41591-018-0327-9, получали и поддерживали в Gibco DMEM/F12+глутамакс (Thermofisher), дополненной 1% пенициллина/стрептомицина, 1% незаменимых аминокислот и 15% эмбриональной телячьей сыворотки.

6.8.7.1.4. Трансфекция и трансдукция

Трансфекция клеток HEK293T

[0267] Трансфекцию осуществляли в клетках HEK293T, посеянных (150000 клеток/лунку) в 24-луночный планшет. Клетки трансфицировали с использованием PEI (полиэтиленимина) с 100 нг плазмид минигенов и 700 нг плазмиды, кодирующей RR AsCas12a и гРНК Cas12a.

Трансдукция клеток HEK293, стабильно экспрессирующих минигены, и фибробластов пациента

[0258] Стабильные линии клеток с минигенами (HEK293/CEP290 WT IVS26+1655A и HEK293/CEP290 LCA IVS26+1655A>G) получали посредством трансфекции с использованием линейаризованных плазмид минигенов (pMG CEP290 WT IVS26+1655A или pMG CEP290 LCA IVS26+1655A>G) в клетки HEK293. Клетки подвергали селекции с помощью 500 мкг/мл G418 через 48 ч. после трансфекции. Отдельные клоны клеток выделяли и охарактеризовывали по экспрессии конструкции минигенов.

[0269] Лентивирусные частицы продуцировали в клетках HEK293T при 80% конфлюэнтности в чашках 10 см. 10 мкг векторной плазмиды для переноса (pY108 lentiRR AsCas12a), 3,5 мкг VSV-G и 6,5 мкг упаковывающей плазмиды Δ8.91 трансфицировали с использованием PEI. После инкубации в течение ночи среду заменяли полной DMEM. Вирусный супернатант собирали через 48 ч. и фильтровали через фильтр PES 0,45 мкм. Лентивирусные частицы концентрировали и очищали с помощью 20% сахарозной подушки посредством ультрацентрифугирования в течение 2 часов при 4°C и 150000×g. Осадки ресуспендировали в подходящем объеме OptiMEM. Аликвоты хранили при -80°C. Титры векторов измеряли в единицах обратной транскриптазы (RTU) способом SG-PERT (см. Casini, A., et al., 2015, J. Virol. 89:2966-2971). Для исследований трансдукции клетки HEK293, стабильно экспрессирующие конструкции минигенов, и фибробласты пациента IVS26 высевали (300000 клеток/лунку) в 12-луночный планшет и через день после посева клетки трансдуцировали с 1-5 RTU лентивирусных векторов. Приблизительно через 48 часов клетки подвергали селекции пуромицином (2-10 мкг/мл) и собирали через 10-14 дней после трансдукции.

6.8.7.1.5. RT-ПЦР и анализ транскрипции

[0270] РНК выделяли с использованием реагента TRIzol™ (Invitrogen) и ресуспендировали в DEPC-ddH₂O. кДНК получали с использованием 500 нг РНК и обратной транскриптазы RevertAid (Thermo Scientific) по инструкциям производителя. Целевые области амплифицировали посредством ПЦР с использованием высокоточной ДНК-полимеразы Phusion (Thermo Fisher) с использованием праймеров ex26for (TGCTAAGTACAGGGACATCTTGC (SEQ ID NO: 172)) и ex27rev (AGACTCCACTTGTTCTTTTAAGGAG (SEQ ID NO: 173)) для минигена CEP290. Продукты ПЦР разделяли на 1-2% агарозном геле. Фрагменты, соответствующие корректно и аномально сплайсированному CEP290 вырезали из геля, очищали с использованием набора для выделения Nucleospin Extract II (MACHEREY-NAGEL) и секвенировали.

6.8.7.2. Результаты

[0271] Транскрипты минигенов анализировали через 2-3 дня после трансфекции и демонстрировали корректный и аномальный сплайсинг в случае pMG CEP290 WT IVS26+1655A и плазмид, соответственно. Избыточное включение криптического экзона 128 п.н. также наблюдали в контрольных клетках, обработанных pY108 lentiRR AsCas12a, имеющим рандомизированную укороченную гРНК, хотя этот аномальный сплайсинг снижался в трансфицированных клетках, обработанных гРНК CEP290. Эти результаты воспроизводили в клетках HEK293, стабильно трансфицированных с использованием минигена pMG CEP290 LCA IVS26+1655A>G и трансдуцированных с использованием лентивирусных векторов CEP290 гРНК/AsCas12a, демонстрируя коррекцию сплайсинга, пропорциональную эффективности редактирования генома. Транскрипты мРНК CEP290 анализировали через 10-14 дней после трансдукции IVS26+1655A>G, и в первичных фибробластах пациента наблюдали, что транскрипт дикого типа значительно повышался, а мутантный транскрипт снижался относительно контроля.

6.8.8. Пример 8: Коррекция мутации USH2A с.7595-2144A>G посредством CRISPR-Cas12a

6.8.8.1. Материалы и способы

6.8.8.1.1. Дизайн гРНК

[0272] Мутация USH2A с.7595-2144A>G является глубокой интронной мутацией, вызывающей аномальный сплайсинг по криптическому 5'-участку сплайсинга и криптическому 3'-участку сплайсинга. Мутация ассоциирована с синдромом Ашера II типа (Slijkerman et al., 2016, Mol. Ther. Nucleic Acids, 5(10):e381). Конструировали молекулы гРНК Cas12a, имеющие нацеливающие последовательности, соответствующие целевым доменам в USH2A, приведенным в таблице 9, без ошибочно спаренных оснований между нацеливающей последовательностью и комплементом целевого домена. В этом примере гРНК Cas12a конструировали для редактирования гена USH2A вблизи криптического 5'-участка сплайсинга (верхние четыре целевых домена, приведенных в таблице 9) или криптического 3'-участка сплайсинга (нижние четыре целевых домена, приведенных в таблице 9). Петлевой домен в 5'-направлении относительно целевого домена в молекулах

гРНК Cas12a состоит из последовательности UAAUUUCUACUCUUGUAGAU (SEQ ID NO: 25).

Таблица 9				
Ген (мутация) (ассоциированное заболевание)	Частичная последовательность гена	SEQ ID NO:	PAM и целевой домен	SEQ ID NO:
USH2A (с.7595- 2144A>G) (синдром Ашера II типа)	GGCTTTTAAGGGGG AAACAAATCATGAA ATTGAAATTGAACA CCTCTCCTTTCCCAA G/(a>g)gtaagagatcatcttta agaaaaggctgtgtattgtgggg gt (включает криптический 5'- участок сплайсинга)	174	<u>tttc</u> -ttaaagatgatctcttacCTTGG	176
			<u>TTTC</u> - CCAAGgtaagagatcatctttaa	177
			<u>ATTG</u> - AAATTGAACACCTCTCC TTTCCC	178
			<u>ctta</u> - aagatgatctcttacCTTGGGAA	179
	ttttaacacttcctagccaaagg agctaattaagctgctttcag/CT TCCTCTCCAGAATCA CACAAGTTAAAGGA CCCTTCTGCAAC (включает криптический 3'- участок сплайсинга)	175	<u>atta</u> - agctgctttcagCTTCCTCTCCA G	180
			<u>ATTC</u> - TGGAGAGGAAGctgaaagca gct	181
			<u>CTTG</u> - TGTGATTCTGGAGAGGA AGctga	182
			<u>TTTA</u> - ACTTGTGTGATTCTGGA GAGGAA	183
Последовательности PAM подчеркнуты; нуклеотиды экзона указаны прописными буквами; интрон нуклеотиды указаны строчными буквами; мутации указаны полужирным шрифтом				

[0273] Используя стандартную сборку способом Golden Gate, последовательности ДНК, кодирующие гРНК Cas12a, клонировали в плазмиды pY108 lentiAsCas12a, сконструированные так, чтобы кодировать RR AsCas12a, RVR AsCas12a или другие белки

Cas12a, распознающие последовательности РАМ выше целевых доменов, для получения плазмид, кодирующих белок Cas12a и одиночную гРНК Cas12a. Плазмиды pY108 lentiAsCas12a, кодирующие белок Cas12a и рандомизированную укороченную гРНК также получали для использования в качестве контролей.

6.8.8.1.2. Получение минигенов

[0274] Плазмиду, содержащую геномную область RHO, включающую экзоны 3-5, клонированные по участкам EcoRI/SalI в вектор pCI-NEO (Gamundi, et al., 2008, Hum Mutat 29:869-878), адаптировали для системы клонирования Gateway, как описано ранее (Yariz, et al., 2012, Am J Hum Genet, 91:872-882). Технологию клонирования Gateway использовали для встраивания 152 п.н. псевдоэкзона 40 USH2A человека (PE40, дикого типа и мутантного) вместе с 722 п.н. 5'-фланкирующих и 636 п.н. 3'-фланкирующих интронных последовательностей для получения pMG USH2A-PE40wt и pMG USH2A-PE40A>G, как описано в Slijkerman et al., 2016, Mol. Ther. Nucleic Acids, 5(10):e381.

6.8.8.1.3. Культивирование клеток

[0275] Клетки HEK293T и HEK293 получали из American Type Culture Collection (ATCC; www.atcc.org). Клетки HEK293T и клетки HEK293, стабильно экспрессирующие pMG USH2A-PE40wt или pMG USH2A-PE40A>G, культивировали в модифицированной по способу Дульбекко среде Игла (DMEM; Life Technologies), дополненной 10% эмбриональной телячьей сывороткой (FBS; Life Technologies), 10 ед./мл антибиотиков (PenStrep, Life Technologies) и 2 мМ L-глутамина при 37°C во влажной камере с 5% CO₂.

[0276] Первичные фибробласты пациента USH2 с компаундными гетерозиготными мутациями USH2A культивировали в DMEM (Sigma-Aldrich D0819), дополненной 20% эмбриональной телячьей сыворотки (Sigma-Aldrich F7524), 1% пирувата натрия (Sigma-Aldrich S8636) и 1% пенициллина-стрептомицина (Sigma-Aldrich P4333).

6.8.8.1.4. Трансфекция и трансдукция

Трансфекция клеток HEK293T

[0277] Трансфекцию осуществляли в клетках HEK293T, посеянных (150000 клеток/лунку) в 24-луночный планшет. Клетки трансфицировали с использованием PEI (полиэтиленимина) с 100 нг плазмид минигена и 700 нг плазмид, кодирующих белки Cas12a и гРНК Cas12a.

Трансдукция клеток HEK293, стабильно экспрессирующих минигены и фибробласты пациента

[0278] Стабильные линии клеток с минигенами (HEK293/pMG USH2A-PE40wt и HEK293/pMG USH2A-PE40A>G) получали посредством трансфекции линейаризованных плазмид минигенов (pMG USH2A-PE40wt или pMG USH2A-PE40A>G) в клетки HEK293. Клетки подвергали селекции с помощью 500 мкг/мл G418 через 48 ч. после трансфекции. Клоны отдельных клеток выделяли и охарактеризовывали по экспрессии конструкций минигенов.

[0279] Лентивирусные частицы продуцировали в клетках HEK293T при 80% конфлюэнтности в чашках 10 см. Десять мкг векторной плазмиды для переноса (плазмид

pY108 lentiAsCas12a, кодирующих белки Cas12a и гРНК Cas12a), 3,5 мкг VSV-G и 6,5 мкг упаковывающей плазмиды Δ8.91 трансфицировали в клетки HEK293T с использованием PEI. После инкубации в течение ночи среду заменяли полной DMEM. Вирусные супернатанты собирали через 48 ч. и фильтровали через фильтр 0,45 мкм PES. Лентивирусные частицы концентрировали и очищали с помощью 20% сахарозной подушки посредством ультрацентрифугирования в течение 2 часов при 4°C и 150000×g. Осадки ресуспендировали в подходящем объеме OptiMEM. Аликвоты хранили при -80°C. Титры векторов измеряли в виде единиц обратной транскриптазы (RTU) способом SG-PERT (см. Casini, A., et al., 2015, J. Virol.89:2966-2971). Для исследований трансдукции клетки HEK293, стабильно экспрессирующий конструкции минигенов и фибробласты пациента USH2 высевали (300000 клеток/лунку) в 12-луночный планшет, и через день после посева клетки трансдуцировали с использованием 1-5 RTU лентивирусных векторов. Через приблизительно 48 часов клетки подвергали селекции пурамицином (2-10 мкг/мл) и собирали через 10-14 дней после трансдукции.

6.8.8.1.5. RT-ПЦР и анализ транскрипции

[0280] РНК выделяли с использованием реагента TRIzol™ (Invitrogen) и ресуспендировали DEPC-ddH₂O. кДНК получали с использованием 500 нг РНК и обратной транскриптазы RevertAid (Thermo Scientific) по инструкциям производителя. Целевые области амплифицировали посредством ПЦР с помощью высокоточной ДНК-полимеразы Phusion (Thermo Fisher) с использованием праймеров миниген-USH2A прямого (CGGAGGTCAACAACGAGTCT) (SEQ ID NO: 184) и обратного (AGGTGTAGGGGATGGGAGAC (SEQ ID NO: 185)). Для экспериментов по коррекции сплайсинга на фибробластах часть кДНК USH2A амплифицировали в стандартных условиях ПЦР с использованием полимеразы Q5 и праймеров 5'-GCTCTCCCAGATACCAACTCC-3' (SEQ ID NO: 186) и 5'-GATTCACATGCCTGACCCTC-3' (SEQ ID NO: 187), сконструированных для экзонов 39 и 42, соответственно. Продукты ПЦР разделяли на 1-2% агарозном геле. Фрагменты, соответствующие корректно и аномально сплайсированному USH2A, вырезали из геля, очищали с использованием набора для выделения Nucleospin Extract II (MACHEREY-NAGEL) и секвенировали.

6.8.8.2. Результаты

[0281] Транскрипты минигена анализировали через 2-3 дня после трансфекции и наблюдали корректный и аномальный сплайсинг в случае плазмид pMG USH2A-PE40wt или pMG USH2A-PE40A>G, соответственно. Избыточное включение криптического экзона PE40 152 п.н. также наблюдали в контрольных клетках, обработанных белком Cas12a и рандомизированными укороченными гРНК, в то время как этот аномальный сплайсинг снижался в клетках, обработанных по меньшей мере некоторыми из нацеленных на PE40 USH2A гРНК. Результаты подтверждали на клетках HEK293T, стабильно трансфицированных минигеном pMG USH2A-PE40A>G и трансдуцированных лентивирусными векторами с нацеленными на PE40 USH2A гРНК/белком AsCas12a,

наблюдая коррекцию сплайсинга, пропорциональную эффективности редактирования генома. Транскрипты мРНК USH2A анализировали через 10-14 дней после трансдукции фибробластов пациента USH2 и наблюдали, что транскрипт дикого типа значимо повышен, а мутантный транскрипт снижен относительно контроля.

6.8.9. Пример 9: CRISPR-Cas12a-опосредованный проскок экзона 51 DMD

6.8.9.1. Материалы и способы

6.8.9.1.1. Дизайн гРНК

[0282] Мутации в экзоне 50 гена DMD могут вызывать преждевременное укорочение белка дистрофин. Проскок экзона 51 может восстанавливать рамку считывания и экспрессию функционального белка дистрофина (см., Amoasii et al., 2017, Science Translational Medicine, 9(418):eaan8081). Конструировали молекулы гРНК Cas12a, имеющие нацеливающие последовательности, соответствующие целевым доменам в DMD, приведенным в таблице 10, без ошибочно спаренных оснований между нацеливающей последовательностью и комплементом целевого домена. Петлевой домен в 5'-направлении относительно целевого домена в молекулах гРНК Cas12a состоит из последовательности UAAUUUCUACUCUUGUAGAU (SEQ ID NO: 25).

Таблица 10				
Ген (мутация) (ассоциированное заболевание)	Частичная последовательность гена	SEQ ID NO:	PAM и целевой домен	SEQ ID NO:
DMD (мутация в экзоне 50) (мышечная дистрофия Дюшена)	ttttcttttcttctttttc cttttgcaaaaaccsa aaatatttttagCTCC TACTCAGACT GTTACTCTGG TGACACAACC TGTGGTACT AAGGAAA	188	<u>tttg</u> -caaaaacccaaaatatttttagCT	189
			<u>tttc</u> -cttttgcaaaaacccaaaatat	190
			<u>ttcc</u> -tttttgcaaaaacccaaaatatt	191
			<u>GTTG</u> - TGTCACCAGAGTAACAGTC TGAG	192
			<u>ttta</u> - gCTCCTACTCAGACTGTTAC TCT	193
Последовательности PAM подчеркнуты; нуклеотиды экзона указаны прописными буквами; интрон нуклеотиды указаны строчными буквами				

[0283] Используя стандартную сборку способом Golden Gate, последовательности ДНК, кодирующие гРНК Cas12a, клонировали в плазмиды pY108 lentiAsCas12a, сконструированные так, чтобы кодировать RR AsCas12a, RVR AsCas12a или другие белки Cas12a, распознающие последовательности РАМ выше целевых доменов, для получения плазмид, кодирующих белок Cas12a и одиночную гРНК Cas12a. Плазмиды pY108

lentiAsCas12a, кодирующие белок Cas12a и рандомизированную укороченную гРНК, также получали для использования в качестве контролей.

6.8.9.1.2. Получение минигенов

[0284] Плазмиду pCI (Alanis et al., 2012, Hum. Mol. Genet. 21:2389-2398) использовали для клонирования минигена DMDΔex50. Миниген получали посредством ПЦР-амплификации и клонирования целевых экзонов 49-52 DMD из мышечных клеток или клеток HEK293, за исключением экзона 50 и включая приблизительно 200 п.н. интронов 49, 50 и 51, фланкирующих экзоны 49, 51, 52, включенные из гена DMD. Пары праймеров, которые можно использовать для ПЦР-амплификации генетических областей, необходимых для конечной сборки минигена (за исключением последовательностей для стандартных участков клонирования, используемых для сборки способом Golden Gate), представляют собой: 1) экзон 49 for GAAACTGAAATAGCAGTTCAAGCTAAACAACC (SEQ ID NO: 194) и интрон 49 rev GCCTTAAGATCACAATATATAAATAGGATATGCTG (SEQ ID NO: 195); 2) интрон 50 for TGAATCTTTTCATTTTCTACCATGTATTGCT (SEQ ID NO: 196) и интрон 51 rev CTTTTTAATGTATGGCTACTTTTGTTATTTGCA (SEQ ID NO: 197); 3) интрон 51 for TGAAATATTTTTGATATCTAAGAATGAAACATATTTCCCTGT (SEQ ID NO: 198) и экзон 52 rev TTCGATCCGTAATGATTGTTCTAGCCTCT (SEQ ID NO: 199).

6.8.9.1.3. Культивирование клеток

[0285] Клетки HEK293T и HEK293 получали из American Type Culture Collection (ATCC; www.atcc.org). Клетки HEK293T культивировали в модифицированной по способу Дульбекко среде Игла (DMEM; Life Technologies), дополненной 10% эмбриональной телячьей сывороткой (FBS; Life Technologies), 10 ед./мл антибиотиков (PenStrep, Life Technologies) и 2 mM L-глутамина при 37°C во влажной камере с 5% CO₂.

6.8.9.1.4. Трансфекция

[0286] Трансфекцию осуществляли в клетках HEK293T, посеянных (150000 клеток/луноку) в 24-луночный планшет. Клетки трансфицировали с использованием PEI (полиэтиленимина) с 100 нг плазмид минигенов и 700 нг плазмид, кодирующих Cas12a и гРНК Cas12a.

6.8.9.2. Результаты

[0287] Транскрипты минигенов, анализируемые через 2-3 дня после трансфекции, демонстрировали ожидаемый профиль сплайсинга, включая экзон 51, в контрольных клетках. Снижение включения экзона 51 наблюдали в клетках, трансфицированных с использованием плазмид, кодирующих гРНК, имеющие нацеливающую последовательность, соответствующую целевому домену, находящемуся в непосредственной близости или включающему соединение интрон 50-экзон 51.

6.8.10. Пример 10: Коррекция различных генетических дефектов

6.8.10.1. Материалы и способы

[0288] Конструировали молекулы гРНК Cas12a, имеющие нацеливающие последовательности, соответствующие целевым доменам, приведенным в таблице 11, без

ошибочно спаренных оснований между нацеливающей последовательностью и комплементом целевого домена. Петлевой домен в 5'-направлении относительно целевого домена в молекулах гРНК Cas12a, состоит из последовательности UAAUUUCUACUCUUGUAGAU (SEQ ID NO: 25). Мутации, приведенные в таблице 11, ассоциированы с различными генетическими заболеваниями (см. раздел 6.3.4).

Таблица 11				
Ген (мутация) (ассоциированное заболевание)	Частичная последовательност ь гена	SEQ ID NO:	РАМ и целевой домен	SEQ ID NO:
DMD (IVS9+46806C>T) (мышечная дистрофия)	CCACCAGTTACC TTTGTGACCTTTG /g(c>t)aagtcataatcttt ctatttccattt	200	<u>TTTGTGACCTTTG</u> gtaagtca tctaat	222
			<u>GTTACCTTTGTGACCTTT</u> Ggtaagtca	223
DMD (IVS62+62296A>G) (мышечная дистрофия)	GTCCTGATAGTC GATTATTGATCA CATAACAAG/gtca(a>g)tttatcataactgaagt gcgatcgatt	201	<u>ATTATTGATCACATAAC</u> AAGgtcagtt	224
			<u>ATTGATCACATAACAAG</u> gtcagtttat	225
			<u>cttcagttatgataaactgacCTTGT</u> T	226
			<u>gttatgataaactgacCTTGTTAT</u> GTG	227
DMD (IVS1+36846G>A) (мышечная дистрофия)	tattataaaattactctttctctt cccttggtttgc(g>a)g/C TTCTCGAGTTCAT AGGAGACTTTCA GTTTCC	202	<u>tttctcttcttggtttgcagCTTCT</u>	228
			<u>ttcccttggtttgcagCTTCTCGA</u> GTT	229
			<u>attactctttctcttcccttggtttgc</u>	230
DMD (IVS2+5591T>A) (мышечная дистрофия)	acctagtttgtaataagccat atttccttggttctctacat(t> a)g/()GTTGAATCT GTTCTGCAGCA ACTAGTAAC	203	<u>tttccttggttctctacatagGTTGAA</u>	231
DMD (IVS8-15A>G)	ttccccctctctctatccac tccccca(a>g)/acccttct ctgcagATCACGGT	204	<u>ccccctctctctatccacctccccag</u>	232
			<u>tttccccctctctctatccactcccc</u>	233
			<u>tccacctccccagaccttctctgca</u>	234

	CAGTCTAGCACAGGGATA		<u>tccccctcctctctatccacctcccc</u>	235
DMD (мутация in экзон 50) (мышечная дистрофия Дюшена)	ttttcttttcttcttttctttt gcaaaaaccccaaatatttta gCTCCTACTCAGA CTGTTACTCTGGT GACACAACCTGT GGTACTAAGGA AA	188	<u>tttg</u> -caaaaaccccaaatatttttagCT	189
			<u>tttc</u> -cttttgcaaaaaccccaaatat	190
			<u>ttcc</u> -ttttgcaaaaaccccaaatatt	191
			<u>GTTG</u> - TGTCACCAGAGTAACAG TCTGAG	192
			<u>ttta</u> - gCTCCTACTCAGACTGTT ACTCT	193
FGB (IVS6+13C>T) (афибриногенемия)	AATTACTGTGGC CTACCAGgtaacgaa caggatgcaaaataaaatc attctatttgaaatggg	205	<u>tttattttgcatacctgttcgttac</u> CT	236
			<u>tttcaaatagaatgattttattttgca</u>	237
SOD1 IVS4+792C>G (боковой амиотрофический склероз)	cttttttccaaag/CAAT TAAAAAACTGC CAAAGTAAGAGT GACTGCGGAACT AAG/gtta(c>g)tgtaac ttaccatggaggattaaggg tagcgt	206	<u>tccatggttaagttactaac</u> CTTAG T	238
HBB (IVS2+645C>T) (бета-талассемия)	ttctttcagGGCAATA ATGATACAATGT ATCATGCCTCTTT GCACCATTTCTAA AGAATAACAGTG ATAATTTCTGGGT TAAGgtaatagcaatattc tctgcatataaatatttctgcat ataaattgtaactg	207	<u>TTTCTGGGT</u> TAAAgtaatag caatattc	239
			<u>tttatatgcagagatattgctattac</u> C	240
			<u>attgctattac</u> CTTAACCCAGA AATTA	241
			<u>tatgcagagatattgctattac</u> CTTA A	242
HBB (IVS2+705T>G) (бета-талассемия)	ttccctaattcttttctttcag/ GGCAATAATGAT ACAATGTATCAT	208	<u>TTTCTGCATATAAATTG</u> TAACTGAGgt	243
			<u>TATAAATTGTA</u> ACTGAG	244

	GCCTCTTTGCACC ATTCTAAAGAAT AACAGTGATAAT TTCTGGGTTAAG GCAATAGCAATA TCTCTGCATATAA ATATTTCTGCATA TAAATTGTAAC GA(T>G)/gtaagaggtt tcatattgctaatagcagcta caatc		gtaagaggtt	
			<u>tatgaaacctcttac</u> CTCAGTTA CAAT	245
			<u>attagcaatatgaaacctcttac</u> CTC A	246
HBV (IVS2+745C>G) (бета-талассемия)	tcag/()GGCAATAA TGATAACAATGTA TCATGCCTCTTTG CACCATTCTAAA GAATAACAGTGA TAATTTCTGGGTT AAGGCAATAGCA ATATCTCTGCATA TAAATATTTCTGC ATATAAATTGTA ACTGATGTAAGA GGTTTCATATTGC TAATAGCAGCTA CAATCCAG/(c>g)ta ccattctgctttattttatggtt gggataag	209	<u>ATTG</u> CTAATAGCAGCTA CAATCCAGgt	247
CFTR (IVS11+194A>G) (кистозный фиброз)	acag/AAGTACCAA CAATTACATGTA TAAACAGAGAAT CCTATGTACTTGA GAT/(a>g)taagtaaggt tactatcaatcacacctgaaa aatftaaat	210	<u>TATGT</u> ACTTGAGATgtaagt aaggtta	248
			<u>attgatagtaaccttacttac</u> ATCTC A	249

CFTR (IVS19+11505C>G) (кистозный фиброз)	GCTTGATCAATG GCATGGGAAAAC AGGCAATACAGT TAGAATTGgtaagat ggaattttaacgttcaattaag gatctatctcta	211	<u>gt</u> taaaattccatcttacCAATTCT AA	250
			<u>att</u> gaacgttaaaattccatcttacCA	251
QDPR (IVS3+2552A>G) (дефицит дигидроптеридинред уктазы)	GTTTTGTCATCTG TAAAATAAG/(a>g)taaaatagtgctcctttatat atatggtggtgtaccttgt	212	<u>TTT</u> GTCATCTGTAAAAT AAGagtaaaa	252
GLA (IVS4+919G>A) (болезнь Фабри)	ttctcagAGCTCCAC ACTATTTGGAAG TATTTGTTGACTT GTTACCATGTCTC CCCACTA(G>A)A GT/gtaagtttcatgagggc agggacctgtctg	213	<u>GTT</u> ACCATGTCTCCCCA CTAAAGTgta	253
LDLR (IVS12+11C>G) (семейная гиперхолестеринемия)	GGGCAACCGGAA GACCATCTTGGA GGATGAAAAGAG GCTGGCCCACCC CTTCTCCTTGGCC GTCTTTGAGgtgtgg ctta(c>g)/gtacgagatgc aagcacttaggtggcggata gac	214	<u>TTT</u> GAGgtgtggcttaggtacgag atg	254
BRIP1 (IVS11+2767A>T) (анемия Фанкони)	GTAGATGAAGGC TGAGACTCAGGT TTCAAAG/g(a>t)at gtaagaattttataactgttg ctaatactttaaaaactt	215	<u>gt</u> tataaaattcttacatacCTTTGA A	255
F9 (IVS5+13A>G+12) (гемофилия В)	AAGTCCTGTGAA CCAGCAGgtcataatc tga/(a>g)taagatttttaa	216	<u>ttt</u> aaaaaatcttactcagattatgac	256
			<u>ttt</u> ctttaaaaaatcttactcagatta	257

	agaaaatctgtatctgaaac			
CEP290 (IVS26+1655A>G) (врожденный амавроз Лебера)	GAGCCACCGCAC CTGGCCCCAGTT GTAATT/gtga(a>g)t atctcatacctatccctattgg cagtgtc	166	<u>CCCC</u> AGTTGTAATTgtgagt atctcat	167
COL2A1 (IVS23+135A-234) (синдром Стиклера)	tttctccatccacaccgc(g> a)g/ggagagggagtctgat cctgatttgtgccgc	217	<u>tttctccatccacaccgc</u> agggagag	258
USH2A (IVS40-8C>G) (синдром Ашера II типа)	gaggtgggacatttccaaga ggtctgactttctggattattt ta(c>g)/tttacagAACCC TGGACCTGTAGT TCCTCCGATTCTT CTGGATGTGAAG T	218	<u>tttctggatttattttag</u> tttacagAA	259
			<u>tttcca</u> agaggtctgactttctggatt	260
			<u>tcca</u> agaggtctgactttctggattta	261
			<u>TCCAG</u> GTTTctgtaaaactaaaataa atc	262
			<u>tttattttag</u> tttacagAACCTGGA CC	263
USH2A (IVS66+39C>T) (синдром Ашера)	GGCAGAAGGATG AAGAAACTAACA AG/g(c>t)atgtgtacag acatatgaactcatggtatag cctact	219	<u>ttca</u> - tatgtctgtacacatacCTTGTT	264
			<u>gttc</u> - atatgtctgtacacatacCTTGTT	265
USH2A (с.7595-2144A>G) (синдром Ашера II типа)	GGCTTTTAAGGG GGAAACAAATCA TGAAATTGAAAT TGAACACCTCTC CTTTCCCAAG/(a> g)gtaagagatcatctttaag aaaaggctgtgtattgtggg ggt	174	<u>tttc</u> - ttaaagatgatctcttacCTTGG	176
			<u>TTTC</u> - CCAAGgtaagagatcatctttaa	177
			<u>ATTG</u> - AAATTGAACACCTCTCC TTTCCC	178
			<u>ctta</u> - aagatgatctcttacCTTGGGAA	179
	ttttaacacttccctagccaaa ggagctaattaagctgctttc ag/CTTCCTCTCCA GAATCACACAAG	175	<u>atta</u> - agctgctttcagCTTCCTCTCC AG <u>ATTC</u> -	180 181

	TTAAAGGACCCT TCTGCAAC		TGGAGAGGAAGctgaaagca gct	
			<u>CTTG</u> - TGTGATTCTGGAGAGGA AGctga	182
			<u>TTTA</u> - ACTTGTGTGATTCTGGA GAGGAA	183
GAA (IVS1-13T>G) (гликогеноз типа II)	agtgccgccccctccgcctc cctgctgagcccgtt/(t>g))cttctcccgcagGCCTG TAGGAGCTGTCC AGGCCA	220	<u>tccc</u> -tgctgagcccgtt g cttctccc	266
			<u>tccc</u> -gcctccctgctgagcccgtt g c	267
			<u>cccc</u> - tcccgctccctgctgagcccgc	268
GAA (IVS6-22T>G) (гликогеноз типа II)	gccccgccccaaaggtcc ctctccctccctca(t>g)/ gaagtcggcggttggcctgca gGATACCCGTTCA T	221	<u>tccc</u> -tcctccctccctcag g aagtcgg	269
			<u>cccc</u> -aaggtccctccctccctccctca	270
			<u>tccc</u> -tcctcag g aagtcggcggttggc	271
Последовательности РАМ подчеркнуты; нуклеотиды экзона указаны прописными буквами; интрон нуклеотиды указаны строчными буквами; мутации указаны полужирным шрифтом				

[0289] Лентивирусные частицы, кодирующие одиночные гРНК Cas12a и белки Cas12a, получали способами, схожими с описанными в примере 1. Стабильные линии клеток, экспрессирующие миниген дикого типа и мутантные минигены, соответствующий генам, приведенным в таблице 11, получали аналогично примеру 1 и трансдуцировали с использованием лентивирусных частиц. Через приблизительно 10 дней после трансдукции клетки собирали и выделяли ДНК и РНК из клеток. ДНК анализировали на индуцированное Cas12a редактирование генома и РНК анализировали на корректный сплайсинг аналогично примеру 1.

[0290] Органоиды от индивидуумов, имеющих мутации, описанные в таблице 11, трансдуцировали с использованием лентивирусных частиц способами, схожими с описанными в примерах 2. Через четырнадцать дней после трансдукции органоиды анализировали на реверсирование фенотипа заболевания.

6.8.10.2. Результаты

[0291] Белки Cas12a в комбинации с одиночными гРНК Cas12a корректировали дефекты сплайсинга, вызванные мутациями, указанными в таблице 11, в моделях минигенов и восстанавливали экспрессию дистрофина в минигеновой модели вредной

мутации в экзоне 50 DMD. В органоидах белки Cas12a в комбинации с одиночными гРНК Cas12a реверсировали фенотипы заболевания.

6.8.11. Пример 11: Коррекция мутации USH2A с.7595-2144A>G посредством CRISPR-Cas12a

6.8.11.1. Материалы и способы

6.8.11.1.1. Дизайн гРНК

[0292] Конструировали молекулы гРНК Cas12a, имеющие нацеливающие последовательности, соответствующие целевым доменам USH2A, приведенным в таблице 12, без ошибочно спаренных оснований между нацеливающей последовательностью и комплементом целевого домена. В этом примере гРНК Cas12a конструировали для редактирования гена USH2A вблизи криптоического 5'-участка сплайсинга (верхние два целевых домена, приведенные в таблице 12) или криптоического 3'-участка сплайсинга (нижний целевой домен, приведенный в таблице 12). Петлевой домен в 5'-направлении относительно целевого домена в молекулах гРНК Cas12a состоит из последовательности UAAUUUCUACUCUUGUAGAU (SEQ ID NO: 25) (AsCas12a) или UAAUUUCUACUAAGUGUAGAU (SEQ ID NO: 31) (LbCas12a). Схема положений выбранных целевых доменов приведена на фиг. 25.

Таблица 12 Спейсеры и целевые последовательности для мутации USH2A с.7595-2144A>G					
Частичная последовательность гена	SEQ ID NO :	РАМ и целевой домен	SEQ ID NO:	Название гена	
GGCTTTTAAGGGGGAACAAAT CATGAAATTGAAATTGAACACC TCTCCTTTCCCAAG/(a>g)gtaagagat catctttaagaaaaggctgtgtattgtgggggt (включает криптоический 5'-участок сплайсинга)	174	<u>tttc</u> - ttaagatgatctcttacCTTGG	176	Гид 1	
		<u>TTTC</u> - CCAAGgtaagagatcatctttaa	177	Гид 2	
ttttaacacttcctagccaaaggagctaattaagctg ctttcag/CTTCCTCTCCAGAATCAC ACAAGTTAAAGGACCCTTCTGCAAC (включает криптоический 3'-участок сплайсинга)	175	<u>TTTA</u> - ACTTGTGTGATTCTGG AGAGGAA	183	Гид 3	
Последовательности РАМ подчеркнуты. Интронные последовательности указаны строчными буквами, экзонные последовательности указаны прописными буквами.					

Мутантное основание указано полужирным шрифтом. "Черточкой" указано интрон-экзонное соединение.

[0293] Используя стандартную сборку способом Golden Gate, последовательности ДНК, кодирующие гРНК Cas12a, клонировали в лентивирусные векторы pY108 (плазмиду Addgene № 84739, кодирующую AsCas12a) или pY109 (плазмиду Addgene № 84740, кодирующую LbCas12a). Эти векторы сконструировали так, чтобы кодировать белки Cas12a вместе с соответствующими гРНК для распознавания последовательностей РАМ выше выбранных целевых доменов. Плазмиды pY108 и pY109, кодирующие белки AsCas12a и LbCas12a, соответственно, вместе с рандомизированными укороченными гРНК также подготавливали для использования в качестве контролей. Олигонуклеотиды, используемые для получения описанных выше векторов, приведены в таблице 13.

Таблица 13. Олигонуклеотиды, используемые для клонирования гРНК				
Название гена	Олигонуклеотид 1 (5'-3')	SEQ ID NO:	Олигонуклеотид 2 (5'-3')	SEQ ID NO:
Гид 1	agatTTAAAGATGATCTCTTACCTTGG	272	aaaaCCAAGGTAAGAGATCATCTTTAA	275
Гид 2	agatCCAAGGTAAGAGATCATCTTTAA	273	aaaaTTAAAGATGATCTCTTACCTTGG	276
Гид 3	agatACTTGTGTGATTCTGGAGAGGAA	274	aaaaTTCCTCTCCAGAATCACACAAGT	277
Липкие концы при клонировании указаны строчными буквами. Спейсеры указаны прописными буквами.				

6.8.11.1.1. Получение минигенов

[0294] Модели минигенов получали для имитации профиля сплайсинга гена USH2A дикого типа и его мутантной версии. Экзон 40 и экзон 41 USH2A вместе с геномными областями, соответствующими PE40, амплифицировали из геномной ДНК, выделенной из клеток НЕК293Т с использованием праймеров, приведенных в таблице 14. Ампликон, соответствующий экзону 40, включает дополнительные 208 п.н. 5'-конца интрона 40; ампликон, соответствующий экзону 41, дополнительно включает 248 п.н. 3'-конца интрона 40; ампликон, соответствующий PE40, дополнительно включает части интрона от 40 до 722 п.н. выше и на 622 п.н. ниже самого псевдоэкзона. Затем эти фрагменты собирали способом сборки Golden Gate и клонировали по участкам KpnI и BglII ранее описанного вектора pcDNA3 (Cesaratto et al., 2015, J. Biotechnol. 212:159-166), чтобы сделать возможной экспрессию под контролем промотора CMV. Конструкция также включала две белковые метки, V5-метку и го-метку (Petrís et al., 2014, PLoS One, 9(5):e96700), соответственно, на 5'- и 3'-конце минигена, чтобы способствовать ее экспрессии. Миниген, содержащий мутацию USH2A с.7595-2144A>G, получали из

минигена дикого типа стандартными способами сайт-специфического мутагенеза с использованием праймеров, приведенных в таблице 14 (олигонуклеотиды USH2A_mutA2144G_F и USH2A_mutA2144G_R). Схема конструкции минигена приведена на фиг. 23.

Таблица 14. Олигонуклеотиды, используемые для получения минигенов USH2A		
Название олигонуклеотида	Последовательность (5'-3')	SEQ ID NO:
Kpn-USH2A_ex40-F	ttaggtaccgaGTTATTTTCCAATCCTTCTGCATC	278
BsmBI-USH2A_ex40-R	ttccgtctcataatGCCTAACCCTCCAACCCTCC	279
BsmBI-USH2A_PE40-F	gaacgtctctATTACTCTATTTTAGGCTGGGGC	280
BsmBI-USH2A_PE40-R	tctcgtctcatcaaTGTATCCTATTTGAAGAGAAATCC	281
BsmBI-USH2A_ex41-F	agacgtctcaTTGATAAAGCTGTCTTAGAGAGGA	282
BglII-USH2A_ex41-R	taatagatctCTGGACTGCATCGGGTTCC	283
USH2A_mutA2144G_F	CTCTCCTTTCCCAAGgTAAGAGATCATCTTTAAG	284
USH2A_mutA2144G_R	CTTAAAGATGATCTCTTAcCTTGGGAAAGGAGAG	285

6.8.11.1.1. Культивирование клеток

[0295] Клетки HEK293T и HEK293 получали в American Type Culture Collection (ATCC; www.atcc.org). Клетки культивировали в модифицированной по способу Дульбекко среде Игла (DMEM; Life Technologies), дополненной 10% эмбриональной телячьей сывороткой (FBS; Life Technologies), 10 ед./мл антибиотиков (PenStrep, Life Technologies) и 2 мМ L-глутамина при 37°C во влажной камере с 5% CO₂.

[0296] Клетки HEK293, стабильно экспрессирующие USH2A дикого типа и мутантные минигены, получали посредством стабильной трансфекции линейаризованных плазмид минигенов. Клетки подвергали селекции с помощью 600 мкг/мл G418 (Invivogen), начиная через 48 ч. после трансфекции. Клоны отдельных клеток выделяли и охарактеризовывали по количеству копий минигенов и экспрессии конструкций минигенов. Стабильные клоны поддерживали в культуре, как указано выше, с дополнительными 500 мкг/мл G418.

6.8.11.1.1. Определение количества копий минигена в стабильных клонах HEK293

[0297] Определение количества копий минигена осуществляли посредством анализа qPCR на геномной ДНК, выделенной с использованием набора NucleoSpin Tissue kit (Macherey-Nagel). Геномную ДНК разводили до 86,2 нг/мкл и осуществляли qPCR с использованием праймеров, приведенных в таблице 15. GAPDH использовали в качестве контроля для определения относительного количества копий. Получали стандартные кривые для минигена и GAPDH с серийными разведениями плазмид минигеном или pcDNA3-GAPDH-фрагмент, соответственно. Конструкцию pcDNA3-GAPDH-фрагмента

получали посредством клонирования с тупыми концами фрагмента GAPDH, амплифицированного с использованием праймеров GAPDH_CN_For и GAPDH_CN_Rev, приведенных в таблице 15, являющимися теми же праймерами, которые использовали для qPCR-амплификации GAPDH.

Таблица 15. Олигонуклеотиды, используемые для определения количества копий		
Название олигонуклеотида	Последовательность (5'-3')	SEQ ID NO:
USH2A_миниген_CN_For	GGCAAACCAATCCCAAACCC	286
USH2A_миниген_CN_Rev	ATTGGAGGCAACCAACCGAA	287
GAPDH_CN_For	CACAGTCCAGTCCTGGGAAC	288
GAPDH_CN_Rev	TAGTAGCCGGGCCCTACTTT	289

6.8.11.1.1. Трансфекция и трансдукция

Трансфекция клеток HEK293

[0298] Осуществляли трансфекцию клеток HEK293, посеянных (100000 клеток/лунку) в 24-луночный планшет. Через 24 часа после посева клетки трансфицировали с использованием 100 нг плазмид минигенов и 700 нг плазмид, кодирующих белки Cas12a и гРНК Cas12a, нацеленных на USH2A, с использованием TransIT-LT1 (Mirus Bio) по инструкциям производителя. Клетки разделяли при конфлюэнтности и собирали через 6 дней после трансфекции. Затем осадки разделяли пополам для выделения ДНК и РНК для сравнения эффективности редактирования и коррекции сплайсинга в одних и тех же образцах.

Трансдукция клеток HEK293. стабильно экспрессирующих минигены

[0299] Лентивирусные частицы продуцировали в клетках HEK293T при 80% конфлюэнтности в чашках 10 см. В кратком изложении, 10 мкг векторной плазмиды для переноса (плазмиды pY108 или pY109, кодирующие белки Cas12a и гРНК Cas12a), 3,5 мкг VSV-G-экспрессирующей плазмиды (pMD2.G, плазида Addgene № 12259) и 6,5 мкг лентивирусной упаковывающей плазмиды (pCMV-dR8.91) трансфицировали в клетки HEK293T способом с использованием полиэтиленимина (PEI) (см. Casini A et al., 2015, J. Virol. 89: 2966-2971). После инкубации в течение ночи среду замени полной DMEM. Вирусные супернатанты собирали через 48 ч. и фильтровали через фильтр 0,45 мкм PES. Аликвоты хранили при -80°C до использования. Титры вектора измеряли в виде единиц обратной транскриптазы (RTU) способом SG-PERT (см. Casini, A., et al., 2015, J. Virol. 89:2966-2971). Для исследований трансдукции клетки HEK293, стабильно экспрессирующие конструкции минигенов, высевали (100000 клеток/лунку) в 24-луночный планшет и через день после посева клетки трансдуцировали с использованием 1 RTU лентивирусных векторов посредством центрифугирования содержащей вектор среды на клетках в течение 2 часов при 1600×g и 25°C. Через приблизительно 48 часов клетки подвергали селекции пурамицинов (1 мкг/мл) и собирали через 10 дней после трансдукции.

6.8.11.1.1.RT-ПЦР и анализ транскрипции

[0300] РНК выделяли с использованием реагента NucleoZOL (Macherey-Nagel) и ресуспендировали в ddH₂O без РНКазы. кДНК получали из 1 мкг РНК с использованием набора для обратной транскрипции RevertAid RT (Thermo Scientific) по инструкциям производителя. Целевые области амплифицировали посредством ПЦР со смесью HOT FIREPol MultiPlex Mix (Solis Biodyne) с использованием праймеров V5tag_For и TEVsite_Rev (приведенных в таблице 13). Продукты ПЦР анализировали с помощью 1,5% агарозного геля и получали изображения с помощью системы UVIdoc HD5 (Uvitec Cambridge). Количественный анализ полос осуществляли с использованием программного обеспечения Uvitec Alliance (Uvitec Cambridge).

6.8.11.1.1. Оценка образования инсерционно-делеционных мутаций

[0301] Геномную ДНК выделяли из осадков клеток с использованием раствора QuickExtract (Lucigen) по инструкциям производителя. Смесь HOT FIREPol MultiPlex Mix (Solis Biodyne) использовали для амплификации интегрированного минигена USH2A с использованием праймеров TIDE-USH2A-PE40-F (приведенного в таблице 16) и TEVsite_Rev (приведенного в таблице 16), специфически определяя интегрированный миниген USH2A. Совокупности ампликонов секвенировали по Сэнгеру (наборы Mix2seq, Eurofins Genomics) и оценивали уровни инсерционно-делеционных мутаций с использованием веб-инструмента TIDE (tide.deskgen.com/) или веб-инструмента Synthego ICE (ice.synthego.com/).

Таблица 16. Олигонуклеотиды, используемые для RT-ПЦР и анализов TIDE		
Название олигонуклеотида	Последовательность (5'-3')	SEQ ID NO:
V5tag_For	CAAACCAATCCCAAACCCACT	290
TEVsite_Rev	CGCCCTGGAAGTATAAATTCTC	291
TIDE-USH2A-PE40-F	AGTTGCAGGCCAGTTGATTT	292

6.8.11.2

6.8.11.3. Результаты

6.8.11.3.1. Дизайн минигенов для повторения сплайсинга USH2A с.7595-2144A>G

[0302] Миниген для повторения аномального сплайсинга USH2A с.7595-2144A>G получали посредством клонирования геномных областей человека, кодирующих экзон 40 и экзон 41 USH2A, а также части интрона 40 USH2A, соответствующей псевдоэкзону 40 (PE40), в CMV-регулируемый экспрессирующий вектор млекопитающего на основе pcDNA3 (Cesaratto et al., J. Biotechnol. 212, 159-166, 2015). Кроме того, для сохранения важных регуляторных последовательностей сплайсинга миниген также включал части интрона 40 USH2A непосредственно ниже и выше экзонов 40 и 41, соответственно. Схема дизайна минигена показана на фиг. 1А. Кроме того, миниген дикого типа и миниген, содержащий мутацию с.7595-2144A>G, конструировали для оценки эффекта созданной стратегии редактирования генома в отношении сплайсинга последовательности USH2A дикого типа и мутантной последовательности USH2A. Профили сплайсинга минигена

дикого типа и мутантного минигена сначала оценивали посредством RT-ПЦР после транзиторной трансфекции двух конструкций в клетках HEK293. Как и ожидали, продукт сплайсинга, образующийся из мутантного минигена, демонстрировал увеличение длины на 153 п.н., соответствующее включению PE40 в экспрессируемую мРНК. Включение PE40 дополнительно подтверждали посредством секвенирования по Сэнгеру продуктов ПЦР.

6.8.11.3.1. Коррекция сплайсинга USH2A с.7595-2144A>G с использованием Cas12a-опосредованного редактирования генома

[0303] Гидовую РНК Cas12a, нацеленную на криптические 5'- и 3'-участки сплайсинга, способствующие включению PE40 в транскрипт USH2A, конструировали для AsCas12a и LbCas12a. Хотя гид 1 и гид 2 охватывают криптический 3'-участок сплайсинга и мутацию с.7595-2144A>G, гид 3 расположен на уровне криптического 5'-участка сплайсинга в начале последовательности, соответствующей PE40 (фиг. 25).

[0304] Уровни коррекции сплайсинга, которой способствовали AsCas12a и LbCas12a в комбинации с 3 сконструированными гРНК, сначала тестировали посредством транзиторной трансфекции клеток HEK293 с каждой парой нуклеаза-гРНК вместе с минигеном USH2A, несущим мутацию с.7595-2144A>G. Рандомизированную ненацеленную гРНК (scr) включали в исследования в качестве контроля. Клетки собирали через 6 дней после трансфекции и профиль сплайсинга USH2A анализировали посредством RT-ПЦР на тотальной выделенной мРНК. Как показано на фиг. 26А и фиг. 26С, и AsCas12a, и LbCas12a могли реверсировать включение PE40 в зрелый транскрипт. Гид 1 являлся наиболее эффективной гРНК (коррекция сплайсинга приблизительно 70-100%, см. фиг. 26В и фиг. 26D), за ней следует гид 3 (коррекция сплайсинга приблизительно 50-80%, см. фиг. 26В и фиг. 26D). Гид 2 мог стимулировать лишь низкие уровни восстановления сплайсинга (приблизительно 15-40% корректных продуктов, см. фиг. 26В и фиг. 26D). Кроме того, неожиданно, LbCas12a был гораздо более эффективным в стимуляции коррекции сплайсинга, чем AsCas12a, с почти 2-кратным улучшением процентной доли транскриптов, не включающих PE40 (ср. фиг. 26А-В и фиг. 26С-D). Для верификации отсутствия неблагоприятных эффектов стратегии редактирования генома в отношении транскрипта USH2A дикого типа осуществляли схожие исследования транзиторной трансфекции с использованием минигена USH2A дикого типа. Как показано на фиг. 26А и фиг. 26С (левые стороны панелей), AsCas12a и LbCas12a в комбинации со всеми тестируемыми гРНК не нарушали сплайсинг транскрипта минигена USH2A дикого типа (ср. дорожки scr, рандомизированный, с дорожками g1-g3).

[0305] Для дальнейшего подтверждения эффективности стратегии коррекции клоны HEK293, стабильно экспрессирующие мутантный миниген USH2A с.7595-2144A>G и соответствующий миниген дикого типа, получали и охарактеризовывали по количеству копий с использованием анализа qPCR. Для дальнейших исследований выбирали три клон: два клон, экспрессирующих мутантный миниген (клон 4, несущий 2 копии мутантного минигена; клон 6, несущий 1 копию мутантного минигена), и один клон (клон

1), отличающийся 5 копиями минигена дикого типа. Кроме того, только LbCas12a в комбинации с гидом 1 и гидом 3 тестировали дополнительно, т.к. они оказались лучшими комбинациями в исследованиях транзиторной трансфекции. Продуцировали лентивирусные векторы, кодирующие LbCas12a и гид 1, гид 3 или рандомизированную ненацеленную гРНК. Клоны НЕК293, несущие мутантные минигены, трансдуцировали с использованием каждого из трех лентивирусных векторов и хранили в течение 10 дней при селекции пурамицином для выделения трансдуцированных клеток. Затем уровни коррекции сплайсинга USH2A оценивали посредством RT-ПЦР на тотальной выделенной РНК, выявляя восстановление скорректированного транскрипта с обеими гРНК (фиг. 27А-В), при этом гид 1 демонстрировал более высокую эффективность, чем гид 3 (приблизительно 80% по сравнению с 40-50%, соответственно, см. фиг. 27В) в соответствии с предыдущими данными, полученными в исследованиях транзиторной трансфекции. Примечательно, что коррекция сплайсинга была согласованной в обоих тестируемых клонах (фиг. 27А-В), что дополнительно подтверждает эффективность подхода.

[0306] Уровни образования инсерционно-делеционной мутации в минигенах дикого типа и мутантных минигенов, образуемых разными комбинациями LbCas12a-гРНК, также изучали для оценки их аллельной специфичности. Геномную ДНК, выделенную из тех же образцов, используемых для оценки транскрипта, подвергали ПЦР-амплификации, секвенировали по Сэнгеру и анализировали с использованием веб-инструмента TIDE (фиг. 27С). Для всех тестируемых гРНК измеряли значительное образование инсерционно-делеционных мутаций в мутантном минигене USH2A (приблизительно 80%, см. фиг. 27С), демонстрируя хорошую согласованность среди двух разных тестируемых клонов (клон 4 и клон 6). Затем образование инсерционно-делеционных мутаций оценивали после трансдукции клона 1 НЕК293, стабильно экспрессирующего минигена USH2A дикого типа. Как и ожидали, гид 3 не демонстрировал какой-либо аллельной специфичности, т.к. целевой домен этой гРНК не располагался на мутации с.7595-2144А>G, и, таким образом, его мишень присутствует в минигенах дикого типа и мутантных минигенах (фиг. 27С). С другой стороны, гид 1, нацеленный на мутацию с.7595-2144А>G, фактически мог приводить к инсерционно-делеционным мутациям в мутантном минигене в клонах 4 и 6, в то время как определяли фоновые уровни редактирования в клоне 1, экспрессирующем конструкцию USH2A дикого типа (фиг. 27С). Кроме того, профили инсерционно-делеционных мутаций, генерируемых гидом 1 и гидом 3 в клонах 4 и 6 USH2A с.7595-2144А>G анализировали с использованием веб-инструмента Synthego ICE, определяя широкий спектр делеций в диапазоне от -1 н. до -22 н. (фиг. 28А-28D). Примечательно, что гид 3, в отличие от гида 1, также приводил к инсерциям, несмотря на низкую частоту. Кроме того, наблюдали хорошую согласованность среди двух клонов в отношении определенных инсерционно-делеционных мутаций, даже притом, что их относительная частота не всегда сохранялась среди двух линий клеток.

7. КОНКРЕТНЫЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

[0307] Настоящее изобретение проиллюстрировано примерами конкретных вариантов осуществления ниже.

1. Молекула гидовой РНК (гРНК) Cas12a, содержащая:

- (a) протоспейсерный домен, содержащий нацеливающую последовательность; и
- (b) петлевой домен;

где

(i) нацеливающая последовательность соответствует целевому домену в последовательности геномной ДНК;

(ii) целевой домен является смежным с протоспейсер-смежным мотивом (РАМ) белка Cas12a; и

(iii) после встраивания гРНК и белка Cas12a в клетку, содержащую геномную последовательность, Cas12a расщепляет геномную ДНК через до 15 нуклеотидов от участка сплайсинга, кодируемого геномной ДНК.

2. гРНК Cas12a по варианту осуществления 1, где клетка является эукариотической клеткой.

3. гРНК Cas12a по варианту осуществления 2, где является клеткой млекопитающего.

4. гРНК Cas12a по варианту осуществления 3, где является клеткой человека.

5. Молекула гидовой РНК (гРНК) Cas12a, содержащая:

- (a) протоспейсерный домен, содержащий нацеливающую последовательность; и
- (b) петлевой домен;

где

(i) нацеливающая последовательность соответствует целевому домену в последовательности геномной ДНК;

(ii) целевой домен является смежным с протоспейсер-смежным мотивом (РАМ) белка Cas12a; и

(iii) РАМ находится в пределах 40 нуклеотидов от участка сплайсинга, кодируемого геномной ДНК.

6. гРНК Cas12a по варианту осуществления 5, где РАМ находится в пределах от 4 до 38 нуклеотидов от участка сплайсинга.

7. гРНК Cas12a по варианту осуществления 5 или варианту осуществления 6, где после встраивания гРНК и белка Cas12a в клетку, содержащую геномную последовательность, Cas12a расщепляет геномную ДНК через до 15 нуклеотидов от участка сплайсинга.

8. гРНК Cas12a по варианту осуществления 7, где клетка является эукариотической клеткой.

9. гРНК Cas12a по варианту осуществления 8, где является клеткой млекопитающего.

10. гРНК Cas12a по варианту осуществления 9, где является клеткой человека.

11. Молекула гРНК Cas12a по любому из вариантов осуществления 1-10, где после встраивания гРНК и белка Cas12a в клетку, содержащую геномную последовательность, Cas12a расщепляет геномную ДНК через до 10 нуклеотидов от участка сплайсинга.

12. Молекула гРНК Cas12a по любому из вариантов осуществления 1-10, где после встраивания гРНК и белка Cas12a в клетку, содержащую геномную последовательность, Cas12a расщепляет геномную ДНК через 10-15 нуклеотидов от участка сплайсинга.

13. Молекула гРНК Cas12a по любому из вариантов осуществления 1-12, где участок сплайсинга является криптическим участком сплайсинга.

14. Молекула гРНК Cas12a по варианту осуществления 13, где криптический участок сплайсинга образуется в результате мутации в последовательности геномной ДНК.

15. Молекула гРНК Cas12a по варианту осуществления 13, где криптический участок сплайсинга активирован мутацией в последовательности геномной ДНК.

16. гРНК Cas12a по варианту осуществления 14 или варианту осуществления 15, где мутация локализована через 1-23 нуклеотида в 3'-направлении от последовательности РАМ.

17. гРНК Cas12a по любому из вариантов осуществления 14-16, где мутация является однонуклеотидным полиморфизмом.

18. гРНК Cas12a по любому из вариантов осуществления 14-16, где мутация является делецией.

19. гРНК Cas12a по варианту осуществления 18, где делеция является делецией от 1 до 10^6 нуклеотидов.

20. гРНК Cas12a по варианту осуществления 18, где делеция является делецией от 1 до 10^5 нуклеотидов.

21. гРНК Cas12a по варианту осуществления 18, где делеция является делецией от 1 до 10^4 нуклеотидов.

22. гРНК Cas12a по варианту осуществления 18, где делеция является делецией от 1 до 10^3 нуклеотидов.

23. гРНК Cas12a по варианту осуществления 18, где делеция является делецией от 1 до 100 нуклеотидов.

24. гРНК Cas12a по варианту осуществления 18, где делеция является делецией от 1 до 10 нуклеотидов.

25. гРНК Cas12a по любому из вариантов осуществления 14-16, где мутация является инсерцией.

26. гРНК Cas 12 по варианту осуществления 25, где инсерция является инсерцией от 1 до 10^6 нуклеотидов.

27. гРНК Cas 12 по варианту осуществления 25, где инсерция является инсерцией от 1 до 10^5 нуклеотидов.

28. гРНК Cas 12 по варианту осуществления 25, где инсерция является инсерцией от 1 до 10^4 нуклеотидов.

29. гРНК Cas 12 по варианту осуществления 25, где инсерция является инсерцией от 1 до 10^3 нуклеотидов.

30. гРНК Cas 12 по варианту осуществления 25, где инсерция является инсерцией от 1 до 100 нуклеотидов.

31. гРНК Cas 12 по варианту осуществления 25, где инсерция является инсерцией от 1 до 10 нуклеотидов.

32. гРНК Cas12a по любому из вариантов осуществления 14-31, где после встраивания гРНК и белка Cas12a в популяцию клеток, содержащих геномную последовательность, *in vitro* расщепление геномной ДНК белком Cas12a приводит к делеции мутации в 10-50% образующихся инсерционно-делеционных мутаций.

33. гРНК Cas12a по любому из вариантов осуществления 14-31, где после встраивания гРНК и белка Cas12a в популяцию клеток, содержащих геномную последовательность, *in vitro* расщепление геномной ДНК белком Cas12a приводит к делеции мутации в 10-40% образующихся инсерционно-делеционных мутаций.

34. гРНК Cas12a по любому из вариантов осуществления 14-31, где после встраивания гРНК и белка Cas12a в популяцию клеток, содержащих геномную последовательность *in vitro*, расщепление геномной ДНК белком Cas12a приводит к делеции мутации в 10-30% образующихся инсерционно-делеционных мутаций.

35. гРНК Cas12a по любому из вариантов осуществления 14-31, где после встраивания гРНК и белка Cas12a в популяцию клеток, содержащих геномную последовательность *in vitro*, расщепление геномной ДНК белком Cas12a приводит к делеции мутации в 10-20% образующихся инсерционно-делеционных мутаций.

36. гРНК Cas12a по любому из вариантов осуществления 13-35, где сплайсинг по криптическому участку сплайсинга приводит к фенотипу заболевания.

37. гРНК Cas12a по любому из вариантов осуществления 13-36, где при встраивании с использованием белка Cas12a в клетку, имеющую последовательность геномной ДНК, корректируют аномальный сплайсинг, вызванный криптическим участком сплайсинга.

38. гРНК Cas12a по любому из вариантов осуществления 13-36, где при встраивании с использованием белка Cas12a в популяцию клеток, имеющих последовательность геномной ДНК, *in vitro* нормальный сплайсинг восстанавливают по меньшей мере в 10% клеток.

39. гРНК Cas12a по варианту осуществления 38, где при встраивании с использованием белка Cas12a в популяцию клеток, имеющих последовательность геномной ДНК, *in vitro* нормальный сплайсинг восстанавливают в 10% до 20% клеток.

40. гРНК Cas12a по любому из вариантов осуществления 13-36, где при встраивании с использованием белка Cas12a в популяцию клеток, имеющих последовательность геномной ДНК, *in vitro* нормальный сплайсинг восстанавливают по меньшей мере в 20% клеток.

41. гРНК Cas12a по варианту осуществления 40, где при встраивании с использованием белка Cas12a в популяцию клеток, имеющих последовательность геномной ДНК, *in vitro* нормальный сплайсинг восстанавливают в 20-30% клеток.

42. гРНК Cas12a по любому из вариантов осуществления 13-36, где при встраивании с использованием белка Cas12a в популяцию клеток, имеющих последовательность геномной ДНК, *in vitro* нормальный сплайсинг восстанавливают по меньшей мере в 30% клеток.

43. гРНК Cas12a по варианту осуществления 42, где при встраивании с использованием белка Cas12a в популяцию клеток, имеющих последовательность геномной ДНК, *in vitro* нормальный сплайсинг восстанавливают в 30-40% клеток.

44. гРНК Cas12a по любому из вариантов осуществления 13-36, где при встраивании с использованием белка Cas12a в популяцию клеток, имеющих последовательность геномной ДНК, *in vitro* нормальный сплайсинг восстанавливают по меньшей мере в 40% клеток.

45. гРНК Cas12a по варианту осуществления 44, где при встраивании с использованием белка Cas12a в популяцию клеток, имеющих последовательность геномной ДНК, *in vitro* нормальный сплайсинг восстанавливают в 40-50% клеток.

46. гРНК Cas12a по любому из вариантов осуществления 13-36, где при встраивании с использованием белка Cas12a в популяцию клеток, имеющих последовательность геномной ДНК, *in vitro* нормальный сплайсинг восстанавливают по меньшей мере в 50% клеток.

47. гРНК Cas12a по варианту осуществления 46, где при встраивании с использованием белка Cas12a в популяцию клеток, имеющих последовательность геномной ДНК, *in vitro* нормальный сплайсинг восстанавливают в 50-60% клеток.

48. гРНК Cas12a по любому из вариантов осуществления 13-36, где при встраивании с использованием белка Cas12a в популяцию клеток, имеющих последовательность геномной ДНК, *in vitro* нормальный сплайсинг восстанавливают по меньшей мере в 60% клеток.

49. гРНК Cas12a по варианту осуществления 48, где при встраивании с использованием белка Cas12a в популяцию клеток, имеющих последовательность геномной ДНК, *in vitro* нормальный сплайсинг восстанавливают в 60-70% клеток.

50. гРНК Cas12a по любому из вариантов осуществления 13-36, где при встраивании с использованием белка Cas12a в популяцию клеток, имеющих последовательность геномной ДНК, *in vitro* нормальный сплайсинг восстанавливают по меньшей мере в 70% клеток.

51. гРНК Cas12a по варианту осуществления 50, где при встраивании с использованием белка Cas12a в популяцию клеток, имеющих последовательность геномной ДНК, *in vitro* нормальный сплайсинг восстанавливают в 70-80% клеток.

52. гРНК Cas12a по варианту осуществления 50, где при встраивании с использованием белка Cas12a в популяцию клеток, имеющих последовательность геномной ДНК, *in vitro* нормальный сплайсинг восстанавливают в 70-90% клеток.

53. Молекула гРНК Cas12a по любому из вариантов осуществления 13-52, где криптический участок сплайсинга является криптическим 3'-участком сплайсинга.

54. Молекула гРНК Cas12a по варианту осуществления 53, где после встраивания гРНК и белка Cas12a в клетку, содержащую геномную последовательность, активность криптического 3'-участка сплайсинга снижена.

55. Молекула гРНК Cas12a по варианту осуществления 54, где после встраивания гРНК и белка Cas12a в клетку, содержащую геномную последовательность, участок ветвления криптического 3'-участка сплайсинга поврежден.

56. Молекула гРНК Cas12a по варианту осуществления 54, где после встраивания гРНК и белка Cas12a в клетку, содержащую геномную последовательность, полипиримидиновый тракт криптического 3'-участка сплайсинга поврежден.

57. Молекула гРНК Cas12a по варианту осуществления 54, где после встраивания гРНК и белка Cas12a в клетку, содержащую геномную последовательность, интрон/экзонное соединение криптического 3'-участка сплайсинга повреждено.

58. гРНК Cas12a по любому из вариантов осуществления 53-57, где криптический 3'-участок сплайсинга находится выше канонического 3'-участка сплайсинга.

59. гРНК Cas12a по любому из вариантов осуществления вариант осуществления 53-58, где криптический 3'-участок сплайсинга находится выше криптического 5'-участка сплайсинга.

60. Молекула гРНК Cas12a по любому из вариантов осуществления 13-52, где криптический участок сплайсинга является криптическим 5'-участком сплайсинга.

61. Молекула гРНК Cas12a по варианту осуществления 60, где после встраивания гРНК и белка Cas12a в клетку, содержащую геномную последовательность, активность криптического 5'-участка сплайсинга снижена.

62. Молекула гРНК Cas12a по варианту осуществления 61, где после встраивания гРНК и белка Cas12a в клетку, содержащую геномную последовательность, интрон/экзонное соединение криптического 5'-участка сплайсинга повреждено.

63. гРНК Cas12a по любому из вариантов осуществления 60-62, где криптический 5'-участок сплайсинга находится ниже криптического 3'-участка сплайсинга.

64. гРНК Cas12a по любому из вариантов осуществления 60-62, где криптический 5'-участок сплайсинга находится ниже канонического 5'-участка сплайсинга.

65. гРНК Cas12a по любому из вариантов осуществления 1-12, где участок сплайсинга является каноническим участком сплайсинга.

66. гРНК Cas12a по варианту осуществления 65, где канонический участок сплайсинга является каноническим 3'-участком сплайсинга.

67. Молекула гРНК Cas12a по варианту осуществления 66, где после встраивания гРНК и белка Cas12a в клетку, содержащую геномную последовательность, активность канонического 3'-участка сплайсинга нарушена.

68. Молекула гРНК Cas12a по варианту осуществления 67, где после встраивания гРНК и белка Cas12a в клетку, содержащую геномную последовательность, участок ветвления канонического 3'-участка сплайсинга поврежден.

69. Молекула гРНК Cas12a по варианту осуществления 67, где после встраивания гРНК и белка Cas12a в клетку, содержащую геномную последовательность, полипиримидиновый тракт канонического 3'-участка сплайсинга поврежден.

70. Молекула гРНК Cas12a по варианту осуществления 67, где после встраивания гРНК и белка Cas12a в клетку, содержащую геномную последовательность, интрон/экзонное соединение канонического 3'-участка сплайсинга повреждено.

71. гРНК Cas12a по варианту осуществления 65, где канонический участок сплайсинга является каноническим 5'-участком сплайсинга.

72. Молекула гРНК Cas12a по варианту осуществления 71, где после встраивания гРНК и белка Cas12a в клетку, содержащую геномную последовательность, активность канонического 5'-участка сплайсинга снижена.

73. Молекула гРНК Cas12a по варианту осуществления 71, где после встраивания гРНК и белка Cas12a в клетку, содержащую геномную последовательность, интрон/экзонное соединение канонического 5'-участка сплайсинга повреждено.

74. гРНК Cas12a по любому из вариантов осуществления 1-73, имеющая длину 40-44 нуклеотида.

75. гРНК Cas12a по любому из вариантов осуществления 1-74, где нацеливающая последовательность имеет длину 20-24 нуклеотида.

76. гРНК Cas12a по любому из вариантов осуществления 1-75, где протоспейсерный домен имеет длину 17-26 нуклеотидов.

77. гРНК Cas12a по любому из вариантов осуществления 1-75, где протоспейсерный домен имеет длину 20-24 нуклеотида.

78. гРНК Cas12a по любому из вариантов осуществления 1-77, где нацеливающая последовательность имеет длину 23 нуклеотида.

79. гРНК Cas12a по любому из вариантов осуществления 1-78, где нет ошибочно спаренных оснований между нацеливающей последовательностью и комплементом целевого домена.

80. гРНК Cas12a по любому из вариантов осуществления 1-79, где протоспейсерный домен имеет длину 23 нуклеотида.

81. гРНК Cas12a по любому из вариантов осуществления 1-80, где последовательность РАМ является ТТТV, где V является А, С или G.

82. гРНК Cas12a по любому из вариантов осуществления 1-80, где последовательность РАМ является ТУСV, где У является С или Т и V является А, С или G.

83. гРНК Cas12a по любому из вариантов осуществления 1-80, где последовательность PAM является CCCC.

84. гРНК Cas12a по любому из вариантов осуществления 1-80, где последовательность PAM является ACCC.

85. гРНК Cas12a по любому из вариантов осуществления 1-80, где последовательность PAM является TATV, где V является A, C или G.

86. гРНК Cas12a по любому из вариантов осуществления 1-80, где последовательность PAM является RATR.

87. гРНК Cas12a по любому из вариантов осуществления 1-80, где последовательность PAM является NTTN, где N является любым нуклеотидом.

88. гРНК Cas12a по любому из вариантов осуществления 1-80, где последовательность PAM является TCTN, где N является любым нуклеотидом.

89. гРНК Cas12a по любому из вариантов осуществления 1-80, где последовательность PAM является TTTN, где N является любым нуклеотидом.

90. гРНК Cas12a по любому из вариантов осуществления 1-80, где последовательность PAM является TTN, где N является любым нуклеотидом.

91. гРНК Cas12a по любому из вариантов осуществления 1-80, где последовательность PAM является YYN, где Y является C или T, и N является любым нуклеотидом.

92. гРНК Cas12a по любому из вариантов осуществления 1-80, где последовательность PAM является YTN, где Y является C или T, и N является любым нуклеотидом.

93. гРНК Cas12a по любому из вариантов осуществления 1-80, где последовательность PAM является TYYN, где Y является C или T, и N является любым нуклеотидом.

94. гРНК Cas12a по любому из вариантов осуществления 1-93, где геномная последовательность является эукариотической геномной последовательностью.

95. гРНК Cas12a по варианту осуществления 94, где эукариотическая геномная последовательность является геномной последовательностью млекопитающего.

96. гРНК Cas12a по варианту осуществления 95, где геномная последовательность млекопитающего является геномной последовательностью человека.

97. гРНК Cas12a по варианту осуществления 96, где целевой домен находится в геномной последовательности человека, являющейся геном CFTR, геном DMD, геном HBB, геном FGB, геном SOD1, геном QDPR, геном GLA, геном LDLR, геном BRIP1, геном F9, геном CEP290, геном COL2A1, геном USH2A или геном GAA.

98. гРНК Cas12a по варианту осуществления 96, где целевой домен находится в геномной последовательности человека, являющейся геном CFTR, геном DMD, геном FGB, геном SOD1, геном QDPR, геном GLA, геном LDLR, геном BRIP1, геном F9, геном CEP290, геном COL2A1, геном USH2A или геном GAA.

99. гРНК Cas12a по любому из вариантов осуществления 1-96, где целевой домен не находится в гене HBB человека.

100. гРНК Cas12a по любому из вариантов осуществления 1-99, где целевой домен содержит или состоит из иной нуклеотидной последовательности, чем GGTAATAGCAATATTTCTGCATA (SEQ ID NO: 293).

101. гРНК Cas12a по любому из вариантов осуществления 1-10, где целевой домен находится в геномной последовательности человека, являющейся геном CFTR, геном DMD, геном HBB, геном FGB, геном SOD1, геном QDPR, геном GLA, геном LDLR, геном BRIP1, геном F9, геном CEP290, геном COL2A1, геном USH2A или геном GAA.

102. гРНК Cas12a по варианту осуществления 101, где целевой домен находится в гене CFTR.

103. гРНК Cas12a по варианту осуществления 102, где ген CFTR имеет мутацию, являющуюся мутацией 3272-26A>G, мутацией 3849+10kbC>T, мутацией IVS11+194A>G или мутацией IVS19+11505C>G.

104. гРНК Cas12a по варианту осуществления 103, где мутация является мутацией 3272-26A>G.

105. гРНК Cas12a по варианту осуществления 104, где целевой домен имеет нуклеотидную последовательность CATAGAAAACACTGCAAATAACA (SEQ ID NO: 38).

106. Молекула гидовой РНК (гРНК) Cas12a, содержащая протоспейсерный домен, содержащий нацеливающую последовательность, и петлевой домен, где нацеливающая последовательность соответствует целевому домену, имеющему нуклеотидную последовательность CATAGAAAACACTGCAAATAACA (SEQ ID NO: 38).

107. гРНК Cas12a по варианту осуществления 103, где мутация является мутацией 3849+10kbC>T.

108. гРНК Cas12a по варианту осуществления 107, где целевой домен имеет нуклеотидную последовательность AGGGTGTCTTACTCACCATTTTA (SEQ ID NO: 39).

109. Молекула гидовой РНК (гРНК) Cas12a, содержащая протоспейсерный домен, содержащий нацеливающую последовательность, и петлевой домен, где нацеливающая последовательность соответствует целевому домену, имеющему нуклеотидную последовательность AGGGTGTCTTACTCACCATTTTA (SEQ ID NO: 39).

110. гРНК Cas12a по варианту осуществления 103, где мутация является мутацией IVS11+194A>G.

111. гРНК Cas12a по варианту осуществления 110, где целевой домен имеет нуклеотидную последовательность TACTTGAGATGTAAGTAAGGTТА (SEQ ID NO: 40).

112. Молекула гидовой РНК (гРНК) Cas12a, содержащая протоспейсерный домен, содержащий нацеливающую последовательность, и петлевой домен, где нацеливающая последовательность соответствует целевому домену, имеющему нуклеотидную последовательность TACTTGAGATGTAAGTAAGGTТА (SEQ ID NO: 40).

113. гРНК Cas12a по варианту осуществления 110, где целевой домен имеет нуклеотидную последовательность ATAGTAACCTTACTTACATCTCA (SEQ ID NO: 41).

114. Молекула гидовой РНК (гРНК) Cas12a, содержащая протоспейсерный домен, содержащий нацеливающую последовательность, и петлевой домен, где нацеливающая последовательность соответствует целевому домену, имеющему нуклеотидную последовательность ATAGTAACCTTACTTACATCTCA (SEQ ID NO: 41).

115. гРНК Cas12a по варианту осуществления 103, где мутация является мутацией IVS19+11505C>G.

116. гРНК Cas12a по варианту осуществления 115, где целевой домен имеет нуклеотидную последовательность AAATTCCATCTTACCAATTCTAA (SEQ ID NO: 42).

117. Молекула гидовой РНК (гРНК) Cas12a, содержащая протоспейсерный домен, содержащий нацеливающую последовательность, и петлевой домен, где нацеливающая последовательность соответствует целевому домену, имеющему нуклеотидную последовательность AAATTCCATCTTACCAATTCTAA (SEQ ID NO: 42).

118. гРНК Cas12a по варианту осуществления 115, где целевой домен имеет нуклеотидную последовательность AACGTTAAAATTCCATCTTACCA (SEQ ID NO: 43).

119. Молекула гидовой РНК (гРНК) Cas12a, содержащая протоспейсерный домен, содержащий нацеливающую последовательность, и петлевой домен, где нацеливающая последовательность соответствует целевому домену, имеющему нуклеотидную последовательность AACGTTAAAATTCCATCTTACCA (SEQ ID NO: 43).

120. гРНК Cas12a по варианту осуществления 101, где целевой домен находится в гене DMD.

121. гРНК Cas12a по варианту осуществления 120, где ген DMD имеет мутацию, являющуюся мутацией IVS9+46806C>T, мутацией IVS62+62296A>G, мутацией IVS1+36947G>A, мутацией IVS1+36846G>A, мутацией IVS1+36846G>A, мутацией IVS2+5591T>A или мутацией IVS8-15A>G.

122. гРНК Cas12a по варианту осуществления 121, где мутация является мутацией IVS9+46806C>T.

123. гРНК Cas12a по варианту осуществления 122, где целевой домен имеет нуклеотидную последовательность TGACCTTTGGTAAGTCATCTAAT (SEQ ID NO: 44).

124. Молекула гидовой РНК (гРНК) Cas12a, содержащая протоспейсерный домен, содержащий нацеливающую последовательность, и петлевой домен, где нацеливающая последовательность соответствует целевому домену, имеющему нуклеотидную последовательность TGACCTTTGGTAAGTCATCTAAT (SEQ ID NO: 44).

125. гРНК Cas12a по варианту осуществления 122, где целевой домен имеет нуклеотидную последовательность CCTTTGTGACCTTTGGTAAGTCA (SEQ ID NO: 45).

126. Молекула гидовой РНК (гРНК) Cas12a, содержащая протоспейсерный домен, содержащий нацеливающую последовательность, и петлевой домен, где нацеливающая последовательность соответствует целевому домену, имеющему нуклеотидную последовательность CCTTTGTGACCTTTGGTAAGTCA (SEQ ID NO: 45).

127. гРНК Cas12a по варианту осуществления 121, где мутация является мутацией IVS62+62296A>G.

128. гРНК Cas12a по варианту осуществления 127, где целевой домен имеет нуклеотидную последовательность TTGATCACATAACAAGGTCAGTT (SEQ ID NO: 46).

129. Молекула гидовой РНК (гРНК) Cas12a, содержащая протоспейсерный домен, содержащий нацеливающую последовательность, и петлевой домен, где нацеливающая последовательность соответствует целевому домену, имеющему нуклеотидную последовательность TTGATCACATAACAAGGTCAGTT (SEQ ID NO: 46).

130. гРНК Cas12a по варианту осуществления 127, где целевой домен имеет нуклеотидную последовательность ATCACATAACAAGGTCAGTTTAT (SEQ ID NO: 47).

131. Молекула гидовой РНК (гРНК) Cas12a, содержащая протоспейсерный домен, содержащий нацеливающую последовательность, и петлевой домен, где нацеливающая последовательность соответствует целевому домену, имеющему нуклеотидную последовательность ATCACATAACAAGGTCAGTTTAT (SEQ ID NO: 47).

132. гРНК Cas12a по варианту осуществления 127, имеющая нуклеотидную последовательность AGTTATGATAAACTGACCTTGTT (SEQ ID NO: 48).

133. Молекула гидовой РНК (гРНК) Cas12a, содержащая протоспейсерный домен, содержащий нацеливающую последовательность, и петлевой домен, где нацеливающая последовательность соответствует целевому домену, имеющему нуклеотидную последовательность AGTTATGATAAACTGACCTTGTT (SEQ ID NO: 48).

134. гРНК Cas12a по варианту осуществления 127, имеющая нуклеотидную последовательность TGATAAACTGACCTTGTTATGTG (SEQ ID NO: 49).

135. Молекула гидовой РНК (гРНК) Cas12a, содержащая протоспейсерный домен, содержащий нацеливающую последовательность, и петлевой домен, где нацеливающая последовательность соответствует целевому домену, имеющему нуклеотидную последовательность TGATAAACTGACCTTGTTATGTG (SEQ ID NO: 49).

136. гРНК Cas12a по варианту осуществления 121, где мутация является мутацией IVS1+36947G>A.

137. гРНК Cas12a по варианту осуществления 136, где целевой домен имеет нуклеотидную последовательность TCTTCCTTGGTTTTGCAGCTTCT (SEQ ID NO: 50).

138. Молекула гидовой РНК (гРНК) Cas12a, содержащая протоспейсерный домен, содержащий нацеливающую последовательность, и петлевой домен, где нацеливающая последовательность соответствует целевому домену, имеющему нуклеотидную последовательность TCTTCCTTGGTTTTGCAGCTTCT (SEQ ID NO: 50).

139. гРНК Cas12a по варианту осуществления 136, где целевой домен имеет нуклеотидную последовательность TTGGTTTTGCAGCTTCTCGAGTT (SEQ ID NO: 51).

140. Молекула гидовой РНК (гРНК) Cas12a, содержащая протоспейсерный домен, содержащий нацеливающую последовательность, и петлевой домен, где нацеливающая последовательность соответствует целевому домену, имеющему нуклеотидную последовательность TTGGTTTTGCAGCTTCTCGAGTT (SEQ ID NO: 51).

141. гРНК Cas12a по варианту осуществления 136, где целевой домен имеет нуклеотидную последовательность CTCTTTCTCTTCCTTGGTTTTGC (SEQ ID NO: 52).

142. Молекула гидовой РНК (гРНК) Cas12a, содержащая протоспейсерный домен, содержащий нацеливающую последовательность, и петлевой домен, где нацеливающая последовательность соответствует целевому домену, имеющему нуклеотидную последовательность CTCTTTCTCTTCCTTGGTTTTGC (SEQ ID NO: 52).

143. гРНК Cas12a по варианту осуществления 121, где мутация является мутацией IVS2+5591T>A.

144. гРНК Cas12a по варианту осуществления 143, где целевой домен имеет нуклеотидную последовательность CTTGTTTCTCTACATAGGTTGAA (SEQ ID NO: 53).

145. Молекула гидовой РНК (гРНК) Cas12a, содержащая протоспейсерный домен, содержащий нацеливающую последовательность, и петлевой домен, где нацеливающая последовательность соответствует целевому домену, имеющему нуклеотидную последовательность CTTGTTTCTCTACATAGGTTGAA (SEQ ID NO: 53).

146. гРНК Cas12a по варианту осуществления 121, где мутация является мутацией IVS8-15A>G.

147. гРНК Cas12a по варианту осуществления 146, где целевой домен имеет нуклеотидную последовательность TCCTCTCTATCCACCTCCCCCAG (SEQ ID NO: 54).

148. Молекула гидовой РНК (гРНК) Cas12a, содержащая протоспейсерный домен, содержащий нацеливающую последовательность, и петлевой домен, где нацеливающая последовательность соответствует целевому домену, имеющему нуклеотидную последовательность TCCTCTCTATCCACCTCCCCCAG (SEQ ID NO: 54).

149. гРНК Cas12a по варианту осуществления 146, где целевой домен имеет нуклеотидную последовательность CCTCCCCCAGACCCTTCTCTGCA (SEQ ID NO: 55).

150. Молекула гидовой РНК (гРНК) Cas12a, содержащая протоспейсерный домен, содержащий нацеливающую последовательность, и петлевой домен, где нацеливающая последовательность соответствует целевому домену, имеющему нуклеотидную последовательность CCTCCCCCAGACCCTTCTCTGCA (SEQ ID NO: 55).

151. гРНК Cas12a по варианту осуществления 146, где целевой домен имеет нуклеотидную последовательность CCCCTCCTCTCTATCCACTCCCC (SEQ ID NO: 56).

152. Молекула гидовой РНК (гРНК) Cas12a, содержащая протоспейсерный домен, содержащий нацеливающую последовательность, и петлевой домен, где нацеливающая последовательность соответствует целевому домену, имеющему нуклеотидную последовательность CCCCTCCTCTCTATCCACTCCCC (SEQ ID NO: 56).

153. гРНК Cas12a по варианту осуществления 146, где целевой домен имеет нуклеотидную последовательность CCTCCTCTCTATCCACCTCCCC (SEQ ID NO: 57).

154. Молекула гидовой РНК (гРНК) Cas12a, содержащая протоспейсерный домен, содержащий нацеливающую последовательность, и петлевой домен, где нацеливающая последовательность соответствует целевому домену, имеющему нуклеотидную последовательность CCTCCTCTCTATCCACCTCCCC (SEQ ID NO: 57).

155. гРНК Cas12a по варианту осуществления 120, где целевой домен находится в интроне 50 и/или экзоне 51 DMD.

156. гРНК Cas12a по варианту осуществления 155, где целевой домен имеет нуклеотидную последовательность CAAAAACCCAAAAATATTTTAGCT (SEQ ID NO: 58).

157. Молекула гидовой РНК (гРНК) Cas12a, содержащая протоспейсерный домен, содержащий нацеливающую последовательность, и петлевой домен, где нацеливающая последовательность соответствует целевому домену, имеющему нуклеотидную последовательность CAAAAACCCAAAAATATTTTAGCT (SEQ ID NO: 58).

158. гРНК Cas12a по варианту осуществления 155, где целевой домен имеет нуклеотидную последовательность CTTTTTGCAAAAACCCAAAAATAT (SEQ ID NO: 59).

159. Молекула гидовой РНК (гРНК) Cas12a, содержащая протоспейсерный домен, содержащий нацеливающую последовательность, и петлевой домен, где нацеливающая последовательность соответствует целевому домену, имеющему нуклеотидную последовательность CTTTTTGCAAAAACCCAAAAATAT (SEQ ID NO: 59).

160. гРНК Cas12a по варианту осуществления 155, где целевой домен имеет нуклеотидную последовательность TTTTTGCAAAAACCCAAAAATATT (SEQ ID NO: 60).

161. Молекула гидовой РНК (гРНК) Cas12a, содержащая протоспейсерный домен, содержащий нацеливающую последовательность, и петлевой домен, где нацеливающая последовательность соответствует целевому домену, имеющему нуклеотидную последовательность TTTTTGCAAAAACCCAAAAATATT (SEQ ID NO: 60).

162. гРНК Cas12a по варианту осуществления 155, где целевой домен имеет нуклеотидную последовательность TGTCACCAGAGTAACAGTCTGAG (SEQ ID NO: 61).

163. Молекула гидовой РНК (гРНК) Cas12a, содержащая протоспейсерный домен, содержащий нацеливающую последовательность, и петлевой домен, где нацеливающая последовательность соответствует целевому домену, имеющему нуклеотидную последовательность TGTCACCAGAGTAACAGTCTGAG (SEQ ID NO: 61).

164. гРНК Cas12a по варианту осуществления 155, где целевой домен имеет нуклеотидную последовательность GTCCTACTCAGACTGTTACTCT (SEQ ID NO: 62).

165. Молекула гидовой РНК (гРНК) Cas12a, содержащая протоспейсерный домен, содержащий нацеливающую последовательность, и петлевой домен, где нацеливающая последовательность соответствует целевому домену, имеющему нуклеотидную последовательность GTCCTACTCAGACTGTTACTCT (SEQ ID NO: 62).

166. гРНК Cas12a по варианту осуществления 101, где целевой домен находится в гене HBB.

167. гРНК Cas12a по варианту осуществления 166, где ген HBB имеет мутацию, являющуюся мутацией IVS2+645C>T, IVS2+705T>G или IVS2+745C>G.

168. гРНК Cas12a по варианту осуществления 167, где мутация является мутацией IVS2+645C>T.

169. гРНК Cas12a по любому из вариантов осуществления 166 до 168, где целевой домен содержит или состоит из иной нуклеотидной последовательности, чем GGTAATAGCAATATTTCTGCATA (SEQ ID NO: 293).

170. гРНК Cas12a по варианту осуществления 168, где целевой домен имеет нуклеотидную последовательность TGGGTAAAGGTAATAGCAATATC (SEQ ID NO: 63).

171. Молекула гидовой РНК (гРНК) Cas12a, содержащая протоспейсерный домен, содержащий нацеливающую последовательность, и петлевой домен, где нацеливающая последовательность соответствует целевому домену, имеющему нуклеотидную последовательность TGGGTAAAGGTAATAGCAATATC (SEQ ID NO: 63).

172. гРНК Cas12a по варианту осуществления 168, где целевой домен имеет нуклеотидную последовательность TATGCAGAGATATTGCTATTACC (SEQ ID NO: 64).

173. Молекула гидовой РНК (гРНК) Cas12a, содержащая протоспейсерный домен, содержащий нацеливающую последовательность, и петлевой домен, где нацеливающая последовательность соответствует целевому домену, имеющему нуклеотидную последовательность TATGCAGAGATATTGCTATTACC (SEQ ID NO: 64).

174. гРНК Cas12a по варианту осуществления 168, где целевой домен имеет нуклеотидную последовательность СТАТТАССТТААСССАГАААТТА (SEQ ID NO: 65).

175. Молекула гидовой РНК (гРНК) Cas12a, содержащая протоспейсерный домен, содержащий нацеливающую последовательность, и петлевой домен, где нацеливающая последовательность соответствует целевому домену, имеющему нуклеотидную последовательность СТАТТАССТТААСССАГАААТТА (SEQ ID NO: 65).

176. гРНК Cas12a по варианту осуществления 168, где целевой домен имеет нуклеотидную последовательность САГАГАТАТТГСТАТТАССТТАА (SEQ ID NO: 66).

177. Молекула гидовой РНК (гРНК) Cas12a, содержащая протоспейсерный домен, содержащий нацеливающую последовательность, и петлевой домен, где нацеливающая последовательность соответствует целевому домену, имеющему нуклеотидную последовательность САГАГАТАТТГСТАТТАССТТАА (SEQ ID NO: 66).

178. гРНК Cas12a по варианту осуществления 167, где мутация является мутацией IVS2+705T>G.

179. гРНК Cas12a по варианту осуществления 178, где целевой домен имеет нуклеотидную последовательность TGCATATAAATTGTAAGTGGT (SEQ ID NO: 67).

180. Молекула гидовой РНК (гРНК) Cas12a, содержащая протоспейсерный домен, содержащий нацеливающую последовательность, и петлевой домен, где нацеливающая последовательность соответствует целевому домену, имеющему нуклеотидную последовательность TGCATATAAATTGTAAGTGGT (SEQ ID NO: 67).

181. гРНК Cas12a по варианту осуществления 178, где целевой домен имеет нуклеотидную последовательность ААТТГТААСТГАГГТААГАГГТТ (SEQ ID NO: 68).

182. Молекула гидовой РНК (гРНК) Cas12a, содержащая протоспейсерный домен, содержащий нацеливающую последовательность, и петлевой домен, где нацеливающая последовательность соответствует целевому домену, имеющему нуклеотидную последовательность ААТТГТААСТГАГГТААГАГГТТ (SEQ ID NO: 68).

183. гРНК Cas12a по варианту осуществления 178, где целевой домен имеет нуклеотидную последовательность АААССТСТТАССТСАГТТАСААТ (SEQ ID NO: 69).

184. Молекула гидовой РНК (гРНК) Cas12a, содержащая протоспейсерный домен, содержащий нацеливающую последовательность, и петлевой домен, где нацеливающая последовательность соответствует целевому домену, имеющему нуклеотидную последовательность AAACCTCTTACCTCAGTTACAAT (SEQ ID NO: 69).

185. гРНК Cas12a по варианту осуществления 178, где целевой домен имеет нуклеотидную последовательность GCAATATGAAACCTCTTACCTCA (SEQ ID NO: 70).

186. Молекула гидовой РНК (гРНК) Cas12a, содержащая протоспейсерный домен, содержащий нацеливающую последовательность, и петлевой домен, где нацеливающая последовательность соответствует целевому домену, имеющему нуклеотидную последовательность GCAATATGAAACCTCTTACCTCA (SEQ ID NO: 70).

187. гРНК Cas12a по варианту осуществления 167, где мутация является мутацией IVS2+745C>G.

188. гРНК Cas12a по варианту осуществления 187, где целевой домен имеет нуклеотидную последовательность СТААТАГСАГСТАСААТССАГГТ (SEQ ID NO: 71).

189. Молекула гидовой РНК (гРНК) Cas12a, содержащая протоспейсерный домен, содержащий нацеливающую последовательность, и петлевой домен, где нацеливающая последовательность соответствует целевому домену, имеющему нуклеотидную последовательность СТААТАГСАГСТАСААТССАГГТ (SEQ ID NO: 71).

190. гРНК Cas12a по варианту осуществления 101, где целевой домен находится в гене FGB.

191. гРНК Cas12a по варианту осуществления 190, где ген FGB имеет мутацию IVS6+13C>T.

192. гРНК Cas12a по варианту осуществления 191, где целевой домен имеет нуклеотидную последовательность TTTTGCATACCTGTTCGTTACCT (SEQ ID NO: 72).

193. Молекула гидовой РНК (гРНК) Cas12a, содержащая протоспейсерный домен, содержащий нацеливающую последовательность, и петлевой домен, где нацеливающая последовательность соответствует целевому домену, имеющему нуклеотидную последовательность TTTTGCATACCTGTTCGTTACCT (SEQ ID NO: 72).

194. гРНК Cas12a по варианту осуществления 191, где целевой домен имеет нуклеотидную последовательность AAATAGAATGATTTTATTTTGCA (SEQ ID NO: 73).

195. Молекула гидовой РНК (гРНК) Cas12a, содержащая протоспейсерный домен, содержащий нацеливающую последовательность, и петлевой домен, где нацеливающая последовательность соответствует целевому домену, имеющему нуклеотидную последовательность AAATAGAATGATTTTATTTTGCA (SEQ ID NO: 73).

196. гРНК Cas12a по варианту осуществления 101, где целевой домен находится в гене SOD1.

197. гРНК Cas12a по варианту осуществления 196, где ген SOD1 имеет мутацию IVS4+792C>G.

198. гРНК Cas12a по варианту осуществления 197, где целевой домен имеет нуклеотидную последовательность TGGTAAGTTACACTAACCTTAGT (SEQ ID NO: 74).

199. Молекула гидовой РНК (гРНК) Cas12a, содержащая протоспейсерный домен, содержащий нацеливающую последовательность, и петлевой домен, где нацеливающая последовательность соответствует целевому домену, имеющему нуклеотидную последовательность TGGTAAGTTACACTAACCTTAGT (SEQ ID NO: 74).

200. гРНК Cas12a по варианту осуществления 101, где целевой домен находится в гене QDPR.

201. гРНК Cas12a по варианту осуществления 200, где мутация является мутацией IVS3+2552A>G.

202. гРНК Cas12a по варианту осуществления 201, где целевой домен имеет нуклеотидную последовательность TCATCTGTAAAATAAGAGTAAAA (SEQ ID NO: 75).

203. Молекула гидовой РНК (гРНК) Cas12a, содержащая протоспейсерный домен, содержащий нацеливающую последовательность, и петлевой домен, где нацеливающая последовательность соответствует целевому домену, имеющему нуклеотидную последовательность TCATCTGTAAAATAAGAGTAAAA (SEQ ID NO: 75).

204. гРНК Cas12a по варианту осуществления 101, где целевой домен находится в гене GLA.

205. гРНК Cas12a по варианту осуществления 204, где ген GLA имеет мутацию IVS4+919G>A.

206. гРНК Cas12a по варианту осуществления 205, имеющая нуклеотидную последовательность CCATGTCTCCCCACTAAAGTGTA (SEQ ID NO: 76).

207. Молекула гидовой РНК (гРНК) Cas12a, содержащая протоспейсерный домен, содержащий нацеливающую последовательность, и петлевой домен, где нацеливающая последовательность соответствует целевому домену, имеющему нуклеотидную последовательность CCATGTCTCCCCACTAAAGTGTA (SEQ ID NO: 76).

208. гРНК Cas12a по варианту осуществления 101, где целевой домен находится в гене LDLR.

209. гРНК Cas12a по варианту осуществления 208, где ген LDLR имеет мутацию IVS12+11C>G.

210. гРНК Cas12a по варианту осуществления 209, где целевой домен имеет нуклеотидную последовательность AGGTGTGGCTTAGGTACGAGATG (SEQ ID NO: 77).

211. Молекула гидовой РНК (гРНК) Cas12a, содержащая протоспейсерный домен, содержащий нацеливающую последовательность, и петлевой домен, где нацеливающая последовательность соответствует целевому домену, имеющему нуклеотидную последовательность AGGTGTGGCTTAGGTACGAGATG (SEQ ID NO: 77).

212. гРНК Cas12a по варианту осуществления 101, где целевой домен находится в гене BRIP1.

213. гРНК Cas12a по варианту осуществления 212, где ген BRIP1 имеет мутацию IVS11+2767A>T.

214. гРНК Cas12a по варианту осуществления 213, где целевой домен имеет нуклеотидную последовательность TAAAATTCTTACATACCTTTGAA (SEQ ID NO: 78).

215. Молекула гидовой РНК (гРНК) Cas12a, содержащая протоспейсерный домен, содержащий нацеливающую последовательность, и петлевой домен, где нацеливающая последовательность соответствует целевому домену, имеющему нуклеотидную последовательность TAAAATTCTTACATACCTTTGAA (SEQ ID NO: 78).

216. гРНК Cas12a по варианту осуществления 101, где целевой домен находится в гене F9.

217. гРНК Cas12a по варианту осуществления 216, где ген F9 имеет мутацию IVS5+13A>G.

218. гРНК Cas12a по варианту осуществления 217, где целевой домен имеет нуклеотидную последовательность AAAAATCTTACTCAGATTATGAC (SEQ ID NO: 79).

219. Молекула гидовой РНК (гРНК) Cas12a, содержащая протоспейсерный домен, содержащий нацеливающую последовательность, и петлевой домен, где нацеливающая последовательность соответствует целевому домену, имеющему нуклеотидную последовательность AAAAATCTTACTCAGATTATGAC (SEQ ID NO: 79).

220. гРНК Cas12a по варианту осуществления 217, где целевой домен имеет нуклеотидную последовательность TTAAAAAATCTTACTCAGATTA (SEQ ID NO: 80).

221. Молекула гидовой РНК (гРНК) Cas12a, содержащая протоспейсерный домен, содержащий нацеливающую последовательность, и петлевой домен, где нацеливающая последовательность соответствует целевому домену, имеющему нуклеотидную последовательность TTAAAAAATCTTACTCAGATTA (SEQ ID NO: 80).

222. гРНК Cas12a по варианту осуществления 101, где целевой домен находится в гене CEP290.

223. гРНК Cas12a по варианту осуществления 222, где ген CEP290 имеет мутацию IVS26+1655A>G.

224. гРНК Cas12a по варианту осуществления 223, где целевой домен имеет нуклеотидную последовательность AGTTGTAATTGTGAGTATCTCAT (SEQ ID NO: 81).

225. Молекула гидовой РНК (гРНК) Cas12a, содержащая протоспейсерный домен, содержащий нацеливающую последовательность, и петлевой домен, где нацеливающая последовательность соответствует целевому домену, имеющему нуклеотидную последовательность AGTTGTAATTGTGAGTATCTCAT (SEQ ID NO: 81).

226. гРНК Cas12a по варианту осуществления 101, где целевой домен находится в гене COL2A1.

227. гРНК Cas12a по варианту осуществления 226, где ген COL2A1 имеет мутацию IVS23+135G>A.

228. гРНК Cas12a по варианту осуществления 227, где целевой домен имеет нуклеотидную последовательность TCCATCCACACCGCAGGGAGAG (SEQ ID NO: 82).

229. Молекула гидовой РНК (гРНК) Cas12a, содержащая протоспейсерный домен, содержащий нацеливающую последовательность, и петлевой домен, где нацеливающая последовательность соответствует целевому домену, имеющему нуклеотидную последовательность TCCATCCACACCGCAGGGAGAG (SEQ ID NO: 82).

230. гРНК Cas12a по варианту осуществления 101, где целевой домен находится в гене USH2A.

231. гРНК Cas12a по варианту осуществления 230, где ген USH2A имеет мутацию IVS40-8C>G.

232. гРНК Cas12a по варианту осуществления 231, где целевой домен имеет нуклеотидную последовательность TGGATTTATTTTAGTTTACAGAA (SEQ ID NO: 83).

233. Молекула гидовой РНК (гРНК) Cas12a, содержащая протоспейсерный домен, содержащий нацеливающую последовательность, и петлевой домен, где нацеливающая последовательность соответствует целевому домену, имеющему нуклеотидную последовательность TGGATTTATTTTAGTTTACAGAA (SEQ ID NO: 83).

234. гРНК Cas12a по варианту осуществления 231, где целевой домен имеет нуклеотидную последовательность TTTTAGTTTACAGAACCTGGACC (SEQ ID NO: 84).

235. Молекула гидовой РНК (гРНК) Cas12a, содержащая протоспейсерный домен, содержащий нацеливающую последовательность, и петлевой домен, где нацеливающая последовательность соответствует целевому домену, имеющему нуклеотидную последовательность TTTTAGTTTACAGAACCTGGACC (SEQ ID NO: 84).

236. гРНК Cas12a по варианту осуществления 231, где целевой домен имеет нуклеотидную последовательность CAAGAGGTCTGACTTTCTGGATT (SEQ ID NO: 85).

237. Молекула гидовой РНК (гРНК) Cas12a, содержащая протоспейсерный домен, содержащий нацеливающую последовательность, и петлевой домен, где нацеливающая последовательность соответствует целевому домену, имеющему нуклеотидную последовательность CAAGAGGTCTGACTTTCTGGATT (SEQ ID NO: 85).

238. гРНК Cas12a по варианту осуществления 231, где целевой домен имеет нуклеотидную последовательность AGAGGTCTGACTTTCTGGATTТА (SEQ ID NO: 86).

239. Молекула гидовой РНК (гРНК) Cas12a, содержащая протоспейсерный домен, содержащий нацеливающую последовательность, и петлевой домен, где нацеливающая последовательность соответствует целевому домену, имеющему нуклеотидную последовательность AGAGGTCTGACTTTCTGGATTТА (SEQ ID NO: 86).

240. гРНК Cas12a по варианту осуществления 231, где целевой домен имеет нуклеотидную последовательность GGTTCGTGТАААСТААААТАААТC (SEQ ID NO: 87).

241. Молекула гидовой РНК (гРНК) Cas12a, содержащая протоспейсерный домен, содержащий нацеливающую последовательность, и петлевой домен, где нацеливающая последовательность соответствует целевому домену, имеющему нуклеотидную последовательность GGTTCGTGТАААСТААААТАААТC (SEQ ID NO: 87).

242. гРНК Cas12a по варианту осуществления 230, где ген USH2A имеет мутацию IVS66+39C>T.

243. гРНК Cas12a по варианту осуществления 242, где целевой домен имеет нуклеотидную последовательность TATGTCTGTACACATACCTTGTT (SEQ ID NO: 88).

244. Молекула гидовой РНК (гРНК) Cas12a, содержащая протоспейсерный домен, содержащий нацеливающую последовательность, и петлевой домен, где нацеливающая

последовательность соответствует целевому домену, имеющему нуклеотидную последовательность TATGTCTGTACACATACCTTGTT (SEQ ID NO: 88).

245. гРНК Cas12a по варианту осуществления 242, где целевой домен имеет нуклеотидную последовательность ATATGTCTGTACACATACCTTGTT (SEQ ID NO: 89).

246. Молекула гидовой РНК (гРНК) Cas12a, содержащая протоспейсерный домен, содержащий нацеливающую последовательность, и петлевой домен, где нацеливающая последовательность соответствует целевому домену, имеющему нуклеотидную последовательность ATATGTCTGTACACATACCTTGTT (SEQ ID NO: 89).

247. гРНК Cas12a по варианту осуществления 230, где ген USH2A имеет мутацию с.7595-2144A>G.

248. гРНК Cas12a по варианту осуществления 247, где целевой домен имеет нуклеотидную последовательность TTAAAGATGATCTCTTACCTTGG (SEQ ID NO: 90).

249. Молекула гидовой РНК (гРНК) Cas12a, содержащая протоспейсерный домен, содержащий нацеливающую последовательность, и петлевой домен, где нацеливающая последовательность соответствует целевому домену, имеющему нуклеотидную последовательность TTAAAGATGATCTCTTACCTTGG (SEQ ID NO: 90).

250. гРНК Cas12a по варианту осуществления 247, где целевой домен имеет нуклеотидную последовательность CCAAGGTAAGAGATCATCTTTAA (SEQ ID NO: 91).

251. Молекула гидовой РНК (гРНК) Cas12a, содержащая протоспейсерный домен, содержащий нацеливающую последовательность, и петлевой домен, где нацеливающая последовательность соответствует целевому домену, имеющему нуклеотидную последовательность CCAAGGTAAGAGATCATCTTTAA (SEQ ID NO: 91).

252. гРНК Cas12a по варианту осуществления 247, где целевой домен имеет нуклеотидную последовательность AAATTGAACACCTCTCCTTTCCC (SEQ ID NO: 92).

253. Молекула гидовой РНК (гРНК) Cas12a, содержащая протоспейсерный домен, содержащий нацеливающую последовательность, и петлевой домен, где нацеливающая последовательность соответствует целевому домену, имеющему нуклеотидную последовательность AAATTGAACACCTCTCCTTTCCC (SEQ ID NO: 92).

254. гРНК Cas12a по варианту осуществления 247, где целевой домен имеет нуклеотидную последовательность AAGATGATCTCTTACCTTGGGAA (SEQ ID NO: 93).

255. Молекула гидовой РНК (гРНК) Cas12a, содержащая протоспейсерный домен, содержащий нацеливающую последовательность, и петлевой домен, где нацеливающая последовательность соответствует целевому домену, имеющему нуклеотидную последовательность AAGATGATCTCTTACCTTGGGAA (SEQ ID NO: 93).

256. гРНК Cas12a по варианту осуществления 247, где целевой домен имеет нуклеотидную последовательность AGCTGCTTTCAGCTTCCTCTCCAG (SEQ ID NO: 94).

257. Молекула гидовой РНК (гРНК) Cas12a, содержащая протоспейсерный домен, содержащий нацеливающую последовательность, и петлевой домен, где нацеливающая последовательность соответствует целевому домену, имеющему нуклеотидную последовательность AGCTGCTTTCAGCTTCCTCTCCAG (SEQ ID NO: 94).

258. гРНК Cas12a по варианту осуществления 247, где целевой домен имеет нуклеотидную последовательность TGGAGAGGAAGCTGAAAGCAGCT (SEQ ID NO: 95).

259. Молекула гидовой РНК (гРНК) Cas12a, содержащая протоспейсерный домен, содержащий нацеливающую последовательность, и петлевой домен, где нацеливающая последовательность соответствует целевому домену, имеющему нуклеотидную последовательность TGGAGAGGAAGCTGAAAGCAGCT (SEQ ID NO: 95).

260. гРНК Cas12a по варианту осуществления 247, где целевой домен имеет нуклеотидную последовательность TGTGATTCTGGAGAGGAAGCTGA (SEQ ID NO: 96).

261. Молекула гидовой РНК (гРНК) Cas12a, содержащая протоспейсерный домен, содержащий нацеливающую последовательность, и петлевой домен, где нацеливающая последовательность соответствует целевому домену, имеющему нуклеотидную последовательность TGTGATTCTGGAGAGGAAGCTGA (SEQ ID NO: 96).

262. гРНК Cas12a по варианту осуществления 247, где целевой домен имеет нуклеотидную последовательность ACTTGTGTGATTCTGGAGAGGAA (SEQ ID NO: 97).

263. Молекула гидовой РНК (гРНК) Cas12a, содержащая протоспейсерный домен, содержащий нацеливающую последовательность, и петлевой домен, где нацеливающая последовательность соответствует целевому домену, имеющему нуклеотидную последовательность ACTTGTGTGATTCTGGAGAGGAA (SEQ ID NO: 97).

264. гРНК Cas12a по варианту осуществления 101, где целевой домен находится в гене GAA.

265. гРНК Cas12a по варианту осуществления 264, где ген GAA имеет мутацию IVS1-13T>G.

266. гРНК Cas12a по варианту осуществления 265, где целевой домен имеет нуклеотидную последовательность TGCTGAGCCCGCTTGCTTCTCCC (SEQ ID NO: 98).

267. Молекула гидовой РНК (гРНК) Cas12a, содержащая протоспейсерный домен, содержащий нацеливающую последовательность, и петлевой домен, где нацеливающая последовательность соответствует целевому домену, имеющему нуклеотидную последовательность TGCTGAGCCCGCTTGCTTCTCCC (SEQ ID NO: 98).

268. гРНК Cas12a по варианту осуществления 265, где целевой домен имеет нуклеотидную последовательность GCCTCCCTGCTGAGCCCGCTTGC (SEQ ID NO: 99).

269. Молекула гидовой РНК (гРНК) Cas12a, содержащая протоспейсерный домен, содержащий нацеливающую последовательность, и петлевой домен, где нацеливающая последовательность соответствует целевому домену, имеющему нуклеотидную последовательность GCCTCCCTGCTGAGCCCGCTTGC (SEQ ID NO: 99).

270. гРНК Cas12a по варианту осуществления 265, где целевой домен имеет нуклеотидную последовательность TCCCGCCTCCCTGCTGAGCCCGC (SEQ ID NO: 100).

271. Молекула гидовой РНК (гРНК) Cas12a, содержащая протоспейсерный домен, содержащий нацеливающую последовательность, и петлевой домен, где нацеливающая последовательность соответствует целевому домену, имеющему нуклеотидную последовательность TCCCGCCTCCCTGCTGAGCCCGC (SEQ ID NO: 100).

272. гРНК Cas12a по варианту осуществления 264, где ген GAA имеет мутацию IVS6-22T>G.

273. гРНК Cas12a по варианту осуществления 272, где целевой домен имеет нуклеотидную последовательность TCCTCCCTCCCTCAGGAAGTCGG (SEQ ID NO: 101).

274. Молекула гидовой РНК (гРНК) Cas12a, содержащая протоспейсерный домен, содержащий нацеливающую последовательность, и петлевой домен, где нацеливающая последовательность соответствует целевому домену, имеющему нуклеотидную последовательность TCCTCCCTCCCTCAGGAAGTCGG (SEQ ID NO: 101).

275. гРНК Cas12a по варианту осуществления 272, где целевой домен имеет нуклеотидную последовательность AAGGCTCCCTCCTCCCTCCCTCA (SEQ ID NO: 102).

276. Молекула гидовой РНК (гРНК) Cas12a, содержащая протоспейсерный домен, содержащий нацеливающую последовательность, и петлевой домен, где нацеливающая последовательность соответствует целевому домену, имеющему нуклеотидную последовательность AAGGCTCCCTCCTCCCTCCCTCA (SEQ ID NO: 102).

277. гРНК Cas12a по варианту осуществления 272, где целевой домен имеет нуклеотидную последовательность TCCCTCAGGAAGTCGGCGTTGGC (SEQ ID NO: 103).

278. Молекула гидовой РНК (гРНК) Cas12a, содержащая протоспейсерный домен, содержащий нацеливающую последовательность, и петлевой домен, где нацеливающая последовательность соответствует целевому домену, имеющему нуклеотидную последовательность TCCCTCAGGAAGTCGGCGTTGGC (SEQ ID NO: 103).

279. гРНК Cas12a по любому из вариантов осуществления 1-278, где петлевой домен находится в 5'-направлении от протоспейсерного домена.

280. гРНК Cas12a по любому из вариантов осуществления 1-279, где петлевой домен содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из UCUACUGUUGUAGA (SEQ ID NO: 1), UCUACUGUUGUAGAU (SEQ ID NO: 2), UCUGCUGUUGCAGA (SEQ ID NO: 3), UCUGCUGUUGCAGAU (SEQ ID NO: 4), UCCACUGUUGUGGA (SEQ ID NO: 5), UCCACUGUUGUGGAU (SEQ ID NO: 6), CCUACUGUUGUAGG (SEQ ID NO: 7), CCUACUGUUGUAGGU (SEQ ID NO: 8), UCUACUAUUGUAGA (SEQ ID NO: 9), UCUACUAUUGUAGAU (SEQ ID NO: 10), UCUACUGCUGUAGAU (SEQ ID NO: 11), UCUACUGCUGUAGAUU (SEQ ID NO: 12), UCUACUUUCUAGAU (SEQ ID NO: 13), UCUACUUUCUAGAUU (SEQ ID NO: 14), UCUACUUUGUAGA (SEQ ID NO: 15), UCUACUUUGUAGAU (SEQ ID NO: 16), UCUACUUGUAGA (SEQ ID NO: 17), UCUACUUGUAGAU (SEQ ID NO: 18), UAAUUUCUACUGUUGUAGAU (SEQ ID NO: 19), AGAAAUGCAUGGUUCUCAUGC (SEQ ID NO: 20), AAAAUUACCUAGUAAUUAGGU (SEQ ID NO: 21), GGAUUUCUACUUUUGUAGAU (SEQ ID NO: 22), AAAUUUCUACUUUUGUAGAU (SEQ ID NO: 23), CGCGCCACGCGGGGCGCGAC (SEQ ID NO: 24), UAAUUUCUACUCUUGUAGAU (SEQ ID NO: 25), GAAUUUCUACUAUUGUAGAU (SEQ ID NO: 26), GAAUCUCUACUCUUUGUAGAU (SEQ ID NO: 27),

UAAUUUCUACUUUGUAGAU (SEQ ID NO: 28), AAAUUUCUACUGUUUGUAGAU (SEQ ID NO: 29), GAAUUUCUACUUUGUAGAU (SEQ ID NO: 30), UAAUUUCUACUAAGUGUAGAU (SEQ ID NO: 31), UAAUUUCUACUAUUGUAGAU (SEQ ID NO: 32), UAAUUUCUACUUCGGUAGAU (SEQ ID NO: 33), UAAUUUCUACUAUUGUAGAU (SEQ ID NO: 32), AUUUCUACUAGUGUAGAU (SEQ ID NO: 34), AUUUCUACUGUGUGUAGA (SEQ ID NO: 35), AUUUCUACUAUUGUAGAU (SEQ ID NO: 36) и AUUUCUACUUUGGUAGAU (SEQ ID NO: 37).

281. гРНК Cas12a по любому из вариантов осуществления 1-279, где петлевой домен имеет нуклеотидную последовательность UAAUUUCUACUCUUGUAGAU (SEQ ID NO: 25).

282. гРНК Cas12a по любому из вариантов осуществления 1-279, где петлевой домен имеет нуклеотидную последовательность UAAUUUCUACUAAGUGUAGAU (SEQ ID NO: 31).

283. гРНК Cas12a по любому из вариантов осуществления 1-281, где петлевой домен имеет длину 20 нуклеотидов.

284. Нуклеиновая кислота, кодирующая гРНК Cas12a по любому из вариантов осуществления 1-283.

285. Нуклеиновая кислота по варианту осуществления 284, дополнительно кодирующая белок Cas12a.

286. Нуклеиновая кислота по варианту осуществления 284 или вариант осуществления 285, являющаяся плазмидой.

287. Нуклеиновая кислота по варианту осуществления 284 или вариант осуществления 285, являющаяся вирусом.

288. Частица, содержащая гРНК Cas12a по любому из вариантов осуществления 1-283.

289. Частица по варианту осуществления 288, дополнительно содержащая белок Cas12a.

290. Частица по варианту осуществления 288 или варианту осуществления 289, где частица является липосомой, везикулой или наночастицей золота.

291. Частица по варианту осуществления 290, являющаяся липосомой.

292. Частица по варианту осуществления 290, являющаяся везикулой.

293. Частица по варианту осуществления 290, являющаяся наночастицей золота.

294. Частица по любому из вариантов осуществления 288-293, где:

(a) если последовательность PAM является TTTV, Cas12a является AsCas12a дикого типа или LbCas12a дикого типа;

(b) если последовательность PAM является TYCV, CCCC или ACCC, белок Cas12a является RR AsCas12; и

(c) если последовательность PAM является TATV или RATR, белок Cas12a является RVR AsCas12.

295. Частица по любому из вариантов осуществления 288-294, где частица содержит только один вид гРНК Cas12a.

296. Система, содержащая белок Cas12a и молекулу гРНК по любому из вариантов осуществления 1-283.

297. Система по варианту осуществления 296, содержащая одиночную молекулу гРНК.

298. Система по варианту осуществления 296 или варианту осуществления 297, где:

(a) если последовательность PAM является TTTV, Cas12a является AsCas12a дикого типа или LbCas12a дикого типа;

(b) если последовательность PAM является TYCV, CCCC или ACCC, белок Cas12a является RR AsCas12; и

(c) если последовательность PAM является TATV или RATR, белок Cas12a является RVR AsCas12.

299. Система по варианту осуществления 298, где, если последовательность PAM является TTTV, Cas12a является AsCas12a дикого типа.

300. Система по варианту осуществления 298, где, если последовательность PAM является TTTV, Cas12a является LbCas12a дикого типа.

301. Система по любому из вариантов осуществления 296-300, дополнительно содержащая геномную ДНК.

302. Клетка, содержащая нуклеиновую кислоту по любому из вариантов осуществления 284-287.

303. Клетка, содержащая частицу по любому из вариантов осуществления 288-295.

304. Клетка, содержащая систему по любому из вариантов осуществления 296-301.

305. Популяция клеток по любому из вариантов осуществления 302-304.

306. Способ изменения клетки, включающий приведение клетки в контакт с частицей по любому из вариантов осуществления 289-295 или системой по любому из вариантов осуществления 296-300.

307. Способ по варианту осуществления 306, включающий приведение клетки в контакт с частицей по любому из вариантов осуществления 289-295.

308. Способ по варианту осуществления 306, включающий приведение клетки в контакт с системой по любому из вариантов осуществления 296-300.

309. Способ по варианту осуществления 308, где приведение в контакт включает доставку системы в клетку посредством частицы или вектора.

310. СПОСОБ по варианту осуществления 308, где приведение в контакт включает доставку системы в клетку посредством частицы.

311. Способ по варианту осуществления 310, где частица является липосомой, везикулой или наночастицей золота.

312. Способ по варианту осуществления 311, где частица является липосомой.

313. Способ по варианту осуществления 311, где частица является везикулой.

314. Способ по варианту осуществления 311, где частица является наночастицей золота.

315. Способ по варианту осуществления 309, где приведение в контакт включает доставку системы в клетку посредством вектора.

316. Способ по варианту осуществления 315, где вектор является вирусным вектором.

317. Способ по варианту осуществления 316, где вирусный вектор является лентивирусом, аденовирусом или аденоассоциированным вирусом.

318. Способ по варианту осуществления 317, где вирусный вектор является лентивирусом.

319. Способ по варианту осуществления 317, где вирусный вектор является аденовирусом.

320. Способ по варианту осуществления 317, где вирусный вектор является аденоассоциированным вирусом.

321. Способ по любому из вариантов осуществления 306-320, где клетка является стволовой клеткой.

322. Способ по любому из вариантов осуществления 306-321, где клетка является клеткой iPS.

323. Способ по любому из вариантов осуществления 306-322, где приведение в контакт снижает активность участка сплайсинга, приводящего к фенотипу заболевания.

324. Способ по любому из вариантов осуществления 306-323, где приведение в контакт восстанавливает нормальный сплайсинг в клетке.

325. Способ по любому из вариантов осуществления 306-324, где клетку получают из индивидуума, имеющего генетическое заболевание, или из клетки из индивидуума, имеющего генетическое заболевание.

326. Способ по варианту осуществления 325, где приведение в контакт осуществляют *ex vivo*.

327. Способ по варианту осуществления 326, дополнительно включающий возвращение приведенных в контакт клетки в организм индивидуума.

328. Способ по варианту осуществления 325, где приведение в контакт осуществляют *in vivo*.

329. Способ лечения индивидуума, имеющего ген CFTR с мутацией 3272-26A>G, включающий приведение клетки индивидуума или клетки, полученной из клетки индивидуума, в контакт с системой, содержащей гРНК Cas12a по любому из вариантов осуществления 104-106 и белок Cas12a.

330. Способ лечения индивидуума, имеющего ген CFTR с мутацией 3849+10kbC>T, включающий приведение клетки индивидуума или клетки, полученной из клетки индивидуума, в контакт с системой, содержащей гРНК Cas12a по любому из вариантов осуществления 107-109 и белок Cas12a.

331. Способ лечения индивидуума, имеющего ген CFTR с мутацией IVS11+194A>G, включающий приведение клетки индивидуума или клетки, полученной из клетки индивидуума, в контакт с системой, содержащей гРНК Cas12a по любому из вариантов осуществления 110-114 и белок Cas12a.

332. Способ лечения индивидуума, имеющего ген CFTR с мутацией IVS19+11505C>G, включающий приведение клетки индивидуума или клетки, полученной из клетки индивидуума, в контакт с системой, содержащей гРНК Cas12a по любому из вариантов осуществления 115-119 и белок Cas12a.

333. Способ лечения индивидуума, имеющего ген DMD с мутацией IVS9+46806C>T, включающий приведение клетки индивидуума или клетки, полученной из клетки индивидуума, в контакт с системой, содержащей гРНК Cas12a по любому из вариантов осуществления 122-126 и белок Cas12a.

334. Способ лечения индивидуума, имеющего ген DMD с мутацией IVS62+62296A>G, включающий приведение клетки индивидуума или клетки, полученной из клетки индивидуума, в контакт с системой, содержащей гРНК Cas12a по любому из вариантов осуществления 127-135 и белок Cas12a.

335. Способ лечения индивидуума, имеющего ген DMD с мутацией IVS1+36947G>A, включающий приведение клетки индивидуума или клетки, полученной из клетки индивидуума, в контакт с системой, содержащей гРНК Cas12a по любому из вариантов осуществления 136-142 и белок Cas12a.

336. Способ лечения индивидуума, имеющего ген DMD с мутацией IVS2+5591T>A, включающий приведение клетки индивидуума или клетки, полученной из клетки индивидуума, в контакт с системой, содержащей гРНК Cas12a по любому из вариантов осуществления 143-145 и белок Cas12a.

337. Способ лечения индивидуума, имеющего ген DMD с мутацией IVS8-15A>G, включающий приведение клетки индивидуума или клетки, полученной из клетки индивидуума, в контакт с системой, содержащей гРНК Cas12a по любому из вариантов осуществления 146-154 и белок Cas12a.

338. Способ лечения индивидуума, имеющего ген DMD с мутацией в экзоне 50, включающий приведение клетки индивидуума или клетки, полученной из клетки индивидуума, в контакт с системой, содержащей гРНК Cas12a по любому из вариантов осуществления 155-165 и белок Cas12a.

339. Способ лечения индивидуума, имеющего ген HBB с мутацией IVS2+645C>T, включающий приведение клетки индивидуума или клетки, полученной из клетки индивидуума, в контакт с системой, содержащей гРНК Cas12a по любому из вариантов осуществления 168-177 и белок Cas12a.

340. Способ лечения индивидуума, имеющего ген HBB с мутацией IVS2+705T>G, включающий приведение клетки индивидуума или клетки, полученной из клетки индивидуума, в контакт с системой, содержащей гРНК Cas12a по любому из вариантов осуществления 178-186 и белок Cas12a.

341. Способ лечения индивидуума, имеющего ген HBB с мутацией IVS2+745C>G, включающий приведение клетки индивидуума или клетки, полученной из клетки индивидуума, в контакт с системой, содержащей гРНК Cas12a по любому из вариантов осуществления 187-189 и белок Cas12a.

342. Способ лечения индивидуума, имеющего ген FGB с мутацией IVS6+13C>T, включающий приведение клетки индивидуума или клетки, полученной из клетки индивидуума, в контакт с системой, содержащей гРНК Cas12a по любому из вариантов осуществления 191-195 и белок Cas12a.

343. Способ лечения индивидуума, имеющего ген SOD1 с мутацией IVS4+792C>G, включающий приведение клетки индивидуума или клетки, полученной из клетки индивидуума, в контакт с системой, содержащей гРНК Cas12a по любому из вариантов осуществления 197-199 и белок Cas12a.

344. Способ лечения индивидуума, имеющего ген QDPR с мутацией IVS3+2552A>G, включающий приведение клетки индивидуума или клетки, полученной из клетки индивидуума, в контакт с системой, содержащей гРНК Cas12a по любому из вариантов осуществления 201-203 и белок Cas12a.

345. Способ лечения индивидуума, имеющего ген GLA с мутацией IVS4+919G>A, включающий приведение клетки индивидуума или клетки, полученной из клетки индивидуума, в контакт с системой, содержащей гРНК Cas12a по любому из вариантов осуществления 205-207 и белок Cas12a.

346. Способ лечения индивидуума, имеющего ген LDLR с мутацией IVS12+11C>G, включающий приведение клетки индивидуума или клетки, полученной из клетки индивидуума, в контакт с системой, содержащей гРНК Cas12a по любому из вариантов осуществления 209-211 и белок Cas12a.

347. Способ лечения индивидуума, имеющего ген BRIP1 с мутацией IVS11+2767A>T, включающий приведение клетки индивидуума или клетки, полученной из клетки индивидуума, в контакт с системой, содержащей гРНК Cas12a по любому из вариантов осуществления 213-215 и белок Cas12a.

348. Способ лечения индивидуума, имеющего ген F9 с мутацией IVS5+13A>G, включающий приведение клетки индивидуума или клетки, полученной из клетки индивидуума, в контакт с системой, содержащей гРНК Cas12a по любому из вариантов осуществления 217-221 и белок Cas12a.

349. Способ лечения индивидуума, имеющего ген CEP290 с мутацией IVS26+1655A>G, включающий приведение клетки индивидуума или клетки, полученной из клетки индивидуума, в контакт с системой, содержащей гРНК Cas12a по любому из вариантов осуществления 223-225 и белок Cas12a.

350. Способ лечения индивидуума, имеющего ген COL2A1 с мутацией IVS23+135G>A, включающий приведение клетки индивидуума или клетки, полученной из клетки индивидуума, в контакт с системой, содержащей гРНК Cas12a по любому из вариантов осуществления 227-229 и белок Cas12a.

351. Способ лечения индивидуума, имеющего ген USH2A с мутацией IVS40-8C>G, включающий приведение клетки индивидуума или клетки, полученной из клетки индивидуума, в контакт с системой, содержащей гРНК Cas12a по любому из вариантов осуществления 231-241 и белок Cas12a.

352. Способ лечения индивидуума, имеющего ген USH2A с мутацией IVS66+39C>T, включающий приведение клетки индивидуума или клетки, полученной из клетки индивидуума, в контакт с системой, содержащей гРНК Cas12a по любому из вариантов осуществления 242-246 и белок Cas12a.

353. Способ лечения индивидуума, имеющего ген USH2A с мутацией c.7595-2144A>G, включающий приведение клетки индивидуума или клетки, полученной из клетки индивидуума, в контакт с системой, содержащей гРНК Cas12a по любому из вариантов осуществления 247-263 и белок Cas12a.

354. Способ лечения индивидуума, имеющего ген GAA с мутацией IVS1-13T>G, включающий приведение клетки индивидуума или клетки, полученной из клетки индивидуума, в контакт с системой, содержащей гРНК Cas12a по любому из вариантов осуществления 265-271 и белок Cas12a.

355. Способ лечения индивидуума, имеющего ген GAA с мутацией IVS6-22T>G, включающий приведение клетки индивидуума или клетки, полученной из клетки индивидуума, в контакт с системой, содержащей гРНК Cas12a по любому из вариантов осуществления 272-278 и белок Cas12a.

356. Способ по любому из вариантов осуществления 329-355, включающий приведение клетки индивидуума в контакт с системой.

357. Способ по варианту осуществления 356, где клетка является стволовой клеткой.

358. Способ по варианту осуществления 356 или варианту осуществления 357, где приведение в контакт осуществляют *ex vivo*, и способ дополнительно включает возвращение клетки в организм индивидуума после приведения клетки в контакт с системой.

359. Способ по варианту осуществления 356 или варианту осуществления 357, где приведение в контакт осуществляют *in vivo*.

360. Способ по любому из вариантов осуществления 329-355, включающий приведение клетки, полученной из клетки индивидуума, в контакт с системой *ex vivo*, и способ дополнительно включает возвращение клетки в организм индивидуума после приведения клетки в контакт с системой.

361. Способ по варианту осуществления 360, где клетка, приведенная в контакт с системой, является клеткой iPS.

362. Способ по любому из вариантов осуществления 329-361, где:

(а) если последовательность PAM является TTTV, белок Cas12a является AsCas12a дикого типа или LbCas12a дикого типа;

(b) если последовательность PAM является TYCV, CCCC или ACCC, белок Cas12a является RR AsCas12; и

(c) если последовательность PAM является TATV или RATR, белок Cas12a является RVR AsCas12.

363. Способ по варианту осуществления 362, где, если последовательность PAM является TTTV, белок Cas12a является AsCas12a дикого типа.

364. Способ по варианту осуществления 362, где, если последовательность PAM является TTTV, белок Cas12a является LbCas12a дикого типа.

365. Способ по любому из вариантов осуществления 329-364, где приведение клетки в контакт с системой включает доставку системы в клетку посредством частицы или вектор.

366. Способ по варианту осуществления 365, где приведение в контакт включает доставку системы в клетку посредством частицы.

367. Способ по варианту осуществления 366, где частица является липосомой, везикулой или наночастицей золота.

368. Способ по варианту осуществления 367, где частица является липосомой.

369. Способ по варианту осуществления 367, где частица является везикулой.

370. Способ по варианту осуществления 367, где частица является наночастицей золота.

371. Способ по варианту осуществления 365, где приведение в контакт включает доставку системы в клетку посредством вектора.

372. Способ по варианту осуществления 371, где вектор является вирусным вектором.

373. Способ по варианту осуществления 372, где вирусный вектор является лентивирусом, аденовирусом или аденоассоциированным вирусом.

374. Способ по варианту осуществления 373, где вирусный вектор является лентивирусом.

375. Способ по варианту осуществления 373, где вирусный вектор является аденовирусом.

376. Способ по варианту осуществления 373, где вирусный вектор является аденоассоциированным вирусом.

[0308] Хотя различные конкретные варианты осуществления проиллюстрированы и описаны, следует понимать, что различные изменения можно осуществлять без отклонения от сущности и объема изобретения.

8. ЦИТИРОВАНИЕ ССЫЛОК

[0309] Все публикации, патенты, патентные заявки и другие документы, процитированные в настоящей заявке, включены, таким образом, в нее в качестве ссылки в полном объеме для всех целей в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент, патентная заявка или другой документ были отдельно указаны как включенные в качестве ссылки для всех целей. В случае противоречия между описанным

по одной или более ссылок, включенных в настоящее описание, и настоящим описанием, настоящее описание обладает приоритетом.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Молекула гидовой РНК (гРНК) Cas12a для редактирования гена USH2A человека или гена CFTR человека, содержащая:

- (a) протоспейсерный домен, содержащий нацеливающую последовательность; и
- (b) петлевой домен;

где

(i) нацеливающая последовательность соответствует целевому домену в последовательности геномной ДНК USH2A человека или CFTR человека;

(ii) целевой домен является смежным с протоспейсер-смежным мотивом (РАМ) белка Cas12a; и

(iii) (a) после встраивания гРНК и белка Cas12a в клетку человека, содержащую геномную последовательность, Cas12a расщепляет геномную ДНК через до 15 нуклеотидов от участка сплайсинга, кодируемого геномной ДНК, и/или (b) РАМ находится в пределах 40 нуклеотидов от участка сплайсинга, кодируемого геномной ДНК.

2. Молекула гРНК Cas12a по п.1, где участок сплайсинга является криптическим участком сплайсинга, необязательно, где криптический участок сплайсинга образуется в результате мутации в последовательности геномной ДНК или активирован мутацией в последовательности геномной ДНК.

3. гРНК Cas12a по п.2, где криптический участок сплайсинга образуется в результате мутации в последовательности геномной ДНК или активирован мутацией в последовательности геномной ДНК, и где мутация локализована через 1-23 нуклеотида в 3'-направлении от последовательности РАМ.

4. гРНК Cas12a по п.2 или 3, где мутация является однонуклеотидным полиморфизмом.

5. гРНК Cas12a по любому из пп.2-4, где сплайсинг по криптическому участку сплайсинга приводит к фенотипу заболевания.

6. Молекула гРНК Cas12a по любому из пп.2-5, где криптический участок сплайсинга является криптическим 3'-участком сплайсинга.

7. Молекула гРНК Cas12a по любому из пп.2-5, где криптический участок сплайсинга является криптическим 5'-участком сплайсинга.

8. гРНК Cas12a по любому из пп.1-7, имеющая длину 40-44 нуклеотиды.

9. гРНК Cas12a по любому из пп.1-8, где нацеливающая последовательность имеет длину 20-24 нуклеотида.

10. гРНК Cas12a по любому из пп.1-9, где протоспейсерный домен имеет длину 17-26 нуклеотидов.

11. гРНК Cas12a по любому из пп.1-10, где нет ошибочно спаренных оснований между нацеливающей последовательностью и комплементом целевого домена.

12. гРНК Cas12a по п.1, где целевой домен находится в гене USH2A человека.

13. гРНК Cas12a по п.12, где ген USH2A имеет мутацию c.7595-2144A>G, мутацию IVS40-8C>G или мутацию IVS66+39C>T.

14. гРНК Cas12a по п.13, где ген USH2A имеет мутацию с.7595-2144A>G.

15. гРНК Cas12a по п.14, где целевой домен имеет нуклеотидную последовательность TTAAAGATGATCTCTTACCTTGG (SEQ ID NO: 90), ACTTGTGTGATTCTGGAGAGGAA (SEQ ID NO: 97), CCAAGGTAAGAGATCATCTTTAA (SEQ ID NO: 91), AAATTGAACACCTCTCCTTTCCC (SEQ ID NO: 92), AAGATGATCTCTTACCTTGGGAA (SEQ ID NO: 93), AGCTGCTTTTCAGCTTCCTCTCCAG (SEQ ID NO: 94), TGGAGAGGAAGCTGAAAGCAGCT (SEQ ID NO: 95) или TGTGATTCTGGAGAGGAAGCTGA (SEQ ID NO: 96).

16. Молекула гидовой РНК (гРНК) Cas12a, содержащая протоспейсерный домен, содержащий нацеливающую последовательность, и петлевой домен, где нацеливающая последовательность соответствует целевому домену, имеющему нуклеотидную последовательность TTAAAGATGATCTCTTACCTTGG (SEQ ID NO: 90), ACTTGTGTGATTCTGGAGAGGAA (SEQ ID NO: 97), CCAAGGTAAGAGATCATCTTTAA (SEQ ID NO: 91), AAGATGATCTCTTACCTTGGGAA (SEQ ID NO: 93), AGCTGCTTTTCAGCTTCCTCTCCAG (SEQ ID NO: 94), TGGAGAGGAAGCTGAAAGCAGCT (SEQ ID NO: 95) или TGTGATTCTGGAGAGGAAGCTGA (SEQ ID NO: 96).

17. гРНК Cas12a по п.13, где ген USH2A имеет мутацию IVS40-8C>G.

18. гРНК Cas12a по п.17, где целевой домен имеет нуклеотидную последовательность TGGATTTATTTTAGTTTACAGAA (SEQ ID NO: 83), TTTTAGTTTACAGAACCTGGACC (SEQ ID NO: 84), CAAGAGGTCTGACTTTCTGGATT (SEQ ID NO: 85), AGAGGTCTGACTTTCTGGATTTA (SEQ ID NO: 86) или GGTTCTGTAAACTAAAATAAATC (SEQ ID NO: 87).

19. Молекула гидовой РНК (гРНК) Cas12a, содержащая протоспейсерный домен, содержащий нацеливающую последовательность, и петлевой домен, где нацеливающая последовательность соответствует целевому домену, имеющему нуклеотидную последовательность TGGATTTATTTTAGTTTACAGAA (SEQ ID NO: 83), TTTTAGTTTACAGAACCTGGACC (SEQ ID NO: 84), CAAGAGGTCTGACTTTCTGGATT (SEQ ID NO: 85), AGAGGTCTGACTTTCTGGATTTA (SEQ ID NO: 86) или GGTTCTGTAAACTAAAATAAATC (SEQ ID NO: 87).

20. гРНК Cas12a по п.13, где ген USH2A имеет мутацию IVS66+39C>T.

21. гРНК Cas12a по п.20, где целевой домен имеет нуклеотидную последовательность TATGTCTGTACACATACCTTGTT (SEQ ID NO: 88) или ATATGTCTGTACACATACCTTGTT (SEQ ID NO: 89).

22. Молекула гидовой РНК (гРНК) Cas12a, содержащая протоспейсерный домен, содержащий нацеливающую последовательность, и петлевой домен, где нацеливающая последовательность соответствует целевому домену, имеющему нуклеотидную последовательность TATGTCTGTACACATACCTTGTT (SEQ ID NO: 88) или

ATATGTCTGTACACATACCTTGT (SEQ ID NO: 89).

23. гРНК Cas12a по п.1, где целевой домен находится в гене CFTR человека.

24. гРНК Cas12a по п.23, где ген CFTR имеет мутацию, являющуюся мутацией 3272-26A>G, мутацией 3849+10kbC>T, мутацией IVS11+194A>G или мутацией IVS19+11505C>G.

25. гРНК Cas12a по п.24, где мутация является мутацией 3272-26A>G.

26. гРНК Cas12a по п.25, где целевой домен имеет нуклеотидную последовательность CATAGAAAACACTGCAAATAACA (SEQ ID NO: 38).

27. Молекула гидовой РНК (гРНК) Cas12a, содержащая протоспейсерный домен, содержащий нацеливающую последовательность, и петлевой домен, где нацеливающая последовательность соответствует целевому домену, имеющему нуклеотидную последовательность CATAGAAAACACTGCAAATAACA (SEQ ID NO: 38).

28. гРНК Cas12a по п.24, где мутация является мутацией 3849+10kbC>T.

29. гРНК Cas12a по п.28, где целевой домен имеет нуклеотидную последовательность AGGGTGTCTTACTCACCATTTTA (SEQ ID NO: 39).

30. Молекула гидовой РНК (гРНК) Cas12a, содержащая протоспейсерный домен, содержащий нацеливающую последовательность, и петлевой домен, где нацеливающая последовательность соответствует целевому домену, имеющему нуклеотидную последовательность AGGGTGTCTTACTCACCATTTTA (SEQ ID NO: 39).

31. гРНК Cas12a по п.24, где мутация является мутацией IVS11+194A>G.

32. гРНК Cas12a по п.31, где целевой домен имеет нуклеотидную последовательность TACTTGAGATGTAAGTAAGGTТА (SEQ ID NO: 40) или ATAGTAACCTTACTTACATCTCA (SEQ ID NO: 41).

33. Молекула гидовой РНК (гРНК) Cas12a, содержащая протоспейсерный домен, содержащий нацеливающую последовательность, и петлевой домен, где нацеливающая последовательность соответствует целевому домену, имеющему нуклеотидную последовательность TACTTGAGATGTAAGTAAGGTТА (SEQ ID NO: 40) или ATAGTAACCTTACTTACATCTCA (SEQ ID NO: 41).

34. гРНК Cas12a по п.24, где мутация является мутацией IVS19+11505C>G.

35. гРНК Cas12a по п.34, где целевой домен имеет нуклеотидную последовательность AAATTCCATCTTACCAATTCTAA (SEQ ID NO: 42) или AACGTТАAAATTCCATCTTACCA (SEQ ID NO: 43).

36. Молекула гидовой РНК (гРНК) Cas12a, содержащая протоспейсерный домен, содержащий нацеливающую последовательность, и петлевой домен, где нацеливающая последовательность соответствует целевому домену, имеющему нуклеотидную последовательность AAATTCCATCTTACCAATTCTAA (SEQ ID NO: 42) или AACGTТАAAATTCCATCTTACCA (SEQ ID NO: 43).

37. Молекула гидовой РНК (гРНК) Cas12a, содержащая протоспейсерный домен, содержащий нацеливающую последовательность, и петлевой домен, где нацеливающая последовательность соответствует целевому домену, имеющему нуклеотидную

последовательность: TGACCTTTGGTAAGTCATCTAAT (SEQ ID NO: 44), CCTTTGTGACCTTTGGTAAGTCA (SEQ ID NO: 45), TTGATCACATAACAAGGTCAGTT (SEQ ID NO: 46), ATCACATAACAAGGTCAGTTTAT (SEQ ID NO: 47), AGTTATGATAAACTGACCTTGTT (SEQ ID NO: 48), TGATAAACTGACCTTGTTATGTG (SEQ ID NO: 49), TCTTCCTTGGTTTTGCAGCTTCT (SEQ ID NO: 50), TTGGTTTTGCAGCTTCTCGAGTT (SEQ ID NO: 51), TTGGTTTTGCAGCTTCTCGAGTT (SEQ ID NO: 51), CTCTTTCTCTTCCTTGGTTTTGC (SEQ ID NO: 52), CTTGTTTCTCTACATAGGTTGAA (SEQ ID NO: 53), TCCTCTCTATCCACCTCCCCCAG (SEQ ID NO: 54), CCTCCCCCAGACCTTCTCTGCA (SEQ ID NO: 55), CCCCTCCTCTCTATCCACTCCCC (SEQ ID NO: 56), CCTCCTCTCTATCCACCTCCCC (SEQ ID NO: 57), CAAAAACCCAAAATATTTAGCT (SEQ ID NO: 58), CTTTTTGCAAAAACCCAAAATAT (SEQ ID NO: 59), TTTTTGCAAAAACCCAAAATATT (SEQ ID NO: 60), TGTCACCAGAGTAACAGTCTGAG (SEQ ID NO: 61), GCTCCTACTCAGACTGTTACTCT (SEQ ID NO: 62), TGGGTAAAGGTAATAGCAATATC (SEQ ID NO: 63), TATGCAGAGATATTGCTATTACC (SEQ ID NO: 64), CTATTACCTTAACCCAGAAATTA (SEQ ID NO: 65), CAGAGATATTGCTATTACCTTAA (SEQ ID NO: 66), TGCATATAAATTGTAAGTCTGAGGT (SEQ ID NO: 67), AATTGTAAGTCTGAGGTAAAGAGGTT (SEQ ID NO: 68), AAACCTCTTACCTCAGTTACAAT (SEQ ID NO: 69), GCAATATGAAACCTCTTACCTCA (SEQ ID NO: 70), CTAATAGCAGCTACAATCCAGGT (SEQ ID NO: 71), TTTTGCATACCTGTTTCGTTACCT (SEQ ID NO: 72), AAATAGAATGATTTTATTTTGCA (SEQ ID NO: 73), TGGTAAGTTACACTAACCTTAGT (SEQ ID NO: 74), TCATCTGTAAAATAAGAGTAAAA (SEQ ID NO: 75), CCATGTCTCCCCACTAAAGTGTA (SEQ ID NO: 76), AGGTGTGGCTTAGGTACGAGATG (SEQ ID NO: 77), TAAAATTCTTACATACCTTTGAA (SEQ ID NO: 78), AAAAATCTTACTCAGATTATGAC (SEQ ID NO: 79), TTAAAAAATCTTACTCAGATTA (SEQ ID NO: 80), AGTTGTAATTGTGAGTATCTCAT (SEQ ID NO: 81), TCCATCCACACCGCAGGGAGAG (SEQ ID NO: 82), TGCTGAGCCCGCTTGCTTCTCCC (SEQ ID NO: 98), GCCTCCCTGCTGAGCCCGCTTGC (SEQ ID NO: 99), TCCCGCCTCCCTGCTGAGCCCGC (SEQ ID NO: 100), TCCTCCCTCCCTCAGGAAGTCGG (SEQ ID NO: 101), AAGGCTCCCTCCTCCCTCCCTCA (SEQ ID NO: 102) или TCCCTCAGGAAGTCGGCGTTGGC (SEQ ID NO: 103).

38. гРНК Cas12a по любому из пп.1-37, где петлевой домен находится в 5'-направлении от протоспейсерного домена.

39. гРНК Cas12a по любому из пп.1-38, где петлевой домен имеет нуклеотидную последовательность UAAUUUCUACUAAGUGUAGAU (SEQ ID NO: 31) или UAAUUUCUACUCUUGUAGAU (SEQ ID NO: 25).

40. Нуклеиновая кислота, кодирующая гРНК Cas12a по любому из пп.1-39.

41. Нуклеиновая кислота по п.40, дополнительно кодирующая белок Cas12a.

42. Частица, содержащая гРНК Cas12a по любому из пп.1-39 и белок Cas12a.
43. Система, содержащая белок Cas12a и молекулу гРНК по любому из пп.1-39.
44. Клетка, содержащая нуклеиновую кислоту по п.40 или 41, частицу по п.42 или систему по п.43.
45. Способ изменения клетка, включающий приведение клетки в контакт с частицей по п.42 или системой по п.43.
46. Способ по п.45, где приведение в контакт снижает активность участка сплайсинга, приводящую к фенотипу заболевания, и/или восстанавливает нормальный сплайсинг в клетке.
47. Способ по п.45 или 46, где клетку получают из индивидуума, имеющего генетическое заболевание, или из клетки из индивидуума, имеющего генетическое заболевание.
48. Способ по п.47, где приведение в контакт осуществляют *ex vivo*, и, необязательно, где способ дополнительно включает возвращение приведенной в контакт клетки в организм индивидуума.
49. Способ по п.47, где приведение в контакт осуществляют *in vivo*.
50. Способ лечения индивидуума, имеющего ген USH2A с мутацией c.7595-2144A>G, включающий приведение клетки индивидуума или клетки, полученной из клетки индивидуума, в контакт с системой, содержащей гРНК Cas12a по любому из пп.14-16 и белок Cas12a.
51. Способ лечения индивидуума, имеющего ген USH2A с мутацией IVS40-8C>G, включающий приведение клетки индивидуума или клетки, полученной из клетки индивидуума, в контакт с системой, содержащей гРНК Cas12a по любому из пп.17-19 и белок Cas12a.
52. Способ лечения индивидуума, имеющего ген USH2A с мутацией IVS66+39C>T, включающий приведение клетки индивидуума или клетки, полученной из клетки индивидуума, в контакт с системой, содержащей гРНК Cas12a по любому из пп.20-22 и белок Cas12a.
53. Способ лечения индивидуума, имеющего ген CFTR с мутацией 3272-26A>G, включающий приведение клетки индивидуума или клетки, полученной из клетки индивидуума, в контакт с системой, содержащей гРНК Cas12a по любому из пп.25-27 и белок Cas12a.
54. Способ лечения индивидуума, имеющего ген CFTR с мутацией 3849+10kbC>T, включающий приведение клетки индивидуума или клетки, полученной из клетки индивидуума, в контакт с системой, содержащей гРНК Cas12a по любому из пп.28-30 и белок Cas12a.
55. Способ лечения индивидуума, имеющего ген CFTR с мутацией IVS11+194A>G, включающий приведение клетки индивидуума или клетки, полученной из клетки индивидуума, в контакт с системой, содержащей гРНК Cas12a по любому из пп.31-33 и белок Cas12a.

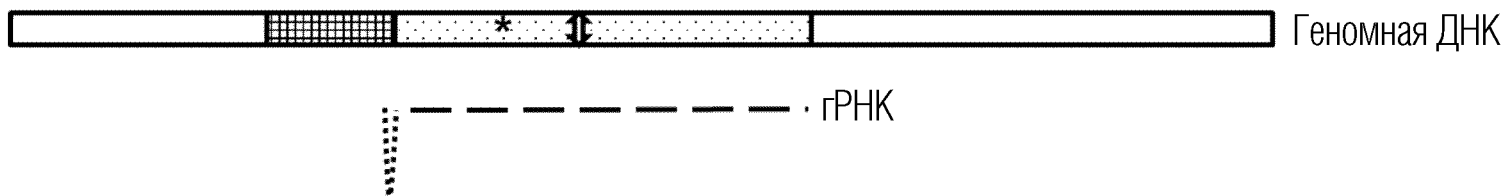
56. Способ лечения индивидуума, имеющего ген CFTR с мутацией IVS19+11505C>G, включающий приведение клетки индивидуума или клетки, полученной из клетки индивидуума, в контакт с системой, содержащей гРНК Cas12a по любому из пп.34-36 и белок Cas12a.

57. Способ по любому из пп.50-56, включающий приведение клетки индивидуума в контакт с системой *ex vivo*, и где способ дополнительно включает возвращение клетки в организм индивидуума после приведения клетки в контакт с системой.

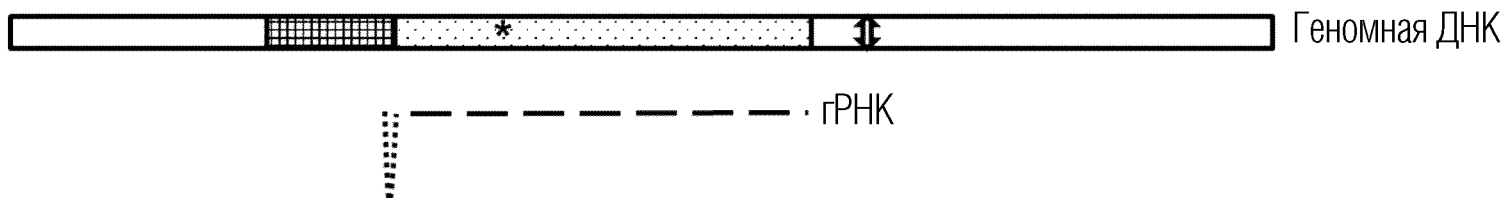
58. Способ по любому из пп.50-56, включающий приведение клетки индивидуума в контакт с системой *in vivo*.

59. Способ по любому из пп.50-56, включающий приведение клетки, полученной из клетки индивидуума, в контакт с системой *ex vivo*, и где способ дополнительно включает возвращение клетки в организм индивидуума после приведения клетки в контакт с системой.

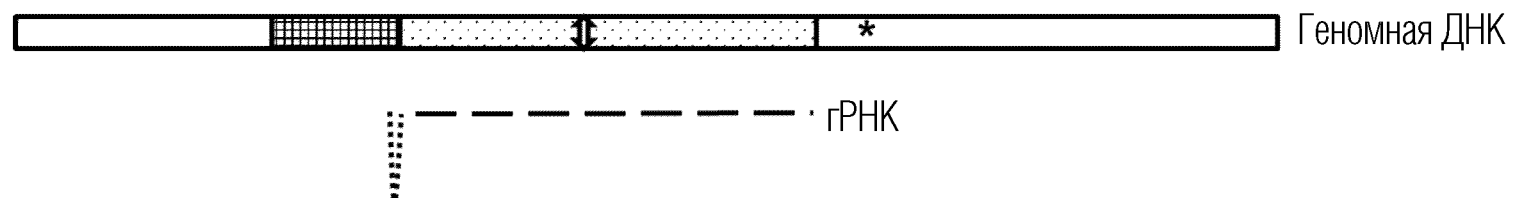
По доверенности



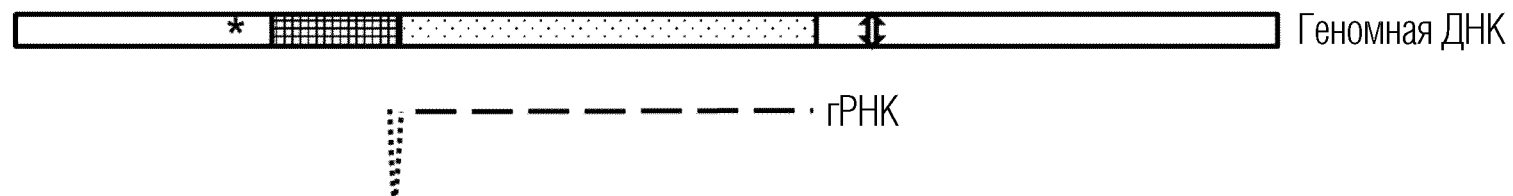
ФИГ. 1А



ФИГ. 1В



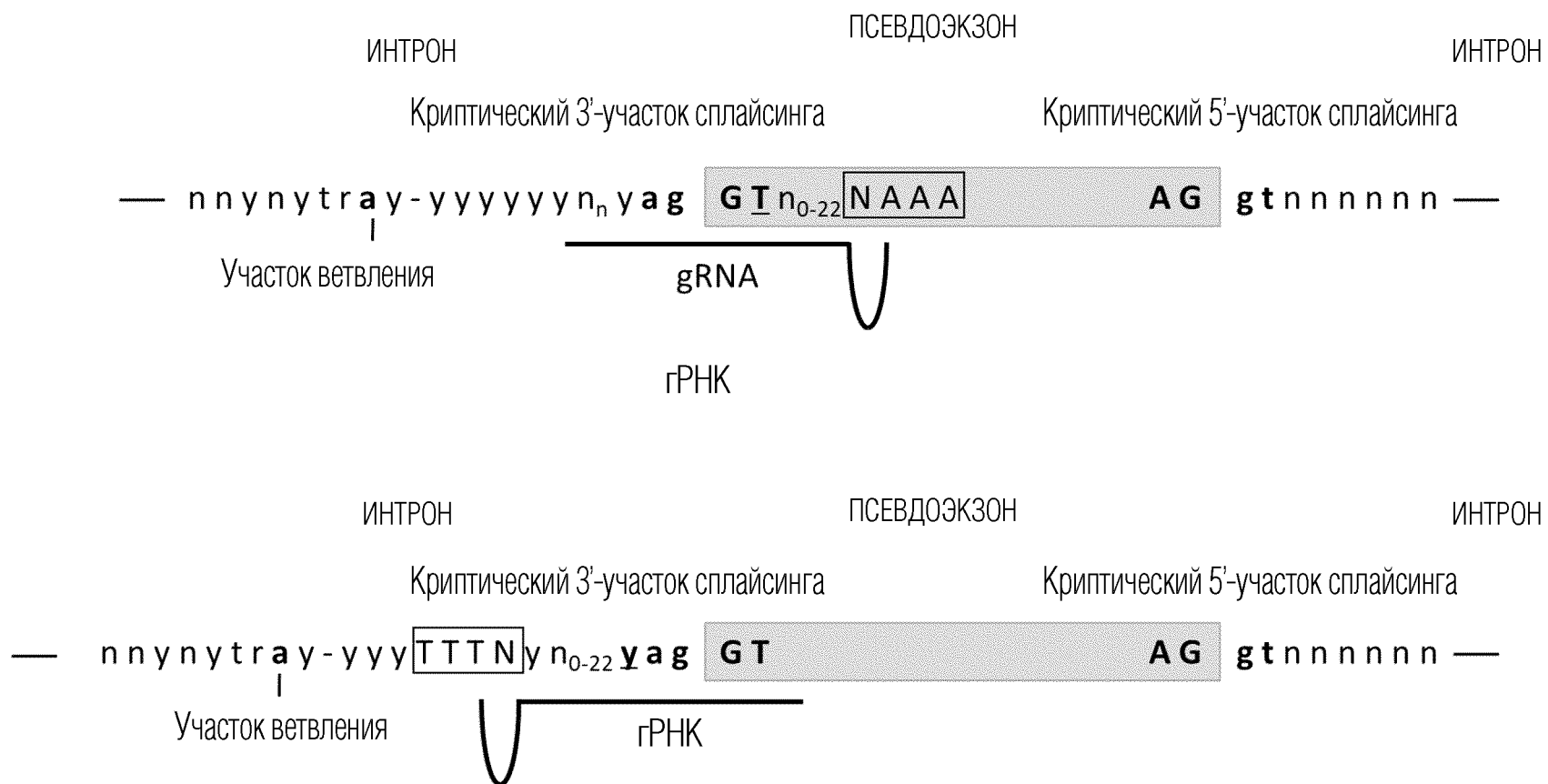
ФИГ. 2А



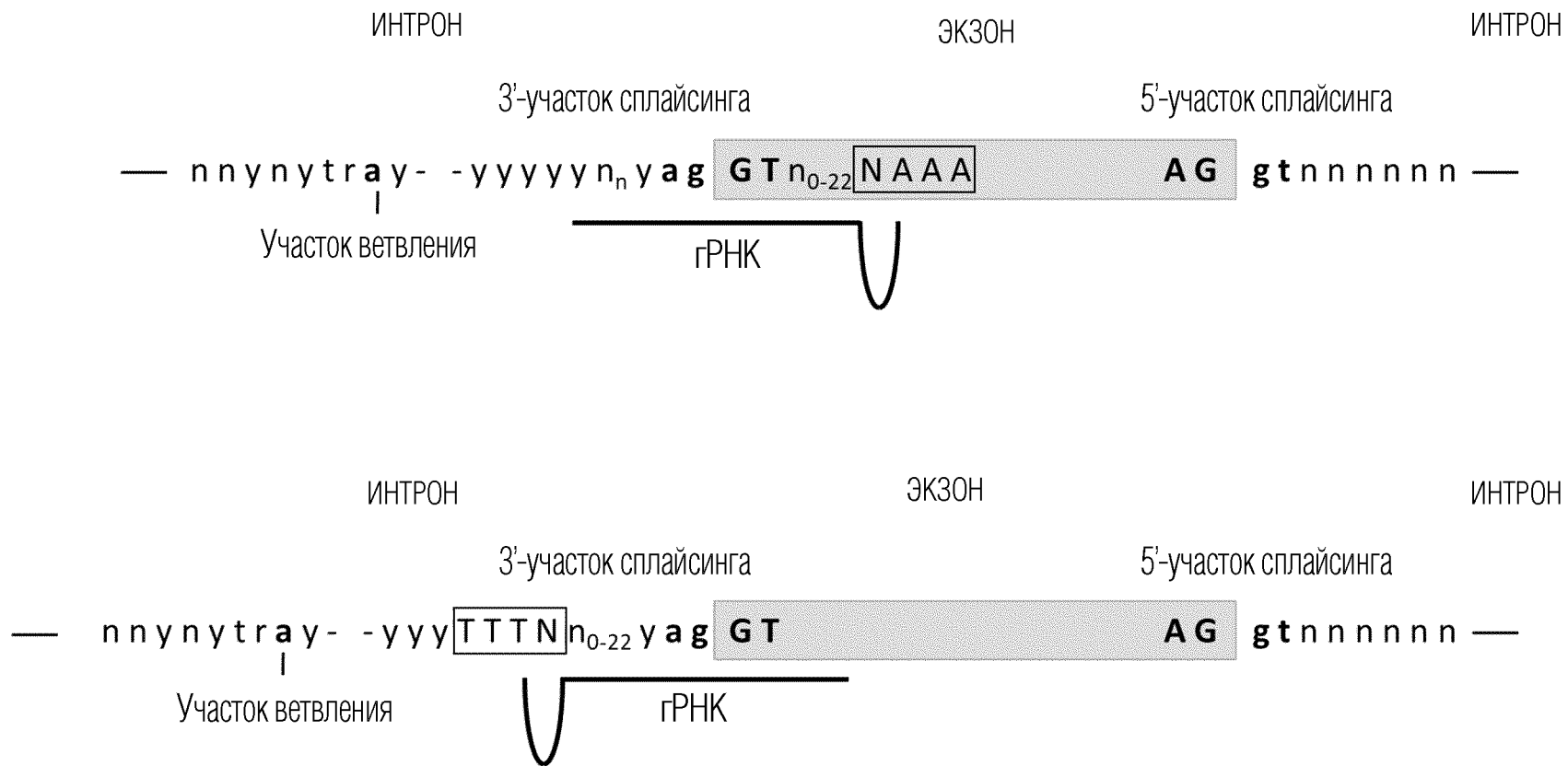
ФИГ. 2В



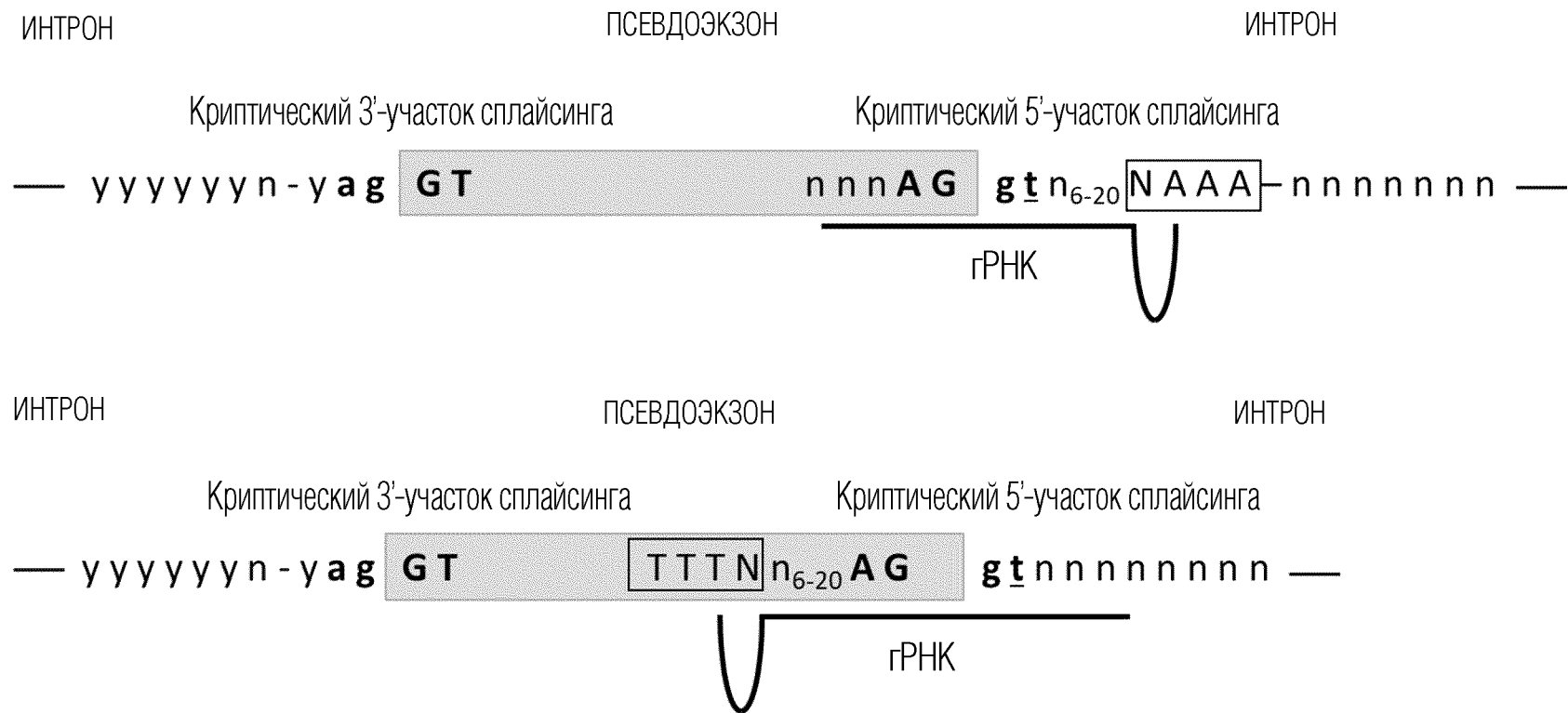
ФИГ. 3А



ФИГ. 3В



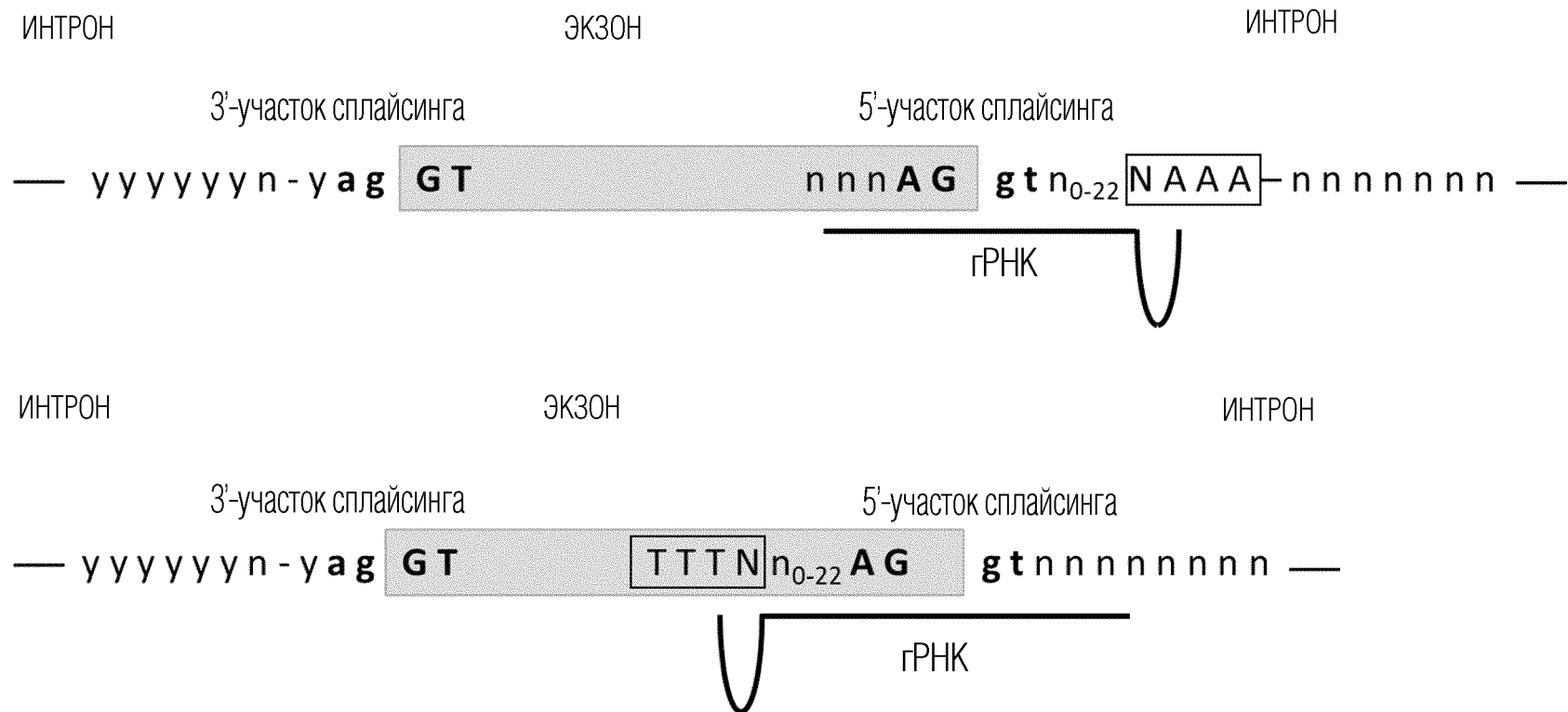
ФИГ. 4



ФИГ. 5А

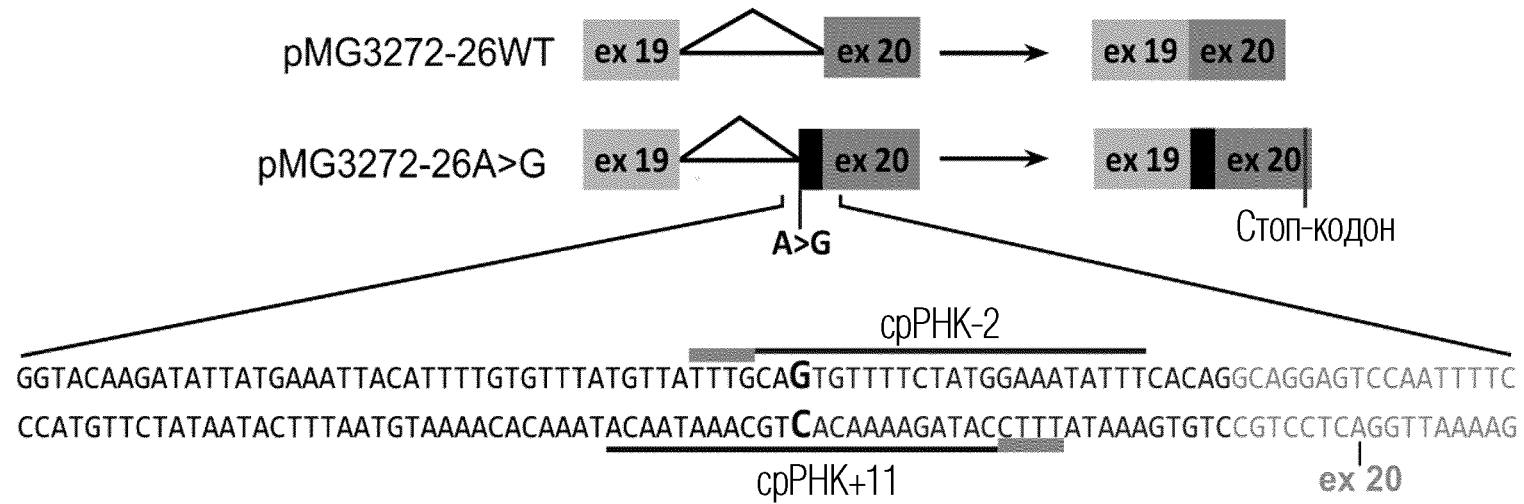


ФИГ. 5В

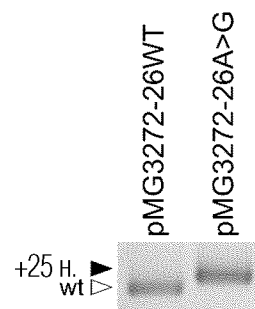


ФИГ. 6

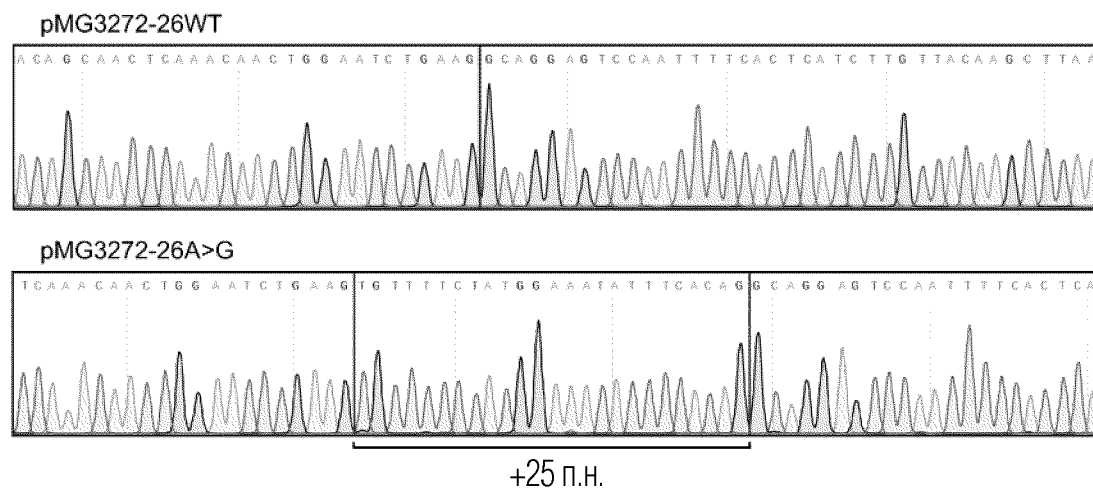
Модель минигена интрона 19 CFTR



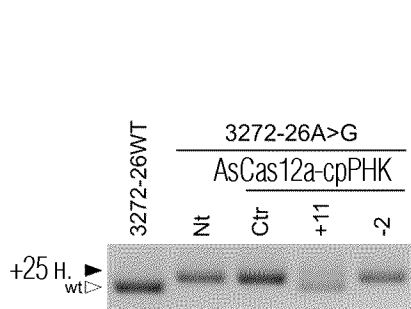
ФИГ. 7



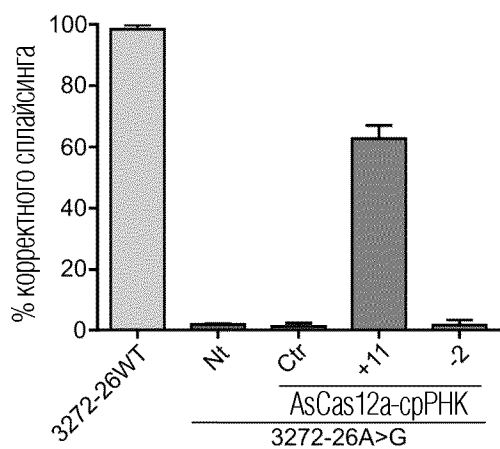
ФИГ. 8А



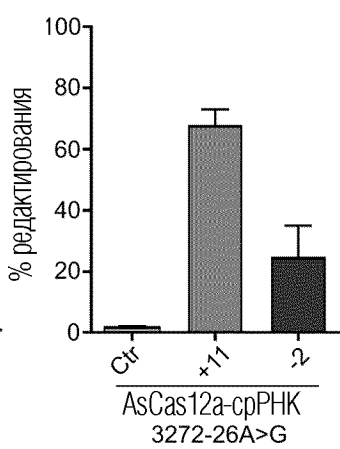
ФИГ. 8В



ФИГ. 9А

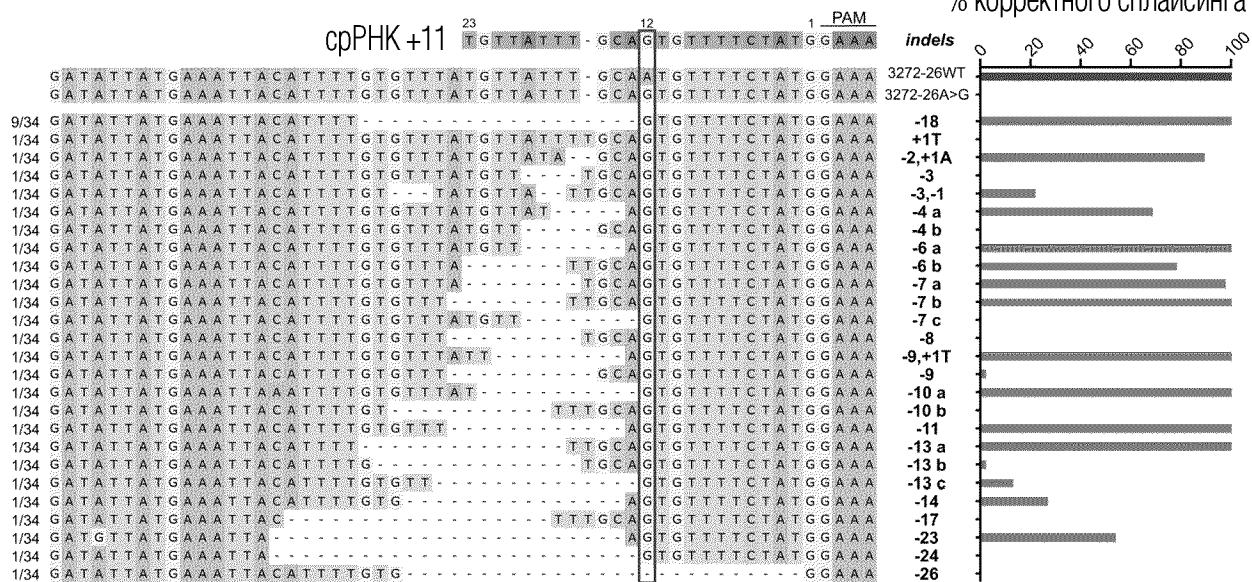


ФИГ. 9В

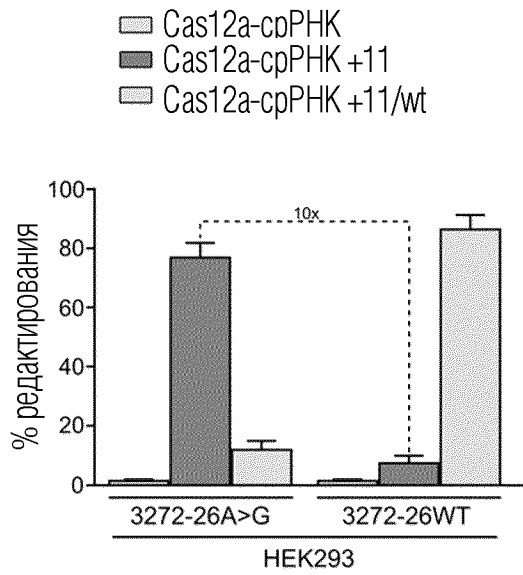


ФИГ. 9С

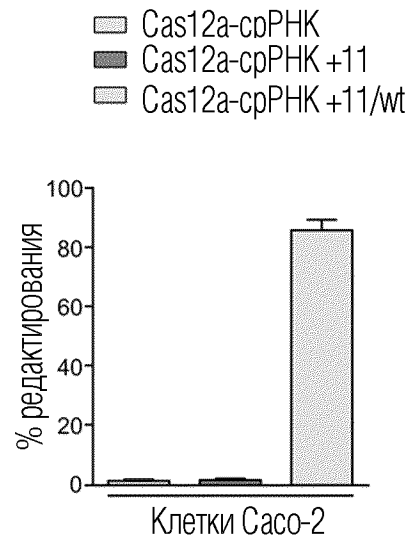
Редактирование CFTR pMG3272-26A>G посредством AsCas12a



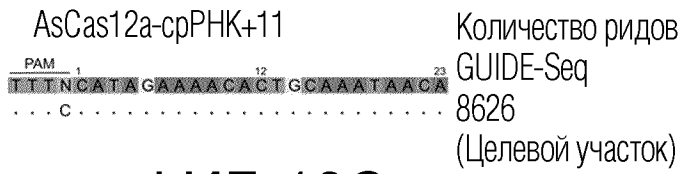
ФИГ. 9D



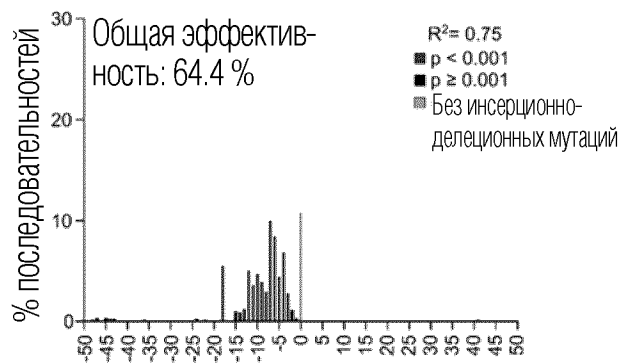
ФИГ. 10А



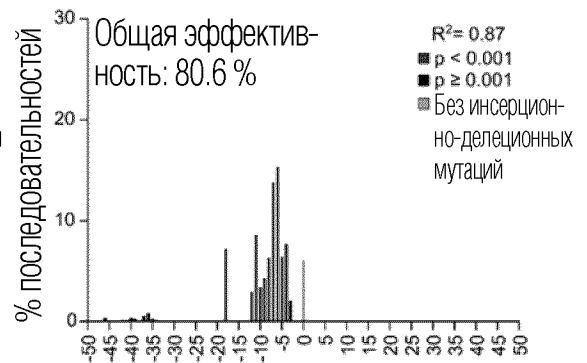
ФИГ. 10В



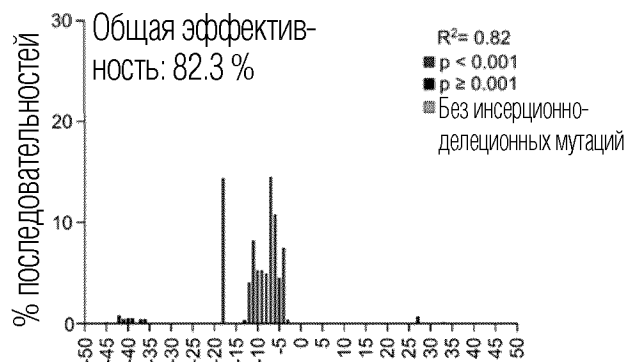
ФИГ. 10С



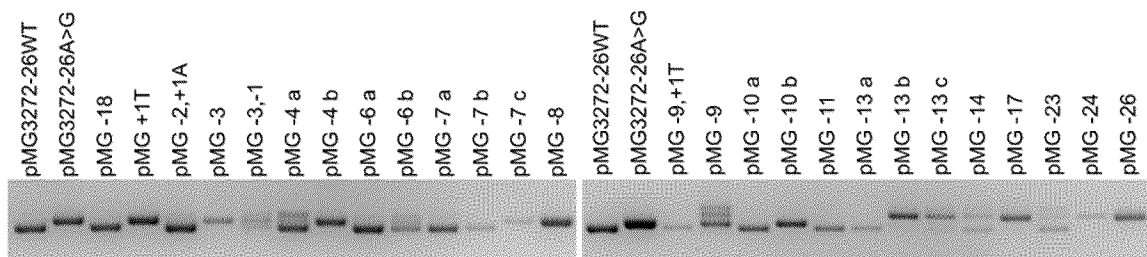
ФИГ. 11А



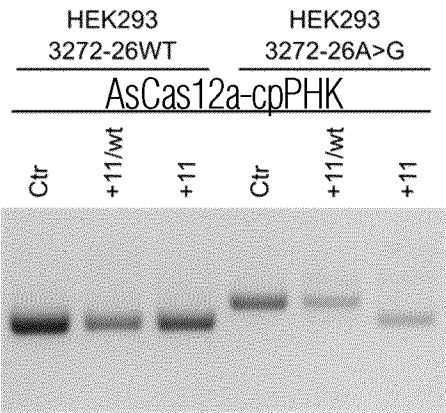
ФИГ. 11В



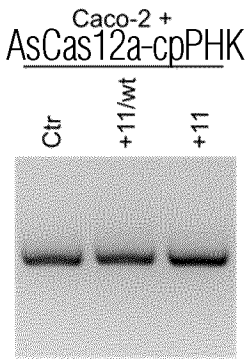
ФИГ. 11С



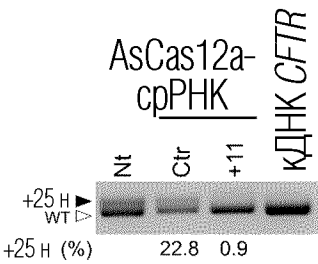
ФИГ. 11D



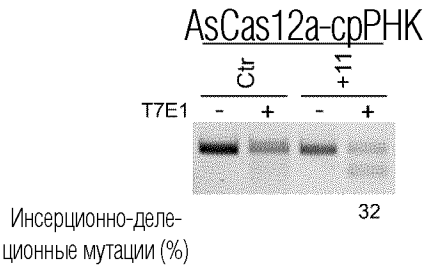
ФИГ. 12А



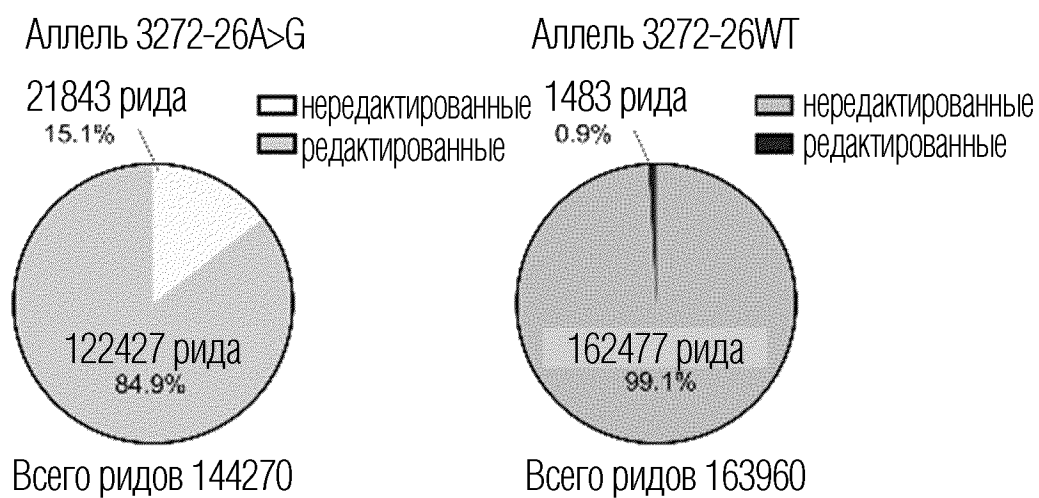
ФИГ. 12В



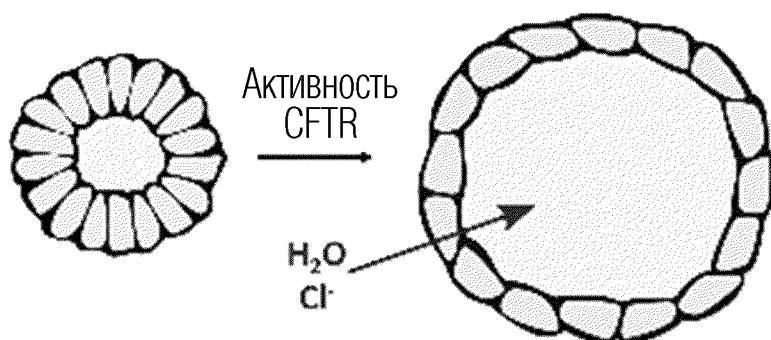
ФИГ. 13А



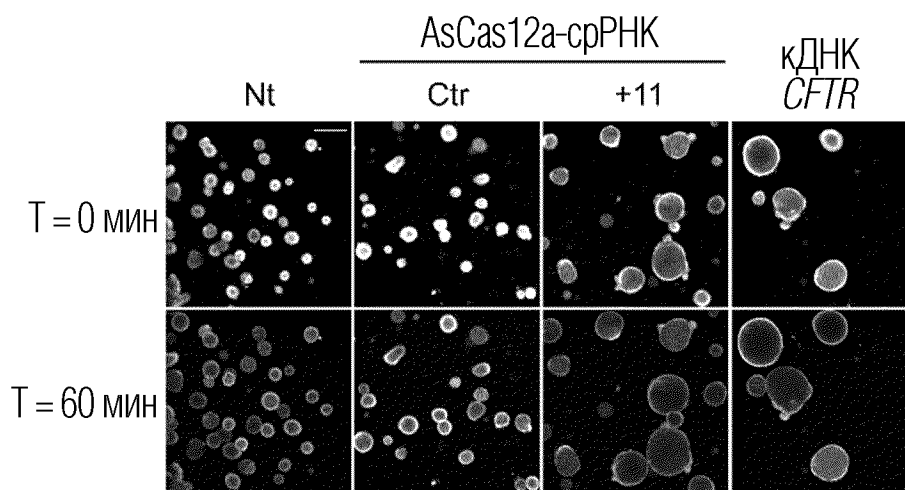
ФИГ. 13В



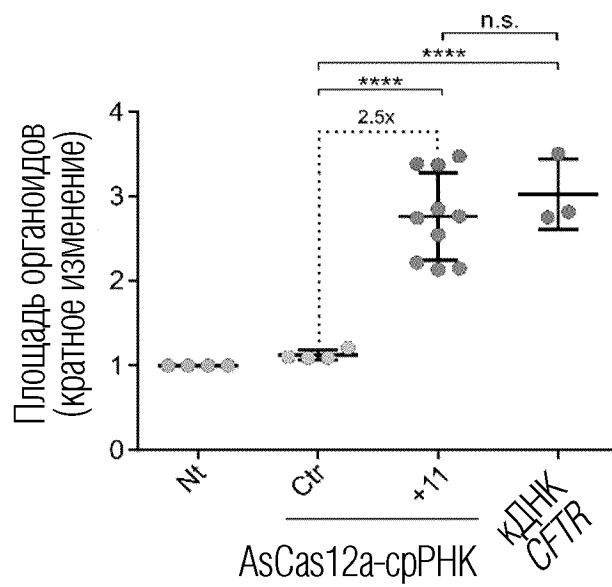
ФИГ. 13D



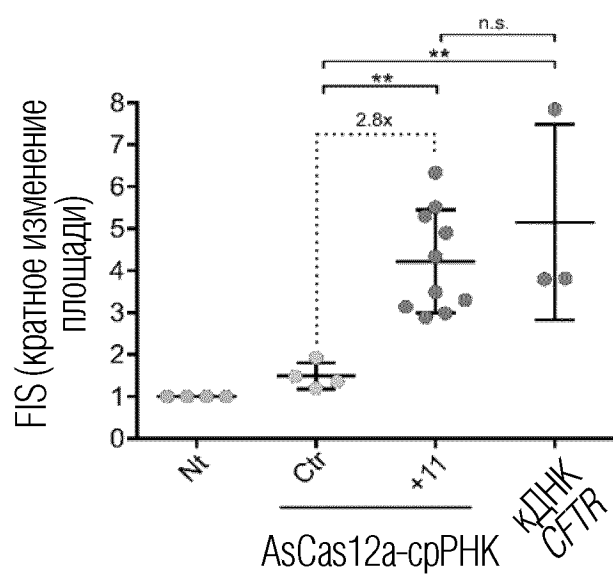
ФИГ. 13E



ФИГ. 13F

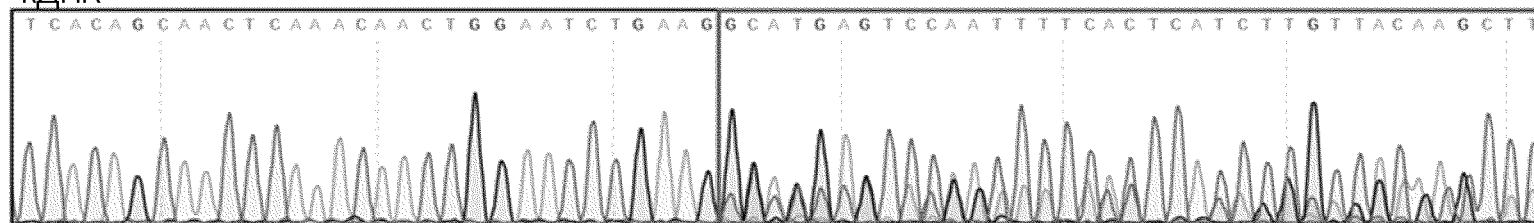


ФИГ. 13G

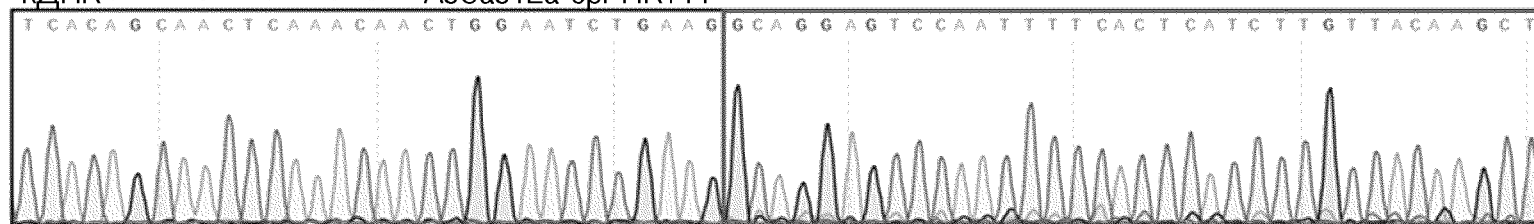


ФИГ. 13H

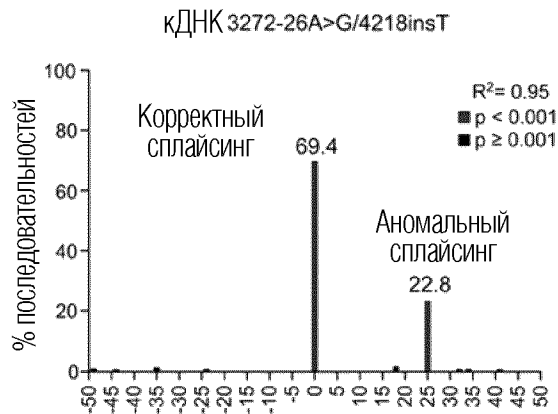
кДНК 3272-26A>G/4218insT



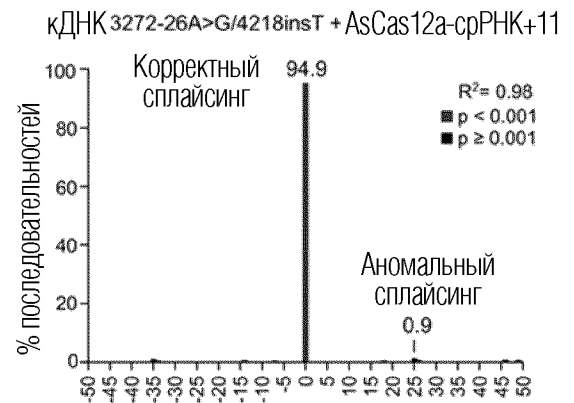
кДНК 3272-26A>G/4218insT + AsCas12a-срPHK+11



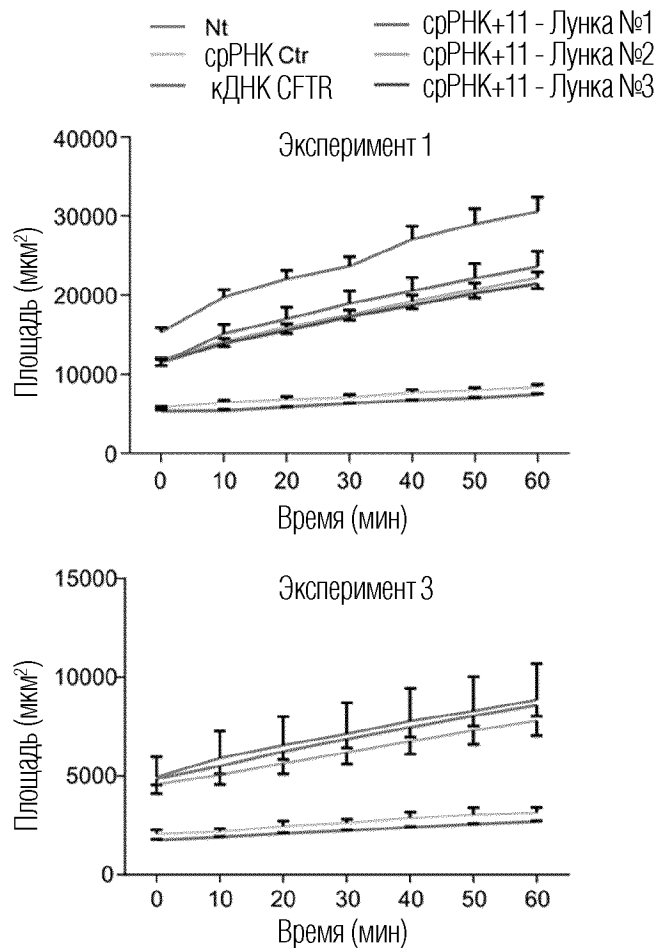
ФИГ. 14А



ФИГ. 14В

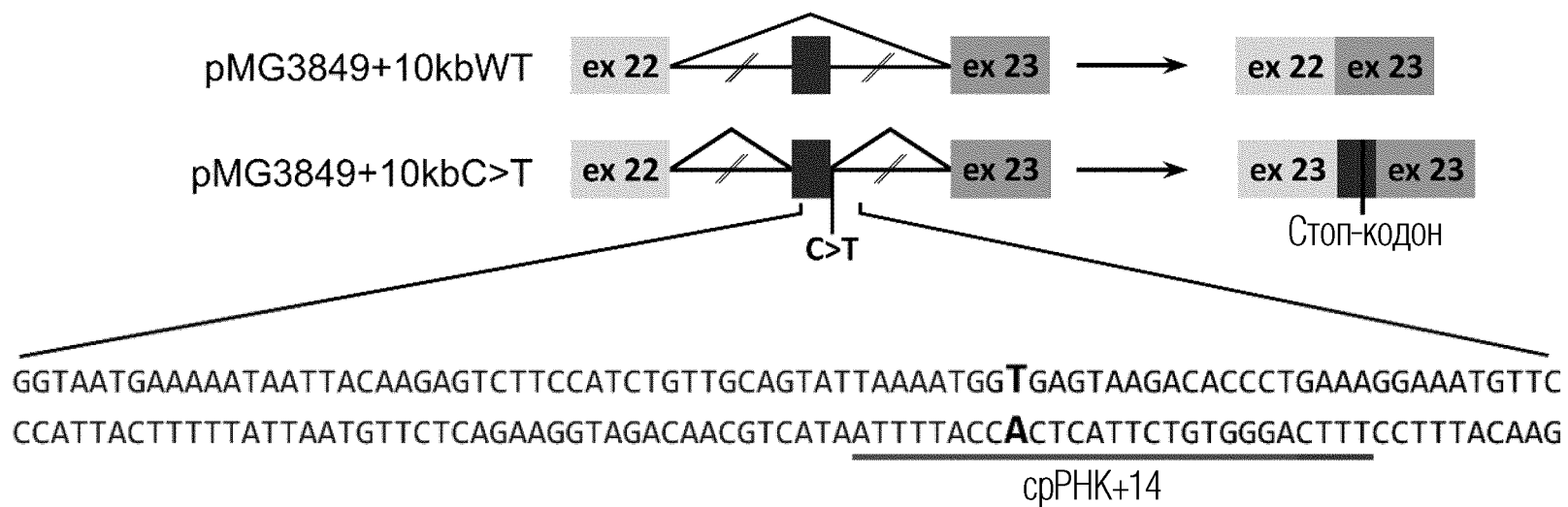


ФИГ. 14С

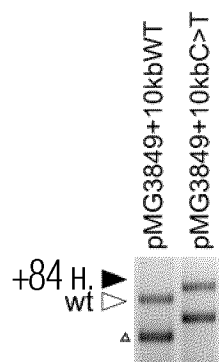


ФИГ. 14D

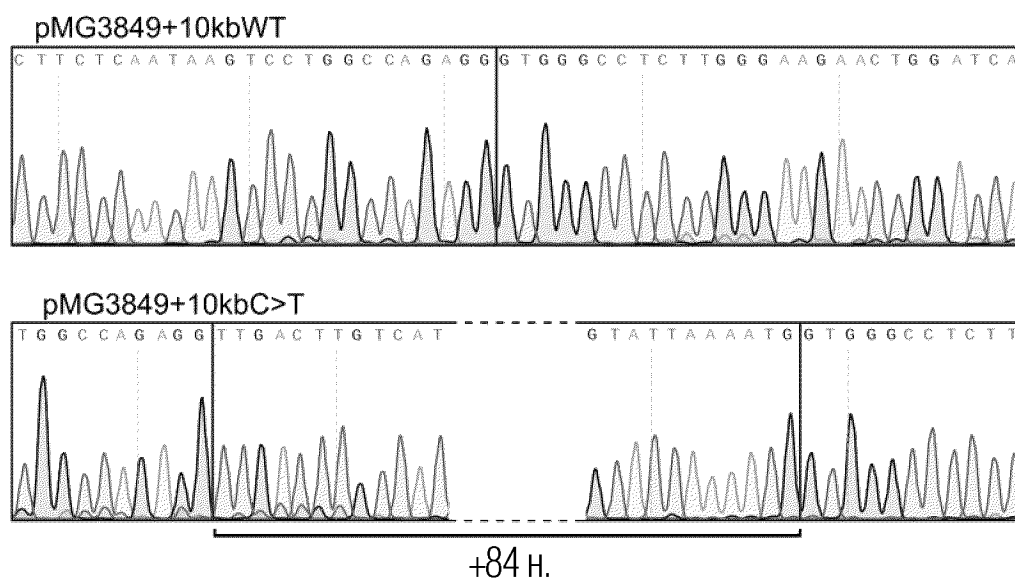
Модель минигена интрона 22 CFTR



ФИГ. 15

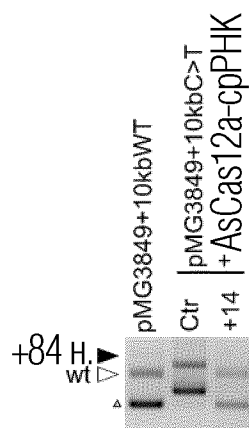


ФИГ. 16А

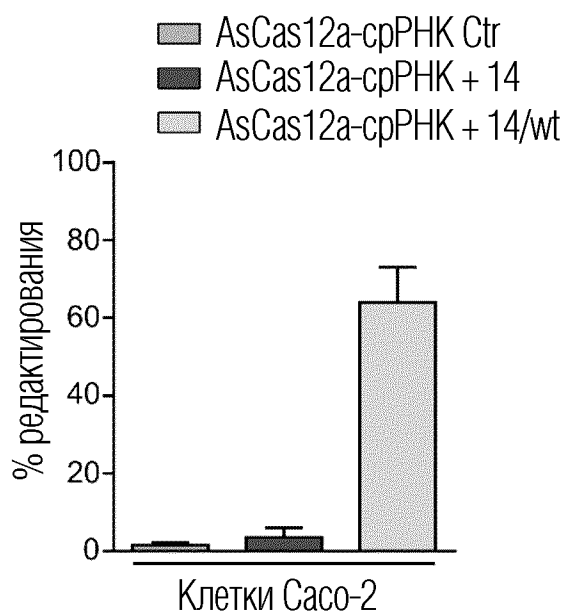


ФИГ. 16В

23/39



ФИГ. 17А



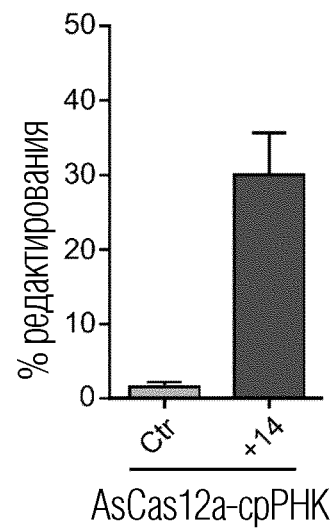
ФИГ. 17В

AsCas12a-cpPHK+14*

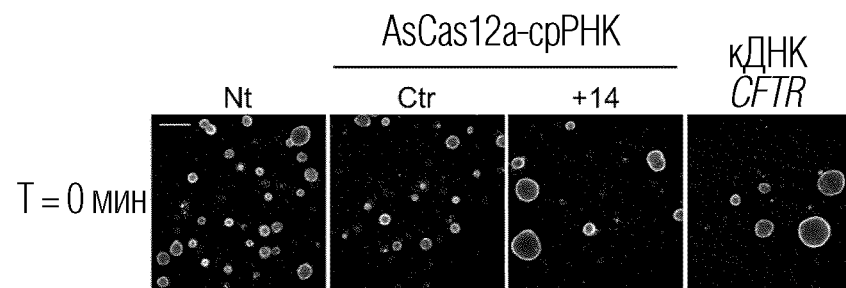
МИШЕНЬ	Количество ридов GUIDE-Seq
Локус CFTR дикого типа	0
Нецелевой участок	0
Фоновые DSB	631

*отсутствие совпадающих целевых участков

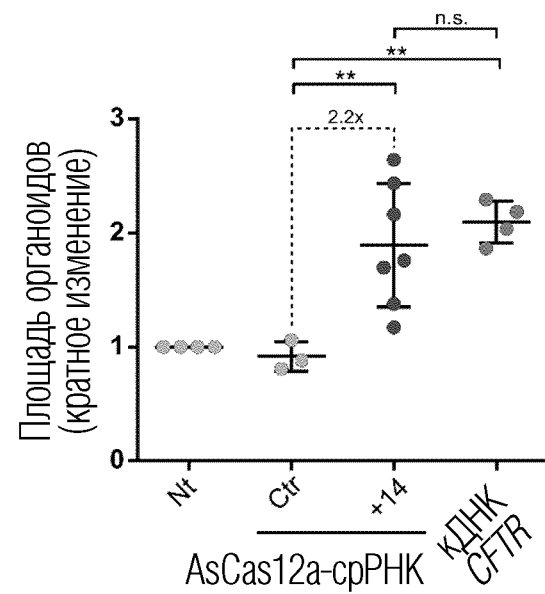
ФИГ. 17С



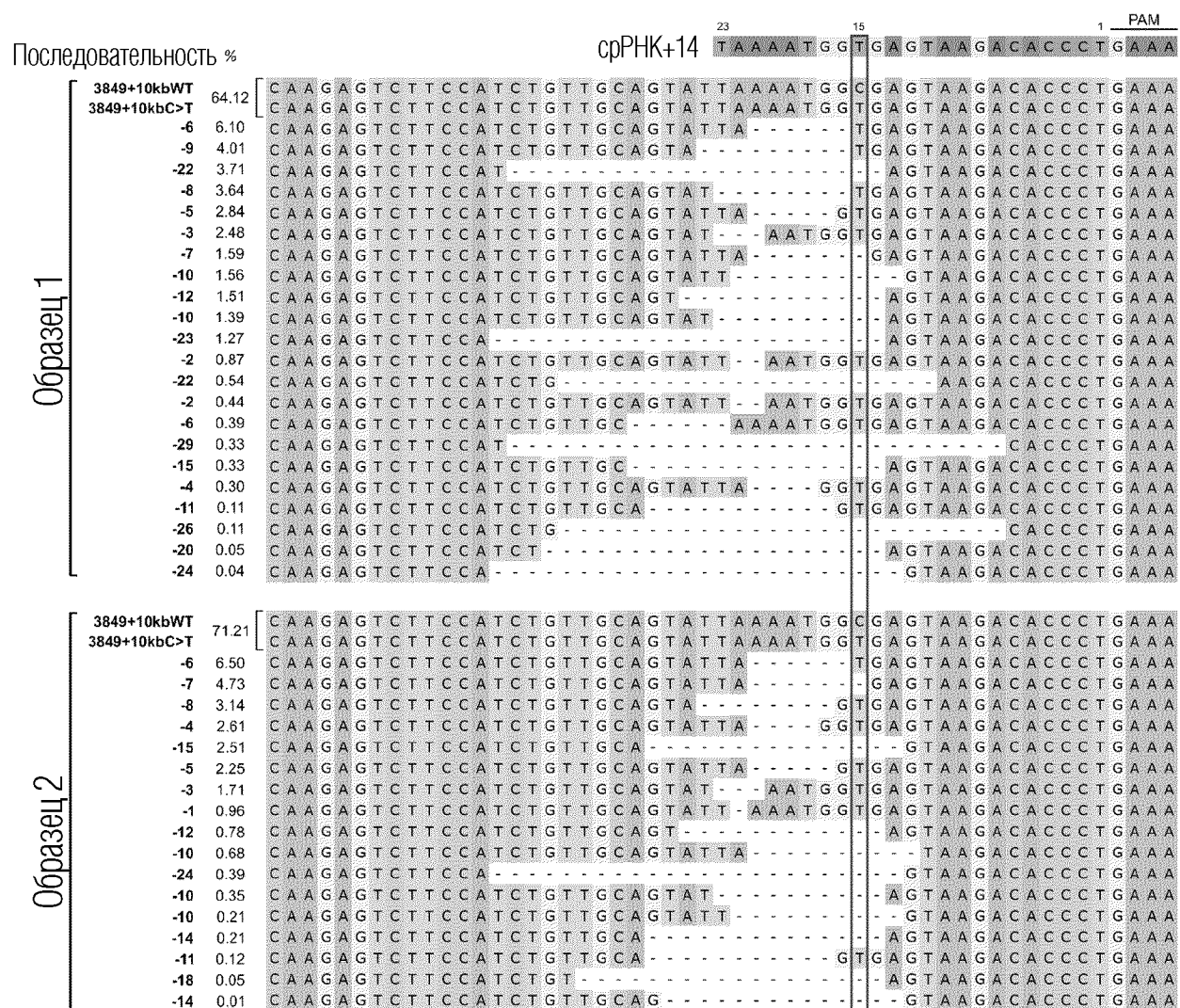
ФИГ. 18А



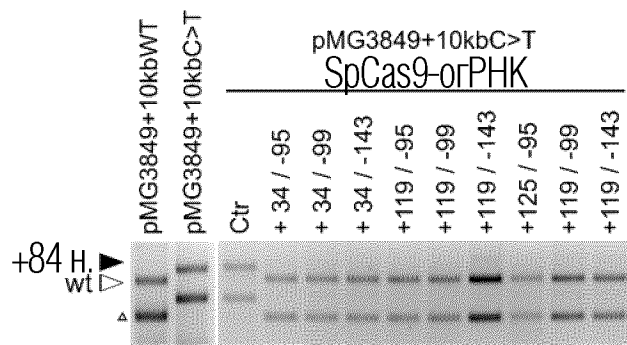
ФИГ. 18В



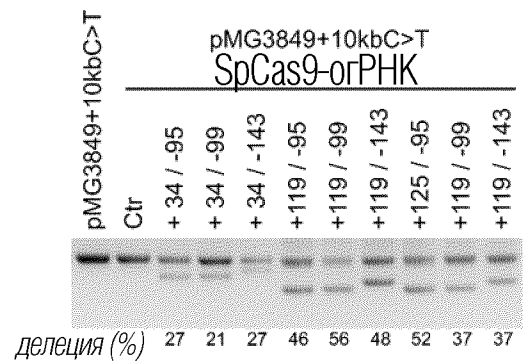
ФИГ. 18С



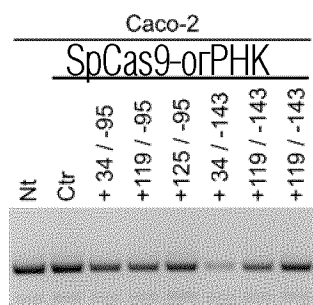
ФИГ. 19



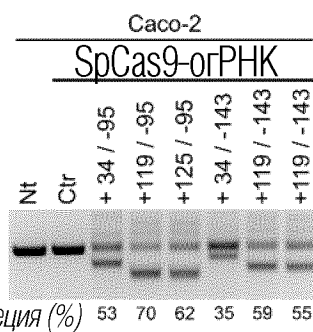
ФИГ. 20А



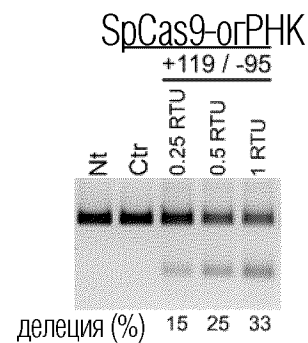
ФИГ. 20В



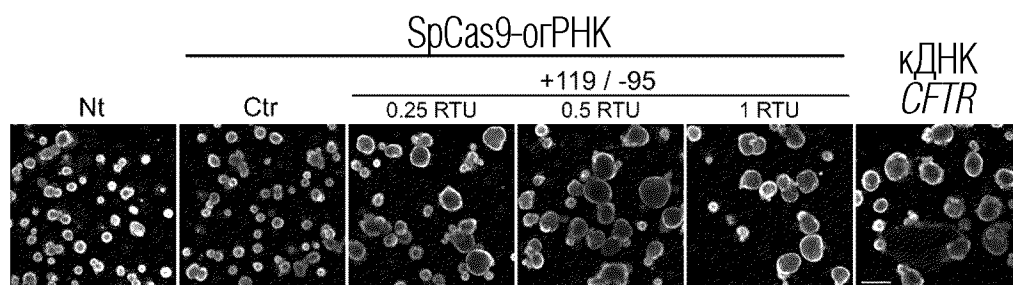
ФИГ. 20С



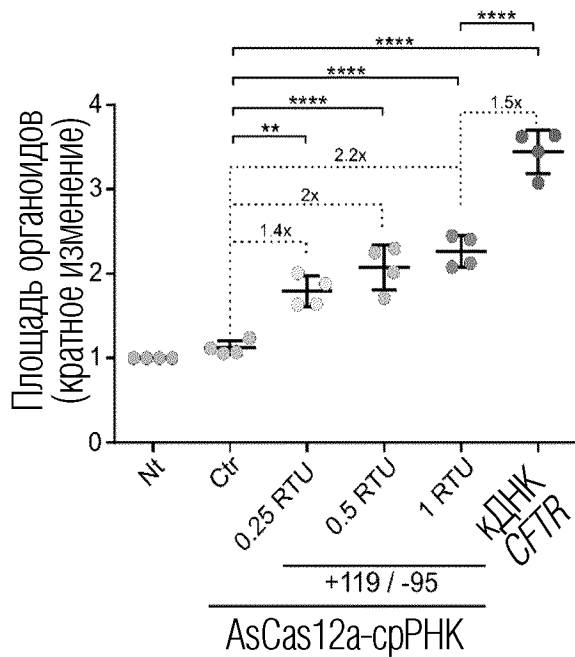
ФИГ. 20D



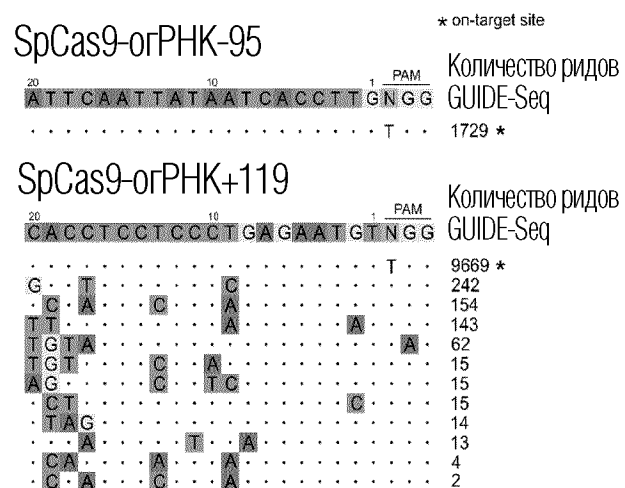
ФИГ. 20Е



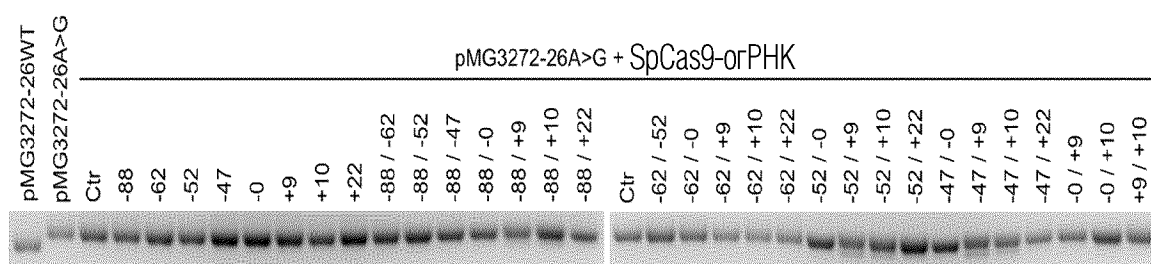
ФИГ. 20F



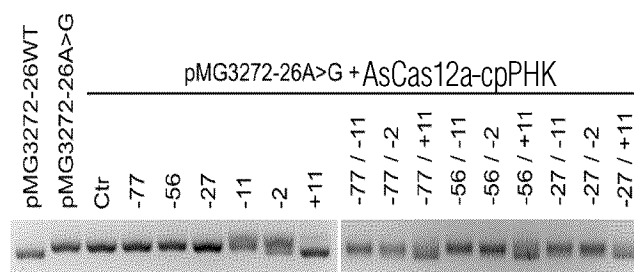
ФИГ. 20G



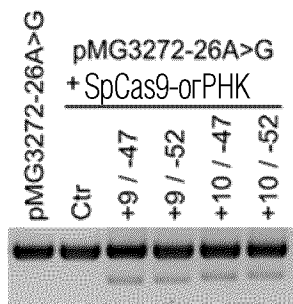
ФИГ. 20H



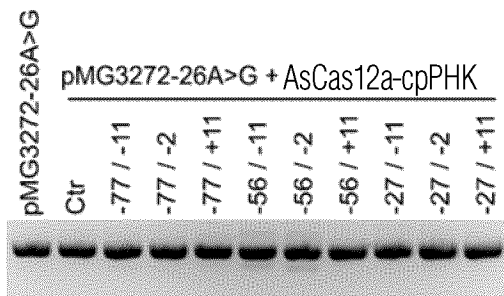
ФИГ. 21A



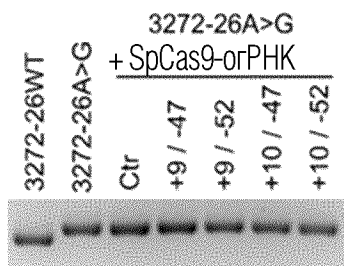
ФИГ. 21B



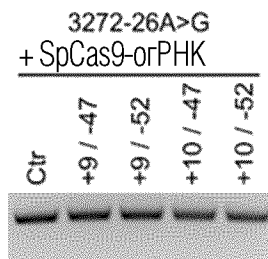
ФИГ. 21С



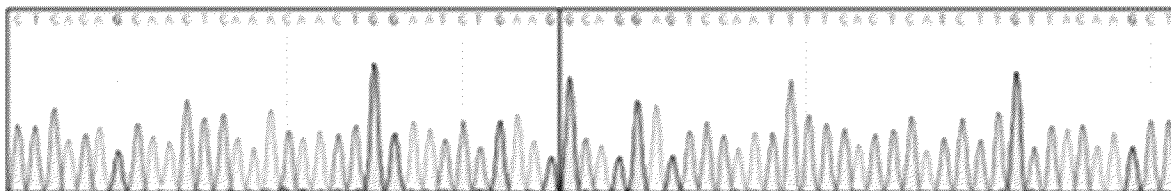
ФИГ. 21D



ФИГ. 21Е



ФИГ. 21F



ФИГ. 21G

29/39

pMG3272-26A>GWT

aagccttgTACCATGGGCAAACCAATCCCAAACCCACTGCTGGGTCTGGATggtaccggtgaccttctgcctcTTACCATA
TTTGACTTCATCCAGTTGTTATTAATTGTGATTGGAGCTATAGCAGttgtcgcagttTTACAACCCCTACATCTTTGTTGC
AACAGTGCCAGTGATAGTGGCTTTTATTATGTTGAGAGCATATTTCTCCAAACCTCACAGCAACTCAAACAAGTGAAT
CTGAAGGTATGACAGTGAATGTGCGATACTCATCTTGTAAGAGCTATAAGAGCTATTTGAGATTCTTTATTGTTAATC
TACTTAAAAAAATTCGCTTTTAACTTTTACATCATATAACAATAATTTTTTTCTACATGCATGTGTATATAAAAGGA
AACTATATTACAAAGTACACATGGATTTTTTTCTTAATTAATGACCATGTGACTTCATTTTGGTTTTAAATAGGTATA
TAGAATCTTACCACAGTTGGTGTACAGGACATTCATTTATAATAAACTTATATCAGTCAAATTAACAAGGATAGTGCTG
CTATTACTAAAGGTTTCTCTGGGTTCCCAAATGATACTTGACCAAATTTGTCCCTTTGGCTTGTGTCTTCAGACACCCT
TTCTTCATGTGTTGGAGCTGCCATTTTCGTGTGCCCCCAAACCTCTACTTGAGCTGTTAGGGAATCACATTTTGCAGTGACA
GCCTTAGTGTGGGTGCATTTTCAGGCAATACTTTTTCAGTATATTTCTGCTTTGTAGATTATTAGCTAAATCAAGTCACA
TAACTTCCTTAATTTAGATACTTGAAAAAATTGTCTTAAAGAAAAATTTTTTTAGTAAGAATTAATTTAGAATTAGCCA
GAAAACTCCAGTGGTAGCCAAGAAAGAGGAATAAATATTGGTGGTAATTTTTTAAGTTCCCATCTCTGGTAGCCAAGTA
AAAAAAGAGGGTAACCTATTAATAAAATAACAAATCATATCTATTCAAAGAATGGCACCAGTGTGAAAAAAGCTTTTTTA
ACCAATGACATTTGTGATATGATTATTCTAATTTAGTCTTTTTCAGGTACAAGATATTATGAAATTACATTTTGTGTTTA
TGTTATTTGCAaTGTTTTCTATGGAAATATTTACagGCAGGAGTCCAATTTTCACTCATCTTGTTACAAGCTTAAAGG
ACTATGGACACTTCGTGCCTTCGGACGGCAGCCTTACTTTGAACTCTGTTCCACAAAGCTCTGAATTTACATACTGCCA
ACTGGTTCTTGACCTGTCAACACTGCGCTGGTTCCAAATGAGAATAGAAATGATTTTTGTCATCTTCTTCATTGCTGTT
ACCTTCATTTCCATTTTAAACACAGgcgaggGATCCggAGAGaATTTATAcTTcCAGGGCgggAATTCgggcTCCATTTT
TTCTAGTATCTTTAAAAATGAAGGTtaagcgccgctctaga

ФИГ. 22А

pMG3272-26A>G

aagccttgTACCATGGGCAAACCAATCCCAAACCCACTGCTGGGTCTGGATggtaccggtgaccttctgcctcTTACCATA
TTTGACTTCATCCAGTTGTTATTAATTGTGATTGGAGCTATAGCAGttgtcgcagttTTACAACCCCTACATCTTTGTTGC
AACAGTGCCAGTGATAGTGGCTTTTATTATGTTGAGAGCATATTTCTCCAAACCTCACAGCAACTCAAACAAGTGAAT
CTGAAGGTATGACAGTGAATGTGCGATACTCATCTTGTAAGAGCTATAAGAGCTATTTGAGATTCTTTATTGTTAATC
TACTTAAAAAAATTCGCTTTTAACTTTTACATCATATAACAATAATTTTTTTCTACATGCATGTGTATATAAAAGGA
AACTATATTACAAAGTACACATGGATTTTTTTCTTAATTAATGACCATGTGACTTCATTTTGGTTTTAAATAGGTATA
TAGAATCTTACCACAGTTGGTGTACAGGACATTCATTTATAATAAACTTATATCAGTCAAATTAACAAGGATAGTGCTG
CTATTACTAAAGGTTTCTCTGGGTTCCCAAATGATACTTGACCAAATTTGTCCCTTTGGCTTGTGTCTTCAGACACCCT
TTCTTCATGTGTTGGAGCTGCCATTTTCGTGTGCCCCCAAACCTCTACTTGAGCTGTTAGGGAATCACATTTTGCAGTGACA
GCCTTAGTGTGGGTGCATTTTCAGGCAATACTTTTTCAGTATATTTCTGCTTTGTAGATTATTAGCTAAATCAAGTCACA
TAACTTCCTTAATTTAGATACTTGAAAAAATTGTCTTAAAGAAAAATTTTTTTAGTAAGAATTAATTTAGAATTAGCCA
GAAAACTCCAGTGGTAGCCAAGAAAGAGGAATAAATATTGGTGGTAATTTTTTAAGTTCCCATCTCTGGTAGCCAAGTA
AAAAAAGAGGGTAACCTATTAATAAAATAACAAATCATATCTATTCAAAGAATGGCACCAGTGTGAAAAAAGCTTTTTTA
ACCAATGACATTTGTGATATGATTATTCTAATTTAGTCTTTTTCAGGTACAAGATATTATGAAATTACATTTTGTGTTTA
TGTTATTTGCAgTGTTTTCTATGGAAATATTTACagGCAGGAGTCCAATTTTCACTCATCTTGTTACAAGCTTAAAGG
ACTATGGACACTTCGTGCCTTCGGACGGCAGCCTTACTTTGAACTCTGTTCCACAAAGCTCTGAATTTACATACTGCCA
ACTGGTTCTTGACCTGTCAACACTGCGCTGGTTCCAAATGAGAATAGAAATGATTTTTGTCATCTTCTTCATTGCTGTT
ACCTTCATTTCCATTTTAAACACAGgcgaggGATCCggAGAGaATTTATAcTTcCAGGGCgggAATTCgggcTCCATTTT
TTCTAGTATCTTTAAAAATGAAGGTtaagcgccgctctaga

ФИГ. 22В

pMG3849+10kbWT

TACTTAATACGACTCACTATAGGCTAGCctcgagATGCGATCTGTGAGCCGAGTCTTTAAGTTCATTGACATGCCAACAG
AAGGTAAACCTACCAAGTCAACCAAACCATAACAAGAATGGCCAACTCTCGAAAGTTATGATTATTGAGAATTCACACGTG
AAGAAAAGATGACATCTGGCCCTCAGGGGGCCAAATGACTGTCAAAGATCTCACAGCAAAATACACAGAAGGTGGAAATGC
CATATTAGAGAACATTTCTTCTCAATAAGTCCTGGCCAGAGGGTGAGATTTGAACACTGCTTGCTTTGTTAGACTGTGT
TCAGTAAGTGAATCCCAGTAGCCTGAAGCAATGTGTTAGCAGAATCTATTTGTAACATTATTATTGTACAGTAGAATCAA
TATTAAACACACATGTTTTATTATATGGAGTCATTATTTTTAATATGAAATTTAATTTGCAGAGTCCTGAACCTATATAT
TCAGTGGGTATAAGCAGCATATTCTCAATACTATGTTTCATTAATAATTAATAGAGATATATGAACACATAAAAGATTCA
ATTATAATCACCTTGTGGATCTAAATTTCAAGTTGACTTGTCTATCTTGATTTCTGGAGACCACAAGGTAATGAAAAATAAT
TACAAGAGTCTTCCATCTGTTGCAGTATTAATAATGGCGAGTAAGACACCCTGAAAGGAAATGTTCTATTCATGGTACAAT
GCAATTACAGCTAGCACCAAAATTCACACTGTTTAACTTTCAACATATTATTTTGATTATCTTGATCCAACATTCTCAG
GGAGGAGGTGCATTGAAGTTATTAGAAAACACTGACTTAGATTTAGGGTATGTCTTAAAGCTTATTTGCGGGAAGTACT
CTAGCCTTATTCAACAGATCACTGAGAAGCCTAAAGGTCAGTGATAAAGGAAGTCTGCATCAGGGGTCCAATTCCTTATG
GCCAGTTTCTCTATTCTGTTCCAAGGTTGTTTGTCTCCATATATCAACATTGGTCAGGATTGAAAGTGTGCAACAAGGTT
TGAATGAATAAGTGAATCTTCCACTGGTGACAGGATAAAATATTCCAATGGTTTTTATTGAAGTACAATACTGAATTA
TGTTTATGGCATGGTACCTATATGTCACAGAAGTGATCCCATCACTTTTACCTTATAGGTGGGCCTCTTGGGAAGAACTG
GATCAGGGAAGAGTACTTTGTTATCAGCTTTTTTGAGACTACTGAACACTGAAGGAGAAATCCAGATCGATGGTGTGTCT
TGGGATTCAATAACTTTGCAACAGTGGAGGAAAGCCTTTGGAGTGATACCACAGgcggccgcT

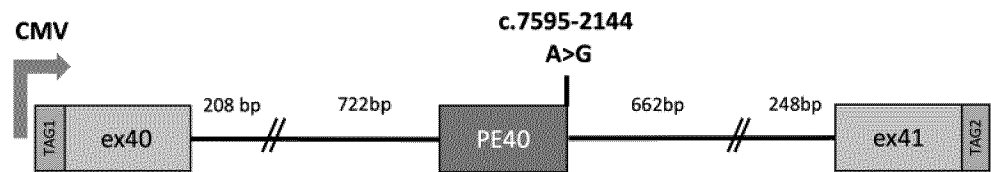
ФИГ. 22С

pMG3849+10kbC>T

TACTTAATACGACTCACTATAGGCTAGCctcgagATGCGATCTGTGAGCCGAGTCTTTAAGTTCATTGACATGCCAACAG
AAGGTAAACCTACCAAGTCAACCAAACCATAACAAGAATGGCCAACTCTCGAAAGTTATGATTATTGAGAATTCACACGTG
AAGAAAAGATGACATCTGGCCCTCAGGGGGCCAAATGACTGTCAAAGATCTCACAGCAAAATACACAGAAGGTGGAAATGC
CATATTAGAGAACATTTCTTCTCAATAAGTCCTGGCCAGAGGGTGAGATTTGAACACTGCTTGCTTTGTTAGACTGTGT
TCAGTAAGTGAATCCCAGTAGCCTGAAGCAATGTGTTAGCAGAATCTATTTGTAACATTATTATTGTACAGTAGAATCAA
TATTAAACACACATGTTTTATTATATGGAGTCATTATTTTTAATATGAAATTTAATTTGCAGAGTCCTGAACCTATATAT
TCAGTGGGTATAAGCAGCATATTCTCAATACTATGTTTCATTAATAATTAATAGAGATATATGAACACATAAAAGATTCA
ATTATAATCACCTTGTGGATCTAAATTTCAAGTTGACTTGTCTATCTTGATTTCTGGAGACCACAAGGTAATGAAAAATAAT
TACAAGAGTCTTCCATCTGTTGCAGTATTAATAATGGtGAGTAAGACACCCTGAAAGGAAATGTTCTATTCATGGTACAAT
GCAATTACAGCTAGCACCAAAATTCACACTGTTTAACTTTCAACATATTATTTTGATTATCTTGATCCAACATTCTCAG
GGAGGAGGTGCATTGAAGTTATTAGAAAACACTGACTTAGATTTAGGGTATGTCTTAAAGCTTATTTGCGGGAAGTACT
CTAGCCTTATTCAACAGATCACTGAGAAGCCTAAAGGTCAGTGATAAAGGAAGTCTGCATCAGGGGTCCAATTCCTTATG
GCCAGTTTCTCTATTCTGTTCCAAGGTTGTTTGTCTCCATATATCAACATTGGTCAGGATTGAAAGTGTGCAACAAGGTT
TGAATGAATAAGTGAATCTTCCACTGGTGACAGGATAAAATATTCCAATGGTTTTTATTGAAGTACAATACTGAATTA
TGTTTATGGCATGGTACCTATATGTCACAGAAGTGATCCCATCACTTTTACCTTATAGGTGGGCCTCTTGGGAAGAACTG
GATCAGGGAAGAGTACTTTGTTATCAGCTTTTTTGAGACTACTGAACACTGAAGGAGAAATCCAGATCGATGGTGTGTCT
TGGGATTCAATAACTTTGCAACAGTGGAGGAAAGCCTTTGGAGTGATACCACAGgcggccgc

ФИГ. 22D

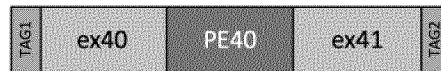
Модель минигена:



Продукты сплайсинга:

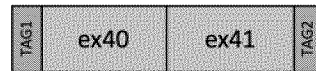
Продукты RT-ПЦР

Мутантная мРНК



Ожидаемый размер: 998 п.н.

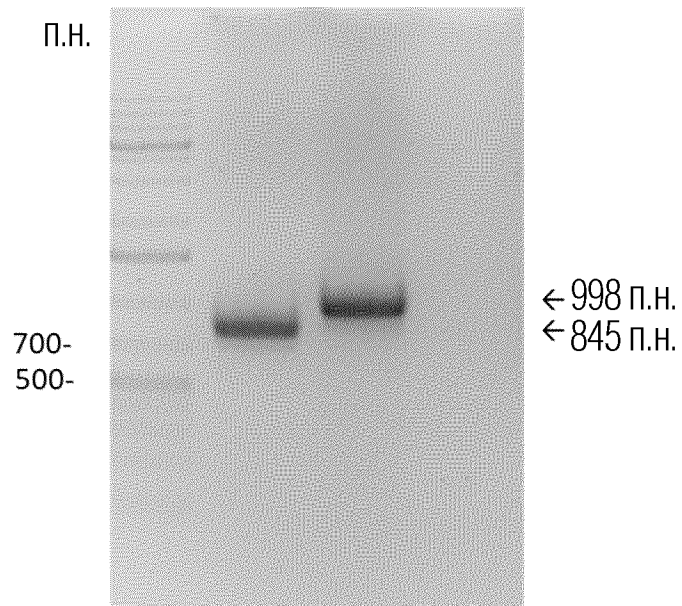
мРНК дикого типа



Ожидаемый размер: 845 п.н.

ФИГ. 23

WT MUT NTC



ФИГ. 24

TGATTTGTATATAGAAATTAGATGATTCGGCTTATCATTTTAAAGCACTAAATTGAAAGAGTGCCAGGAGTCAGGTTTAAACACTTCCTAGCCAAAGGAG
 ACTAAACATATATCTTAATCTACTAAGCCGAATAGTAAAATTTCGTGATTTAACTTTCTCACGGTCCTCAGTCCAAAAATTGTGAAGGGATCGGTTTCCTC

CTAATTAAAGCTGCTTTCAGCTTCCTCTCCAGCAATCACACAAGTTAAAGGACCCCTTCTGCAACAAGAGCAGCGAATCTACTCAGCCAGAGCAGGAAGCTAA
 GATTAATTCGACGAAAGTCCAAAGGAGAGGTCTTAGTGTGTTCTATTTCCTGGGAAGACGTTGTTCTCGTCGCTTAGATGAGTCGGTCTCGTCCTTCGATT

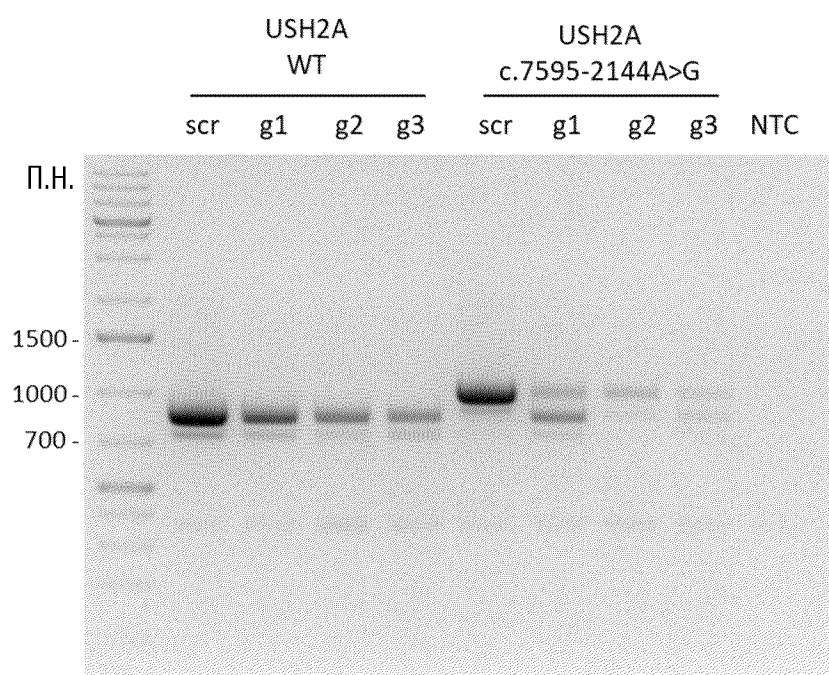
гид 3 гид 2 >PE40
 >c.7595-2144A>G

TAAAAATGTATGCTGGCTTTTAAAGGGGGAAACAAATCATGAAATTGAAATTGAACACCTCTCCTTCCCAAGCTAAGAGATCATCTTTAAGAAAAGGCTGT
 ATTTTACATACGACCGAAAATTCCCCCTTTGTTTAGTACTTTAACTTTAACTTGTGGAGAGGAAAGGGTCCATTCTCTAGTAGAAATCTTTTCCGACA

гид 1

GTATTGTGGGGTTTGAAGTGCAAGTTCATCTCATTATCATGGATGTTTCAACCATAATACTATCATCATATGCAGGAGAAAATAAAGCCTTATCCCCCA
 CATACACCCCCAAACTTCACGTTCAAGTAGAGTAATAGTACCTACAAAGTGGGTATTATGATAGTAGTATACGTCTCTTTATTTTCGGAATAGGGGGT

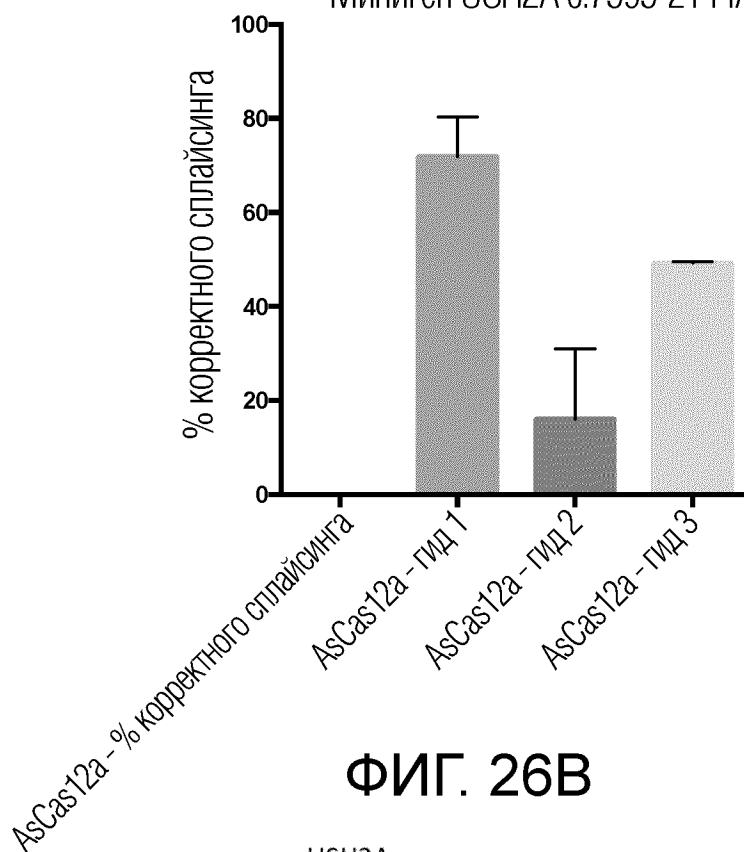
ФИГ. 25



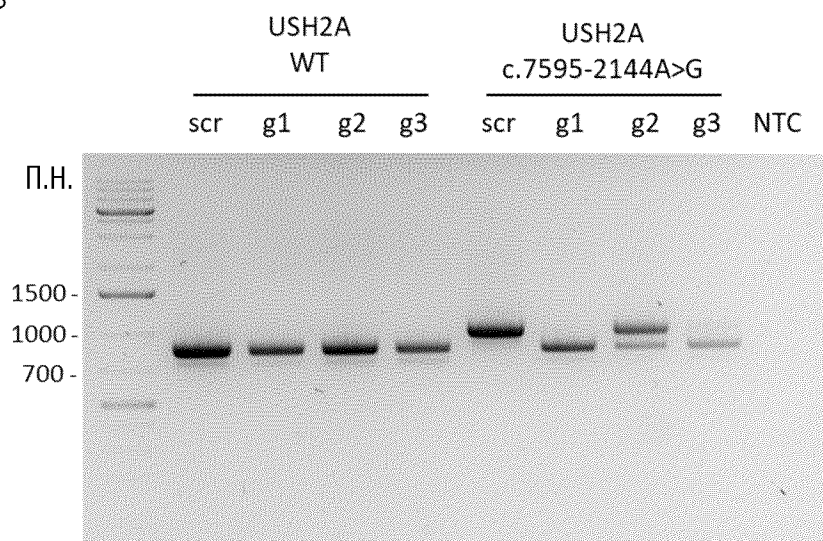
ФИГ. 26А

33/39

Миниген USH2A с.7595-2144A>G



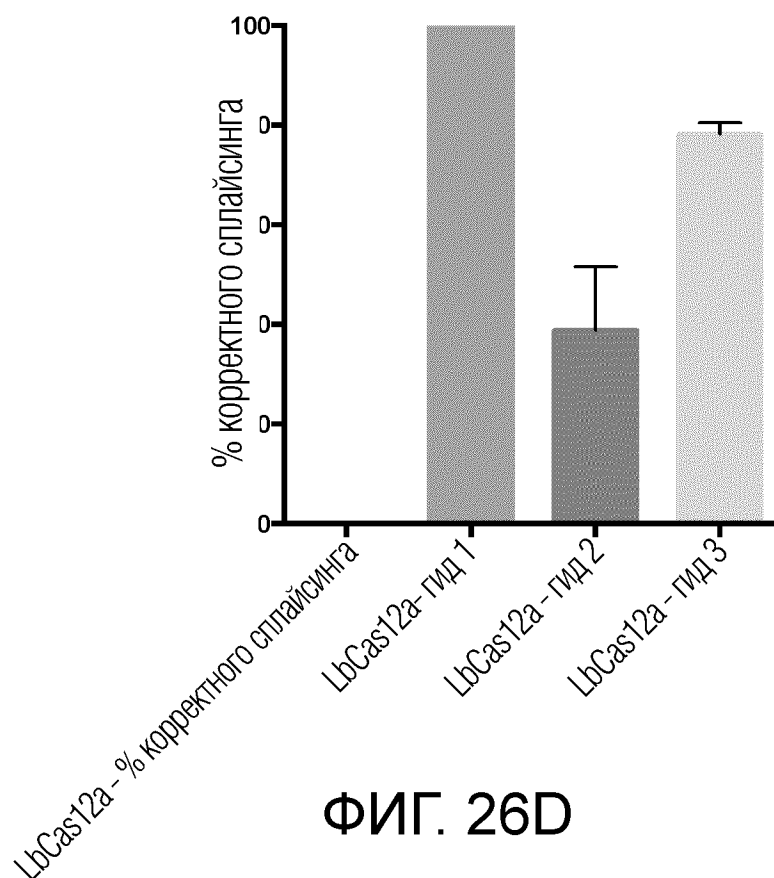
ФИГ. 26В



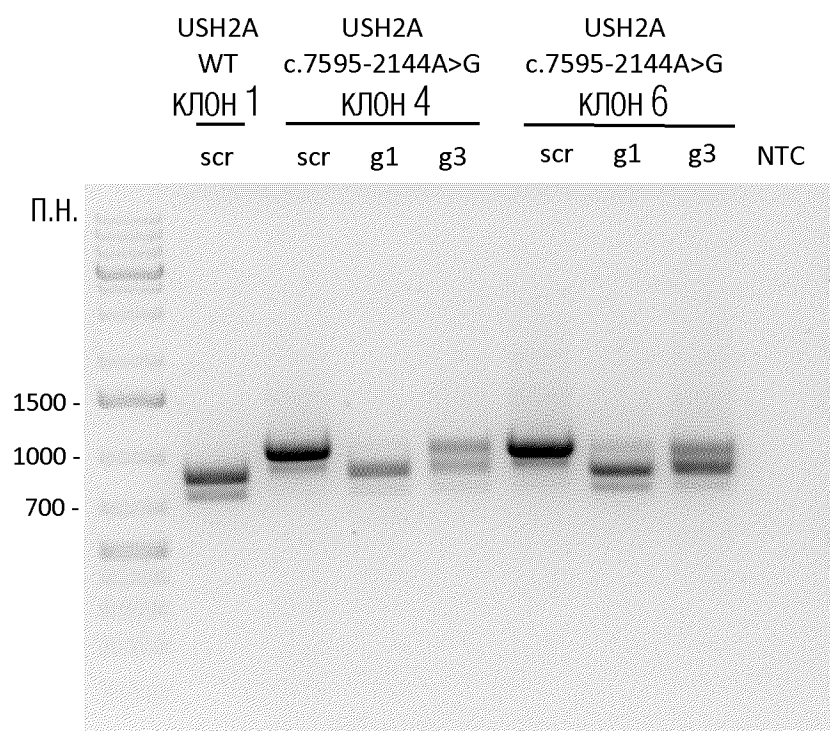
ФИГ. 26С

34/39

Миниген USH2A с.7595-2144A>G



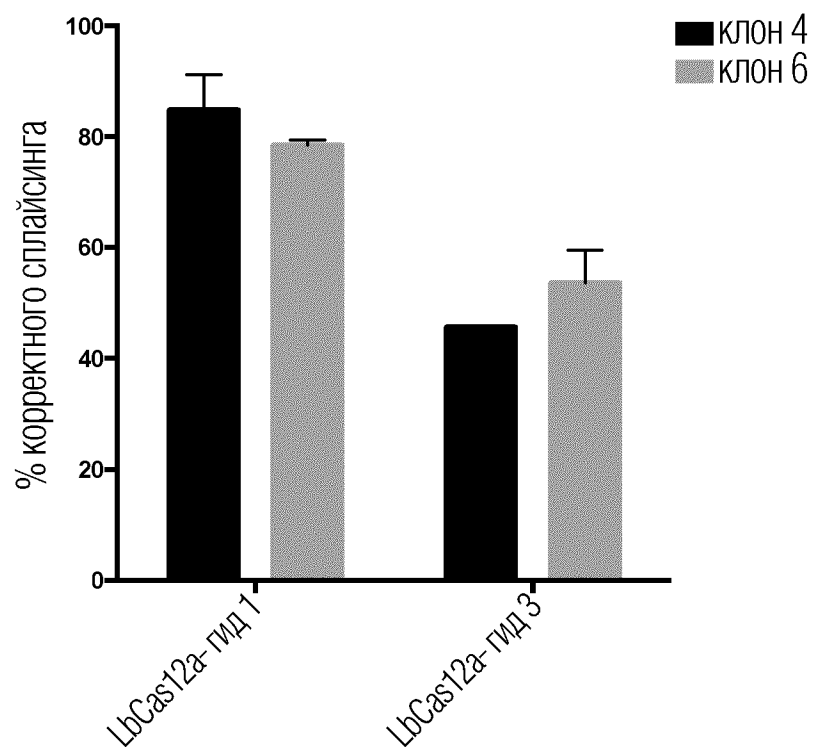
ФИГ. 26D



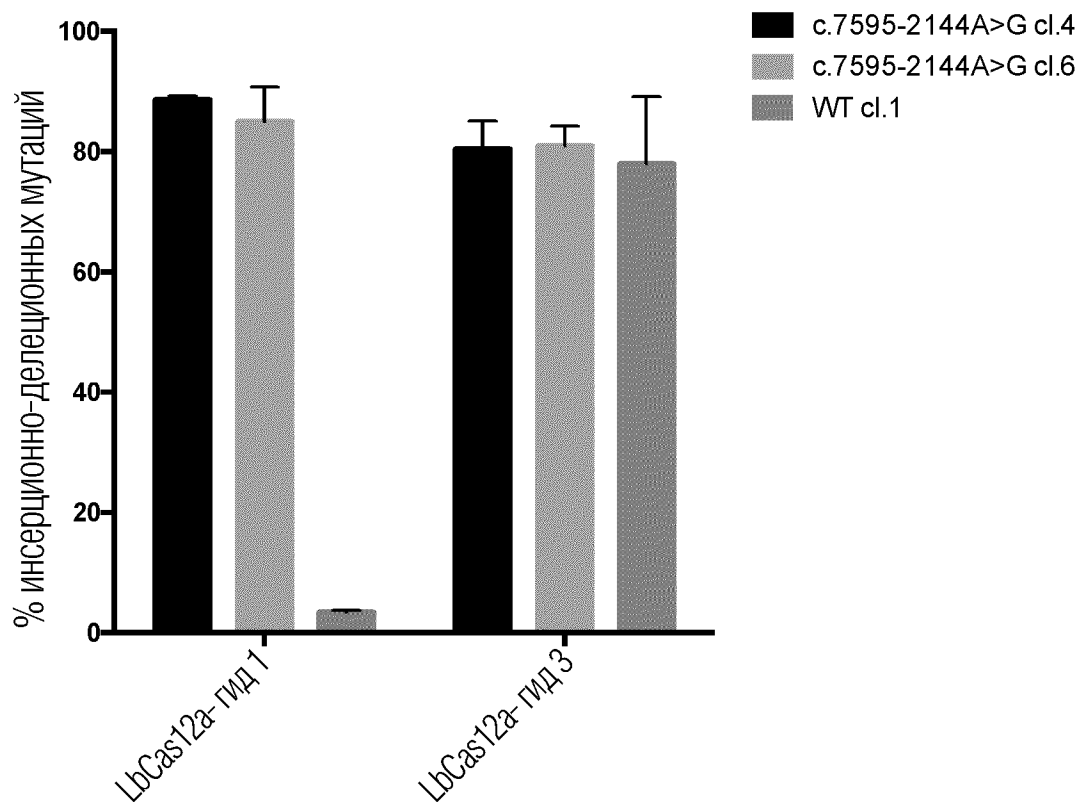
ФИГ. 27A

35/39

USH2A c.7595-2144A>G



ФИГ. 27В

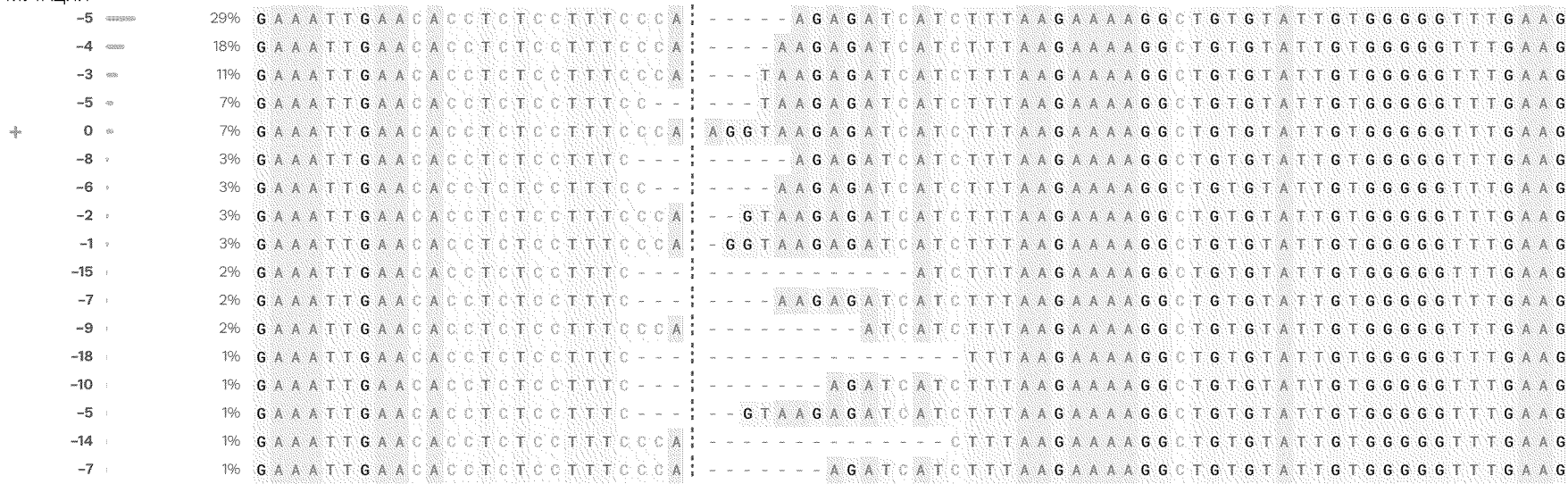


ФИГ. 27С

ИНСЕРЦИОННО-
ДЕЛЕЦИОННЫЕ
МУТАЦИИ

USH2A c.7595-2144>G cl.4 – LbCas12a – гид 1

ВКЛАД ▾ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ



ФИГ. 28А

ИНСЕРЦИОННО-
ДЕЛЕЦИОННЫЕ
МУТАЦИИ

USH2A c.7595-2144>G cl.6 – LbCas12a – гид 1

ВКЛАД ▾ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

-5	31%	G A A A T T G A A C A C C T C T C C T T T C C C A	- - - - A G A G A T C A T C T T T A A G A A A A G G C T G T G T A T T G T G G G G G T T T G A A G
-4	13%	G A A A T T G A A C A C C T C T C C T T T C C C A	- - - - A A G A G A T C A T C T T T A A G A A A A G G C T G T G T A T T G T G G G G G T T T G A A G
+	0	G A A A T T G A A C A C C T C T C C T T T C C C A	A G G T A A G A G A T C A T C T T T A A G A A A A G G C T G T G T A T T G T G G G G G T T T G A A G
-22	8%	G A A A T T G A A C A C C T C T C C - - - - -	- - - - - T T T A A G A A A A G G C T G T G T A T T G T G G G G G T T T G A A G
-3	5%	G A A A T T G A A C A C C T C T C C T T T C C C A	- - - T A A G A G A T C A T C T T T A A G A A A A G G C T G T G T A T T G T G G G G G T T T G A A G
-18	3%	G A A A T T G A A C A C C T C T C C T T T C - -	- - - - - T T T A A G A A A A G G C T G T G T A T T G T G G G G G T T T G A A G
-6	3%	G A A A T T G A A C A C C T C T C C T T T C C - -	- - - - A A G A G A T C A T C T T T A A G A A A A G G C T G T G T A T T G T G G G G G T T T G A A G
-15	3%	G A A A T T G A A C A C C T C T C C T T T C C C -	- - - - - C T T T A A G A A A A G G C T G T G T A T T G T G G G G G T T T G A A G
-8	3%	G A A A T T G A A C A C C T C T C C T T T C C C A	- - - - - G A T C A T C T T T A A G A A A A G G C T G T G T A T T G T G G G G G T T T G A A G
-7	3%	G A A A T T G A A C A C C T C T C C T T T C C C A	- - - - - A G A T C A T C T T T A A G A A A A G G C T G T G T A T T G T G G G G G T T T G A A G
-1	3%	G A A A T T G A A C A C C T C T C C T T T C C C A	- G G T A A G A G A T C A T C T T T A A G A A A A G G C T G T G T A T T G T G G G G G T T T G A A G
-14	2%	G A A A T T G A A C A C C T C T C C T T T C C - -	- - - - - A T C T T T A A G A A A A G G C T G T G T A T T G T G G G G G T T T G A A G
-3	2%	G A A A T T G A A C A C C T C T C C T T T C C C -	- - G T A A G A G A T C A T C T T T A A G A A A A G G C T G T G T A T T G T G G G G G T T T G A A G
-2	2%	G A A A T T G A A C A C C T C T C C T T T C C C A	- - G T A A G A G A T C A T C T T T A A G A A A A G G C T G T G T A T T G T G G G G G T T T G A A G
-15	1%	G A A A T T G A A C A C C T C T C C T T T C - -	- - - - - A T C T T T A A G A A A A G G C T G T G T A T T G T G G G G G T T T G A A G
-5	1%	G A A A T T G A A C A C C T C T C C T T T C C - -	- - - T A A G A G A T C A T C T T T A A G A A A A G G C T G T G T A T T G T G G G G G T T T G A A G
-16	1%	G A A A T T G A A C A C C T C T C C T T T C C C -	- - - - - T T T A A G A A A A G G C T G T G T A T T G T G G G G G T T T G A A G

ФИГ. 28В

ИНСЕРЦИОННО-
ДЕЛЕЦИОННЫЕ
МУТАЦИИ

ВКЛАД

▼ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

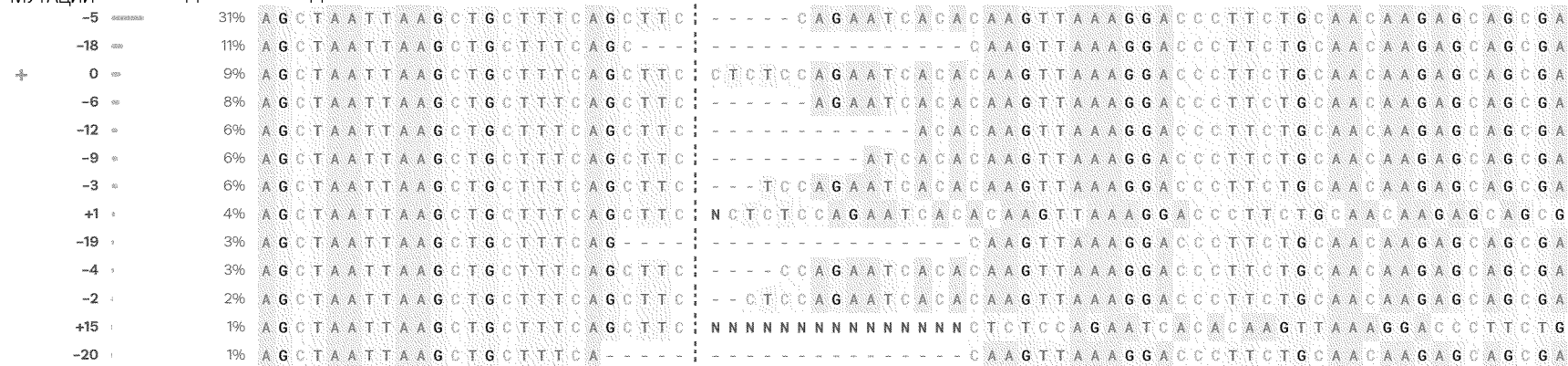
-5	27%	A G C T A A T T A A G C T G C T T T C A G C T T C	- - - - - C A G A A T C A C A C A A G T T A A A G G A C C C T T C T G C A A C A A G A G C A G C G A
+	0	16%	A G C T A A T T A A G C T G C T T T C A G C T T C C T C T C C A G A A T C A C A C A A G T T A A A G G A C C C T T C T G C A A C A A G A G C A G C G A
-18	7%	A G C T A A T T A A G C T G C T T T C A G C - - -	- - - - - C A A G T T A A A G G A C C C T T C T G C A A C A A G A G C A G C G A
-9	7%	A G C T A A T T A A G C T G C T T T C A G C T T C	- - - - - A T C A C A C A A G T T A A A G G A C C C T T C T G C A A C A A G A G C A G C G A
-6	7%	A G C T A A T T A A G C T G C T T T C A G C T T C	- - - - - A G A A T C A C A C A A G T T A A A G G A C C C T T C T G C A A C A A G A G C A G C G A
-12	6%	A G C T A A T T A A G C T G C T T T C A G C T T C	- - - - - A C A C A A G T T A A A G G A C C C T T C T G C A A C A A G A G C A G C G A
-3	6%	A G C T A A T T A A G C T G C T T T C A G C T T C	- - - T C C A G A A T C A C A C A A G T T A A A G G A C C C T T C T G C A A C A A G A G C A G C G A
+1	5%	A G C T A A T T A A G C T G C T T T C A G C T T C	N C T C T C C A G A A T C A C A C A A G T T A A A G G A C C C T T C T G C A A C A A G A G C A G C G
-18	2%	A G C T A A T T A A G C T G C T T T C A - - - - -	- - - - - C A C A A G T T A A A G G A C C C T T C T G C A A C A A G A G C A G C G A
-19	1%	A G C T A A T T A A G C T G C T T T C A G - - -	- - - - - C A A G T T A A A G G A C C C T T C T G C A A C A A G A G C A G C G A
-8	1%	A G C T A A T T A A G C T G C T T T C A G C T T -	- - - - - G A A T C A C A C A A G T T A A A G G A C C C T T C T G C A A C A A G A G C A G C G A
-7	1%	A G C T A A T T A A G C T G C T T T C A G C T T -	- - - - - A G A A T C A C A C A A G T T A A A G G A C C C T T C T G C A A C A A G A G C A G C G A
-4	1%	A G C T A A T T A A G C T G C T T T C A G C T T -	- - - T C C A G A A T C A C A C A A G T T A A A G G A C C C T T C T G C A A C A A G A G C A G C G A
-2	1%	A G C T A A T T A A G C T G C T T T C A G C T T -	- T C T C C A G A A T C A C A C A A G T T A A A G G A C C C T T C T G C A A C A A G A G C A G C G A
-13	1%	A G C T A A T T A A G C T G C T T T C A G C T T C	- - - - - C A C A A G T T A A A G G A C C C T T C T G C A A C A A G A G C A G C G A

ФИГ. 28С

ИНСЕРЦИОННО-
ДЕЛЕЦИОННЫЕ
МУТАЦИИ

USH2A c.7595-2144>G cl.6 – LbCas12a - гид 3

ВКЛАД ▾ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ



ФИГ. 28D