

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202192806** (13) **A1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**(43) Дата публикации заявки  
**2022.02.03**(51) Int. Cl. **C12N 9/22 (2006.01)**  
**C12N 15/113 (2010.01)**  
**C12N 15/864 (2006.01)**(22) Дата подачи заявки  
**2020.04.10**(54) **СИСТЕМЫ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОВ ДЛЯ МОДИФИЦИРОВАНИЯ ГЕНА SCN9A ИЛИ SCN10A И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**(31) **62/833,523**

(72) Изобретатель:

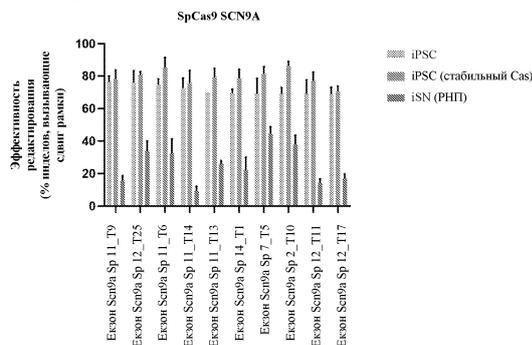
(32) **2019.04.12****Саайман Шина, Кахалан Стюарт, Йен Анджела, Эспанола София, Спенсер Сара Джин (US)**(33) **US**(86) **PCT/US2020/027690**(87) **WO 2020/210640 2020.10.15**

(74) Представитель:

(71) Заявитель:

**ВЕРТЕКС ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ  
ИНКОРПОРЕЙТЕД (US)****Медведев В.Н. (RU)**

(57) В изобретении раскрыты высокоэффективные системы редактирования генов для редактирования гена натриевого потенциалзависимого канала, такого как ген альфа-субъединицы 9 натриевого потенциалзависимого канала (SCN9A) или альфа-субъединицы 10 натриевого потенциалзависимого канала (SCN10A), как *in vitro*, так и *in vivo*. Системы редактирования генов, раскрытые в данном документе, содержат РНК-направленную ДНК-эндонуклеазу и специфические направляющие РНК. Также в данном документе предложены варианты применения систем редактирования генов для модификации целевого гена, обеспечивающие облегчение боли.

**A1****202192806****202192806****A1**

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-571383EA/019

### СИСТЕМЫ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОВ ДЛЯ МОДИФИЦИРОВАНИЯ ГЕНА SCN9A ИЛИ SCN10A И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

#### ПЕРЕКРЕСТНЫЕ ССЫЛКИ НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Данная заявка заявляет приоритет согласно § 119(e) 35 U.S.C. по предварительной заявке США № 62/833523, поданной 12 апреля 2019 г., полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки.

#### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Редактирование генов (включая геномное редактирование) - это вид генной инженерии, при котором нуклеотид(ы)/нуклеиновая кислота(ы) вставляются, удаляются и/или заменяются в последовательности ДНК, например, в геноме клетки-мишени. Последние стратегии редактирования генов, использующие РНК-направленные эндонуклеазы, такие как Cas9, позволяют осуществлять сайт-специфическую модификацию ДНК; однако было обнаружено, что не все РНК-направленных эндонуклеазы, пары направляющих РНК редактируют с высокой эффективностью. Поэтому по-прежнему существует острая необходимость в определении эффективных пар РНК-направленных эндонуклеаз и направляющих РНК, которые эффективно модифицируют интересующий ген.

#### СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Данное изобретение основано, по меньшей мере частично, на разработке эффективных систем редактирования генов для модификации гена альфа-субъединицы 9 натриевого потенциалзависимого канала (SCN9A) или альфа-субъединицы 10 натриевого потенциалзависимого канала (SCN10A). В некоторых вариантах осуществления система редактирования генов основана на определении пар эффективных РНК-направляющих эндонуклеаз и направляющих РНК (например, раскрытых в данном документе) для эффективной модификации гена натриевого потенциалзависимого канала с низкой внецелевой встречаемостью.

Таким образом, в некоторых аспектах данное изобретение относится к системам редактирования генов для модификации гена натриевого потенциалзависимого канала, такого как SCN9A или SCN10A. Такая система редактирования генов может включать: (a) первый полинуклеотидный фрагмент, который содержит первую нуклеотидную последовательность, кодирующую РНК-направленную ДНК-эндонуклеазу, или РНК-направленную ДНК-эндонуклеазу; и (b) второй полинуклеотидный фрагмент, который содержит вторую нуклеотидную последовательность, кодирующую направляющую РНК (нРНК).

В некоторых вариантах осуществления система редактирования генов может модифицировать ген SCN9A и включать: (a) первый полинуклеотидный фрагмент, который содержит первую нуклеотидную последовательность, кодирующую РНК-направленную ДНК-эндонуклеазу, или РНК-направленную ДНК-эндонуклеазу; и (b)

второй полинуклеотидный фрагмент, который содержит вторую нуклеотидную последовательность, кодирующую направляющую РНК (нРНК), причем нРНК содержит нуклеотидную последовательность любой из SEQ ID NO: 1-20. Полинуклеотидный фрагмент, используемый в данном документе, может представлять собой независимую молекулу нуклеиновой кислоты. Альтернативно, полинуклеотидный фрагмент может быть частью молекулы нуклеиновой кислоты, которая может содержать один или более дополнительных полинуклеотидных фрагментов.

РНК-направленная эндонуклеаза такой системы редактирования генов может быть Cas9 *Staphylococcus pyogenes* (SpCas9), которая может быть сопряжена с нРНК, содержащей нуклеотидную последовательность любого из следующих элементов SEQ ID NO: 1-10. Альтернативно или дополнительно, РНК-направленная эндонуклеаза такой системы редактирования генов может быть Cas9 *Staphylococcus aureus* (SaCas9), которая может быть сопряжена с нРНК, включающей нуклеотидную последовательность любого из следующих элементов SEQ ID NO: 11-20.

В некоторых вариантах осуществления система редактирования генов может модифицировать ген SCN10A и включать: (а) первый полинуклеотидный фрагмент, который содержит первую нуклеотидную последовательность, кодирующую РНК-направленную ДНК-эндонуклеазу, или РНК-направленную ДНК-эндонуклеазу; и (b) второй полинуклеотидный фрагмент, который содержит вторую нуклеотидную последовательность, кодирующую направляющую РНК (нРНК), причем нРНК содержит нуклеотидную последовательность любой из SEQ ID NO: 21-40. РНК-направленная эндонуклеаза такой системы редактирования генов может быть Cas9 *Staphylococcus pyogenes* (SpCas9), которая может быть сопряжена с нРНК, содержащей нуклеотидную последовательность любого из следующих элементов SEQ ID NO: 21-30. Альтернативно или дополнительно РНК-направленная эндонуклеаза такой системы редактирования генов может быть SaCas9, которая может быть сопряжена с нРНК, включающей нуклеотидную последовательность любого из следующих элементов SEQ ID NO: 31-40.

В некоторых вариантах осуществления первая нуклеотидная последовательность, кодирующая РНК-направленную ДНК-эндонуклеазу из (а) может дополнительно содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую сигнал ядерной локализации (NLS), который слит в рамке с РНК-направленной ДНК-эндонуклеазой. В некоторых вариантах осуществления NLS представляет собой NLS SV40.

В некоторых вариантах осуществления вторая нуклеотидная последовательность в (b) может дополнительно содержать каркасную последовательность. В некоторых примерах каркасная последовательность может быть распознаваемой SaCas9. Такая каркасная последовательность может включать нуклеотидную последовательность GUUUUAGUACUCUGGAAACAGAAUCUACUAAAACAAGGCAAAAUGCCGUGUUUA UCUCGUCAACUUGUUGGCGAGAUUUU (SEQ ID NO: 41). В других примерах каркасная последовательность может быть распознаваемой SpCas9. Следует понимать, что поскольку вторая нуклеотидная последовательность, кодирующая нРНК, может быть как

последовательностью ДНК, так и последовательностью РНК, любой из урацилов (U) в этой последовательности может быть заменен на тимин (T).

В некоторых вариантах осуществления первый полинуклеотидный фрагмент (a) и второй полинуклеотидный фрагмент (b) представляют собой различные полинуклеотиды, по меньшей мере один из которых может быть вектором. Вектор может быть вирусным вектором, например, аденоассоциированным вирусным вектором (AAV). В некоторых вариантах осуществления первый полинуклеотидный фрагмент (a) и второй полинуклеотидный фрагмент (b) представляют собой различные векторы AAV.

В некоторых вариантах осуществления единичный полинуклеотид содержит первый полинуклеотидный фрагмент из (a) и второй полинуклеотидный фрагмент из (b). Единичный полинуклеотид может представлять собой вектор, который может быть вирусным вектором, например, вектором AAV. В некоторых вариантах осуществления AAV представляет собой AAV1.

Также в объем данного изобретения входят нуклеиновые кислоты и вирусные частицы или наборы вирусных частиц, которые в совокупности составляют любую из систем редактирования генов, раскрытых в данном документе. В некоторых вариантах осуществления вирусная частица или набор вирусных частиц представляет собой частицу(ы) AAV.

В других аспектах, изобретение относится к способам редактирования гена потенциалзависимого натриевого канала, такого как SCN9A или SCN10A, способ включает приведение в контакт клетки с: (i) любой из систем редактирования генов, раскрытых в данном документе; (ii) нуклеиновой кислотой, содержащей систему редактирования генов; или (iii) вирусной частицей или набором вирусных частиц, которые в совокупности составляют систему редактирования генов.

В некоторых вариантах осуществления стадию приведения в контакт осуществляют путем введения системы редактирования генов из (a), нуклеиновой кислоты из (b) или вирусной частицы (частиц) из (c) нуждающемуся в этом субъекту. В некоторых вариантах осуществления указанный субъект представляет собой пациента-человека, страдающего болью.

В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой аутологическую клетку. Альтернативно клетка может быть гетерологичной клеткой. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой стволовую клетку, например, клетку iPSC или мезенхимальную стволовую клетку. В некоторых примерах способ может дополнительно включать введение клетки с отредактированным геном субъекту, нуждающемуся в этом (например, пациенту, страдающему от боли).

Также в объем данного изобретения входит применение любой из описанных в данном документе систем редактирования генов или их компонентов для лечения боли, а также их применение для производства лекарственного препарата для предполагаемого лечения.

Подробности одного или более вариантов осуществления изобретения изложены в

описании ниже. Другие признаки или преимущества настоящего изобретения будут очевидны из подробного описания нескольких вариантов осуществления, а также из приложенной формулы изобретения.

### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ**

Следующие графические материалы составляют часть настоящего описания и включены для дополнительной демонстрации определенных аспектов настоящего изобретения, которые можно лучше понять, обратившись к одному или более из этих графических материалов в сочетании с подробным описанием конкретных вариантов осуществления, представленных в данном документе. Следует понимать, что данные, показанные на графических материалах, никоим образом не ограничивают объем данного изобретения.

На **фиг. 1A-1D** изображена эффективность редактирования мишеней 40 приоритетных нРНК в различных клеточных моделях. Приоритетные нРНК включают (фиг. 1A) десять нРНК для нацеливания на SpCas9 SCN9A, (фиг. 1B) десять нРНК для нацеливания на SpCas9 SCN10A, (фиг. 1C) десять нРНК для нацеливания на SaCas9 SCN9A и (фиг. 1D) десять нРНК для нацеливания на SaCas9 SCN10A. Эти нРНК были скринированы на iPSC, iPSC, стабильно экспрессирующих Cas9, и iPSC-произведенных сенсорных нейронах. Значения представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение.

### **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Редактирование генов (включая геномное редактирование) - это вид генной инженерии, при котором нуклеотид(ы)/нуклеиновая кислота(ы) вставляются, удаляются и/или заменяются в последовательности ДНК, например, в геноме клетки-мишени. Целевое редактирование генов позволяет осуществлять вставку, удаление и/или замену в заранее выбранных местах в геноме клетки-мишени (например, в целевом гене или целевой последовательности ДНК). Когда последовательность эндогенного гена редактируется, например, путем делеции, вставки или замены нуклеотида(ов)/нуклеиновой кислоты, эндогенный ген, включающий затронутую последовательность, может быть нокаутирован или «отключен» вследствие изменения последовательности. Поэтому для нарушения экспрессии эндогенных генов можно использовать направленное редактирование. Альтернативно или дополнительно, желаемая нуклеиновая кислота может быть вставлена в целевой сайт в последовательности ДНК (например, в эндогенный ген), что известно как целевая интеграция. «Направленная интеграция» означает процесс, включающий вставку одной или более экзогенных последовательностей с удалением или без удаления эндогенной последовательности в месте вставки. Направленная интеграция может быть результатом направленного редактирования генов при наличии донорского шаблона, содержащего экзогенную последовательность.

Данное изобретение основано, по меньшей мере частично, на разработке эффективных систем редактирования генов для модификации гена альфа-субъединицы 9

натриевого потенциалзависимого канала (SCN9A) или альфа-субъединицы 10 натриевого потенциалзависимого канала (SCN10A). Натриевые каналы - это интегральные мембранные белки, которые образуют ионные каналы через мембрану клетки. Потенциалзависимые натриевые каналы - это натриевые каналы, которые «открываются» (т.е. пропускают поток ионов натрия через канал) в ответ на изменение напряжения. Альфа-субъединица натриевого канала образует ядро канала и функционирует сама по себе (т.е. в отсутствие соответствующих бета-субъединиц или других вспомогательных белков). Семейство натриевых потенциалзависимых каналов состоит из девяти членов. Альфа-субъединицами этих каналов представляет собой  $Na_v1.1$ ,  $Na_v1.2$ ,  $Na_v1.3$ ,  $Na_v1.4$ ,  $Na_v1.5$ ,  $Na_v1.6$ ,  $Na_v1.7$ ,  $Na_v1.8$  и  $Na_v1.9$ , кодируемая SCN1A, SCN2A, SCN3A, SCN4A, SCN5A, SCN8A, SCN9A, SCN10A и SCN11A, соответственно.

$Na_v1.7$  (кодируемая SCN9A) экспрессируется, например, в дорсальном корешковом ганглии, тройничном ганглии и нейронах симпатического ганглия.  $Na_v1.8$  (кодируемая SCN10A) экспрессируется, например, в дорсальном корешковом ганглии, в немиелинизированных сенсорных нейронах малого диаметра, называемых С-волоками. Как  $Na_v1.7$ , так и  $Na_v1.8$  участвуют в ноцицепции (т.е. сенсорном механизме, который обеспечивает сигналы, приводящие к ощущению боли).

Редактирование гена SCN9A и/или SCN10A с помощью любого из описанных в данном документе способом может быть использовано для лечения, профилактики и/или облегчения симптомов заболеваний и расстройств, таких как, без ограничения, врожденная нечувствительность к боли, anosmia, гипотетическая личность, пограничное расстройство личности, злокачественное новообразование молочной железы, немелкоклеточная карцинома легкого, непереносимость холода, лихорадочные судороги, диабет, сахарный диабет, диссоциативное расстройство, эпилепсия, эритромелалгия, первичная эритермия, лицевая боль, инфекции семейства Herpesviridae, наследственная сенсорная автономная нейропатия типа 5, гиперплазия, невралгия, наследственные сенсорные и вегетативные нейропатии, дегенеративный полиартрит, боль, боль в конечности, послеоперационная боль, болезнь Паркинсона, постгерпетическая невралгия, простатические новообразования, зуд, судороги, соматоформное расстройство, расстройство, связанное с употреблением табака, тригеминальная невралгия, синовиальная киста, хроническая боль, острая приступообразная боль, Paramyotonia Congenita (расстройство), недомогание, сенсорный дискомфорт, жгучая боль, нечувствительность к боли, воспалительная боль, механическая боль, боль в коже головы, наследственная моторная и сенсорная нейропатия II типа, распространенная мигрень, отсутствие болевых ощущений, злокачественное новообразование предстательной железы, болевое расстройство, остеоартрит коленного сустава, нейропатия, комплексные региональные болевые синдромы, тонико-клонические судороги, наследственные невропатии, карцинома предстательной железы, карцинома молочной железы, инфантильная тяжелая миоклоническая эпилепсия, миксоидная киста, каналопатия, пароксизмальное экстремальное болевое расстройство, болезненная нейропатия,

компрессионные нейропатии, врожденное невосприимчивость к боли аутосомно-рецессивная форма, генерализованная эпилепсия с фебрильными припадками плюс тип 2, генерализованная эпилепсия с фебрильными судорогами плюс 7, фебрильные судороги семейные 3В и нейропатия мелких волокон (у взрослых называется нейропатией мелких волокон).

Известно, что мутации в гене SCN9A вызывают расстройства восприятия боли, включая первичную эритермиалгию, пароксизмальное экстремальное болевое расстройство, врожденную нечувствительность к боли и нейропатию мелких волокон. Мутации усиления функции в гене SCN9A приводят к спонтанной боли, наблюдаемой при первичной эритермиалгии и пароксизмальном экстремальном болевом расстройстве. Таким образом, нокаут или нокдаун гена SCN9A у пациентов с первичной эритермиалгией или пароксизмальным болевым расстройством может быть использован для лечения, профилактики и/или облегчения связанных с ними симптомов.

Первичная эритромелалгия - редкое аутосомно-доминантное заболевание, характеризующееся приступами жгучей боли в стопах и кистях в ответ на тепло и движение. У больных людей признаки и симптомы обычно появляются в раннем детстве, хотя в более легких случаях симптомы могут проявляться и в более позднем возрасте. Лечение этого состояния в основном симптоматическое. Помимо избегания провоцирующих боль факторов (таких как тепло, физические нагрузки и алкоголь), варианты лечения включают охлаждение и повышение высоты конечности, использование анестетиков, таких как лидокаин и мексилитин, а также применение опиоидных препаратов в крайних случаях.

Пароксизмальное экстремальное болевое расстройство - еще одно редкое заболевание, характеризующееся сильными эпизодическими болями в ректальной, глазной и нижнечелюстной областях, а также покраснением кожи. Симптомы этого состояния часто начинаются в неонатальный период или в раннем детстве и могут сохраняться на протяжении всей жизни. Агенты для лечения хронических нейропатических болевых расстройств часто используются для облегчения эпизодов боли, вызванных заболеванием. Карбамазепин, блокатор натриевых каналов, оказался наиболее эффективным из этих методов лечения.

Известно, что мутации в гене SCN10A также вызывают нарушения восприятия боли, включая семейный эпизодический болевой синдром типа 2 и нейропатию мелких волокон. Таким образом, нокаут или нокдаун гена SCN10A у пациентов с семейным эпизодическим болевым синдромом типа 2 или нейропатией мелких волокон может быть использован для лечения, профилактики и/или смягчения соответствующих симптомов.

Семейный эпизодический болевой синдром типа 2 - редкое аутосомно-доминантное неврологическое заболевание, характеризующееся появлением во взрослом возрасте пароксизмальных болей в области стоп. Приступы обычно провоцируются жарой, холодом, химическими веществами и определенными поверхностями. У пациентов также может развиться повышенная чувствительность к прикосновениям и повышенная

реакция на болевые стимулы. В настоящее время лечения этого заболевания не существует. Доказано, что тепло облегчает приступы боли.

Нейропатия мелких волокон - это состояние, характеризующееся сильными болевыми приступами и нечувствительностью к боли. Приступы боли обычно описываются как онемение, колющая боль или жжение, или аномальные кожные ощущения, такие как покалывание или зуд. В настоящее время не существует лекарства от периферической невропатии мелких волокон. Варианты лечения включают внутривенный иммуноглобулин (IVIg) и плазмаферез.

Как описано в данном документе, частота инделов и паттерны инделов были определены для систем редактирования генов, состоящих из пар РНК-направляющих эндонуклеаз (например, SpCas9 или SaCas9) и специфических направляющих РНК. Системы редактирования генов, описанные в данном документе, основаны на определении конкретных пар эффективных РНК-направляющих эндонуклеаз и пар направляющих РНК (например, раскрытых в данном документе), которые способствуют эффективной модификации гена потенциалзависимого натриевого канала, такого как SCN9A или SCN10A, с низким уровнем внецелевой встречаемости.

Соответственно, в данном документе предложены системы редактирования генов для эффективной модификации генов потенциалзависимых натриевых каналов и их применение. Компоненты систем редактирования генов и генетически модифицированные клетки, полученные в результате применения систем редактирования генов, также входят в объем данного изобретения.

#### **I. Системы редактирования генов для генетической модификации гена потенциалзависимого натриевого канала**

В некоторых аспектах в данное изобретение относится к системе редактирования генов для модификации гена, такого как альфа-субъединицы 9 натриевого потенциалзависимого канала (SCN9A) или альфа-субъединицы 10 натриевого потенциалзависимого канала (SCN10A). «Система редактирования генов» означает комбинацию компонентов для редактирования целевого гена (например, SCN9A или SCN10A), или один или более агентов для продуцирования таких компонентов. Например, система редактирования генов может включать: (a) нуклеазу или агент для ее получения (например, нуклеиновую кислоту, кодирующую нуклеазу); и/или (b) направляющую РНК (нРНК) или агент для ее получения (например, вектор, способный экспрессировать нРНК).

Системы редактирования генов, описанные в данном документе, могут проявлять одно или более преимуществ при модификации генов потенциалзависимого натриевого канала, таких как SCN9A или SCN10A. Например, можно добиться высокой частоты редактирования генов, например, частоты инделов, вызывающих сдвиг рамки считывания (например, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 21%, по меньшей мере 22%, по меньшей мере 23%, по меньшей мере 24%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35% или по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере

мере 70%, или по меньшей мере 75% оцениваемые методами, описанными в данном документе или известными в данной области) или такие, как общая частота инделов (например, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 21%, по меньшей мере 22%, по меньшей мере 23%, по меньшей мере 24%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, или по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, или по меньшей мере 85% по оценке методами, описанными в данном документе или известными в данной области техники). Кроме того, клетки, отредактированные системой редактирования генов, раскрытой в данном документе, могут иметь высокую выживаемость (например, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%) по сравнению с неотредактированным контролем.

В одном иллюстративном варианте осуществления система редактирования генов, описанная в данном документе, может включать: (а) эндонуклеазу (например, РНК-направленную ДНК-эндонуклеазу) или агент, продуцирующий ее (например, полинуклеотид, кодирующий эндонуклеазу); и (b) нРНК или агент, продуцирующий ее (например, вектор для экспрессии нРНК). Более того, любая из описанных в данном документе систем редактирования генов может дополнительно включать полинуклеотидную последовательность, кодирующую донорный шаблон. В некоторых примерах система редактирования генов, описанная в данном документе, включает эндонуклеазу, нРНК и, по желанию, донорный шаблон. Такая система редактирования генов может включать один полинуклеотид, который обеспечивает донорный шаблон и продуцирует нРНК. Альтернативно, система редактирования генов может включать донорный шаблон и отдельную нуклеиновую кислоту, которая может быть нРНК как таковой или полинуклеотидом, который продуцирует нРНК. В других примерах система редактирования генов может включать один или более полинуклеотидов, которые совместно продуцируют эндонуклеазу, нРНК и, необязательно, донорный шаблон. В некоторых примерах система редактирования генов может включать полинуклеотид, содержащий первую полинуклеотидную последовательность, кодирующую эндонуклеазу, и вторую полинуклеотидную последовательность, кодирующую нРНК. Альтернативно, система редактирования генов может включать два полинуклеотида: первый, включающий первую полинуклеотидную последовательность, кодирующую эндонуклеазу, и второй, включающий вторую полинуклеотидную последовательность, кодирующую нРНК.

#### *РНК-направленные эндонуклеазы*

РНК-направленные эндонуклеазы - это ферменты, которые используют сопряжение оснований РНК:ДНК для нацеливания и расщепления полинуклеотида. РНК-направленная эндонуклеаза может расщеплять одноцепочечные полинуклеиновые кислоты или по

меньшей мере одну нить двухцепочечного полинуклеотида. Система редактирования генов может включать одну РНК-направленную эндонуклеазу. Альтернативно, система редактирования генов может включать по меньшей мере две (например, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или более десяти) РНК-направленных эндонуклеаз.

Система CRISPR-Cas9 представляет собой естественный защитный механизм прокариот, который был перепрофилирован в РНК-направленную ДНК-нацеленную платформу, используемую для редактирования генов. Она использует ДНК-нуклеазу Cas9 и две некодирующие РНК - crgRNA (cgRNA) и транс-активирующую РНК (tracrRNA) - для направленного расщепления ДНК. cgRNA управляет распознаванием последовательности и специфичностью комплекса CRISPR-Cas9 посредством сопряжения оснований по Уотсону-Крику, обычно с 20-нуклеотидной (нт) последовательностью в целевой ДНК. Изменение последовательности 5' 20 нт в cgRNA позволяет нацелить комплекс CRISPR-Cas9 на конкретные локусы. Комплекс CRISPR-Cas9 связывает последовательности ДНК, которые содержат последовательность, совпадающую с первыми 20 нт кРНК, только если за целевой последовательностью следует специфический короткий мотив ДНК (с последовательностью NGG), называемый протоспейсерным смежным мотивом (PAM). TracrRNA гибридизуется с 3' концом кРНК, образуя РНК-дуплексную структуру, которая связывается эндонуклеазой Cas9 с образованием каталитически активного комплекса CRISPR-Cas9, который затем может расщеплять целевую ДНК.

Как только комплекс CRISPR-Cas9 связывается с ДНК в целевом сайте, два независимых нуклеазных домена фермента Cas9 расщепляют одну из цепей ДНК выше сайта PAM, оставляя двухцепочечный разрыв (DSB), где обе цепи ДНК заканчиваются парой оснований (тупой конец).

Система редактирования генов может включать эндонуклеазу CRISPR (например, CRISPR-ассоциированный белок 9 или нуклеазу Cas9). В некоторых вариантах осуществления эндонуклеаза относится к группе *Streptococcus aureus* (например, saCas9) или *Streptococcus pyogenes* (например, spCas9), хотя могут быть использованы и другие гомологи CRISPR. Следует понимать, что Cas9 может быть заменен другой РНК-направленной эндонуклеазой, известной в данной области, такой как Cpf1. Наконец, следует понимать, что может быть использована РНК-направленная эндонуклеаза дикого типа или могут быть использованы модифицированные версии (например, эволюционировавшие версии Cas9, ортологи Cas9, химерные/смешанные белки Cas9 или другие функциональные варианты Cas9). Например, в некоторых вариантах осуществления РНК-направленная эндонуклеаза, модифицирована таким образом, что включает сигнал ядерной локализации (NLS), такой как SV40 NLS или NLS нуклеоплазмина. Примеры других сигналов ядерной локализации известны специалистам в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления NLS включает NLS SV40 и NLS нуклеоплазмина.

### *В. Направляющая РНК*

Настоящее изобретение предоставляет геномно-направленную нуклеиновую кислоту или средство для ее получения (например, полинуклеотид, включающий нуклеотидную последовательность, кодирующую нРНК), которая может направлять активность связанного полипептида (например, РНК-направленной эндонуклеазы) на конкретную целевую последовательность в целевой нуклеиновой кислоте. Нуклеиновая кислота, нацеленная на геном, может быть РНК. РНК, нацеленная на геном, в данном документе называется «направляющая РНК» или «нРНК». В некоторых вариантах осуществления, система редактирования генов включает одну нРНК. В других вариантах осуществления система редактирования генов включает по меньшей мере две нРНК (например, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или более десяти нРНК).

нРНК системы редактирования генов может быть предоставлена в синтезированной форме. Например, направляющая РНК может быть синтезирована химическим путем, как показано ниже и описано в данной области техники. Хотя химические синтетические процедуры постоянно расширяются, очистка таких РНК с помощью таких процедур, как высокоэффективная жидкостная хроматография (которая позволяет избежать использования гелей, таких как ПААГ), становится все более сложной, поскольку длина полинуклеотидов значительно превышает сотню или около того нуклеотидов. Один из подходов, используемых для создания РНК большей длины, заключается в получении двух или более молекул, которые соединяются вместе. Более длинные РНК легче образуются ферментативным путем. Во время или после химического синтеза и/или ферментативного получения РНК могут быть введены различные виды модификаций РНК, например, модификации, которые повышают стабильность, снижают вероятность или степень врожденного иммунного ответа, и/или улучшают другие свойства, как описано в данной области техники.

Альтернативно, система редактирования генов может включать агент для продуцирования нРНК. Например, система редактирования генов может включать нуклеотидную последовательность, кодирующую нуклеотидную последовательность нРНК, и дополнительную нуклеотидную последовательность, облегчающую экспрессию/продуцирование нРНК.

нРНК может представлять собой двухмолекулярную направляющую РНК. Двухмолекулярная нРНК состоит из двух цепей РНК. Первая цепь может содержать в направлении 5' - 3' необязательную последовательность удлинения спейсера, последовательность спейсера и последовательность спейсхолда, содержащую минимальную последовательность повтора CRISPR. Вторая цепь содержит минимальную последовательность *tracrP*НК (комплементарную минимальной последовательности повтора CRISPR), последовательность 3' *tracrP*НК и необязательную последовательность расширения *tracrP*НК.

Альтернативно, нРНК может быть одномолекулярной направляющей РНК

(онРНК), состоящей из спейсерной последовательности и каркасной последовательности. Каркасная последовательность может содержать последовательность *tracrPНК*, описанную в данном документе. онРНК (например, в системе типа II) может содержать в направлении от 5' к 3' необязательную последовательность удлинения спейсера, последовательность спейсера, минимальную последовательность повтора CRISPR, одномолекулярный направляющий линкер, минимальную последовательность *tracrPНК*, последовательность 3' *tracrPНК* и необязательную последовательность удлинения *tracrPНК*. Необязательное расширение *tracrPНК* может включать элементы, которые придают направляющей РНК дополнительную функциональность (например, стабильность). Одномолекулярный направляющий линкер соединяет минимальный повтор CRISPR и минимальную последовательность *tracrPНК*, образуя шпильчатую структуру. Необязательное расширение *tracrPНК* содержит одну или более шпилек. Альтернативно, онРНК (например, в системе типа V) может содержать, в направлении от 5' к 3', минимальную последовательность повтора CRISPR и спейсерную последовательность.

Одномолекулярная нРНК может не содержать урацил на 3' конце последовательности нРНК. Альтернативно, нРНК может содержать один или более урацилов на 3' конце последовательности нРНК. Например, нРНК может содержать 1 урацил (U) на 3' конце последовательности нРНК. нРНК может содержать 2 урацила (UU) на 3' конце последовательности нРНК. нРНК может содержать 3 урацила (UUU) на 3' конце последовательности нРНК. нРНК может содержать 4 урацила (UUUU) на 3' конце последовательности нРНК. нРНК может содержать 5 урацила (UUUUU) на 3' конце последовательности нРНК. нРНК может содержать 6 урацила (UUUUUU) на 3' конце последовательности нРНК. нРНК может содержать 7 урацилов (UUUUUUU) на 3' конце последовательности нРНК. нРНК может содержать 8 урацилов (UUUUUUUU) на 3' конце последовательности нРНК.

Далее следует понимать, что нуклеотиды описанных выше нРНК могут содержать модифицированные нуклеиновые кислоты в любом положении нуклеотида. Соответственно, нРНК может быть немодифицированной или модифицированной. Например, модифицированные нРНК могут содержать один или более 2'-О-метилфосфотиоатных нуклеотидов. Примеры дополнительных модифицированных нуклеиновых кислот известны специалистам в данной области техники. См., например, WO2018007976 и WO2018007980, соответствующие раскрытия каждой из которых включены в данный документ посредством ссылки для целей и/или предмета, упомянутых в данном документе.

*(i) Спейсер нРНК*

Как понятно специалисту в данной области техники, каждая нРНК предназначена для включения спейсерной последовательности, комплементарной ее геномной последовательности-мишени. См Jinek et al., Science, 337, 816-821 (2012) и Deltcheva et al., Nature, 471, 602-607 (2011). Спейсерная последовательность - это нуклеотидная последовательность, определяющая целевую последовательность (например, целевую

последовательность ДНК, такую как геномная целевая последовательность) интересующей целевой нуклеиновой кислоты. В состав нРНК может входить спейсерная последовательность переменной длины с 17-30 нуклеотидами на 5' конце последовательности нРНК. В некоторых вариантах осуществления последовательность спейсера составляет от 15 до 30 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления последовательность спейсера составляет 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления последовательность спейсера составляет 20 нуклеотидов.

«Целевая последовательность» примыкает к последовательности PAM и является последовательностью, модифицированной РНК-направленной нуклеазой (например, Cas9). «Целевая нуклеиновая кислота» представляет собой двухцепочечную молекулу: Одна цепь содержит целевую последовательность и называется «PAM-цепь», а другая комплементарная цепь называется «не-PAM-цепь». Специалисты в данной области техники понимают, что спейсерная последовательность нРНК гибридизуется с обратным комплементом целевой последовательности, которая находится в не-PAM цепи интересующей целевой нуклеиновой кислоты. Таким образом, спейсерная последовательность нРНК является РНК-эквивалентом последовательности-мишени. Например, если целевая последовательность представляет собой 5'-AGAGCAACAGTGCTGTGGCC-3' (SEQ ID NO: 498), тогда спейсерная последовательность нРНК представляет собой 5'-AGAGCAACAGUGCUGUGGCC-3' (SEQ ID NO: 499). Спейсер нРНК взаимодействует с интересующей целевой нуклеиновой кислотой специфическим для последовательности образом посредством гибридизации (т.е. сопряжения оснований). Таким образом, нуклеотидная последовательность спейсера варьирует в зависимости от последовательности интересующей целевой нуклеиновой кислоты.

Последовательность спейсера предназначена для гибридизации с участком целевой нуклеиновой кислоты, который расположен 5' от PAM фермента Cas9, используемого в системе. Спейсер может полностью совпадать с целевой последовательностью или иметь несовпадения. Каждый фермент Cas9 имеет определенную последовательность PAM, которую он распознает в целевой ДНК. Например, Cas9 *S. pyogenes* распознает в целевой нуклеиновой кислоте PAM, который содержит последовательность 5'-NRG-3', где R содержит A или G, где N представляет собой любой нуклеотид, и N находится непосредственно на 3' последовательности целевой нуклеиновой кислоты, на которую нацелена спейсерная последовательность. Каноничный PAM для Cas9 *S. pyogenes* представляет собой 5'-NGG-3', но как указано в предыдущем предложении, Cas9 *S. pyogenes* также может распознать неканонические PAM 5'-NAG-3'. Аналогично, для *S. aureus* Cas9, PAM содержит последовательность 5'-NNGRRT-3'.

В некоторых вариантах осуществления последовательность целевой нуклеиновой кислоты содержит 20-22 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления целевая нуклеиновая кислота содержит менее 20 нуклеотидов. В некоторых вариантах

осуществления целевая нуклеиновая кислота содержит более 20 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления целевая нуклеиновая кислота содержит по меньшей мере: 5, 10, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30 или более нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления целевая нуклеиновая кислота содержит не более: 5, 10, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30 или более нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления последовательность целевой нуклеиновой кислоты содержит 20-22 оснований непосредственно 5' от первого нуклеотида PAM. Например, в последовательности, содержащей 5'-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNRG-3' (SEQ ID NO: 489) или 5'-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGRRT-3' (SEQ ID NO: 490), целевая нуклеиновая кислота содержит последовательность, соответствующую Ns без подчеркивания, где N является любым нуклеотидом, а подчеркнутая последовательность NRG и NNGRRT является последовательностью PAM *S. pyogenes* и PAM *S. aureus*, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления, нРНК, используемая в данном документе, может содержать спейсерную последовательность из 20 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления такая нРНК используется с SpCas9. В других вариантах осуществления, нРНК, используемая в данном документе, может содержать спейсерную последовательность из 22 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления такая нРНК используется с SaCas9.

В некоторых вариантах осуществления, нРНК, используемая в данном документе, может содержать спейсерную последовательность, приведенную в таблицах 1-4. В некоторых примерах нРНК, используемая в данном документе, может содержать спейсерную последовательность, приведенную в таблице 1, в сочетании с SpCas9 для редактирования SCN9A. В некоторых примерах нРНК, используемая в данном документе, может содержать спейсерную последовательность, приведенную в таблице 2, в сочетании с SaCas9 для редактирования SCN9A. В некоторых примерах нРНК, используемая в данном документе, может содержать спейсерную последовательность, приведенную в таблице 3, в сочетании с SpCas9 для редактирования SCN10A. В некоторых примерах нРНК, используемая в данном документе, может содержать спейсерную последовательность, приведенную в таблице 4, в сочетании с SaCas9 для редактирования SCN10A. Любая из этих нРНК может содержать спейсерную последовательность, указанную в любой из таблиц 1 и 3 (в комбинации с ферментом SpCas9) с более чем 40% (например, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80% или более) средним общим процентом инделов и/или с более чем 40% (например, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% или более) средним процентом инделов, вызывающим сдвиг рамки считывания. Альтернативно, любая из этих нРНК может содержать спейсерную последовательность, указанную в любой из таблиц 2 и 4 (в комбинации с ферментом SaCas9) с более чем 15% (например, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55% или более) средним общим процентом инделов и/или с более чем 15% (например, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45% или более) средним процентом инделов, вызывающим сдвиг рамки считывания.

Иллюстративные нРНК могут содержать одну из следующих спейсерных последовательностей:

CAAUUUGGGUGGUACCUGAU (SEQ ID NO: 1);  
GCUUCGCCUUGCAGAAAACA (SEQ ID NO: 2);  
GCCUAUGCCCUUCGACACCA (SEQ ID NO: 3);  
AUAGGCGAGCACAUGAAAAG (SEQ ID NO: 4);  
CGGCUGAAUUAACAAGUAUU (SEQ ID NO: 5);  
GGAACACCACCCAAUGACUG (SEQ ID NO: 6);  
CAGGCCUGAAGACAAUUGUA (SEQ ID NO: 7);  
GGAAUGUCCCCAUAGAUGAA (SEQ ID NO: 8);  
CCACCAAUGCUGCCGGUGAA (SEQ ID NO: 9);  
CAGUCACCACUCAGCAUUCG (SEQ ID NO: 10);  
AAGCAGAAUUAUGGGCCUCUCA (SEQ ID NO: 11);  
GCCUUGCAGAAAACAAGGAGCC (SEQ ID NO: 12);  
ACGACAAAUAUCCAGCCAGUUC (SEQ ID NO: 13);  
CUGGGAAAACCUUUACCAACAG (SEQ ID NO: 14);  
UCCCAACCUCAGACAGAGAGCA (SEQ ID NO: 15);  
GAUGUUACUGCUGCGUCGUCC (SEQ ID NO: 16);  
CAUGAUCCUGACUGUGUUCUGU (SEQ ID NO: 17);  
CUCGUGUGUAGUCAGUGUCCAG (SEQ ID NO: 18);  
AAACUGAUUGCCAUGGAUCCA (SEQ ID NO: 19);  
AGAAAACAAGGAGCCACGAAUG (SEQ ID NO: 20);  
GCUCCCCGAUCAGUUCUGCU (SEQ ID NO: 21);  
UGUAGUCACCAUGGCGUAUG (SEQ ID NO: 22);  
GGAAGCUCCGCAGCACAGAC (SEQ ID NO: 23);  
UCCUUAACAACCAGCGCAGGA (SEQ ID NO: 24);  
ACUUCUGACCCCUUACUGUG (SEQ ID NO: 25);  
GAGCUCCAGCAGAACUGAU (SEQ ID NO: 26);  
CCGAGACAUCGACAGCUCCA (SEQ ID NO: 27);  
AUCCGUUCUACAGCACACAC (SEQ ID NO: 28);  
UCACGUACCUGAGAGAUCU (SEQ ID NO: 29);  
CGCAGGUGCUAGCAGCACUA (SEQ ID NO: 30);  
CCCUGGAGCUGUCGAUGUCUCG (SEQ ID NO: 31);  
UAGAUCCGUUCUACAGCACACA (SEQ ID NO: 32);  
AGUGAGAGGAAAGCCCAAGCAA (SEQ ID NO: 33);  
ACCUUUCGGGCCCAAAGGGCA (SEQ ID NO: 34);  
CUUUGACUGCAUCAUCGUCACU (SEQ ID NO: 35);  
CACUUCUUCUGGAAAUAAUAGU (SEQ ID NO: 36);  
AUUUUAGCGUCAUUACCCUGGC (SEQ ID NO: 37);  
ACAACUUCGGUCGCUUUACUC (SEQ ID NO: 38);

GCCGAGAUUAUCUCACUCCCUGA (SEQ ID NO: 39);

UGGUGUUCAUCUUCUCCAUGCC (SEQ ID NO: 40).

*(ii) Каркас нРНК*

В некоторых вариантах осуществления нРНК дополнительно содержит каркасную последовательность. Каркасная последовательность может содержать минимальную последовательность повтора CRISPR, одномолекулярный направляющий линкер, минимальную последовательность tracrPНК, последовательность 3' tracrPНК и/или необязательную последовательность расширения tracrPНК. Иллюстративные последовательности каркасов для различных белков CRISPR известны специалистам в данной области техники.

Выбор каркасной последовательности может зависеть от того, какая РНК-направленная ДНК-эндонуклеаза будет использоваться в системе редактирования генов, как используемая в данном документе, например, SaCas9 или SpCas9, что известно специалистам в данной области техники. Например, если необходимо использовать SpCas9, можно выбрать каркасную последовательность, распознаваемую SpCas9. Примеры каркасных последовательностей SpCas9 известны в данной области техники. См., например, Zhang et al., Plant Mol Biol. 2018; 96(4): 445-456; www.addgene.org. Одна иллюстративная каркасная последовательность в одномолекулярной направляющей РНК может состоять из нуклеотидной последовательности GTTTAAGAGCTATGCTGGAAACAGCATAGCAAGTTTAAATAAGGCTAGTCC GTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC (SEQ ID NO: 42)

В качестве альтернативы, если будет использоваться эндонуклеаза SaCas9, можно выбрать каркасную последовательность, распознаваемую SaCas9. Каркасная последовательность в одномолекулярной направляющей РНК для SaCas9 может включать последовательность нуклеиновой кислоты из GUUUUAGUACUCUGGAAACAGAAUCUACUAAA ACAAGGCAAAAUGCCGUGUUUAUCUCGUCAACUUGUUGGCGAGAUUUU (SEQ ID NO: 41). Одномолекулярная направляющая РНК может дополнительно включать необязательное спейсерное удлинение.

Следует понимать, что поскольку нуклеотидная последовательность, кодирующая нРНК, может быть как последовательностью ДНК, так и последовательностью РНК, любой из урацилов (U) в последовательностях, описывающих нРНК, может быть заменен на тимин (T). Аналогично, любой T (тимин) в последовательности, относящейся к нРНК, будет относиться к U (или урацилу) в контексте молекул РНК. Последовательности, содержащие T (тимин), охватывают как молекулы ДНК, так и молекулы РНК (где T относится к U).

*(iii) Примеры пар РНК-управляемая эндонуклеаза-нРНК*

В некоторых вариантах осуществления система редактирования генов основывается на идентификации эффективных РНК-направляющих эндонуклеаз, пар направляющих РНК (например, раскрытых в данном документе) для эффективной

модификации гена потенциалзависимого натриевого канала с низкой внецелевой встречаемостью.

Например, система редактирования генов для модификации гена альфа-субъединицы 9 потенциалзависимого натриевого канала (SCN9A) может включать *Staphylococcus pyogenes* (SpCas9) и нРНК, содержащую нуклеотидную последовательность любого из SEQ ID NO: 1-10. Альтернативно или дополнительно, система редактирования генов для модификации гена альфа-субъединицы 9 потенциалзависимого натриевого канала (SCN9A) может включать *Staphylococcus aureus* (SaCas9) и нРНК, содержащую нуклеотидную последовательность любого из SEQ ID NO: 11-20.

В другом примере, система редактирования генов для модификации гена альфа-субъединицы 10 потенциалзависимого натриевого канала (SCN10A) может включать SpCas9 и нРНК, содержащую нуклеотидную последовательность любого из SEQ ID NO: 21-30. Альтернативно или дополнительно, система редактирования генов для модификации гена альфа-субъединицы 10 потенциалзависимого натриевого канала (SCN10A) может включать SaCas9 и нРНК, содержащую нуклеотидную последовательность любого из SEQ ID NO: 31-40.

#### *(iv) Рибонуклеопротеиновые комплексы*

В некоторых случаях система редактирования генов, раскрытая в данном документе, может содержать рибонуклеопротеиновый комплекс (РНП), в котором нРНК и нуклеаза (например, как описано выше) образуют комплекс. Используемый в данном документе, термин «рибонуклеопротеин» или «РНП» относится к белку, который структурно связан с нуклеиновой кислотой (либо ДНК, либо РНК). Например, в некоторых вариантах осуществления РНК-направленная эндонуклеаза Cas9 и нРНК системы редактирования генов находятся в форме РНП.

#### *С. Донорный шаблон*

Донорный шаблон включает последовательность нуклеиновой кислоты, которая должна быть вставлена в целевой сайт в последовательности ДНК (например, в эндогенном гене). Донорный шаблон системы редактирования генов может быть предоставлена в синтезированной форме. Альтернативно, система редактирования генов может содержать агент (например, нуклеиновую кислоту, такую как вектор) для производства донорного шаблона. Например, система редактирования генов может содержать нуклеиновую кислоту (например, вектор) для продуцирования донорного шаблона.

Донорный шаблон может содержать один или более гомологичных рукавов для обеспечения эффективной гомологически зависимой рекомбинации (HDR) в интересующем геномном месте. Длина гомологичного плеча может варьировать. Например, гомологичное плечо может составлять по меньшей мере 50, по меньшей мере 100, по меньшей мере 150, по меньшей мере 200, по меньшей мере 250, по меньшей мере 300, по меньшей мере 350, по меньшей мере 400, по меньшей мере 450, по меньшей мере

500, по меньшей мере 550, по меньшей мере 600, по меньшей мере 650, по меньшей мере 700, по меньшей мере 750, по меньшей мере 800, по меньшей мере 850, по меньшей мере 900, по меньшей мере 950 или по меньшей мере 1000 нуклеотидов в длину. Аналогичным образом, гомологичное плечо может составлять 50-100, 50-200, 50-300, 50-400, 50-500, 50-600, 50-700, 50-800, 50-900, 50-1000, 100-200, 100-300, 100-400, 100-500, 100-600, 100-700, 100-800, 100-900, 100-1000, 200-300, 200-400, 200-500, 200-600, 200-700, 200-800, 200-900, 200-1000, 300-400, 300-500, 300-600, 300-700, 300-800, 300-900, 300-1000, 400-500, 400-600, 400-700, 400-800, 400-900, 400-1000, 500-600, 500-700, 500-800, 500-900, 500-1000, 600-700, 600-800, 600-900, 600-1000, 700-800, 700-900, 700-1000, 800-900, 800-1000 или 900-1000 нуклеотидов в длину. В частности, длина гомологичного плеча может составлять 500 нуклеотидов.

Например, в некоторых вариантах осуществления донорный шаблон содержит 5' гомологичное плечо (т.е. расположенное выше первой нуклеотидной последовательности) и 3' гомологичное плечо (т.е. расположенное ниже первой нуклеотидной последовательности), где 5' гомологичное плечо содержит последовательность нуклеиновой кислоты, которая гомологична участку выше интересующего геномного участка, и где 3' гомологичное плечо содержит последовательность нуклеиновой кислоты, которая гомологична участку ниже интересующего геномного участка.

В других вариантах осуществления донорный шаблон может содержать 5' гомологичное плечо и не иметь 3' гомологичного плеча. В других вариантах осуществления донорный шаблон может содержать 3' гомологичное плечо и не иметь 5' гомологичного плеча.

Альтернативно, в донорном шаблоне могут отсутствовать гомологичные плечи. Например, в некоторых случаях донорный шаблон может быть интегрирован путем NHEJ-зависимого концевого присоединения после расщепления в целевом сайте.

Донорный шаблон может также содержать полинуклеотидную последовательность, кодирующую интересующий ген или его часть (например, SCN9A, SCN10A, или их часть). Альтернативно или дополнительно, донорный шаблон может содержать полинуклеотидную последовательность, кодирующую регуляторный элемент (например, регуляторный элемент SCN9A или SCN10A)

Донорный шаблон может представлять собой ДНК или РНК, одноцепочечную и/или двухцепочечную, и может быть введен в клетку в линейной или кольцевой форме. При введении в линейной форме концы донорной последовательности могут быть защищены (например, от экзонуклеолитической дегградации) методами, известными специалистам в данной области техники. Например, один или более дидезоксинуклеотидных остатков добавляются к 3' концу линейной молекулы и/или самокомплементарные олигонуклеотиды лигируются к одному или обоим концам. См., например, Chang et al., (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:4959-4963; Nehls et al., (1996) Science 272:886-889. Дополнительные методы защиты экзогенных полинуклеотидов от дегградации включают, без ограничения, добавление концевой аминогруппы (групп) и

использование модифицированных межнуклеотидных связей, таких как, например, фосфоротиоаты, фосфорамидаты и остатки О-метилрибозы или дезоксирибозы.

Донорный шаблон может быть введен в клетку как часть векторной молекулы, имеющей дополнительные последовательности, такие как, например, начала репликации, промоторы и гены, кодирующие устойчивость к антибиотикам. Кроме того, донорный шаблон может быть введен в виде голой нуклеиновой кислоты, нуклеиновой кислоты, объединенной с агентом, таким как липосома или поллоксамер, или может быть доставлен вирусами (например, аденовирусом, AAV, герпесвирусом, ретровирусом, лентивирусом и лентивирусом с дефектом интегразы (IDLV)).

Донорный шаблон, в некоторых вариантах осуществления, вставляется так, чтобы его экспрессия управлялась эндогенным промотором, например, промотором, который управляет экспрессией эндогенного гена, в который вставляется донорный шаблон.

Кроме того, экзогенные последовательности могут также включать транскрипционные или трансляционные регуляторные последовательности, например, промоторы, энхансеры, инсультаторы, внутренние сайты входа в рибосому, последовательности, кодирующие 2A пептиды и/или сигналы полиаденилирования.

Понятно, что нуклеотиды описанных выше донорных шаблонов могут включать модифицированные нуклеиновые кислоты в любом положении нуклеотида.

#### *D. Система редактирования генов на основе вирусных векторов/вирусных частиц*

В некоторых вариантах осуществления система редактирования генов, раскрытая в данном документе, может включать полинуклеиновые кислоты (например, векторы, такие как вирусные векторы) или вирусные частицы, включающие их. Полинуклеиновая кислота(ы) производит компоненты (например, нуклеазу и нРНК) для редактирования гена потенциалзависимого натриевого канала, как описано в данном документе.

В некоторых примерах система редактирования генов содержит одну полинуклеиновую кислоту, способную продуцировать все компоненты системы редактирования генов, включая нуклеазу и нРНК. В других примерах система редактирования генов содержит две полинуклеиновые кислоты, одна из которых кодирует нуклеазу, а другая - нРНК.

Нуклеиновая кислота (или по меньшей мере одна нуклеиновая кислота из набора нуклеиновых кислот) может быть вектором, например, вирусным вектором, таким как ретровирусный вектор, аденовирусный вектор, аденоассоциированный вирусный (AAV) вектор и вектор вируса простого герпеса (HSV).

В некоторых примерах система редактирования генов может включать одну или более вирусных частиц, несущих генетические материалы для продуцирования компонентов системы редактирования генов, как раскрыто в данном документе. Вирусная частица (например, частица AAV) может содержать один или более компонентов (или агентов для получения одного или более компонентов) системы редактирования генов (например, как описано в данном документе). Вирусная частица (или вирион) состоит из нуклеиновой кислоты, которая кодирует вирусный геном, и внешней оболочки из белка

(т.е. капсида). В некоторых случаях вирусная частица дополнительно содержит оболочку из липидов, которая окружает белковую оболочку.

В некоторых примерах вирусная частица содержит полинуклеиновую кислоту, способную продуцировать все компоненты системы редактирования генов, включая нуклеазу и нРНК. В других примерах вирусная частица содержит полинуклеиновую кислоту, способную продуцировать один или более компонентов системы редактирования генов. Например, вирусная частица может содержать полинуклеиновую кислоту, способную продуцировать нуклеазу. Альтернативно, вирусная частица может содержать полинуклеиновую кислоту, способную продуцировать нРНК.

Вирусные частицы, описанные в данном документе, могут быть получены из любой вирусной частицы, известной в данной области техники, включая, но не ограничиваясь этим, ретровирусную частицу, аденовирусную частицу, аденоассоциированную вирусную частицу (AAV) или частицу вируса простого герпеса (HSV). В некоторых вариантах осуществления вирусная частица представляет собой частицу AAV. В некоторых вариантах осуществления частица AAV представляет собой частицу AAV1.

В некоторых вариантах осуществления набор вирусных частиц содержит более одной системы редактирования генов. В некоторых вариантах осуществления каждая вирусная частица в наборе вирусных частиц представляет собой частицу AAV. В других вариантах осуществления набор вирусных частиц включает более одного типа вирусных частиц (например, ретровирусную частицу, аденовирусную частицу, аденоассоциированную вирусную частицу (AAV) или частицу вируса простого герпеса (HSV)).

#### *Е. Дополнительные примерные системы редактирования генов*

Кроме прочего, система редактирования генов, раскрытая в данном документе, может содержать нуклеазу (например, фермент Cas9), как раскрыто в данном документе. Такая система редактирования генов может дополнительно содержать нРНК. Нуклеаза и нРНК могут образовывать РНП для доставки. Кроме того, система редактирования генов может дополнительно содержать нРНК и полинуклеиновую кислоту (например, вектор, как описано в данном документе) для получения донорного шаблона. Нуклеаза и нРНК могут образовывать комплекс РНП. Альтернативно, система редактирования генов может дополнительно содержать одну или более полинуклеиновых кислот для продуцирования нРНК и донорного шаблона.

Альтернативно, система редактирования генов, раскрытая в данном документе, может содержать агент для продуцирования нуклеазы, например, вектор экспрессии, такой как вирусный вектор, как раскрыто в настоящем документе, способный экспрессировать нуклеазу. Такая система редактирования генов может дополнительно содержать нРНК или агенты для получения такой нРНК.

Любой другой формат системы редактирования генов, содержащей компоненты, раскрытые в данном документе, для модификации гена потенциалзависимого натриевого

канала или агентов, продуцирующих такие агенты, входит в объем данного изобретения.

## **II. Способы редактирования гена потенциалзависимого натриевого канала**

В некоторых аспектах, данное изобретение относится к способам редактирования гена потенциалзависимого натриевого канала, такого как альфа-субъединица 9 (SCN9A) или альфа-субъединица 10 (SCN10A) потенциалзависимого натриевого канала, с использованием любой из систем редактирования генов, раскрытых в данном документе. Событие редактирования может вводить мутацию или исправлять мутацию в потенциалзависимом натриевом канале (например, SCN9A или SCN10A). Одна или более копий (т.е. аллелей) гена (например, SCN9A или SCN10A) могут быть исправлены и/или мутированы.

Способ редактирования гена потенциалзависимого натриевого канала может включать приведение в контакт клетки с: системой редактирования генов, как описано в данном документе; вирусной частицей или набором вирусных частиц, содержащих систему редактирования генов, как описано в данном документе; и/или нуклеиновой кислотой или набором нуклеиновых кислот, содержащим систему редактирования генов, как описано в данном документе. Эти способы могут быть выполнены, например, на одной или более клетках в живом субъекте (например, *in vivo*). Альтернативно или дополнительно, эти способы могут быть выполнены на одной или более клетках, существующих в культуре (например, *ex vivo*). В некоторых случаях клетки, отредактированные в культуре, затем вводят субъекту (в данном документе классифицируется как «терапия на основе клеток»).

### **A. Способы доставки**

Приведение в контакт клетки (или субъекта) с системой редактирования генов, вирусной частицей или набором вирусных частиц, и/или нуклеиновой кислотой или набором нуклеиновых кислот может осуществляться с помощью различных способов доставки. Например, нуклеазы и/или нРНК могут быть доставлены с помощью векторной системы, включая, без ограничения, плазмидные векторы, ДНК-минициклы, ретровирусные векторы, лентивирусные векторы, аденовирусные векторы, поксвирусные векторы; герпесвирусные векторы и аденоассоциированные вирусные векторы, а также их комбинации.

Для введения в клетки нуклеиновых кислот, кодирующих нуклеазы и нРНК, можно использовать обычные методы переноса генов на основе вирусных и невирусных технологий. Системы доставки невирусных векторов включают ДНК-плазмиды, ДНК-минициклы, голую нуклеиновую кислоту и нуклеиновую кислоту, объединенную с транспортным средством доставки, таким как липосома или поллоксамер. Вирусные векторные системы доставки включают ДНК- и РНК-вирусы, которые после доставки в клетку имеют либо эписомальный, либо интегрированный геном.

Методы невирусной доставки нуклеиновых кислот включают, без ограничения, электропорацию, липофекцию, микроинъекцию, биолистику, виросомы, липосомы, иммунолипосомы, конъюгаты поликатион или липид:нуклеиновая кислота, голую ДНК,

голую РНК, кэппированную РНК, искусственные вирионы и усиленное агентом поглощение ДНК. Сонопорирование с использованием, например, система Sonitron 2000 (Rich-Mar) также может быть использована для доставки нуклеиновых кислот.

Методы доставки белков (например, РНК-направленных эндонуклеаз) включают, без ограничения, использование проникающих в клетки пептидов и наноносителей.

*(i) Доставка аденоассоциированных вирусов*

Один или более компонентов системы редактирования генов могут быть доставлены в клетку с помощью аденоассоциированного вируса (AAV). AAVs - это небольшие вирусы, которые интегрируются в геном хозяина специфически, и поэтому могут доставлять трансген. Инвертированные терминальные повторы (ITR) присутствуют на концах генома AAV и/или интересующего трансгена и служат в качестве источников репликации. Также в геноме AAV присутствуют белки гер и сар, которые при транскрипции образуют капсиды, инкапсулирующие геном AAV для доставки в клетки-мишени. Поверхностные рецепторы на этих капсидах определяют серотип AAV, который определяет, какие органы-мишени капсиды будут связывать в первую очередь и, следовательно, какие клетки AAV будут заражать наиболее эффективно. В настоящее время известно двенадцать серотипов AAV человека. В некоторых вариантах осуществления AAV представляет собой AAV серотипа 6 (AAV6). В некоторых вариантах осуществления AAV представляет собой AAV серотипа 1 (AAV1).

Аденоассоциированные вирусы являются одними из наиболее часто используемых вирусов для генной терапии по нескольким причинам. Во-первых, AAV не вызывают иммунного ответа при введении млекопитающим, включая человека. Во-вторых, AAV эффективно доставляются в клетки-мишени, особенно если уделить внимание выбору подходящего серотипа AAV. Наконец, AAV обладают способностью заражать как делящиеся, так и неделящиеся клетки, поскольку геном может сохраняться в клетке-хозяине без интеграции. Этот признак делает их идеальным кандидатом для генной терапии.

*(ii) Гомологически-направленное восстановление (HDR)*

Один или более компонентов системы редактирования генов могут быть вставлены в целевой геномный участок редактируемой клетки путем гомологически направленной репарации (HDR). Обе цепи ДНК в целевом геномном участке разрезаются ферментом CRISPR Cas9. Затем происходит HDR для восстановления двухцепочечного разрыва (DSB) и вставки донорного фрагмента ДНК. Для того чтобы это произошло правильно, донорная последовательность конструируется с фланкирующими остатками, которые комплементарны последовательности, окружающей сайт DSB в гене-мишени (далее «гомологичные плечи»). Эти гомологичные плечи служат шаблоном для репарации DSB и позволяют HDR быть по сути безошибочным механизмом. Частота направленной гомологической репарации (HDR) зависит от расстояния между мутацией и местом разреза, поэтому выбор перекрывающихся или близких целевых сайтов очень важен. Шаблоны могут включать дополнительные последовательности, фланкирующие

гомологичные области, или могут содержать последовательность, отличающуюся от геномной последовательности, что позволяет редактировать последовательность.

*(iii) Негомологичное соединение концов (NHEJ)*

Путь NHEJ также может приводить к образованию вставок, содержащих экзоны 11-27, с очень низкой частотой. Такая репарация должна корректировать экспрессию, когда вставка находится в ориентации смысловой цепи.

**III. Терапевтическое применение**

Способы редактирования генов, раскрытые в данном документе, могут применяться для лечения пациента, страдающего болью. В некоторых вариантах осуществления в данном документе предложена терапия ex vivo на основе клеток. В других вариантах осуществления в данном документе предложена терапия in vivo.

*(i) Терапия на основе клеток*

Генетически отредактированные клетки могут быть получены с помощью любого из методов, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления одна или более генных правок в популяции отредактированных клеток приводят к фенотипу, связанному с изменением функциональности потенциалзависимого натриевого канала.

В некоторых вариантах осуществления генетически измененные клетки по данному изобретению демонстрируют сниженную активность потенциалзависимого натриевого канала (например, сниженную по меньшей мере на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 100%) по сравнению с неотредактированным контролем. Например, уровни активности  $Na_v1.7$  и/или  $Na_v1.8$  может быть уменьшена по меньшей мере на 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 100% относительно контрольных неотредактированных клеток. В некоторых вариантах осуществления уровни активности  $Na_v1.7$  и/или  $Na_v1.8$  могут быть уменьшены на 5%-10%, 5%-20%, 5%-30%, 5%-40%, 5%-50%, 5%-60%, 5%-70%, 5%-80%, 5%-90%, 10%-20%, 10%-30%, 10%-40%, 10%-50%, 10%-60%, 10%-70%, 10%-80%, 10%-90%, 20%-30%, 20%-40%, 20%-50%, 20%-60%, 20%-70%, 20%-80%, 20%-90%, 30%-40%, 30%-50%, 30%-60%, 30%-70%, 30%-80%, 30%-90%, 40%-50%, 40%-60%, 40%-70%, 40%-80%, 40%-90%, 50%-50%, 50%-70%, 50%-80% или 50%-90% по сравнению с контрольными Т-клетками.

В других вариантах осуществления генетически измененные клетки по данному изобретению демонстрируют повышенную активность потенциалзависимого натриевого канала (например, по меньшей мере на 30%, 50%, 100%, 2 раза, 5 раз или 10 раз) по сравнению с неотредактированным контролем. Например, уровни активности  $Na_v1.7$  и/или  $Na_v1.8$  могут быть увеличены по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 200%, по меньшей мере на 500%, по меньшей мере на 1000% по сравнению с контрольными необработанными клетками. В некоторых вариантах осуществления уровни активности  $Na_v1.7$  и/или  $Na_v1.8$  могут быть увеличены на 30%-50%, 30%-100%, 30%-200%, 30%-500%, 30%-1000%, 50%-100%, 50%-200%, 50%-500%, 50%-1000%, 100%-200%, 100%-500%, 100%-1000%, 200%-500%, 200%-1000% или 500%-1000% относительно контрольных неотредактированных клеток.

В некоторых вариантах осуществления может быть проведена биопсия периферических нервов пациента. Нервная ткань может быть выделена из кожи или ноги пациента. Затем из биопсированного материала выделяют клетку периферической нервной системы (например, нейрон или глиальную клетку, такую как клетка Шванна в нервах или сателлитная глиальная клетка в ганглиях). Затем хромосомная ДНК клетки периферической нервной системы (например, нейрон или глиальная клетка, такая как шванновская клетка в нервах или сателлитная глиальная клетка в ганглиях) может быть отредактирована с использованием материалов и способов, описанных в данном документе. Наконец, отредактированная клетка периферической нервной системы (например, нейрон или глиальная клетка, такая как клетка Шванна в нервах или сателлитная глиальная клетка в ганглиях) имплантируется пациенту. В качестве прогениторной клетки может быть использован любой источник или тип клеток.

В других вариантах осуществления может быть создана индуцированная плюрипотентная стволовая клетка (iPSC), специфичная для пациента. Затем хромосомная ДНК этих клеток iPSC может быть отредактирована с использованием материалов и способов, описанных в данном документе. Затем iPSC с отредактированными геномом могут быть дифференцированы в клетки периферической нервной системы (например, нейрон или глиальную клетку, такую как клетка Шванна в нервах или сателлитная глиальная клетка в ганглиях). Наконец, дифференцированная клетка периферической нервной системы (например, нейрон или глиальная клетка, такая как клетка Шванна в нервах или сателлитная глиальная клетка в ганглиях) имплантируется пациенту.

Альтернативно, мезенхимальная стволовая клетка может быть выделена от пациента, которая может быть выделена из костного мозга или периферической крови пациента. Далее, хромосомная ДНК этих мезенхимальных стволовых клеток может быть отредактирована с использованием материалов и способов, описанных в данном документе. Затем мезенхимальные стволовые клетки с отредактированными геномом могут быть дифференцированы в клетки периферической нервной системы (например, нейрон или глиальную клетку, такую как клетка Шванна в нервах или сателлитная глиальная клетка в ганглиях). Наконец, дифференцированная клетка периферической нервной системы (например, нейрон или глиальная клетка, такая как клетка Шванна в нервах или сателлитная глиальная клетка в ганглиях) имплантируется пациенту.

Любая из генетически отредактированных клеток может быть введена субъекту. Шаг введения может включать размещение (например, трансплантацию) генетически модифицированных клеток у субъекта, способом или путем, который приводит к по меньшей мере частичной локализации введенных клеток в желаемом месте, так что возникает желаемый эффект (эффекты) и где по меньшей мере часть имплантированных клеток или компонентов клеток остается жизнеспособной. Период жизнеспособности клеток после введения субъекту может быть от нескольких часов, например, двадцати четырех часов, до нескольких дней, до нескольких лет или даже до срока жизни субъекта, т.е. долгосрочное приживание. В некоторых вариантах осуществления введение

осуществляется в дыхательные пути субъекта.

Способы введения включают инъекции, инфузии, инстилляции или прием внутрь. Инъекция включает, без ограничений, внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, внутрижелудочковую, внутрикапсульную, внутриорбитальную, внутрисердечную, внутрикожную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсульную, субарахноидальную, интраспинальную, интрацереброспинальную, интрастернальную инъекцию и инфузию. В некоторых вариантах осуществления способ введения представляет собой внутривенный.

В некоторых вариантах осуществления генно-инженерные клетки вводятся системно, что означает введение популяции клеток не непосредственно в целевой участок, ткань или орган, а в систему кровообращения субъекта, где они подвергаются метаболизму и другим подобным процессам.

Для использования в различных аспектах, описанных в данном документе, эффективное количество генно-инженерных клеток включает по меньшей мере  $10^2$  клеток, по меньшей мере  $5 \times 10^2$  клеток, по меньшей мере  $10^3$  клеток, по меньшей мере  $5 \times 10^3$  клеток, по меньшей мере  $10^4$  клеток, по меньшей мере  $5 \times 10^4$  клеток, по меньшей мере  $10^5$  клеток, по меньшей мере  $2 \times 10^5$  клеток, по меньшей мере  $3 \times 10^5$  клеток, по меньшей мере  $4 \times 10^5$  клеток, по меньшей мере  $5 \times 10^5$  клеток, по меньшей мере  $6 \times 10^5$  клеток, по меньшей мере  $7 \times 10^5$  клеток, по меньшей мере  $8 \times 10^5$  клеток, по меньшей мере  $9 \times 10^5$  клеток, по меньшей мере  $1 \times 10^6$  клеток, по меньшей мере  $2 \times 10^6$  клеток, по меньшей мере  $3 \times 10^6$  клеток, по меньшей мере  $4 \times 10^6$  клеток, по меньшей мере  $5 \times 10^6$  клеток, по меньшей мере  $6 \times 10^6$  клеток, по меньшей мере  $7 \times 10^6$  клеток, по меньшей мере  $8 \times 10^6$  клеток, по меньшей мере  $9 \times 10^6$  клеток, или количество, кратное им. В некоторых примерах, описанных в данном документе, клетки размножают в культуре перед введением субъекту, нуждающемуся в этом.

(ii) Генная терапия in vivo

Альтернативно, способы редактирования генов и материалы, раскрытые в данном документе, могут быть применены для генетической модификации целевого гена (SCN9A или SCN10A) in vivo. Хромосомная ДНК клеток пациента может быть отредактирована с использованием материалов и способов, описанных в данном документе. В некоторых аспектах клетка-мишень в терапии in vivo может быть нейроном периферической нервной системы.

Хотя определенные клетки представляют собой привлекательную мишень для лечения и терапии ex vivo, повышение эффективности доставки может позволить осуществлять прямую доставку таких клеток in vivo. В идеале нацеливание и редактирование должны быть направлены на соответствующие клетки. Расщепление в других клетках также может быть предотвращено путем адресной доставки и/или использования промоторов, активных только в определенных клетках или на определенных стадиях развития. Дополнительные промоторы являются индуцибельными,

и поэтому их можно контролировать во времени, если нуклеаза поставляется в виде плазмиды. Количество времени, в течение которого доставленные РНК и белок остаются в клетке, также может быть скорректировано с помощью лечения или доменов, добавленных для изменения периода полужизни. Обработка *in vivo* позволило бы исключить ряд этапов обработки, однако более низкая скорость доставки может потребовать более высокой скорости редактирования. Обработка *in vivo* может устранить проблемы и потери от лечения *ex vivo* и приживления и посттрансплантационной интеграции нейронов и глиальных клеток соответствующим образом в существующие схемы мозга.

В некоторых аспектах данное изобретение относится к способам введения эффективного количества системы редактирования генов, описанной в данном документе, вирусной частицы или набора вирусных частиц, содержащих систему редактирования генов, описанную в данном документе, нуклеиновой кислоты или набора нуклеиновых кислот, содержащих систему редактирования генов, описанную в данном документе, или композиции отредактированных клеток, описанной в данном документе, нуждающемуся в этом субъекту.

Субъект может быть любым субъектом, для которого желательны диагностика, лечение или терапия. В некоторых вариантах осуществления субъект является млекопитающим. В некоторых вариантах осуществления субъект является человеком. В некоторых вариантах осуществления указанный субъект представляет собой пациента-человека, страдающего болью. В некоторых вариантах осуществления пациентом является ребенок.

Эффективное количество относится к количеству системы редактирования генов, вирусной частицы или набора вирусных частиц, содержащих систему редактирования генов, нуклеиновой кислоте или набору нуклеиновых кислот, содержащих систему редактирования генов, или популяции генно-инженерных клеток, необходимых для предотвращения или облегчения по меньшей мере одного или более признаков или симптомов медицинского состояния (например, боли), и относится к достаточному количеству композиции для обеспечения желаемого эффекта (например, для лечения субъекта, страдающего от боли). Эффективное количество также включает количество, достаточное для предотвращения или задержки развития симптома заболевания, изменения течения симптома заболевания (например, но не ограничиваясь этим, замедления прогрессирования симптома заболевания) или обратного развития симптома заболевания. Подразумевается, что для любого конкретного случая соответствующее эффективное количество может быть определено специалистом в данной области с помощью обычного эксперимента.

Эффективность лечения, включающего композицию для лечения медицинского состояния, может быть определена квалифицированным врачом. Лечение считается «эффективным лечением» если какой-либо один или все признаки или симптомы, в качестве одного из примеров, уровни функциональной мишени изменяются

благоприятным образом (например, увеличиваются по меньшей мере на 10%), или другие клинически признанные симптомы или маркеры заболевания (например, боль) улучшаются или ослабляются. Эффективность также может измеряться отсутствием ухудшения состояния пациента, оцениваемого по госпитализации или необходимости медицинского вмешательства (например, прогрессирование заболевания остановлено или, по меньшей мере, замедлено). Методы измерения этих показателей известны специалистам в данной области и/или описаны в данном документе. Лечение включает любое лечение заболевания у субъекта и включает: (1) подавление болезни, например, остановку или замедление прогрессирования симптомов; или (2) облегчение болезни, например, вызывая регресс симптомов; и (3) предотвращение или снижение вероятности развития симптомов.

#### **IV. Наборы для терапевтического применения**

Данное изобретение также предоставляет наборы для применения описанных в данном документе композиций. Например, в данном изобретении представлены наборы, содержащие систему редактирования генов, как описано в данном документе; вирусную частицу или набор вирусных частиц, содержащий систему редактирования генов, как описано в данном документе; нуклеиновую кислоту или набор нуклеиновых кислот, содержащих систему редактирования генов, как описано в данном документе; и/или популяцию генетически измененных клеток, как описано в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления набор может дополнительно содержать инструкции по применению любого из описанных в данном документе способов. Включенные инструкции могут включать описание: (i) доставки системы редактирования генов, как описано в данном документе; вирусной частицы или набора вирусных частиц, содержащих систему редактирования генов, как описано в данном документе и/или нуклеиновой кислоты или набора нуклеиновых кислот, содержащих систему редактирования генов, как описано в данном документе; и/или (ii) введения популяции генетически измененных клеток, как описано в данном документе.

Набор может дополнительно содержать описание выбора субъекта, подходящего для лечения, на основе определения того, нуждается ли субъект в лечении. Инструкции могут включать информацию о дозировке, графике дозирования и способе введения для предполагаемого лечения. Контейнеры могут представлять собой единичные дозы, объемные упаковки (например, многодозовые упаковки) или суб-единичные дозы. Инструкции, поставляемые в по данному изобретению, обычно представляют собой письменные инструкции на этикетке или вкладыше в упаковку. Этикетка или вкладыш к упаковке указывает, что фармацевтические композиции используются для лечения, отсрочки начала и/или облегчения заболевания или расстройства у субъекта.

Наборы, представленные в данном документе, находятся в подходящей упаковке. Подходящая упаковка включает, но не ограничивается этим, флаконы, бутылки, банки, гибкую упаковку и т.п. Также предусмотрены упаковки для использования в сочетании с конкретным устройством, таким как ингалятор, устройство для назального введения или

инфузионное устройство. Набор может иметь порт стерильного доступа (например, контейнер может представлять собой пакет для внутривенного раствора или флакон с пробкой, которую можно проколоть иглой для подкожных инъекций). Контейнер может также иметь порт доступа к стерильному материалу.

Наборы необязательно могут содержать дополнительные компоненты, такие как буферы и интерпретирующая информация. Обычно набор содержит контейнер и этикетку или вкладыш(и) на контейнере или связанный с ним. В некоторых вариантах осуществления данное изобретение предоставляет изделия, включающие содержимое описанных выше наборов.

#### *Общие методики*

В практике данного изобретения будут использоваться, если не указано иное, обычные методики молекулярной биологии (включая рекомбинантные методики), микробиологии, клеточной биологии, биохимии и иммунологии, которые находятся в пределах компетенции специалистов в данной области техники. Такие техники подробно описаны в литературе, например, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, second edition (Sambrook, et al., 1989) Cold Spring Harbor Press; *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait, ed. 1984); *Methods in Molecular Biology*, Humana Press; *Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J. E. Cellis, ed., 1989) Academic Press; *Animal Cell Culture* (R. I. Freshney, ed. 1987); *Introduction to Cell and Tissue Culture* (J. P. Mather and P. E. Roberts, 1998) Plenum Press; *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* (A. Doyle, J. B. Griffiths, and D. G. Newell, eds. 1993-8) J. Wiley and Sons; *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.); *Handbook of Experimental Immunology* (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds.); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J. M. Miller and M. P. Calos, eds., 1987); *Current Protocols in Molecular Biology* (F. M. Ausubel, et al. eds. 1987); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis, et al., eds. 1994); *Current Protocols in Immunology* (J. E. Coligan et al., eds., 1991); *Short Protocols in Molecular Biology* (Wiley and Sons, 1999); *Immunobiology* (C. A. Janeway and P. Travers, 1997); *Antibodies* (P. Finch, 1997); *Antibodies: a practice approach* (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); *Monoclonal antibodies: a practical approach* (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); *Using antibodies: a laboratory manual* (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); *The Antibodies* (M. Zanetti and J. D. Capra, eds. Harwood Academic Publishers, 1995); *DNA Cloning: A practical Approach*, Volumes I and II (D.N. Glover ed. 1985); *Nucleic Acid Hybridization* (B.D. Hames & S.J. Higgins eds.(1985»; *Transcription and Translation* (B.D. Hames & S.J. Higgins, eds. (1984»; *Animal Cell Culture* (R.I. Freshney, ed. (1986»; *Immobilized Cells and Enzymes* (IRL Press, (1986»; and B. Perbal, *A practical Guide To Molecular Cloning* (1984); F.M. Ausubel et al. (eds.).

Без дальнейших уточнений считается, что специалист в данной области техники может, основываясь на приведенном выше описании, использовать данное изобретение в полной мере. Таким образом, следующие конкретные варианты осуществления изобретения должны рассматриваться только как иллюстративные и не ограничивающие остальную часть изобретения каким-либо образом. Все публикации, приведенные в

данном документе, включены в него посредством ссылки для целей или предмета, на который ссылается данный документ.

## **ПРИМЕРЫ**

### **Пример 1. Скрининг эффективности нРНК SpCas9 и SaCas9, нацеленных на SCN9A и SCN10A в iPSC.**

#### **Методы**

##### *Разработка и синтез направляющих РНК*

Конструирование направляющих РНК *in silico* было завершено компанией CRISPR Therapeutics. Направляющие РНК SpCas9 и SaCas9, нацеленные на экзоны 2-15 SCN9A и экзоны 1-14 SCN10A, были разработаны *in silico* и оценены с помощью алгоритма внецелевого предсказания. Направляющие РНК с благоприятным внецелевым профилем были отобраны для синтеза и дальнейшей целевой оценки. Выбранные нРНК включали 99 нРНК SpCas9 (Таблица 1) и 68 нРНК SaCas9, нацеленных на SCN9A (Таблица 2), и 166 нРНК SpCas9 (Таблица 3) и 73 нРНК SaCas9, нацеленных на SCN10A (Таблица 4).

Направляющие РНК были заказаны для синтеза у компании Synthego Corporation. Направляющие РНК были заказаны со стандартными химическими модификациями, которые включают 2'-О-метил 3' фосфоротиоатные модификации в первых и последних 3 нуклеотидах. Для нРНК SpCas9 20-нуклеотидные последовательности, нацеленные на геном, приведены в таблицах 1 и 3, и стандартная 80-мерная последовательность SpCas9 была добавлена для создания направляющей РНК. Для SaCas9 нРНК 22-нуклеотидные последовательности нацеливания на геном перечислены в таблицах 2 и 4 и были использованы для синтеза со следующей каркасной последовательностью SaCas9 для создания направляющих РНК: GUUUUAGUACUCUGGAAACAGAAUCUACUAAAACAA GGCAAAAUGCCGUGUUUAUCUCGUCAACUUGUUGGCGAGAUUUU (SEQ ID NO: 41).

##### *Нуклеофекция iPSC с использованием системы 4D-Nucleofector®*

Для различных этапов скрининга нРНК использовались iPSC дикого типа, а также разработанные iPSC, стабильно экспрессирующие Cas9. iPSC, экспрессирующие SpCas9 или SaCas9 под контролем доксициклина, были получены из iPSC дикого типа путем вставки таргетной конструкции в локус AAVS-1. В этой конструкции две кассеты экспрессируются в противоположных направлениях, разделенные изоляторным элементом IS2. Первая кассета экспрессии представляет собой TetOn3G белок-2A-Puro под контролем промотора CASI, а вторая кассета экспрессии представляет собой SpCas9 или SaCas9 под контролем промотора TRE3G.

iPSC были электропорированы с помощью системы Lonza 4D-Nucleofector® System вместе с набором P3 Primary Cell 96-луночный Nucleofector™ (Lonza, Cat: V4SP-3096) с программой CM137. iPSC культивировали в mTeSR1 (Stemcell Technologies, кат.: 85850). Перед нуклеофекцией клетки диссоциировали с помощью Accutase (Stemcell Technologies, Cat: 07920) и ресуспендировали в растворе P3 Nucleofection. В 96-луночном формате 180000 клеток на лунку были электрофоретированы с 400 нг мРНК Cas9 (TriLink) на

лунку и 400 нг синтетической нРНК (Synthego) в соответствии с инструкциями производителя. После нуклеофекции iPSC поддерживали в mTeSR1, дополненном 10 мкМ Y27632 (Stemcell Technologies, кат: 72308) в 96-луночных планшетах для клеточных культур, предварительно покрытых матригелем, в течение 72 часов до выделения ДНК и обнаружения инсерций/делеций (инделов) на основе секвенирования следующего поколения (NGS). Два повтора были включены в каждый эксперимент по электропорации, и было проведено два независимых эксперимента. Для экспериментов со стабильными клеточными линиями SpCas9 и SaCas9 клетки обрабатывали доксициклином 1 мкг/ул в течение 72 часов до нуклеофекции Amaha.

*Нуклеофекция сенсорных нейронов, полученных из iPSC, с помощью прибора Lonza 4D-Nucleofector® Y Unit*

Для создания культур сенсорных нейронов, полученных из iPSC (iSN), клетки iPSC дифференцировали в присутствии коктейля малых молекул ингибиторов путей развития в колбах, покрытых матригелем. На DIV11 дифференциации клетки были диссоциированы и помещены в 384-луночные планшеты и поддерживались в среде созревания, включающей коктейль факторов роста, где они созревали до DIV26-28. Эти нейроны экспрессируют канонические маркеры ноцицепторов, включая TRPV1, Brn3A, периферический маркер Isl1, neuN и SCN9A (Nav1.7), и могут повторять функциональные свойства физиологически значимых подтипов нейронов.

Полученные из iPSC сенсорные нейроны (iSNs) были электрофоретированы с помощью устройства Lonza 4D-Nucleofector® Y Unit вместе с набором AD1 4D-Nucleofector™ Y Kit (Lonza, кат: V4YP-1A24) с программой EH158. В 24-луночном формате клетки были электрофоретированы рибонуклеопротеиновыми комплексами (РНП) в соответствии с инструкциями производителя. Комплексы РНП создавались путем инкубации 425 пмоль белка SpCas9 или SaCas9 (Aldevron) с 531 пмоль синтетической нРНК (Synthego) при комнатной температуре в течение 20 минут. После нуклеофекции iSNs выдерживали в культуре в течение 72 часов до выделения ДНК и обнаружения инсерций/делеций (инделов) на основе секвенирования следующего поколения (NGS). Два повтора были включены в каждый эксперимент по электропорации, и было проведено два независимых эксперимента.

*Трансдукция сенсорных нейронов, полученных из iPSC, с помощью AAV*

В 384-луночном формате приблизительно 12000 iSN на лунку были трансдуцированы векторами AAV-1, экспрессирующими нРНК SaCas9 и SaCas9 в одном векторе. iSN были трансдуцированы векторами AAV при кратности заражения (MOI), равной 750000. После трансдукции iSN выдерживали в культуре в течение 7 суток до выделения ДНК и обнаружения инсерций/делеций (инделов) на основе NGS. Два повтора были включены в каждый эксперимент по трансдукции, и было проведено два независимых эксперимента.

*Выявление инсерций/делеций (инделов) на основе секвенирования следующего поколения (NGS)*

ДНК выделяли из iPSC через 72 часа после электропорации с помощью раствора Lucigen Quick Extract 2X DNA Extraction Solution (Lucigen, кат: QE09050) в соответствии с инструкциями производителя. Двухэтапный метод ПЦР с использованием смеси KAPA2G Robust HotStart ReadyMix (Sigma Aldrich, кат: KK5702) затем использовали для создания библиотек NGS. Первую ПЦР использовали для создания ампликонов, а вторую ПЦР - для добавления адаптерных последовательностей Nextera DNA Index (i7/i5). Реакционная смесь для ПЦР №1 содержала 1 мкл выделенной гДНК, 1X KAPA2G Robust HotStart ReadyMix, 0,5 мкМ прямого праймера и 0,5 мкМ обратного праймера. Последовательности праймеров приведены в таблицах 5 и 6. Реакционная смесь для ПЦР № 2 состояла из 1 мкл продукта ПЦР №1, 1X KAPA2G Robust HotStart ReadyMix, 0,5 мкМ адаптера Index 1 N7xx и 0,5 мкМ адаптера Index 2 N5xx. Условия осуществления циклиров для ПЦР № 1 и ПЦР № 2 были следующими: (1) 95 °C в течение 3 мин, (2) 95 °C в течение 15 с, (3) 60 °C в течение 15 с, (4) 72 °C в течение 15 с, (5) повторение этапов (2)-(4) 20 раз, (6) 72 °C в течение 1 мин, (7) 4 °C бесконечное удержание. Затем образцы были объединены и очищены с помощью набора Zymo DNA Clean and Concentrator Kit (Zymo, D4034) и количественно определены на биоанализаторе Agilent 2100 (Agilent, кат: G2939BA). Затем библиотеки прогонялись на приборе MiSeq компании Illumina для получения чтений спаренных концов (2×150).

Затем для каждого образца чтения были отфильтрованы для получения минимального балла качества Phred33, равного 30. Чтения спаренных концов были впоследствии объединены с помощью FLASH (Fast Length Adjustment of SHort reads) с требованием перекрытия не менее 1 п.н. Затем полученные объединенные чтения были оптимально выровнены по соответствующим последовательностям эталонных ампликонов с помощью алгоритма Нидлмана-Вунша. Чтения, которые выравнивались с инделами в пределах 3 п.н. от предполагаемого места разреза, подсчитывались, а затем отфильтровывались только для инделов со сдвигом рамки, где длина индела не кратна 3. Оценка общего редактирования рассчитывалась как доля чтений с инделями, расположенными ближе к месту разреза, а продуктивное редактирование рассчитывалось как доля чтений со сдвигом рамки считывания инделей ближе к месту разреза для каждого образца.

После анализа каждого образца был проведен контроль качества образцов, для чего требовалось, чтобы в каждом образце было успешно объединено не менее 90% секвенированных чтений и успешно выровнено 70% секвенированных чтений. Кроме того, образцы должны были иметь не менее 1000 чтений, которые были успешно выровнены. Наконец, контроль качества проводился с учетом партии образцов, отсеивая все образцы, чье окончательное количество выровненных чтений более чем на 2 стандартных отклонения отличалось от среднего значения соответствующей партии образцов. Прошедшие образцы были усреднены с расчетом стандартного отклонения. Были включены положительные и отрицательные контроли, где отрицательный контроль должен был демонстрировать менее 2% частоты инделов, что указывало на низкий

уровень фонового шума, а образцы положительного контроля должны были показывать уровень редактирования выше фонового. Кроме того, воспроизводимость была подтверждена путем сравнения соответствующих образцов между двумя техническими копиями; наблюдалось сильное линейное соответствие с высоким показателем  $R^2$ , равным 0,85.

#### *Оценка внецелевой оценки нРНК SpCas9, нацеленных на SCN9A и SCN10A в iPSC*

Для первоначальной оценки внецелевого воздействия был выполнен этап номинации *in silico*, в ходе которого на основе сходства последовательностей были предсказаны последовательности-кандидаты на внецелевое воздействие. Затем эти сайты были непосредственно оценены с помощью целевого секвенирования следующего поколения, чтобы определить, какие сайты, если таковые имеются, демонстрируют признаки CRISPR-Cas-индуцированного внецелевого редактирования.

##### а) Вычислительное предсказание внецелевых сайтов

Внецелевые сайты были предсказаны на основе сходства последовательностей с помощью трех вычислительных алгоритмов. В частности, CCTop и COSMID использовались для идентификации внецелевых сайтов-кандидатов и имеющих до 3 несовпадений или до 2 несовпадений с 1 отступом ДНК или РНК от последовательности мишени. Последовательность PAM, используемая для идентификации внецелевых сайтов, представляла собой NRG для направляющих SpCas9 и NNGRRT для направляющих SaCas9. Гиды, определенные с помощью двух алгоритмов, затем были объединены вместе, включая де-дубликацию сайтов с идентичными геномными координатами. Общий список из 1471 предполагаемого внецелевого сайта, предсказанного по 40 гидам, представлен в таблице 7.

##### б) Гибридный захват iPSC

Трансфекции iPSC с использованием двух различных доноров дикого типа проводились с использованием условий Lonza, описанных выше. Были использованы два биологических повтора, и геномная ДНК была объединена для получения необходимого количества для гибридного захвата. ДНК выделяли из iPSC через 72 часа после электропорации с помощью набора DNeasy 96 Blood and Tissue Kit (Qiagen, кат: 69581). Количественное определение образцов проводилось с помощью Qubit 1x дцРНК HS Assay (ThermoFisher, кат: Q33231) и ридер планшетов EnVision с расчетом 4PL. Было получено не менее 200 нг каждого образца и обработано для гибридного захвата с помощью набора реагентов SureSelect XT Reagent Kit (Agilent, кат: G9704A). Вкратце, образцы фрагментировали до 150-200 п.н. с помощью Covaris LE220, затем восстанавливали конец, dA-хвост и лигировали адаптер. Затем библиотеки амплифицировали с помощью ДНК-полимеразы Herculase II Fusion, используя следующие условия цикла: (1) 98 °C в течение 2 мин, (2) 98 °C в течение 30 с, (3) 65 °C в течение 30 с, (4) 72 °C в течение 1 мин, (5) повторение этапов (2)-(4) 10 раз, (6) 72 °C в течение 5 мин, (7) 4 °C бесконечное удержание. Для очистки библиотек использовали очистку на основе гранул, AMPure XP (Beckman Coulter, кат.: A63881). Библиотеки гибридизировали с целевой специфической

библиотекой Capture Library и целевые молекулы захватывали с помощью магнитных гранул, покрытых стрептавидином. Захваченные библиотеки затем амплифицировали и очищали, используя те же условия, что и выше. Образцы прошли контроль качества с использованием высокочувствительных наборов ДНК на приборе TapeStation (Agilent, кат: 5067-5584) и/или биоанализатор (Agilent, кат: 5067-1504) и секвенированы на платформе Illumina HiSeq с медианным покрытием секвенирования 2 272x для каждого кандидатного внецелевого сайта.

с) Вычислительный анализ целевого секвенирования следующего поколения

Для каждого предполагаемого внецелевого сайта, включенного в данное исследование, был проведен следующий анализ для определения силы доказательств того, что CRISPR-Cas-лечение вызвало внецелевое редактирование. Сначала чтения секвенирования нового поколения были выровнены по эталонному геному человека hg38 с помощью инструмента выравнивания bwa в режиме mem с параметрами по умолчанию, затем последовало преобразование и сортировка файлов SAM и BAM с удалением дубликатов чтений с помощью программы samtools. Затем измерялась скорость образования инделов путем накопления чтений с инделом в пределах 3 п.н. от ожидаемого сайта разреза с помощью пакета Python pysam и деления числа чтений с инделом на общее число чтений, покрывающих этот сайт.

Затем частоту инделов, измеренную на каждом предсказанном внецелевом сайте, сравнивали между обработанным образцом каждого донора iPSC и необработанным (только электропорация) отрицательным контрольным образцом, подобранным для того же донора iPSC. Если наблюдаемая частота инделов в сайте на >0,2% выше, чем в отрицательном контрольном образце, данные для этого сайта-кандидата поступали в статистическое тестирование. Единственным исключением были сайты-кандидаты, в которых наблюдался генетический вариант зародышевого индела, когда частота инделей ~50% или ~100% наблюдалась как в подходящем образце одного или более доноров без лечения, так и в образце без лечения. Для участков, которые были подвергнуты статистическому тестированию, был проведен парный t-тест по обоим донорам для частоты обработанных и необработанных инделов на данном сайте. Любой проверенный сайт, для которого p-значение было меньше 0,05, считался подтвердившим внецелевое редактирование. Значительное целевое редактирование (средняя частота инделов 9,35%-52,25%) было подтверждено во всех руководствах в качестве положительного контроля для данного исследования.

**Таблица 1: Названия и последовательности направляющих РНК SpCas9, нацеленных на ген SCN9A (Nav1.7)**

нРНК Nav1.7 SpCas9		
SEQ ID NO:	Название нРНК	спейсерная последовательность (5'-3')
43	Экзон Scn9a Sp 2_T1	AuCuAuGGGACAuCCuCC
44	Экзон Scn9a Sp 2_T2	CAGCAuGCGuuGuuCAAuG

45	Экзон Scn9a Sp 2_T3	AGuAGGGGuCCAAGuCCuCC
46	Экзон Scn9a Sp 2_T4	uGGGGACAuuCCuCCCGGCA
47	Экзон Scn9a Sp 2_T5	GuAGGGGuCCAAGuCCuCCA
48	Экзон Scn9a Sp 2_T6	uAGGGGuCCAAGuCCuCCAG
49	Экзон Scn9a Sp 2_T7	AuGGCAAuGuuGCCuCCCC
50	Экзон Scn9a Sp 2_T8	GGCuCuGACACCAuGCCGGG
51	Экзон Scn9a Sp 2_T9	AACAGCuGCCCuCAuCuAu
8	Экзон Scn9a Sp 2_T10	GGAAuGuCCCCAuAGAuGAA
52	Экзон Scn9a Sp 2_T11	CGGCAuGGuGuCAGAGCCCC
53	Экзон Scn9a Sp 2_T12	AGCAAuGCGuuGuuCAuGA
54	Экзон Scn9a Sp 2_T13	AGGAAuGuCCCCAuAGAuGA
55	Экзон Scn9a Sp 2_T14	AAACAGCuGCCCuCAuCuA
56	Экзон Scn9a Sp 2_T15	CCCCuACuAuGCAGACAAAA
57	Экзон Scn9a Sp 4_T1	CCAuGAuAACCACCGGAC
58	Экзон Scn9a Sp 4_T2	CAuuuuuGGuCCAGuCCGGu
59	Экзон Scn9a Sp 4_T3	CCAGuCCGGuGGGuuAuCA
60	Экзон Scn9a Sp 4_T4	ACAuuuuuGGuCCAGuCCGG
61	Экзон Scn9a Sp 4_T5	uCGACAuuuuuGGuCCAGuC
62	Экзон Scn9a Sp 4_T6	ACCACuuACuCGACAuuuu
63	Экзон Scn9a Sp 4_T7	uAuGACCAuGAuAACCAC
64	Экзон Scn9a Sp 5_T1	uuCuuCGuGACCCGuGGAAC
65	Экзон Scn9a Sp 5_T2	uCGuGACCCGuGGAACuGGC
66	Экзон Scn9a Sp 5_T3	uCACuuuuCuuCGuGACCCG
67	Экзон Scn9a Sp 5_T4	GuGuuuAGGuACACuuuuAC
68	Экзон Scn9a Sp 7_T1	AAGCCCCuACAAuuGuCuuC
69	Экзон Scn9a Sp 7_T2	CuGAGuGuGuuuGCACuAAu
70	Экзон Scn9a Sp 7_T3	AuuGGACuACAGCuGuuCAu
7	Экзон Scn9a Sp 7_T5	CAGGCCuGAAGACAAuuGuA
71	Экзон Scn9a Sp 7_T6	AGGCCuGAAGACAuuGuAG
72	Экзон Scn9a Sp 9_T1	AAGCuCGuGuAGCCAuAAuC
73	Экзон Scn9a Sp 9_T2	AGCuCGuGuAGCCAuAAuCA
74	Экзон Scn9a Sp 9_T3	GGCuAAuGACCCAAGAuAC
75	Экзон Scn9a Sp 9_T4	uuCACACAGGuGuACCCCuC
76	Экзон Scn9a Sp 9_T5	CGuGuGuAGuCAGuGuCCAG

77	Экзон Scn9a Sp 9_T6	GCuAAuGACCCAAGAuACu
78	Экзон Scn9a Sp 9_T7	CGAGCuuuGACACuuuCAGC
79	Экзон Scn9a Sp 9_T8	uGGuACuCACCuGuuGGuAA
80	Экзон Scn9a Sp 9_T9	GGGuACACCuGuGuGAAAu
81	Экзон Scn9a Sp 9_T10	CuGGGAAAACCuuuACCAAC
82	Экзон Scn9a Sp 9_T11	uuGGGuCAuuAGCCuAAACA
83	Экзон Scn9a Sp 9_T12	GuGuGuAGuCAGuGuCCAGA
84	Экзон Scn9a Sp 9_T13	GGGCCuuCuuAGCCuuGuuu
85	Экзон Scn9a Sp 9_T14	GAGCuuuGACACuuuCAGCu
86	Экзон Scn9a Sp 9_T15	AuuGGCAGAAACCCuGAuuA
87	Экзон Scn9a Sp 10_T1	CCCuAGACGCuGCGuGCuGC
88	Экзон Scn9a Sp 10_T2	CCAGCAGCACGCAGCGuCuA
89	Экзон Scn9a Sp 10_T4	GCCAGCAGCACGCAGCGuCu
90	Экзон Scn9a Sp 10_T5	CuuuGuCGuAGuGAuuuuCC
91	Экзон Scn9a Sp 11_T2	GAGGuuGuCuACCCCCAAuC
92	Экзон Scn9a Sp 11_T3	uAuGCCCuCGACACCAAGG
93	Экзон Scn9a Sp 11_T5	ACCuuGGuGuCGAAGGGCAu
3	Экзон Scn9a Sp 11_T6	GCCuAuGCCCuCGACACCA
94	Экзон Scn9a Sp 11_T7	AGuuuCCACCuGGuGuCGA
1	Экзон Scn9a Sp 11_T9	CAAuuuGGGuGGuACCuGAu
95	Экзон Scn9a Sp 11_T10	GuuuCCACCuGGuGuCGAA
96	Экзон Scn9a Sp 11_T11	CCGCuGCCGCuGCAAuuGCC
97	Экзон Scn9a Sp 11_T12	GCCCAACCAGGCAAuuGCAG
5	Экзон Scn9a Sp 11_T13	CGGCuGAAuAuACAAGuAuu
4	Экзон Scn9a Sp 11_T14	AuAGGCGAGCACAuGAAAAG
98	Экзон Scn9a Sp 11_T15	AAuuuGGGuGGuACCuGAuu
99	Экзон Scn9a Sp 12_T1	CGuuCACCGGCAGCAuuGGu
100	Экзон Scn9a Sp 12_T2	CCGuuCACCGGCAGCAuuGG
101	Экзон Scn9a Sp 12_T3	uGuuACuGCuGCGuCGCuCC
102	Экзон Scn9a Sp 12_T4	GuuACuGCuGCGuCGCuCCu
103	Экзон Scn9a Sp 12_T5	GGGCuGAGCGuCCAuCAACC
104	Экзон Scn9a Sp 12_T6	CACCAAuGCuGCCGGuGAAC
491	Экзон Scn9a Sp 12_T7	uuCCCGuuCACCGGCAGCAu
105	Экзон Scn9a Sp 12_T8	GGCuGAGCGuCCAuCAACCA

492	Экзон Scn9a Sp 12_T9	GuuCACCGGCAGCAuuGGuG
106	Экзон Scn9a Sp 12_T10	uuACuGCuGCGuCGCuCCuG
9	Экзон Scn9a Sp 12_T11	CCACCAAuGCuGCCGGuGAA
107	Экзон Scn9a Sp 12_T12	CuGCAACGGuGuGGuCuCCC
108	Экзон Scn9a Sp 12_T13	CAGCAuuGGuGGGGACCuAC
493	Экзон Scn9a Sp 12_T14	uuGGuGGGGACCuACuGGCu
109	Экзон Scn9a Sp 12_T16	GCGuCGCuCCuGGGGuCuGu
10	Экзон Scn9a Sp 12_T17	CAGuCACCAcCAGCAuuCG
494	Экзон Scn9a Sp 12_T18	uAGGuCCCCACCAAuGCuGC
110	Экзон Scn9a Sp 12_T19	uGCuGuGGACuGCAACGGuG
111	Экзон Scn9a Sp 12_T20	CGuCGCuCCuGGGGuCuGuG
112	Экзон Scn9a Sp 12_T21	uGCGuCGCuCCuGGGGuCuG
113	Экзон Scn9a Sp 12_T22	GGuGuGGuCuCCCuGGuuGA
114	Экзон Scn9a Sp 12_T23	GuAACAuCAGCCAAGCCAGu
115	Экзон Scn9a Sp 12_T24	CuGuGCAuuuuCCCuuCAC
2	Экзон Scn9a Sp 12_T25	GCuuCGCCuuGCAGAAAACA
116	Экзон Scn9a Sp 12_T26	GuuuGuGCCCCACAGACCCC
495	Экзон Scn9a Sp 12_T27	GCuGuCCAuuGGGGAGCAuG
496	Экзон Scn9a Sp 12_T28	uCuGGCAGAAGCuGuCCAuu
6	Экзон Scn9a Sp 14_T1	GGAACACCACCCAAuGACuG
117	Экзон Scn9a Sp 14_T2	GCAAAuCuGuACCACCAAGG
118	Экзон Scn9a Sp 14_T3	uGuGCAAAuCuGuACCACCA
119	Экзон Scn9a Sp 14_T4	CCAAGGuGGACAuuuuuGuC
120	Экзон Scn9a Sp 14_T5	uGuCuGGACuCuCAAGuuC
121	Экзон Scn9a Sp 14_T6	uCuGGAAuuGCuCuCCAuAu
122	Экзон Scn9a Sp 15_T1	AGuuCuGCGAuCAuuCAGAC
123	Экзон Scn9a Sp 15_T2	GGAGCuCuuuCuAGCAGAuG
124	Экзон Scn9a Sp 15_T3	CCuACuuGGAAuACuCAuA

**Таблица 2: Названия и последовательности направляющих РНК SaCas9, нацеленных на ген SCN9A (Nav1.7)**

<b>нРНК Nav1.7 SaCas9</b>		
<b>SEQ ID NO:</b>	<b>Название нРНК</b>	<b>спейсерная последовательность (5'-3')</b>
125	Экзон Scn9a Sa 2_T1	GGGGCuCuGACACCAuGCCGGG
126	Экзон Scn9a Sa 2_T2	CCCCuACuAuGCAGACAAAAG

127	Экзон Scn9a Sa 2_T3	CuCACCCuuuuuGuCuGCAuAGu
128	Экзон Scn9a Sa 2_T4	AuCAuCAuCuuuuCuuuuCuCu
129	Экзон Scn9a Sa 3_T1	uuuCuCCuuuCAGuCCuCuAAG
130	Экзон Scn9a Sa 4_T1	uCGACAuuuuuGGuCCAGuCCG
131	Экзон Scn9a Sa 4_T4	CCACCGGACuGGACCAAAAuG
132	Экзон Scn9a Sa 4_T5	GACAAACuGCAuAuuuAuGACC
133	Экзон Scn9a Sa 4_T6	AAuAGuGCACAuGAuGAGCAuG
134	Экзон Scn9a Sa 4_T7	uGGuCAuAAuAuGCAGuuuGu
135	Экзон Scn9a Sa 5_T1	CuCCuACACAGAAGCCuCuGC
136	Экзон Scn9a Sa 5_T2	uCuuCGuGACCCGuGGAACuGG
137	Экзон Scn9a Sa 5_T3	GuuCCACGGGuCACGAAGAAAA
138	Экзон Scn9a Sa 5_T4	CuuGCAAGAGGCuuCuGuGuAG
139	Экзон Scn9a Sa 5_T5	uuGuGuuuAGGuACACuuuuAC
13	Экзон Scn9a Sa 5_T6	ACGACAAAuCCAGCCAGuuCC
140	Экзон Scn9a Sa 5_T7	ACuuuuACuGGAAuAuAuACuu
141	Экзон Scn9a Sa 6_T2	uACAAAuuCuGuuAAuACCuG
142	Экзон Scn9a Sa 6_T5	AuuuAAuuCuACAGGuAuuuAA
17	Экзон Scn9a Sa 7_T1	CAuGAuCCuGACuGuGuCuGu
143	Экзон Scn9a Sa 7_T2	uuCuAAAGuCuCuCACuCuC
144	Экзон Scn9a Sa 7_T4	GAGuGAAGAAGACuuuAGAAGu
145	Экзон Scn9a Sa 7_T5	AGAAAGCAuAAuGAuACCCuA
146	Экзон Scn9a Sa 7_T6	ACACACuCAGACAGAACACAGu
147	Экзон Scn9a Sa 7_T7	uAAuGAAACuuAGAAAGCAuA
148	Экзон Scn9a Sa 7_T8	uCuAAuGuuuCAuuAuuuuCAA
149	Экзон Scn9a Sa 8_T1	GAAACCACAAAGGAGAGCAuCu
150	Экзон Scn9a Sa 8_T2	CuuuGuGGuuuCAGCACAGAu
151	Экзон Scn9a Sa 8_T3	ACAGAAuAuuuuuAuuACuuGG
152	Экзон Scn9a Sa 9_T1	uCAAAGCuCGuGuAGCCAuAAu
18	Экзон Scn9a Sa 9_T2	CuCGuGuGuAGuCAGuGuCCAG
14	Экзон Scn9a Sa 9_T3	CuGGGAAAACCuuuACCAACAG
153	Экзон Scn9a Sa 9_T4	GGuAAAGGuuuuCCCAGuAAuC
154	Экзон Scn9a Sa 10_T1	AACAuuGAAGAAGCuAAACAGA
155	Экзон Scn9a Sa 10_T2	CAuAuGCCAuGGCAACCACAGC
156	Экзон Scn9a Sa 10_T3	GAAGAAGCuAAACAGAAAGAAu

157	Экзон Scn9a Sa 11_T1	GCAuuuuGGGuGGuACCuGAuu
158	Экзон Scn9a Sa 11_T2	CAGGCAAuuGCAGCGGCAGCGG
11	Экзон Scn9a Sa 11_T3	AAGCAGAAuuAuGGGCCuCuCA
159	Экзон Scn9a Sa 11_T4	uuuAGCACuuuuAGAGCuCAGu
160	Экзон Scn9a Sa 11_T5	GAuGCuGAGAAuuGuCGAAAu
161	Экзон Scn9a Sa 11_T6	AAuAuACAAGuAuuAGGAGAAG
16	Экзон Scn9a Sa 12_T1	GAuGuuACuGCuGCGuCGCuCC
12	Экзон Scn9a Sa 12_T2	GCCuuGCAGAAAACAAGGAGCC
20	Экзон Scn9a Sa 12_T3	AGAAAACAAGGAGCCACGAAuG
162	Экзон Scn9a Sa 12_T4	GGAAGAGAuAuAGGAuCuGAGA
163	Экзон Scn9a Sa 12_T5	uuCAAAGGCAGAGGAAGAGAuA
164	Экзон Scn9a Sa 13_T1	CuAuCuCCuuuCAGAGGAuAuG
165	Экзон Scn9a Sa 13_T2	CuCAuuGCuCuCuGuCuGAGGu
15	Экзон Scn9a Sa 13_T3	uCCCAACCuCAGACAGAGAGCA
166	Экзон Scn9a Sa 13_T4	uuGuAGuuCCuAuCuCCuuuCA
167	Экзон Scn9a Sa 14_T1	AuGGAACACCACCCAAuGACuG
168	Экзон Scn9a Sa 14_T2	AuAuGGAGAGCAAuuCCAGAuC
169	Экзон Scn9a Sa 14_T3	uGAuCuGGAuuGCuCuCCAuA
170	Экзон Scn9a Sa 14_T4	AuGGuAAuuGCAAGAuCuCAA
171	Экзон Scn9a Sa 14_T5	uGCuuuuuuCuCCCAGAACuuG
172	Экзон Scn9a Sa 14_T6	AuuuCCuAuAGCAAGuACAuuu
173	Экзон Scn9a Sa 14_T7	ACAuuuuuGAuuCCuCAGuCA
174	Экзон Scn9a Sa 14_T8	AuuuGCACACAAuuCuuGAuC
175	Экзон Scn9a Sa 14_T9	AAAGuGuAuCuAuuuuAuuGuA
176	Экзон Scn9a Sa 14_T10	uACAuAuuuuAGAuACACuuu
177	Экзон Scn9a Sa 15_T1	AAuGGuAuuAAAACuGAuuGCC
178	Экзон Scn9a Sa 15_T2	AuAuGAGuAuuuCCAAGuAGGC
19	Экзон Scn9a Sa 15_T3	AAACuGAuuGCCAuGGAuCCAu
179	Экзон Scn9a Sa 15_T4	ACCuuAGuuuAuGuuuACCAGu
180	Экзон Scn9a Sa 15_T5	CAGCCuACuuGGAAuACuCAu
181	Экзон Scn9a Sa 15_T6	GAGCuCuuuCuAGCAGAuGuGG
182	Экзон Scn9a Sa 15_T7	uuuuuCuCACuuAGGuCuuuAC

**Таблица 3: Названия и последовательности направляющих РНК SpCas9, нацеленных на ген SCN10A (Nav1,8)**

<b>нРНК Nav1.8 SpCas9</b>		
<b>SEQ ID NO:</b>	<b>Название нРНК</b>	<b>спейсерная последовательность (5'-3')</b>
183	Экзон Scn10a Sp 1_T2	GACGGAAGuuGuuAGuuuCG
184	Экзон Scn10a Sp 1_T3	CAACuuCCGuCGCuuuACuC
185	Экзон Scn10a Sp 1_T4	uCGCuuuACuCCGGAGuCAC
186	Экзон Scn10a Sp 1_T5	GAACGGAuCuAGAuCCuCCA
187	Экзон Scn10a Sp 1_T6	ACGGAAGuuGuuAGuuuCGA
188	Экзон Scn10a Sp 1_T7	AACGGAuCuAGAuCCuCCAG
189	Экзон Scn10a Sp 1_T8	AGAACGGAuCuAGAuCCuCC
190	Экзон Scn10a Sp 1_T9	GuGACuCCGGAGuAAAGCGA
191	Экзон Scn10a Sp 1_T10	uuAGuuuCGAGGGAuCCAu
192	Экзон Scn10a Sp 1_T11	GuuAGuuuCGAGGGAuCCA
193	Экзон Scn10a Sp 1_T12	GGCuCCCCGAuCAGuuCuGC
194	Экзон Scn10a Sp 1_T14	uAGuuuCGAGGGAuCCAuG
21	Экзон Scn10a Sp 1_T15	GCuCCCCGAuCAGuuCuGCu
195	Экзон Scn10a Sp 1_T16	GCuCCCAGCAGAACuGAuCG
28	Экзон Scn10a Sp 1_T17	AuCCGuuCuACAGCACACAC
196	Экзон Scn10a Sp 1_T18	ACCCGGuGuGuGCuGuAGAA
197	Экзон Scn10a Sp 1_T19	AGAACuGAuCGGGGAGCCCC
198	Экзон Scn10a Sp 1_T20	uCCGuuCuACAGCACACACC
199	Экзон Scn10a Sp 1_T21	CuuuACuCCGGAGuCACuGG
200	Экзон Scn10a Sp 1_T22	CACCAuAGAACuuGGGCAGC
201	Экзон Scn10a Sp 1_T23	uGGGAGCuCACCAuAGAACu
202	Экзон Scn10a Sp 1_T24	ACuGAuCGGGGAGCCCCuGG
203	Экзон Scn10a Sp 1_T25	AACCAGCuGCCCAAGuuCuA
204	Экзон Scn10a Sp 1_T26	GAACuuGGGCAGCuGGuuGC
205	Экзон Scn10a Sp 1_T27	GAAGCAAuuGCuGCCAAGC
206	Экзон Scn10a Sp 1_T28	uCuAuCuCCACCAGuGACuC
207	Экзон Scn10a Sp 1_T29	GGGGCCGAGGCuuCuCuuCu
26	Экзон Scn10a Sp 1_T30	GAGCuCCCAGCAGAACuGAu
208	Экзон Scn10a Sp 2_T1	GGGCCCGAGuGGCACuAAAC
209	Экзон Scn10a Sp 2_T2	uuCCCGGuuuAGuGCCACuC
210	Экзон Scn10a Sp 2_T3	GGCCCGAGuGGCACuAAACC
211	Экзон Scn10a Sp 2_T4	uuuCCCGGuuuAGuGCCACu

212	Экзон Scn10a Sp 2_T5	uuAGuGCCACuCGGGCCCuG
213	Экзон Scn10a Sp 2_T6	uGAuGGCCGuuCuuCuGAuC
214	Экзон Scn10a Sp 2_T7	GAAuAGCCACAGGGCCCGAG
215	Экзон Scn10a Sp 2_T8	GuuCuuCuGAuCAGGGuuGAA
216	Экзон Scn10a Sp 2_T9	AGuGGCACuAAACCGGGAAA
217	Экзон Scn10a Sp 2_T10	ACAAAGGGAGGACCAuuuCC
218	Экзон Scn10a Sp 4_T1	GGAuuuuAGCGuCAuuACCC
219	Экзон Scn10a Sp 4_T2	uCACGuACCuGAGAGuCCu
219	Экзон Scn10a Sp 4_T3	CAuAGAGAuAuACuCACGCC
220	Экзон Scn10a Sp 4_T4	GCCAGuuCCAAGGAuCuCuC
221	Экзон Scn10a Sp 4_T5	ACCuGAGAGAuCCuuGGAAC
222	Экзон Scn10a Sp 5_T1	GCACAGCAAuAGAuCuCCGu
223	Экзон Scn10a Sp 5_T2	uAAGAACuCuGAAuGuCCGC
224	Экзон Scn10a Sp 5_T3	AuAGAuCuCCGuGGGAuCuC
225	Экзон Scn10a Sp 5_T4	GGCACAGCAAuAGAuCuCCG
226	Экзон Scn10a Sp 6_T2	GGGCCCCACAAuGACCuuC
227	Экзон Scn10a Sp 6_T3	CGCAGGCCuGAAGGuCAuuG
228	Экзон Scn10a Sp 6_T4	GuGGGGCuGCAACuCuCAA
229	Экзон Scn10a Sp 6_T7	GCAGGCCuGAAGGuCAuuGu
230	Экзон Scn10a Sp 6_T8	GGuGGGGCuGCAACuCuCA
231	Экзон Scn10a Sp 6_T9	uCAuCuCCCGCAGGCCuGA
232	Экзон Scn10a Sp 6_T10	GAAGAGuuGCAGCCCCACCA
233	Экзон Scn10a Sp 7_T1	GACCCCuACuGuGuGGCAA
234	Экзон Scn10a Sp 7_T2	AGAuCCAuuGCCACACAGuA
235	Экзон Scn10a Sp 7_T3	uGuGGCAAuGGAuCuGACuC
236	Экзон Scn10a Sp 7_T4	GuGGCAAuGGAuCuGACuCA
237	Экзон Scn10a Sp 7_T5	GAuCCAuuGCCACACAGuAA
25	Экзон Scn10a Sp 7_T6	ACuuCuGACCCCuACuGuG
238	Экзон Scn10a Sp 7_T7	AuCCAuuGCCACACAGuAAG
239	Экзон Scn10a Sp 8_T1	ACuGuuCCGCCuCAuGACAC
240	Экзон Scn10a Sp 8_T2	CuGGGAACGCCuCuACCAGC
241	Экзон Scn10a Sp 8_T3	CCGGGuuGuCAGAAGuuuuA
242	Экзон Scn10a Sp 8_T4	GCCuCAuGACACAGGAuuCC
243	Экзон Scn10a Sp 8_T5	AGCuCAGuACCuGCuGGuAG

244	Экзон Scn10a Sp 8_T6	uuAAGGCAGAuAuAACCAuC
245	Экзон Scn10a Sp 8_T7	AAGCuGGuGuAGuuAAAAuC
246	Экзон Scn10a Sp 8_T8	uCAuGAGGCGGAACAGuGAG
247	Экзон Scn10a Sp 8_T9	CCuuAAAACuuCuGACAACC
248	Экзон Scn10a Sp 8_T10	GAAuGCAGCuCAGuACCuGC
249	Экзон Scn10a Sp 9_T1	GGCCCuCGAGAuGCuCCGGA
22	Экзон Scn10a Sp 9_T2	uGuAGuCACCAuGGCGuAuG
250	Экзон Scn10a Sp 9_T3	GuuCuGCuCCuCAuACGCCA
251	Экзон Scn10a Sp 9_T4	CuCCuuCCGGAGCAuCuCGA
252	Экзон Scn10a Sp 9_T5	CuACCuGGuCAACuuGAuCu
253	Экзон Scn10a Sp 9_T6	GCuCCuuCCGGAGCAuCuCG
254	Экзон Scn10a Sp 9_T7	CGAGAuGCuCCGGAAGGAGC
255	Экзон Scn10a Sp 9_T8	AGGAGGCCCuCGAGAuGCuC
256	Экзон Scn10a Sp 9_T9	uuuGuGCuCGuAAuCuCCu
257	Экзон Scn10a Sp 9_T10	GGAGCAuCuCGAGGGCCuCC
258	Экзон Scn10a Sp 9_T11	GGCGuAuGAGGAGCAGAACC
259	Экзон Scn10a Sp 9_T12	uuuuGuGCuCGuAAuCuCC
260	Экзон Scn10a Sp 9_T13	uGACCAGGuAGAAAGAuCCC
261	Экзон Scn10a Sp 9_T14	GAuCuuGGCuGuAGuACCA
262	Экзон Scn10a Sp 10_T1	ACCAuCCuGCGCuGGuuGuA
263	Экзон Scn10a Sp 10_T2	CuGAuCCuuACAACCAGCGC
30	Экзон Scn10a Sp 10_T3	CGCAGGuGCuAGCAGCACuA
264	Экзон Scn10a Sp 10_T4	uCGCAGGuGCuAGCAGCACu
265	Экзон Scn10a Sp 10_T5	GGuuAAAGGuGAuCCAuuGu
266	Экзон Scn10a Sp 10_T6	AGCCuCuACCuCuGCGC
24	Экзон Scn10a Sp 10_T7	uCCuuACAACCAGCGCAGGA
267	Экзон Scn10a Sp 10_T9	AGGuuAAAGGuGAuCCAuuG
268	Экзон Scn10a Sp 10_T10	uGGuuGuAAGGAuCAGAGCG
269	Экзон Scn10a Sp 10_T13	GuGGAGCCCuCuGACACuCu
270	Экзон Scn10a Sp 11_T1	GCuCACuAGuGGCGGGCGGu
271	Экзон Scn10a Sp 11_T2	GGAAAACGCCGGGCuAGuCA
272	Экзон Scn10a Sp 11_T3	ACuAGCCCGGCuuuuCCAG
273	Экзон Scn10a Sp 11_T4	ACCGAGACuCGACAGCuCC
274	Экзон Scn10a Sp 11_T5	CCCGGCuuuuCCAGAGGCG

275	Экзон Scn10a Sp 11_T6	GAGAGCCCCGAuGGCuuuCG
276	Экзон Scn10a Sp 11_T7	CGAuGGCuuuCGuGGuCuCC
497	Экзон Scn10a Sp 11_T8	GCAAGCuCACuAGuGGGCGG
277	Экзон Scn10a Sp 11_T9	CCuCGCCuCuGGAAAACGCC
27	Экзон Scn10a Sp 11_T10	CCGAGACAuCGACAGCuCCA
278	Экзон Scn10a Sp 11_T11	CGAGACAuCGACAGCuCCAG
279	Экзон Scn10a Sp 11_T12	GCCuCGCCuCuGGAAAACGC
280	Экзон Scn10a Sp 11_T13	GGGAGuGAGAuAuCuCGGCC
281	Экзон Scn10a Sp 11_T14	GGAGACCACGAAAGCCAuCG
282	Экзон Scn10a Sp 11_T15	CGAGAuAuCuCACuCCCuGA
283	Экзон Scn10a Sp 11_T16	CCCACuAGuGAGCuuGCCCC
284	Экзон Scn10a Sp 11_T17	CCAGGGGCAAGCuCACuAGu
285	Экзон Scn10a Sp 11_T18	GAGuGAGAuAuCuCGGCCAG
286	Экзон Scn10a Sp 11_T19	CCGAGAuAuCuCACuCCCuG
287	Экзон Scn10a Sp 11_T20	CuCGGCCAGGGGACCGGAAA
288	Экзон Scn10a Sp 11_T21	AGAuAuCuCGGCCAGGGGAC
289	Экзон Scn10a Sp 11_T22	GuGuuCCAuuuCCGuCCCC
290	Экзон Scn10a Sp 11_T23	uCCAGGGGCAAGCuCACuAG
291	Экзон Scn10a Sp 11_T24	GGGGCAAGCuCACuAGuGGG
292	Экзон Scn10a Sp 11_T25	GGAGuGAGAuAuCuCGGCCA
293	Экзон Scn10a Sp 11_T26	uGGAGACCACGAAAGCCAuC
294	Экзон Scn10a Sp 11_T27	GGCGAGGCCuAGAAAAGACu
295	Экзон Scn10a Sp 11_T28	CCCuGGAGCuGuCGAuGuCu
296	Экзон Scn10a Sp 11_T29	CuGGAGACCACGAAAGCCAu
297	Экзон Scn10a Sp 11_T30	uCuuuuCuAGGCCuCGCCuC
298	Экзон Scn10a Sp 11_T31	AGGCGAGGCCuAGAAAAGAC
299	Экзон Scn10a Sp 11_T32	CCuCAGGGAGuGAGAuAuCu
300	Экзон Scn10a Sp 11_T33	GuuGAGGAAGAGGGCuCuA
301	Экзон Scn10a Sp 11_T34	uuCuAGGGAGGGGGCCuuGC
302	Экзон Scn10a Sp 12_T1	uCuCAACAGGCAuuCGAuGC
303	Экзон Scn10a Sp 12_T2	AuGAACCuuuCCGGGCCCAA
304	Экзон Scn10a Sp 12_T3	GCACuuACCCuCAAGGACGG
305	Экзон Scn10a Sp 12_T4	uAuCAuAACCuCCGuCCuuG
306	Экзон Scn10a Sp 12_T5	uGAACCuuuCCGGGCCCAA

307	Экзон Scn10a Sp 12_T6	AuCAuAACCuCCGuCCuuGA
308	Экзон Scn10a Sp 12_T7	AuuGCCCuuuGGGCCCGGAA
309	Экзон Scn10a Sp 12_T8	GuGAGCAGCACuuACCCuCA
310	Экзон Scn10a Sp 12_T9	GCAGCACuuACCCuCAAGGA
311	Экзон Scn10a Sp 12_T10	CACuCAuuGCCCuuuGGGCC
312	Экзон Scn10a Sp 12_T12	GACAACACuCAuuGCCCuuu
313	Экзон Scn10a Sp 12_T13	AuACuuAGAuGAACCuuuCC
314	Экзон Scn10a Sp 12_T14	uGACAACACuCAuuGCCCu
315	Экзон Scn10a Sp 13_T1	CACuCACGAuGuuGCCuAuC
316	Экзон Scn10a Sp 13_T4	uuCGAAGCCAuGCuCCAGAu
317	Экзон Scn10a Sp 13_T5	CACCAuCACCuGuGCAuCG
318	Экзон Scn10a Sp 13_T6	ACACuAuAAuGCAGAACuCG
319	Экзон Scn10a Sp 13_T8	CACCACGAuGCACAAGGuGA
320	Экзон Scn10a Sp 13_T9	CGuGGuGAACACCAuCuCA
321	Экзон Scn10a Sp 13_T10	GGAGCAuGGCuCGAAGGuA
322	Экзон Scn10a Sp 13_T11	uAuCuGGAGCAuGGCuCGA
323	Экзон Scn10a Sp 13_T12	uGGAGCAuGGCuCGAAGGu
324	Экзон Scn10a Sp 13_T13	CGAAGGuAGGGCuCAuGCCA
325	Экзон Scn10a Sp 13_T14	GGuGuuCACCACGAuGCACA
326	Экзон Scn10a Sp 13_T15	ACAAGCuGGuCAAGCAGGGu
327	Экзон Scn10a Sp 13_T16	GAuGuuGCCuAuCuGGAGCA
328	Экзон Scn10a Sp 13_T17	uuCAuGGCCAuGGAGCACCA
329	Экзон Scn10a Sp 13_T18	uCuuGAGCuCACCCACAuG
330	Экзон Scn10a Sp 13_T19	CuGGGAuuGCuGCCCCAuGu
331	Экзон Scn10a Sp 13_T20	uGuCuuGAGCuCACCCACA
332	Экзон Scn10a Sp 13_T21	GuGAuGGuGAGCuCuGCAA
333	Экзон Scn10a Sp 13_T22	GGuGAuGGuGAGCuCuGCAA
334	Экзон Scn10a Sp 14_T1	uGuGCuGCGGAGCuCCGCu
335	Экзон Scn10a Sp 14_T2	GAAuAAuAGuAuGGGuCGA
23	Экзон Scn10a Sp 14_T3	GGAAGCuCCGCAGCACAGAC
336	Экзон Scn10a Sp 14_T4	ACuGuGAGuCuGCuAGAGCu
337	Экзон Scn10a Sp 14_T5	CACuGuGAGuCuGCuAGAGC

**Таблица 4: Названия и последовательности направляющих РНК SaCas9, нацеленных на ген SCN10A (Nav1,8)**

<b>нРНК Nav1.8 SaCas9</b>		
<b>SEQ ID NO:</b>	<b>Название нРНК</b>	<b>спейсерная последовательность (5'-3')</b>
338	Экзон Scn10a Sa 1_T1	GCGACGGAAGuuGuuAGuuuCG
38	Экзон Scn10a Sa 1_T3	AACAACuuCCGuCGCuuuACuC
339	Экзон Scn10a Sa 1_T4	GuuAGuuuCGAGGGAuCCAAuG
340	Экзон Scn10a Sa 1_T5	CuuACCCGGuGuGuGCuGuAGA
341	Экзон Scn10a Sa 1_T6	AGAACuGAuCGGGGAGCCCuG
32	Экзон Scn10a Sa 1_T7	uAGAuCCGuuCuACAGCACACA
342	Экзон Scn10a Sa 1_T8	uCuCuAuCuCCACCAGuGACuC
343	Экзон Scn10a Sa 1_T9	AAuGAGAAGAuGGAAuuCCCCA
344	Экзон Scn10a Sa 2_T1	AAGGACuGAAuAGCCACAGGGC
345	Экзон Scn10a Sa 2_T2	uCuCuGAuCAGGuuGAAAGGA
346	Экзон Scn10a Sa 3_T1	CuGACCuuCCAGAGAAAuuGA
347	Экзон Scn10a Sa 3_T2	CAuuuuCuCuGGAAGGuCAGu
348	Экзон Scn10a Sa 3_T3	CGAACuGACCuuCCAGAGAAAA
349	Экзон Scn10a Sa 4_T2	CuGGCAAGAGGAuuuuGuCuAA
350	Экзон Scn10a Sa 4_T3	ACGCuAAAuCCAGCCAGuuCC
351	Экзон Scn10a Sa 4_T4	CCuGAGAGAuCCuuGGAACuGG
37	Экзон Scn10a Sa 4_T5	AuuuuAGCGuCAuuACCCuGGC
352	Экзон Scn10a Sa 4_T7	GCCuuGAuAAAGAuACuGGCAA
353	Экзон Scn10a Sa 5_T1	uuGGCACAGCAAuAGAuCuCCG
354	Экзон Scn10a Sa 5_T2	GGAuCuCAGGCCuGCGGACuu
355	Экзон Scn10a Sa 5_T4	uGuuuuuAAuGCuCuAAGAACu
356	Экзон Scn10a Sa 6_T1	CuCCACuCACGuuuuCuGuGAG
357	Экзон Scn10a Sa 6_T3	AAACACuuAGGCAGAAGAuGGu
358	Экзон Scn10a Sa 6_T4	CAuCAGCCAGuuuCuuCACuGA
359	Экзон Scn10a Sa 6_T5	AACuACuCAuCuCACAGAAAAC
360	Экзон Scn10a Sa 6_T6	GuCACAuCAGCCAGuuuCuUCA
361	Экзон Scn10a Sa 6_T7	CAACCuCAAAAuAAuGuGuC
362	Экзон Scn10a Sa 6_T8	uuuAuuuuuGAGGuuGCCCuG
363	Экзон Scn10a Sa 7_T2	uCAGAuCCAuuGCCACACAGuA
364	Экзон Scn10a Sa 7_T3	CuGuGuGGCAAuGGAuCuGACu
365	Экзон Scn10a Sa 7_T4	GuGGCAAuGGAuCuGACuCAGG
366	Экзон Scn10a Sa 7_T5	uCuGACCCCuACuGuGuGGCA

367	Экзон Scn10a Sa 8_T1	ACCuGCuGGuAGAGGCGuuCCC
368	Экзон Scn10a Sa 8_T2	CuCACuGuuCCGCCuCAuGACA
369	Экзон Scn10a Sa 8_T3	CuGCCuuAAAACuuCuGACAAC
370	Экзон Scn10a Sa 8_T4	uCAAAGCuGGuGuAGuuAAAu
33	Экзон Scn10a Sa 8_T5	AGuGAGAGGAAAGCCCAAGCAA
371	Экзон Scn10a Sa 9_T1	uuuuuuGuGCuCGuAAuCuCC
372	Экзон Scn10a Sa 9_T3	uAuAGAuuuuCCCAGAAGuCCu
373	Экзон Scn10a Sa 10_T1	GCuCuGAuCCuuACAACCAGCG
374	Экзон Scn10a Sa 10_T2	CuuCGCAGGuGCuAGCAGCACu
375	Экзон Scn10a Sa 10_T3	CuuACCAuCCuGCGCuGGuuGu
376	Экзон Scn10a Sa 10_T4	GCGCuGGuuGuAAGGAuCAGAG
377	Экзон Scn10a Sa 10_T5	ACAACCuCuCuCCACuCCCACA
378	Экзон Scn10a Sa 10_T6	GAGGuuAAAGGuGAuCCAuuGu
379	Экзон Scn10a Sa 10_T7	AGAGAAGGCuAGAAuAAAGCC
380	Экзон Scn10a Sa 10_T8	AAAuGCCAGuGAGAGAAGGCA
31	Экзон Scn10a Sa 11_T1	CCCuGGAGCuGuCGAuGuCuCG
39	Экзон Scn10a Sa 11_T2	GCCGAGAuAuCuCACuCCCuGA
381	Экзон Scn10a Sa 11_T3	AAGCCAuCGGGGCuCuCuGCuG
382	Экзон Scn10a Sa 11_T4	uCCAuCAuCuGuGACuCCCuCA
40	Экзон Scn10a Sa 11_T5	uGGuGuuCAuCuCuCCAuGCC
383	Экзон Scn10a Sa 11_T7	uCGGGGCuCuCuGCuGCuGGGu
384	Экзон Scn10a Sa 11_T8	uCCAuGCCuGGAGuCAGGGuuG
385	Экзон Scn10a Sa 11_T9	uCCCuGAGGGAGuCACAGAuGA
386	Экзон Scn10a Sa 11_T10	uCAuCuCuCCAuGCCuGGAGu
387	Экзон Scn10a Sa 12_T1	CAGuAuCAuAACCuCCGuCCuu
34	Экзон Scn10a Sa 12_T2	ACCuuuCCGGGCCCAAAGGGCA
388	Экзон Scn10a Sa 12_T4	GAAAGuCuCuuuuGuCCuGCA
389	Экзон Scn10a Sa 12_T5	CAAAAGAAGACuuuCuGuCAG
390	Экзон Scn10a Sa 13_T1	CCACACuAuAAuGCAGAACuCG
391	Экзон Scn10a Sa 13_T2	CAuGCuCCAGAuAGGCAACAuC
392	Экзон Scn10a Sa 13_T3	AGGGAuCCGuCACAAGCCCAA
393	Экзон Scn10a Sa 13_T4	uGAuCuGGGAuuGCuGCCCAu
394	Экзон Scn10a Sa 13_T5	CuuGuCuCAGAAGuAuCuGAuC
395	Экзон Scn10a Sa 13_T6	GACAAuuCuCuuuGGGCuuGuG

396	Экзон Scn10a Sa 13_T7	CuuCuGAGACAAGCuGGuCAAG
397	Экзон Scn10a Sa 13_T8	AAGGuGAuGGuGAGCuCuGCAA
398	Экзон Scn10a Sa 13_T9	uGGGCACuuCuGuuCAGACuCC
35	Экзон Scn10a Sa 14_T1	CuuuGACuGCAuCAuCGuCACu
36	Экзон Scn10a Sa 14_T2	CACuuCuuCuGGAAuAAuAGu
399	Экзон Scn10a Sa 14_T3	GuAAAAAuAuGGuAAAGACCu
400	Экзон Scn10a Sa 14_T4	AuACuAuuAuuuCCAGAAGAAG

**Таблица 5: Названия, последовательности и целевые экзоны праймеров, использованных для анализа секвенирования CRISPR-опосредованного редактирование гена SCN9A (Nav1.7)**

Праймеры NGS Nav1.7			
SEQ ID NO:	Праймер	Последовательность	Экзон
401	Nav1-7-Экзон-2-1-NGS-F1	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCATCCAGGCCTCTTATGTGAGGAG	2-1
402	Nav1-7-Экзон-2-1-NGS-R1	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGATAGATGAAGGGCAGCTGTTTGC	
403	Nav1-7-Экзон-2-2-NGS-F1	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTGAACAACGCATTGCTGAAAGA	2-2
404	Nav1-7-Экзон-2-2-NGS-R1	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTTTTTATACAGAAGGAAGCCAACAG	
405	Nav1-7-Экзон-3-NGS-F2	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGAAGCTGCTGATATTGATGTGAAAAA	3
406	Nav1-7-Экзон-3-NGS-R2	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGAAAATAGCAAAAATTACACCATAAAGT	
407	Nav1-7-Экзон-4-NGS-F2	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTCCCTCAAATATTTCAAATTCCCCTGT	4
408	Nav1-7-Экзон-4-NGS-R2	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTCCCCATCTTCATAAATGCAGTAAC	
409	Nav1-7-Экзон-5-NGS-F1	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGAAAGATTTACATGGTGGTTGTATTCTT	5
410	Nav1-7-Экзон-5-NGS-R1	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCTGTGCTGCCTGAGATTTTCAT	
411	Nav1-7-Экзон-6-NGS-F2	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGAGCCCCAAACGTAGAAAATACCT	6

412	Nav1-7-ЭкзоH-6-NGS-R2	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAAGAGA CAGCTCCCAAATAGTTGGAGTTATGAGT	
413	Nav1-7-ЭкзоH-7-1-NGS-F2	TCGTCCGCAGCGTCAGATGTGTATAAAGAGAC AGGTTTCGATTCAGAGGCTTTATGTC	7-1
414	Nav1-7-ЭкзоH-7-1-NGS-R2	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAAGAGA CAGCTCTCTAGGGTATTCATTATGCTTTCT	
415	Nav1-7-ЭкзоH-7-2-NGS-F2	TCGTCCGCAGCGTCAGATGTGTATAAAGAGAC AGGAAGCTTTCTGATGTCATGATCC	7-2
416	Nav1-7-ЭкзоH-7-2-NGS-R2	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAAGAGA CAGGCAACATTCATTATTAAGAGAGCA	
417	Nav1-7-ЭкзоH-8-NGS-F1	TCGTCCGCAGCGTCAGATGTGTATAAAGAGAC AGGGACCAGGCCTGAATTTGTAG	8
418	Nav1-7-ЭкзоH-8-NGS-R1	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAAGAGA CAGTTTGCAAACACTGACTGAACATTCT	
419	Nav1-7-ЭкзоH-9-NGS-F3	TCGTCCGCAGCGTCAGATGTGTATAAAGAGAC AGGTCCTGAAGACACTCTCACCT	9
420	Nav1-7-ЭкзоH-9-NGS-R3	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAAGAGA CAGCAGGCTCTTAACATACACCAGG	
421	Nav1-7-ЭкзоH-10-1-NGS-F1	TCGTCCGCAGCGTCAGATGTGTATAAAGAGAC AGTGCTCATGCCTGTCAAATTGAAATA	10-1
422	Nav1-7-ЭкзоH-10-1-NGS-R1	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAAGAGA CAGACATCTGTTGAAATTCTAATTCTTTCTGT	
423	Nav1-7-ЭкзоH-10-2-NGS-F4	TCGTCCGCAGCGTCAGATGTGTATAAAGAGAC AGCTAGACGCTGCGTGCTGCT	10-2
424	Nav1-7-ЭкзоH-10-2-NGS-R4	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAAGAGA CAGAAGGCCAAGCATATACCGCAGA	
425	Nav1-7-ЭкзоH-11-1-NGS-F3	TCGTCCGCAGCGTCAGATGTGTATAAAGAGAC AGATGTCCTGTCCTAGGGTTTCCT	11-1
426	Nav1-7-ЭкзоH-11-1-NGS-R3	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAAGAGA CAGTCAGCATCTCCCTTTTCCTCTC	
427	Nav1-7-ЭкзоH-11-2-NGS-F1	TCGTCCGCAGCGTCAGATGTGTATAAAGAGAC AGGGCAGCGGCTGAATATACAAGT	11-2
428	Nav1-7-ЭкзоH-11-2-NGS-R1	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAAGAGA CAGCTCGCCTATGCCCTTCGAC	

429	Nav1-7- Экзон11-3- NGS-F3	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGAC AGAGAATCAAAGAAGCTCTCCAGTG	11-3
430	Nav1-7- Экзон11-3- NGS-R3	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGA CAGTCACTCACTATCCTCTCCCGA	
431	Nav1-7- Экзон12-1- NGS-F6	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGAC AGAGTGTACTTCTATCAGTAGGTGCTT	12-1
432	Nav1-7- Экзон12-1- NGS-R6	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGA CAGGACCTACTGGCTTGGCTGAT	
433	Nav1-7-Экзон- 12-2-NGS-F2	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGAC AGAAGCAGCAGAACAAGTCTTTTAGTT	12-2
434	Nav1-7-Экзон- 12-2-NGS-R2	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGA CAGACCAGGGAGACCACACCGT	
435	Nav1-7- Экзон12-3- NGS-F6	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGAC AGACAGCATTTTTGGAGACAATGAGA	12-3
436	Nav1-7- Экзон12-3- NGS-R6	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGA CAGATGCCTGAGCTATGTAAAACGTC	
437	Nav1-7-Экзон- 13-1-NGS-F1	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGAC AGCCCAGCAATCTAGGCTCTACT	13-1
438	Nav1-7-Экзон- 13-1-NGS-R1	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGA CAGCCTTCCACAGTGTTTGTAAATATGC	
439	Nav1-7-Экзон- 13-2-NGS-F4	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGAC AGTCAAATACACAAGAAAAGGCGTTG	13-2
440	Nav1-7-Экзон- 13-2-NGS-R4	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGA CAGACAATTCCATCAGTATCCATTGGT	
441	Nav1-7-Экзон- 14-1-NGS-F1	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGAC AGGGTTAGGAGTGAAACAGACAAATGG	14-1
442	Nav1-7-Экзон- 14-1-NGS-R1	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGA CAGTGGTGTTCCATAGCCATAAATAATGTG	

443	Nav1-7-Экзон-14-2-NGS-F2	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGAC AGTCTTGATCTGGAATTGCTCTCCAT	14-2
444	Nav1-7-Экзон-14-2-NGS-R2	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGA CAGACAATGATGACAАCTАААААGAGAAAC T	
445	Nav1-7-Экзон-15-1-NGS-F2	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGAC AGATCATTGTGTTGATTTCCCTGTTTTCT	15-1
446	Nav1-7-Экзон-15-1-NGS-R2	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGA CAGCCAGTCTGAATGATCGCAGAAC	
447	Nav1-7-Экзон-15-2-NGS-F2	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGAC AGTGCAGCTGAAATGGTATTAАААCTGA	15-2
448	Nav1-7-Экзон-15-2-NGS-R2	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGA CAGTGCAAAACCAAGAAATACCCCTT	

**Таблица 6: Названия, последовательности и целевые экзоны праймеров, использованных для анализа секвенирования CRISPR-опосредованного редактирования гена SCN10A (Nav1.8)**

<b>Праймеры NGS Nav1.8</b>			
<b>SEQ ID NO:</b>	<b>Праймер</b>	<b>Последовательность</b>	<b>Экзон</b>
449	Nav1-8-Экзон-1-1-NGS-F4	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGA GACAGGCTGTCACCTCTCTGTGGTT	1-1
450	Nav1-8-Экзон-1-1-NGS-R4	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAG AGACAGTAGAACTTGGGCAGCTGGTT	
451	Nav1-8-Экзон-1-2-NGS-F1	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGA GACAGCCAAGCAGGGAACAAAGAAA	1-2
452	Nav1-8-Экзон-1-2-NGS-R1	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAG AGACAGCCGAGACTTCCTCTCCAAGA	
453	Nav1-8-Экзон-2-1-NGS-F3	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGA GACAGGCCTGAGATAATGCCTCTCATGT	2
454	Nav1-8-Экзон-2-1-NGS-R3	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAG AGACAGACTGGACACAGTAGGCAAGG	
455	Nav1-8-Экзон-3-1-NGS-F1	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGA GACAGTGTAATCATTCAAGCATCAAGGTG	3
456	Nav1-8-Экзон-3-1-NGS-R1	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAG AGACAGACAAAGACTGCCAAGTGAAGGA	

457	Nav1-8-Экзон-4-1-NGS-F3	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGA GACAGCATCCCTCCCTCCTGGAAGA	4
458	Nav1-8-Экзон-4-1-NGS-R3	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAG AGACAGCCCCTCTCCTATCACACATGC	
459	Nav1-8-Экзон-5-1-NGS-F3	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGA GACAGAGGCTAATGATACCCCAAGT	5
460	Nav1-8-Экзон-5-1-NGS-R3	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAG AGACAGAGTCTTTGCCCTGGAACCTT	
461	Nav1-8-Экзон-6-1-NGS-F4	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGA GACAGGTGTGCTCCGTGTGTGCTAC	6-1
462	Nav1-8-Экзон-6-1-NGS-R4	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAG AGACAGAACCAGACCTTGGTCCCTATG	
463	Nav1-8-Экзон-6-2-NGS-F4	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGA GACAGCTTCAAGGGCAACCTCAAAA	6-2
464	Nav1-8-Экзон-6-2-NGS-R4	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAG AGACAGATTTCCCTTGCAAGAGGGATG	
465	Nav1-8-Экзон-7-1-NGS-F1	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGA GACAGATTGCATTCACCACACAAGG	7
466	Nav1-8-Экзон-7-1-NGS-R1	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAG AGACAGATGCCAAGGACAAGATGGAG	
467	Nav1-8-Экзон-8-1-NGS-F1	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGA GACAGTGGGCTACCTTGTCTGCAAT	8
468	Nav1-8-Экзон-8-1-NGS-R1	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAG AGACAGAGCCTCCAACCAAGTCTGC	
469	Nav1-8-Экзон-9-1-NGS-F2	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGA GACAGCCTGGAGGAGGCTGACTTAAA	9-1
470	Nav1-8-Экзон-9-1-NGS-R2	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAG AGACAGAGGGCCTCCTGGAACCTTCTT	
471	Nav1-8-Экзон-9-2-NGS-F4	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGA GACAGTGCAGACCCTGAGGACTTCT	9-2
472	Nav1-8-Экзон-9-2-NGS-R4	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAG AGACAGTGGACAGTCTGCAACCTTCT	
473	Nav1-8-Экзон-10-1-NGS-F5	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGA GACAGTCATGCTAAGTCCAAGCAAATAC	10

		T	
474	Nav1-8-Экзон-10-1-NGS-R5	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAG AGACAGGCAGCTGCAATGGTGGGTAA	
475	Nav1-8-Экзон-11-1-NGS-F6	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGA GACAGTTCCAGCCTTCTTGCTCCTTT	11-1
476	Nav1-8-Экзон-11-1-NGS-R6	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAG AGACAGAGTCAGGGTTGCTGGGTGA	
477	Nav1-8-Экзон-11-2-NGS-F3	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGA GACAGCCCTGAGGGAGTCACAGATG	11-2
478	Nav1-8-Экзон-11-2-NGS-R3	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAG AGACAGGCTCAAGGCTTCTAGGTGGA	
479	Nav1-8-Экзон-12-1-NGS-F2	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGA GACAGTTTGCCATGAAGATGTCAGG	12
480	Nav1-8-Экзон-12-1-NGS-R2	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAG AGACAGTGCTCACATGGGAATTCATC	
481	Nav1-8-Экзон-13-1-NGS-F2	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGA GACAGAGAGGATGACCGCAGAATTG	13-1
482	Nav1-8-Экзон-13-1-NGS-R2	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAG AGACAGATGCACAAGGTGATGGTGAG	
483	Nav1-8-Экзон-13-2-NGS-F4	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGA GACAGCTTGACCAGCTTGTCTCAGAAG	13-2
484	Nav1-8-Экзон-13-2-NGS-R4	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAG AGACAGACTGCACCCTGCCATCAT	
485	Nav1-8-Экзон-14-1-NGS-F1	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGA GACAGACCCACAGATCCCCTGT	14-1
486	Nav1-8-Экзон-14-1-NGS-R1	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAG AGACAGCACAGACAGGCTTCCCTTCTT	
487	Nav1-8-Экзон-14-2-NGS-F1	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGA GACAGTGCTGAAATGGTCTTCAAAATC	14-2
488	Nav1-8-Экзон-14-2-NGS-R1	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAG AGACAGTGAATCTGGGTGGGAGTTTC	

**Таблица 7: Общий список из 1471 предполагаемых внецелевых сайтов, предсказанных по 40 генам**

Хром	Начало	Конец	Хро	Начало	Конец	Хро	Начало	Конец
------	--------	-------	-----	--------	-------	-----	--------	-------

			<b>M</b>			<b>M</b>		<b>И</b>
chr1	1016738 62	10167388 3	chr6	81389456	81389478	chr8	18547775	18547 797
chr1	1812635 39	18126356 0	chr7	11688543 4	11688545 6	chr9	12139899 8	12139 9019
chr1	2300606 85	23006070 6	chr8	10116376 0	10116378 2	chr9	90536880	90536 903
chr1	5721288 8	57212911	chr8	10204003 7	10204005 8	chrX	15457563 0	15457 5653
chr10	1299628 74	12996289 5	chr8	32017421	32017443	chrX	15462877 7	15462 8800
chr10	8493568 5	84935706	chr9	13442891 7	13442893 9	chr1	21829898 3	21829 9004
chr10	8530131	8530152	chr9	41739585	41739607	chr1	42210368	42210 390
chr11	1165756 8	11657590	chr9	61575358	61575380	chr1	58885286	58885 307
chr11	1184347 80	11843480 1	chr9	67636882	67636904	chr1	99737182	99737 204
chr11	1976957 9	19769600	chrX	10393234 5	10393236 7	chr10	11943666 0	11943 6681
chr11	4459170 7	44591728	chrX	14968759 3	14968761 5	chr10	78303428	78303 451
chr11	6042070 2	60420725	chrX	77969229	77969250	chr11	10563244 3	10563 2465
chr11	7935635 3	79356374	chrY	17093954	17093976	chr11	49938853	49938 876
chr11	8160551 2	81605533	chr1	10613066 0	10613068 1	chr12	10386349 3	10386 3514
chr12	1187760 61	11877608 2	chr1	17346264	17346285	chr12	92649761	92649 783
chr12	5400074 5	54000768	chr1	19129807 5	19129809 7	chr13	11218510 5	11218 5127
chr12	9563059	95630619	chr1	23689018	23689020	chr13	29354998	29355

	8			7	8			019
chr13	1101805 89	11018061 1	chr1	24488425 1	24488427 2	chr14	56541130	56541 151
chr13	4014871 2	40148733	chr10	79776620	79776641	chr14	63594134	63594 155
chr13	6023963 1	60239653	chr10	87298770	87298791	chr15	79057189	79057 210
chr13	6655837 7	66558400	chr10	87439176	87439197	chr16	1024374	10243 97
chr14	1040817 58	10408178 0	chr11	13356611 9	13356614 1	chr17	57649035	57649 057
chr14	1045509 54	10455097 6	chr11	18269330	18269351	chr2	14236817 9	14236 8200
chr14	7067210 1	70672122	chr11	31057715	31057736	chr2	16628637 1	16628 6393
chr14	7288457 8	72884599	chr11	86679889	86679910	chr20	24803468	24803 489
chr14	7637157 1	76371593	chr13	26095101	26095122	chr20	24803468	24803 490
chr15	7576584 8	75765871	chr13	88051002	88051025	chr20	25276655	25276 676
chr16	5126679 6	51266817	chr15	54619157	54619179	chr20	57304528	57304 551
chr16	6697065 6	66970677	chr16	78175674	78175695	chr20	63700780	63700 801
chr17	3873634 4	38736365	chr16	85698295	85698317	chr3	12181396	12181 417
chr17	5662660	5662682	chr18	4435202	4435223	chr3	12736372 1	12736 3742
chr17	7791463 5	77914656	chr18	63953514	63953535	chr3	73435663	73435 686
chr19	1402163 4	14021656	chr18	75626393	75626414	chr4	14879778 9	14879 7810
chr2	1270922	12709223	chr19	16143760	16143782	chr4	98007120	98007

	15	8						141
chr2	1348219 56	13482197 7	chr19	3636896	3636918	chr5	14178788 4	14178 7905
chr2	1789408 31	17894085 3	chr2	10207363 9	10207366 0	chr5	15563515 6	15563 5177
chr20	2043228 9	20432311	chr2	11118958 0	11118960 1	chr6	10416493 4	10416 4956
chr20	5860133 8	58601359	chr2	15761798	15761820	chr7	13958392 2	13958 3943
chr21	3541046 0	35410482	chr2	17828745 9	17828748 0	chr7	14219374 6	14219 3769
chr22	3995747 3	39957496	chr2	81854796	81854819	chr7	47045289	47045 310
chr3	1193816 54	11938167 6	chr2	96711649	96711670	chr7	99403691	99403 712
chr3	1404313 88	14043140 9	chr20	46241748	46241769	chr9	89919212	89919 233
chr3	3875578 7	38755809	chr20	58037844	58037865	chr9	97393314	97393 335
chr4	1098745 22	10987454 3	chr20	61210620	61210641	chrX	10183797 1	10183 7993
chr4	1359862 89	13598631 0	chr21	31457963	31457984	chrX	10232185 9	10232 1881
chr4	1628884 11	16288843 2	chr3	38771311	38771333	chrX	10236523 4	10236 5256
chr4	9525719 6	95257217	chr3	67894307	67894329	chrX	42045623	42045 644
chr5	9193509 8	91935119	chr5	15057029 2	15057031 3	chrX	95359671	95359 693
chr6	1064307 70	10643079 1	chr5	16351846 9	16351849 1	chr1	10690503 0	10690 5051
chr6	1542678 69	15426789 2	chr6	41702022	41702043	chr1	18736987 1	18736 9893
chr7	1466408	14664107	chr6	42338824	42338847	chr1	21728394	21728

	6						2	3964
chr7	4107813 8	41078159	chr8	13373946 9	13373949 1	chr1	67514969	67514 990
chr7	5675924 8	56759270	chr8	14116077 4	14116079 5	chr1	73958112	73958 133
chr7	6381623 9	63816261	chr8	20158237	20158258	chr10	13197615 4	13197 6175
chr8	1176476 12	11764763 3	chr8	23430667	23430688	chr10	4150457	41504 79
chr8	1966329 5	19663316	chr9	13037190 4	13037192 5	chr10	45658400	45658 421
chr8	2684932 9	26849350	chr9	13674611 4	13674613 5	chr10	54308353	54308 374
chr8	4638928 7	46389309	chr9	31741140	31741162	chr10	86859468	86859 489
chr8	500777	500799	chrX	38085667	38085689	chr10	95305836	95305 858
chr8	6734660 2	67346623	chrX	88090240	88090261	chr12	16683841	16683 862
chr9	1097831 58	10978317 9	chr1	10444611 5	10444613 6	chr12	17604379	17604 400
chr9	1309873 64	13098738 5	chr1	18233240 2	18233242 3	chr12	83263173	83263 195
chr9	1324484 90	13244851 1	chr1	18371021 7	18371023 8	chr16	3841926	38419 47
chr9	3023108	3023129	chr1	20874885 1	20874887 2	chr18	71712771	71712 794
chr9	7092575 5	70925777	chr1	24096980 2	24096982 3	chr2	15544209 3	15544 2116
chr9	7807325 7	78073279	chr1	26574711	26574733	chr2	16628658 5	16628 6607
chrX	1303763 70	13037639 3	chr1	30456582	30456603	chr2	17152865 3	17152 8674
chrX	3965005	39650074	chr1	30777702	30777725	chr2	19830616	19830

	2							637
chrY	6906016	6906037	chr1	37625208	37625231	chr2	20693353 0	20693 3551
chr1	1866599 04	18665992 6	chr1	51905268	51905289	chr2	23224743	23224 764
chr1	2479364 65	24793648 6	chr1	95744205	95744228	chr21	29458589	29458 610
chr10	1055391 51	10553917 2	chr10	10950927 6	10950929 9	chr22	29667158	29667 180
chr10	1127152 2	11271544	chr10	11347618 0	11347620 1	chr3	10331502 8	10331 5050
chr10	1200309 19	12003094 0	chr10	11445375 4	11445377 5	chr3	16140186 0	16140 1882
chr10	1221995 48	12219956 9	chr10	11802025 0	11802027 1	chr3	31354038	31354 059
chr10	2105579 5	21055816	chr10	35888611	35888633	chr4	15996034 3	15996 0364
chr10	4930320 9	49303230	chr10	47483140	47483161	chr5	14029153 5	14029 1557
chr11	1205476 6	12054789	chr10	71103889	71103910	chr5	15434001 7	15434 0038
chr11	1349570 78	13495709 9	chr10	8187525	8187546	chr6	11181111 8	11181 1140
chr11	7202574 5	72025766	chr10	82320936	82320957	chr6	17932393	17932 416
chr12	1193727 84	11937280 7	chr10	97073249	97073270	chr7	24855398	24855 419
chr12	6014827 6	60148297	chr10	99797253	99797275	chr7	98797096	98797 118
chr13	4284819 4	42848215	chr11	10659142 9	10659145 1	chr8	11267056 5	11267 0588
chr13	5838675 2	58386775	chr11	11236972 8	11236975 1	chr8	30460352	30460 373
chr13	7570266	75702682	chr11	11294441	11294463	chr9	26330106	26330

	0							127
chr14	2483597 6	24835997	chr11	23994069	23994092	chr9	86133463	86133 485
chr14	2962351 0	29623531	chr11	29830201	29830222	chrX	14622256 2	14622 2583
chr14	4665345 3	46653475	chr11	35420641	35420662	chrX	17601216	17601 237
chr14	7207960 4	72079627	chr11	61138088	61138110	chrX	56719178	56719 201
chr15	3830757 1	38307592	chr11	69777241	69777264	chr1	16171595 7	16171 5978
chr16	3008675 1	30086772	chr11	72020177	72020198	chr1	18672149 5	18672 1516
chr16	5917934 2	59179363	chr11	72658233	72658256	chr1	19946569 5	19946 5717
chr17	7420394 6	74203967	chr11	84482547	84482568	chr1	23423004 6	23423 0069
chr18	1496414 1	14964162	chr11	96164837	96164860	chr1	24659756 3	24659 7584
chr18	7029644 0	70296462	chr12	10940680 3	10940682 5	chr1	9340847	93408 68
chr19	5589288 5	55892908	chr13	11380984 9	11380987 0	chr10	10135079 3	10135 0816
chr2	2045576 23	20455764 6	chr13	26875905	26875926	chr10	10306676 5	10306 6787
chr2	2138750 62	21387508 3	chr13	27416390	27416411	chr10	49429090	49429 111
chr2	2360943 19	23609434 0	chr13	29693044	29693067	chr11	12731192	12731 214
chr2	8109282 9	81092850	chr13	42970814	42970835	chr11	94300239	94300 262
chr20	3979056 1	39790582	chr14	36801548	36801569	chr12	10524295 0	10524 2971
chr21	2271460	22714621	chr14	59632197	59632218	chr12	12801165	12801

	0						4	1676
chr21	3694518 4	36945207	chr14	91903881	91903902	chr12	30430479	30430 500
chr3	3875676 0	38756782	chr14	98960049	98960070	chr12	88935275	88935 296
chr3	3890908 3	38909105	chr14	99595608	99595630	chr12	89530030	89530 053
chr3	6216042 2	62160443	chr15	10039007 8	10039010 0	chr13	10719332 2	10719 3343
chr4	1156978 1	11569802	chr15	27968205	27968227	chr13	36103807	36103 830
chr4	4596463	4596484	chr15	40289231	40289252	chr14	36905708	36905 731
chr4	8689150 8	86891529	chr15	72631643	72631664	chr14	69696064	69696 087
chr5	1259133 29	12591335 0	chr15	74105587	74105608	chr14	78054812	78054 835
chr5	1526878 65	15268788 8	chr16	28011042	28011063	chr15	23634421	23634 442
chr5	2894163 9	28941660	chr16	28181839	28181860	chr15	63926417	63926 438
chr5	5092828 6	50928307	chr16	4699815	4699837	chr15	82103361	82103 382
chr5	7334757 3	73347594	chr16	60430147	60430169	chr15	94230598	94230 619
chr7	1546626 67	15466268 8	chr16	83976871	83976892	chr16	63947100	63947 121
chr7	1546638 11	15466383 2	chr16	86429392	86429414	chr17	19807664	19807 685
chr7	9097230 9	90972330	chr17	1162115	1162136	chr17	3505544	35055 67
chr7	9885438 5	98854406	chr17	30090056	30090077	chr17	44071718	44071 739
chr8	4121446	41214491	chr17	44854537	44854558	chr17	4995262	49952

	8							83
chr8	4940639 6	49406417	chr17	57642792	57642813	chr18	25386572	25386 593
chr8	5066321 4	50663235	chr18	23235311	23235332	chr18	44666298	44666 319
chr8	5117533 4	51175357	chr18	57527960	57527982	chr18	56303935	56303 956
chr8	6267781 7	62677838	chr18	60250771	60250793	chr18	58118525	58118 546
chr9	2710192 5	27101948	chr18	79942923	79942944	chr18	7237437	72374 58
chr1	1163879 55	11638797 6	chr19	15670796	15670818	chr19	28344658	28344 679
chr1	1417304 5	14173066	chr19	30910106	30910127	chr2	11018267	11018 288
chr1	1557134 14	15571343 5	chr19	45792252	45792273	chr2	14223489 9	14223 4920
chr1	1700967 19	17009674 0	chr19	7898697	7898718	chr2	15769654 7	15769 6570
chr1	1758765 99	17587662 0	chr2	11155155 0	11155157 1	chr2	15894912	15894 935
chr1	2022926 24	20229264 7	chr2	12055454 4	12055456 5	chr2	16628635 4	16628 6376
chr1	2105690 59	21056908 0	chr2	12669136 3	12669138 4	chr2	16973889 7	16973 8918
chr1	5066709 3	50667114	chr2	12669494 8	12669496 9	chr2	17422148 9	17422 1510
chr1	6632977 9	66329800	chr2	18078540 4	18078542 6	chr2	19862548 1	19862 5502
chr1	9120177	9120198	chr2	19119783 6	19119785 8	chr2	21346046 9	21346 0491
chr10	1183392 03	11833922 4	chr2	24075237 6	24075239 7	chr2	21685335 4	21685 3375
chr10	2931870	29318722	chr2	40393626	40393648	chr2	30384729	30384

	1							752
chr10	3060563 3	30605654	chr2	87310047	87310068	chr2	50247269	50247 290
chr10	7825191 3	78251934	chr20	24761423	24761445	chr20	17320938	17320 959
chr10	9089465 8	90894681	chr20	48105588	48105609	chr20	19474376	19474 397
chr10	9240868	9240890	chr20	63206596	63206618	chr20	57549695	57549 717
chr11	1196612 75	11966129 6	chr21	34811774	34811795	chr22	45538244	45538 265
chr11	1223986 18	12239863 9	chr21	37675033	37675056	chr3	10761073	10761 095
chr11	1281534 57	12815347 8	chr22	25084069	25084092	chr3	12219783 9	12219 7860
chr11	3587612 3	35876144	chr22	29716915	29716936	chr3	12443387 0	12443 3891
chr12	1094449 59	10944498 0	chr22	37312013	37312034	chr3	14289323 0	14289 3251
chr12	1141636 96	11416371 9	chr3	11666400 4	11666402 5	chr3	17238587 8	17238 5899
chr12	1147946 12	11479463 4	chr3	16584614 2	16584616 3	chr3	70924914	70924 936
chr12	1529199 6	15292018	chr3	18526885 4	18526887 5	chr3	8723005	87230 26
chr12	2086472 4	20864745	chr3	19220065	19220086	chr3	95332559	95332 580
chr12	2732306 1	27323083	chr3	28603456	28603477	chr3	98072324	98072 345
chr12	8492152 5	84921546	chr3	38793784	38793806	chr4	11106251 4	11106 2535
chr13	1002351 36	10023515 7	chr3	63674978	63675001	chr4	18864625	18864 647
chr13	2176233	21762362	chr4	10649192	10649194	chr4	32279580	32279

	9			4	6			603
chr13	3261849 5	32618517	chr4	11711781 5	11711783 8	chr4	85659807	85659 828
chr13	3377681 9	33776840	chr4	11961661 0	11961663 2	chr5	16926618 0	16926 6203
chr13	4399834 5	43998366	chr4	13921996 0	13921998 3	chr5	17933577 6	17933 5797
chr13	7834104 5	78341066	chr4	18505188 8	18505190 9	chr6	10863829 3	10863 8316
chr15	2585363 8	25853659	chr4	24022746	24022767	chr6	13145365 1	13145 3672
chr15	6248135 4	62481375	chr4	52789300	52789321	chr6	35275738	35275 760
chr15	7487847 5	74878498	chr4	82398573	82398596	chr6	40784617	40784 638
chr16	6607972	6607993	chr4	85087003	85087024	chr6	70439658	70439 680
chr16	6716297	6716318	chr5	10788332 2	10788334 3	chr7	10399530 4	10399 5325
chr17	4106740	4106761	chr5	11192522 0	11192524 1	chr7	11051132 7	11051 1348
chr17	4321612 3	43216145	chr5	14322245 1	14322247 2	chr7	27305711	27305 732
chr17	5032838 0	50328401	chr5	15986692 8	15986694 9	chr7	30322503	30322 524
chr17	6146179 0	61461811	chr5	32666438	32666459	chr7	68363358	68363 380
chr17	8190572 2	81905743	chr5	42894065	42894086	chr7	97668279	97668 302
chr18	7308539 1	73085412	chr5	42899359	42899380	chrX	14049333 8	14049 3359
chr19	2923510 9	29235131	chr5	78720216	78720237	chrX	15614904	15614 926
chr19	4500377	45003802	chr5	8655482	8655503	chrX	30782422	30782

	9							443
chr19	4751167 1	47511692	chr5	9135657	9135678	chrX	31984015	31984 036
chr19	5508514 6	55085169	chr6	11322266 2	11322268 3	chrX	86190344	86190 365
chr2	1092285 16	10922853 9	chr6	11553845 7	11553847 8	chrY	19917588	19917 609
chr2	1425394 67	14253948 8	chr6	31688661	31688684	chr1	17806142 5	17806 1447
chr2	1561449 10	15614493 1	chr6	43831465	43831486	chr1	2402386	24024 07
chr2	1912432 99	19124332 0	chr6	87701119	87701140	chr1	72287683	72287 705
chr2	1961035 56	19610357 9	chr7	10594397	10594418	chr1	76614806	76614 827
chr2	2037870 61	20378708 3	chr7	12619084	12619105	chr1	89901148	89901 169
chr2	2149498 17	21494983 9	chr7	14900302 1	14900304 2	chr10	85000194	85000 215
chr2	2346667 09	23466673 0	chr7	18335788	18335809	chr11	10849126 0	10849 1281
chr2	2817248 3	28172506	chr7	24705842	24705863	chr11	66423974	66423 995
chr2	3057588	3057611	chr7	286530	286551	chr12	71595067	71595 090
chr2	3623282 1	36232842	chr7	36193214	36193235	chr13	69934195	69934 216
chr2	5009890 4	50098926	chr7	38601793	38601814	chr14	66094377	66094 398
chr2	7326565 6	73265678	chr7	47909042	47909063	chr16	14656670	14656 691
chr20	1343227 3	13432295	chr7	748771	748792	chr16	87107991	87108 013
chr20	1844903	18449057	chr8	13605961	13605963	chr17	353076	35309

	6			6	9			7
chr20	2929735 8	29297379	chr8	38318140	38318163	chr19	13768686	13768 707
chr20	3245144 2	32451465	chr8	3984113	3984135	chr2	16628458 0	16628 4602
chr20	3835060 1	38350622	chr9	11380880 5	11380882 6	chr3	10226168	10226 189
chr20	4921759 5	49217616	chr9	11673757 9	11673760 0	chr3	11534389 2	11534 3913
chr20	6426967 2	64269693	chr9	12496083	12496104	chr3	13498363 9	13498 3660
chr21	5738568	5738589	chr9	12932783 7	12932785 8	chr3	17833445 2	17833 4474
chr21	5859152	5859173	chr9	13285864 0	13285866 1	chr3	45909277	45909 299
chr21	7585888	7585909	chr9	8978325	8978346	chr3	73176881	73176 902
chr21	8136638	8136659	chrX	13464557 3	13464559 4	chr4	81742352	81742 373
chr21	8319683	8319704	chrX	24998312	24998335	chr4	8245260	82452 81
chr3	1152083 57	11520838 0	chrX	88238872	88238894	chr5	16806652 7	16806 6548
chr3	1390729 76	13907299 7	chrY	15614017	15614038	chr5	16808591 5	16808 5937
chr3	3015840 7	30158428	chr1	20322387 4	20322389 5	chr5	6207756	62077 78
chr3	3876069 9	38760721	chr1	43604017	43604038	chr6	14948905 7	14948 9079
chr3	5812875 5	58128776	chr10	10716502 7	10716504 8	chr6	15177101 2	15177 1033
chr3	5924742 0	59247441	chr10	3981954	3981975	chr6	15495910 1	15495 9124
chr3	7188920	71889221	chr11	12261472	12261494	chr6	71153933	71153

	0							956
chr3	7535019 5	75350217	chr14 _KI2 7072 5v1_r ando m	28652	28674	chr6	95286431	95286 453
chr4	1293686 96	12936871 7	chr15	20303769	20303791	chr7	15187279 9	15187 2820
chr4	1381311 52	13813117 3	chr15	21149388	21149410	chr8	13529172 7	13529 1748
chr4	1452115 41	14521156 2	chr15	60232485	60232507	chr8	14200261 9	14200 2641
chr4	1754105 98	17541061 9	chr15	62708764	62708787	chr8	22622609	22622 632
chr4	1760128 19	17601284 0	chr15	69844005	69844027	chr8	48402295	48402 317
chr4	2336534 8	23365370	chr16	32301913	32301935	chr8	59391289	59391 312
chr4	8051122	8051143	chr16	32860233	32860255	chr8	74353643	74353 665
chr5	1099365 61	10993658 2	chr16	33508183	33508205	chr9	12721527 8	12721 5301
chr5	1547543 03	15475432 6	chr16	33546176	33546198	chrX	10200023 8	10200 0259
chr5	1729383 72	17293839 3	chr16	34001286	34001308	chrX	11082413 7	11082 4158
chr5	6712337 7	67123398	chr16 _KI2 7072 8v1_r ando m	1122344	1122366	chrX	9484434	94844 57
chr6	1154419	11544199	chr16	1846473	1846495	chrX	95109255	95109

	73	6	_KI2 7072 8v1_r ando m					277
chr6	1286057 20	12860574 1	chr16 _KI2 7072 8v1_r ando m	215852	215874	chr1	16342992 7	16342 9948
chr6	1558259 11	15582593 3	chr18	12089271	12089293	chr1	16816574 1	16816 5762
chr6	2849732 4	28497345	chr18	14172226	14172248	chr1	21839918 3	21839 9204
chr6	3868794 5	38687967	chr19	271964	271985	chr1	22590155 8	22590 1579
chr6	5589047 8	55890501	chr19	29923127	29923148	chr1	23982507 4	23982 5095
chr6	6208990 8	62089929	chr19	39416865	39416886	chr1	24617699 9	24617 7020
chr7	1181198 92	11811991 3	chr2	75306193	75306215	chr1	66367983	66368 005
chr7	1372437 39	13724376 0	chr2	821670	821691	chr10	10579231 0	10579 2331
chr7	1432229 5	14322316	chr20	61883165	61883187	chr10	11969096 5	11969 0986
chr7	1528706 74	15287069 5	chr21	14057110	14057132	chr10	15629626	15629 649
chr7	5533809 5	55338117	chr21	41498789	41498811	chr10	20137117	20137 140
chr7	9118928 9	91189310	chr21	8657234	8657256	chr10	56925205	56925 227
chr8	1185958	11859583	chr22	10634363	10634385	chr10	71769157	71769

	07	0						178
chr8	2192092 6	21920947	chr22	16529314	16529336	chr10	96692195	96692 217
chr8	7133612 4	71336145	chr22	22292514	22292536	chr11	11161353	11161 374
chr8	8444382	8444403	chr3	15476719 0	15476721 1	chr11	16266249	16266 271
chr8	9093737 4	90937396	chr3	38522285	38522306	chr11	41679797	41679 819
chr8	9233491 7	92334939	chr3	38752218	38752240	chr11	91540261	91540 283
chr9	1144507 78	11445079 9	chr3	62350580	62350602	chr12	18730599	18730 622
chr9	1221346 71	12213469 4	chr4	14956253 9	14956256 1	chr12	31779884	31779 905
chr9	3440348 1	34403502	chr4	1547652	1547673	chr12	51699567	51699 588
chr9	7599262 4	75992645	chr4	1735133	1735154	chr12	66038774	66038 795
chrX	1155464 38	11554646 0	chr5	16862796 3	16862798 5	chr12	83661770	83661 791
chrX	5308547 5	53085496	chr5	23795022	23795043	chr13	56206698	56206 720
chrY	2080445 9	20804480	chr6	14250700 7	14250703 0	chr13	92515738	92515 759
chr1	2451254 22	24512544 4	chr6	45418675	45418697	chr13	99930308	99930 329
chr10	9715358 8	97153609	chr7	13555853 4	13555855 5	chr14	10070934 2	10070 9363
chr11	1304056 83	13040570 4	chr8	12404182 2	12404184 3	chr14	60948496	60948 517
chr12	4154224 9	41542270	chr8	14330674 8	14330677 1	chr14	63458373	63458 394
chr15	3340541	33405431	chr8	3193432	3193453	chr14	84372203	84372

	0							224
chr15	6049497 5	60494996	chr8	8236128	8236151	chr14	91094537	91094 558
chr15	7798786 6	77987887	chr9	12769886 0	12769888 2	chr15	21654639	21654 661
chr16	1492492 4	14924945	chr9	40589872	40589894	chr15	22097135	22097 157
chr16	1632357 5	16323596	chr9	63047613	63047635	chr15	72236372	72236 393
chr16	1636357 5	16363596	chr9	63390838	63390860	chr15	99388177	99388 200
chr16	1834507 1	18345092	chr9	64717354	64717376	chr15 _KI2 7072 7v1_r ando m	388891	38891 3
chr16	1838858 5	18388606	chr9	65201663	65201685	chr16	47873889	47873 910
chr16	2112027	2112048	chr9	65820018	65820040	chr17	49809267	49809 289
chr16	5071225 9	50712280	chr9	93336083	93336105	chr17	55088691	55088 714
chr16	8775077 7	87750798	chr9	93515538	93515560	chr17	67339549	67339 570
chr16	8775077 7	87750799	chr9	98612376	98612398	chr18	32630505	32630 528
chr17	7139560	7139583	chrU n_KI 2707 49v1	136081	136103	chr18	51862106	51862 127
chr17	7917344 6	79173467	chrX	13477122 8	13477125 0	chr18	73818723	73818 744
chr19	4119880	41198824	chrY	11438592	11438614	chr19	18493880	18493

	3							902
chr2	1560680 13	15606803 4	chrY	26403323	26403345	chr19	44719395	44719 417
chr2	1565485 81	15654860 2	chr1	11475570 5	11475572 8	chr2	12595275 8	12595 2779
chr2	5417743 4	54177455	chr1	80195820	80195841	chr2	13979991 3	13979 9936
chr20	1521424 8	15214269	chr10	46094875	46094896	chr2	16531032 0	16531 0342
chr20	2460603 1	24606052	chr10	48196282	48196304	chr2	16605197 0	16605 1991
chr20	5008999 1	50090013	chr10	80201966	80201989	chr2	16630328 3	16630 3305
chr22	3958659 9	39586620	chr10	8311347	8311368	chr2	17232344 0	17232 3461
chr3	1558895 42	15588956 3	chr10	95610284	95610306	chr2	17965373 5	17965 3756
chr3	3875594 1	38755963	chr10	99188037	99188058	chr2	19828187 3	19828 1895
chr3	3928187 9	39281900	chr11	11144750 9	11144753 0	chr2	20652313 2	20652 3155
chr3	6885969 4	68859715	chr11	11674230 3	11674232 6	chr2	21158933 5	21158 9356
chr4	8882329 5	88823316	chr11	11787383 8	11787386 1	chr2	22381179 4	22381 1815
chr5	1035404 23	10354044 4	chr11	34171625	34171647	chr2	23983502 5	23983 5048
chr5	8416547 4	84165495	chr11	99967904	99967925	chr2	85720060	85720 081
chr5	9891273 1	98912753	chr12	10226257	10226278	chr2	9888602	98886 24
chr7	1394510 04	13945102 5	chr12	1993974	1993996	chr20	30613675	30613 696
chr7	1406172	14061723	chr12	87701468	87701489	chr21	9072499	90725

	17	8						22
chr8	1448080 58	14480807 9	chr13	22987248	22987269	chr22	19036400	19036 421
chr8	4250648 0	42506501	chr13	44594630	44594651	chr22	19345323	19345 344
chr9	1212684 73	12126849 5	chr13	71034293	71034316	chr3	11848378 5	11848 3807
chr9	1257679 30	12576795 2	chr14	18625660	18625681	chr3	12201058	12201 079
chr9	1571324 1	15713262	chr14	19689363	19689384	chr3	17262854 2	17262 8563
chr9	7508127 3	75081294	chr14	45436755	45436777	chr3	18779702 6	18779 7047
chrX	2047831 8	20478339	chr14	55804739	55804761	chr3	88438945	88438 966
chr1	1754444 73	17544449 4	chr15	27948284	27948307	chr3	99743398	99743 421
chr1	2014483 12	20144833 3	chr15	47193064	47193085	chr4	10426347 6	10426 3498
chr1	2015299 25	20152994 7	chr16	88282516	88282537	chr4	11550276 7	11550 2789
chr1	2301127 11	23011273 2	chr17	29595944	29595966	chr4	14951539 5	14951 5418
chr1	389212	389235	chr17	34587857	34587878	chr4	15644622 3	15644 6246
chr10	1215675 01	12156752 2	chr17	66661126	66661148	chr4	15856032 6	15856 0348
chr10	6486192 4	64861945	chr18	44282618	44282639	chr4	17127046	17127 068
chr10	7172463 2	71724653	chr18	56109483	56109504	chr4	36842914	36842 936
chr10	7779436 7	77794389	chr19	41761232	41761254	chr4	42212428	42212 449
chr10	7841692	78416946	chr19	41763774	41763796	chr4	52359436	52359

	5							457
chr10	7896198 3	78962004	chr19	41807094	41807116	chr4	71524135	71524 156
chr11	1056989 87	10569901 0	chr19	42522197	42522219	chr5	10344027 3	10344 0294
chr11	1160614 23	11606144 5	chr2	13000728 3	13000730 4	chr5	10639392 0	10639 3941
chr11	1893431 9	18934341	chr2	14701933 7	14701936 0	chr5	11239800 9	11239 8030
chr11	1895654 6	18956568	chr2	16628478 0	16628480 2	chr5	12634987 7	12634 9898
chr11	4727085 0	47270872	chr2	21046190 5	21046192 6	chr5	12763071 0	12763 0733
chr12	1056420 43	10564206 4	chr2	32942717	32942738	chr5	13482381 9	13482 3840
chr12	1217763 77	12177639 8	chr2	88545335	88545356	chr5	16145007 1	16145 0092
chr12	1303579 13	13035793 4	chr20	40816314	40816335	chr5	63311092	63311 113
chr12	1327658 33	13276585 6	chr20	48467757	48467778	chr5	68226819	68226 840
chr12	1329053 29	13290535 0	chr20	59385246	59385269	chr5	68263783	68263 804
chr12	3005030	3005051	chr21	24973764	24973785	chr5	73863907	73863 928
chr12	9612908 3	96129105	chr22	15552714	15552735	chr5	793395	79341 6
chr13	1134298 27	11342984 9	chr22	27997215	27997236	chr5	85758370	85758 392
chr13	2464931 1	24649333	chr22	47994724	47994746	chr6	11789587 3	11789 5894
chr13	4932156 0	49321581	chr3	13362760	13362781	chr6	15579984 3	15579 9866
chr13	7428864	74288672	chr3	15402388	15402390	chr6	16959494	16959

	9			0	2		9	4972
chr13	9578098 8	95781009	chr3	16565933 3	16565935 4	chr6	42170408	42170 429
chr13	9940837 6	99408397	chr3	19438264 8	19438267 1	chr6	55168056	55168 078
chr14	4803567 3	48035695	chr3	3264339	3264360	chr7	12881100 9	12881 1031
chr14	9500947 2	95009494	chr4	14748195 7	14748198 0	chr7	93930640	93930 662
chr15	3153068 5	31530706	chr4	15454940 7	15454942 8	chr8	11409231 9	11409 2341
chr15	3155281 5	31552836	chr4	16287501 2	16287503 5	chr8	12570523 5	12570 5256
chr15	6662920 4	66629227	chr5	10167407 9	10167410 0	chr8	12717760 4	12717 7625
chr15	6928316 4	69283185	chr5	13998215 8	13998218 0	chr8	43540940	43540 961
chr15	7819530 7	78195330	chr5	14397624 5	14397626 6	chr9	11575953 3	11575 9554
chr16	1206137	1206159	chr5	21985063	21985084	chr9	11641020 9	11641 0232
chr16	1371839	1371861	chr5	69994824	69994845	chr9	37667360	37667 381
chr16	2748969 7	27489719	chr5	70869901	70869922	chr9	83375386	83375 409
chr16	8631479 8	86314819	chr5	82428487	82428510	chrX	11389642 3	11389 6444
chr16	8700030 1	87000322	chr6	13259753 7	13259755 8	chrX	18803751	18803 772
chr17	1955995 9	19559981	chr6	16317775 3	16317777 6	chrX	19705923	19705 946
chr17	5059146 8	50591490	chr6	23306955	23306976	chrX	29277535	29277 556
chr17	6239742	62397451	chr6	25839497	25839518	chrX	46428082	46428

	8							103
chr17	6553964 9	65539670	chr6	35732304	35732325	chrX	86724515	86724 537
chr18	4762170 6	47621727	chr7	13644676 1	13644678 2	chrY	11157940	11157 963
chr18	4930393 9	49303960	chr7	29758402	29758423	chr1	11072870 2	11072 8723
chr19	1432127	1432148	chr7	34654518	34654540	chr1	11177278 2	11177 2803
chr19	2848247 6	28482497	chr8	10797626 8	10797628 9	chr1	15725382 6	15725 3847
chr19	3536679	3536700	chr8	22618602	22618623	chr1	17567151 4	17567 1535
chr19	4462240 2	44622423	chr8	32142917	32142938	chr1	22027609 0	22027 6111
chr19	5826692 4	58266945	chr8	72411350	72411372	chr1	23290207 3	23290 2094
chr19	5851694 1	58516962	chr9	11144293 0	11144295 3	chr1	23900289	23900 310
chr2	1031597 94	10315981 6	chr9	12678667	12678688	chr1	23900897	23900 918
chr2	1088075 3	10880774	chr9	12989731 0	12989733 2	chr1	32770597	32770 618
chr2	1099876 62	10998768 3	chr9	25693154	25693177	chr1	39504712	39504 734
chr2	1103838 22	11038384 3	chr9	76876314	76876335	chr1	46238485	46238 506
chr2	1206762 15	12067623 7	chrX	52819012	52819035	chr1	50137891	50137 912
chr2	1358857 23	13588574 4	chrY	13047155	13047176	chr1	829401	82942 4
chr2	2059560 9	20595631	chr1	11604580 5	11604582 6	chr1	87979064	87979 086
chr2	2361072	23610729	chr1	12052433	12052435	chr10	10364057	10364

	75	6		1	2		3	0594
chr2	2393519 05	23935192 8	chr1	14899791 7	14899793 8	chr10	14556424	14556 445
chr2	7239153 1	72391553	chr1	15186295 9	15186298 0	chr10	38653807	38653 828
chr2	7467584 8	74675869	chr1	16744068 9	16744071 1	chr10	3970671	39706 92
chr20	3319744 7	33197469	chr1	16811560 3	16811562 4	chr10	42269302	42269 323
chr21	4379671 5	43796736	chr1	16978592	16978613	chr10	43355963	43355 984
chr22	2647291 4	26472936	chr1	22963694 1	22963696 2	chr10	47378440	47378 461
chr22	3794069 3	37940714	chr1	24264602	24264623	chr10	81680456	81680 477
chr22	3965896 5	39658986	chr1	44348571	44348592	chr11	10934291 2	10934 2933
chr3	1020920 84	10209210 7	chr1	97897476	97897497	chr11	11076889 8	11076 8919
chr3	1121042 44	11210426 5	chr10	23165804	23165826	chr11	11218000 8	11218 0030
chr3	1287445 56	12874457 8	chr10	63315407	63315429	chr11	11734881 9	11734 8840
chr3	1299986 64	12999868 5	chr10	66751522	66751544	chr11	18804780	18804 801
chr3	1380799 20	13807994 1	chr10	6801553	6801574	chr11	62428859	62428 880
chr3	1792633 49	17926337 0	chr10	98369695	98369716	chr11	64466273	64466 296
chr3	3873952 0	38739542	chr10	99617183	99617204	chr11	6694240	66942 61
chr4	1114983 3	11149854	chr12	10318400 1	10318402 2	chr12	11078171 4	11078 1736
chr4	1240961	12409615	chr12	11240757	11240759	chr12	11078171	11078

	34	5		6	7		5	1736
chr4	1469559 38	14695596 0	chr12	11707006 2	11707008 3	chr12	11520560 3	11520 5624
chr4	1700265 53	17002657 5	chr12	51663013	51663035	chr12	12723113 4	12723 1155
chr5	1814296 55	18142967 8	chr12	59396770	59396791	chr12	12967061 5	12967 0636
chr5	2149346 0	21493481	chr13	11194161 1	11194163 4	chr12	15037363	15037 384
chr5	3418070 4	34180725	chr13	20226701	20226723	chr12	52077141	52077 162
chr5	6708531 9	67085340	chr13	31559301	31559322	chr12	6450200	64502 21
chr5	8227780 2	82277825	chr13	54350438	54350459	chr13	11232389 3	11232 3916
chr6	1499831 69	14998319 2	chr14	10053437 6	10053439 8	chr13	67503995	67504 017
chr6	1500450 94	15004511 7	chr14	10337443 8	10337445 9	chr15	10020217 7	10020 2198
chr6	1707052 55	17070527 8	chr14	63612101	63612122	chr15	44096819	44096 840
chr6	4032695 0	40326971	chr14	94924114	94924137	chr15	94677590	94677 612
chr7	1569435 97	15694361 8	chr14	97887975	97887996	chr16	20465679	20465 702
chr7	1578045 20	15780454 1	chr15	66786266	66786287	chr16	20559262	20559 285
chr7	4118863 3	41188654	chr15	82138605	82138627	chr16	32423276	32423 297
chr8	102946	102969	chr15	88831872	88831894	chr16	53342629	53342 650
chr8	1111643 12	11116433 4	chr16	26819249	26819271	chr16	66650888	66650 909
chr9	1115730	11157311	chr16	62282993	62283016	chr16	85592850	85592

	96	8						871
chr9	1290787 78	12907879 9	chr16	74719101	74719122	chr16	87314891	87314 913
chr9	3887167 2	38871693	chr17	33572853	33572874	chr17	47655542	47655 564
chr9	6209609 9	62096120	chr18	28806699	28806720	chr17	64039697	64039 720
chr9	6749226 2	67492283	chr18	39821341	39821363	chr17	64818903	64818 924
chr9	6846095 1	68460972	chr19	15031517	15031539	chr17	65106815	65106 836
chr9	7678790 2	76787925	chr19	2884427	2884448	chr17	65447014	65447 035
chrX	5039528 4	50395305	chr19	54704669	54704690	chr17	80882551	80882 573
chrX	7376356 5	73763587	chr2	16517618 9	16517621 1	chr18	1469234	14692 55
chrX	9153677 5	91536797	chr2	16529601 0	16529603 2	chr18	57837950	57837 971
chrY	4778305	4778327	chr2	16607341 6	16607343 8	chr18	70384586	70384 607
chr1	1047408	1047431	chr2	16631155 7	16631157 9	chr19	44473808	44473 829
chr1	1122728 03	11227282 5	chr2	17892887 2	17892889 3	chr19	52740558	52740 579
chr1	4935389 6	49353917	chr2	20543773 6	20543775 8	chr2	10064549	10064 571
chr10	1409302 1	14093044	chr2	22778229 7	22778231 9	chr2	12540049 8	12540 0520
chr10	2919957 4	29199595	chr2	23366254 7	23366256 9	chr2	13615662 1	13615 6642
chr11	1193810 98	11938111 9	chr2	35864586	35864607	chr2	14396772 1	14396 7744
chr11	6505793	65057957	chr2	5417088	5417109	chr2	16040464	16040

	4						2	4664
chr11	6977724 6	69777268	chr2	86491497	86491518	chr2	16628480 5	16628 4827
chr12	2794515 1	27945172	chr20	14319152	14319173	chr2	17127497 0	17127 4991
chr12	4479450 3	44794525	chr22	49344269	49344291	chr2	23031335 1	23031 3373
chr13	1063316 57	10633167 8	chr3	14624615 4	14624617 5	chr2	2695712	26957 33
chr14	3671920 7	36719228	chr3	16839378 1	16839380 2	chr2	91895965	91895 986
chr15	3117948 9	31179511	chr3	46155606	46155627	chr20	20797859	20797 880
chr16	8956619 7	89566218	chr4	11328049 0	11328051 2	chr20	24493828	24493 849
chr17	4705556 2	47055583	chr4	64749297	64749319	chr20	36236087	36236 108
chr18	7862873 7	78628760	chr4	85568706	85568727	chr20	45857529	45857 550
chr19	4330268 5	43302706	chr5	10744945 1	10744947 3	chr20	48461342	48461 363
chr2	2383817 49	23838177 0	chr5	12101215 0	12101217 1	chr20	57807620	57807 641
chr2	4992218 9	49922211	chr5	1326658	1326680	chr20	59590440	59590 461
chr2	6652895 5	66528976	chr5	1326687	1326709	chr22	16441864	16441 885
chr2	7429233	7429255	chr5	79949732	79949753	chr22	33423179	33423 200
chr20	1067294 3	10672966	chr5	81104790	81104812	chr22	37134063	37134 085
chr20	3550327 0	35503293	chr5	91214887	91214908	chr3	12322295 5	12322 2976
chr20	3870548	38705509	chr6	15275358	15275360	chr3	95912639	95912

	8			7	9			660
chr22	2951788 3	29517904	chr6	50510462	50510485	chr4	10291403 5	10291 4056
chr22	3219946 6	32199489	chr6	7798609	7798630	chr4	13745239 3	13745 2414
chr3	1946814 45	19468146 6	chr7	14599115 3	14599117 4	chr4	16394589 4	16394 5916
chr3	2581602 8	25816049	chr7	77347062	77347085	chr4	1815215	18152 36
chr3	3879377 9	38793801	chr7	77614538	77614560	chr4	20252878	20252 900
chr3	4307835 5	43078376	chr8	58860663	58860684	chr4	25487429	25487 450
chr3	5504577	5504598	chrY	9215006	9215027	chr4	41329119	41329 140
chr4	1543997 72	15439979 3	chr1	15333092 5	15333094 6	chr4	41330183	41330 205
chr5	1875435 5	18754376	chr1	17906882 1	17906884 3	chr5	12685330 9	12685 3330
chr5	1876942	1876964	chr1	19331700 3	19331702 5	chr5	13564358 4	13564 3607
chr5	2385946 3	23859486	chr1	20117501 6	20117503 8	chr5	14448468 1	14448 4703
chr6	1313861 69	13138619 0	chr1	22976181 3	22976183 4	chr5	14932008 8	14932 0109
chr6	1578487 02	15784872 3	chr1	23661192 5	23661194 6	chr5	34543122	34543 143
chr7	1445058 58	14450587 9	chr1	44003243	44003264	chr5	38374328	38374 349
chr7	2810601 2	28106033	chr1	60484489	60484511	chr5	51582987	51583 008
chr7	5261424	5261446	chr1	77272589	77272611	chr5	51584136	51584 157
chr7	5697214	56972171	chr1	99805299	99805321	chr5	5684323	56843

	9							44
chr7	6360477 7	63604799	chr10	7234091	7234112	chr5	95184977	95184 998
chr9	1138018 9	11380210	chr11	12463921 5	12463923 7	chr6	10345815	10345 837
chrX	7483506 2	74835083	chr11	12856591 9	12856594 0	chr6	11193996 9	11193 9990
chr1	1137896 94	11378971 6	chr11	32183988	32184009	chr6	14485110 2	14485 1123
chr1	1514922 28	15149225 0	chr11	98824964	98824985	chr6	16966052 4	16966 0545
chr1	1743474 5	17434767	chr12	52539784	52539807	chr6	44791613	44791 636
chr1	2372327 84	23723280 6	chr13	53239100	53239123	chr6	54214841	54214 862
chr1	5134393 6	51343958	chr13	67710449	67710471	chr6	85108470	85108 493
chr1	6206028 3	62060305	chr14	10154286 1	10154288 2	chr7	10129335 6	10129 3377
chr10	1220245 2	12202474	chr14	94101963	94101986	chr7	10176988 8	10176 9909
chr10	3450012 9	34500150	chr15	53389064	53389085	chr7	71436053	71436 074
chr10	908595	908617	chr15	59609984	59610006	chr7	77258325	77258 348
chr10	9743062 8	97430649	chr16	83718885	83718908	chr8	10318833 9	10318 8360
chr11	1318005 86	13180060 8	chr17	13619613	13619634	chr8	58208948	58208 971
chr11	4505965 4	45059675	chr18	1302211	1302234	chr8	90410702	90410 725
chr11	4629359 6	46293618	chr18	34382228	34382250	chr9	16091078	16091 101
chr11	6753292	67532943	chr2	13668347	13668349	chr9	87763613	87763

	2			6	9			634
chr11	6847370 1	68473723	chr2	16628038 9	16628041 1	chr9	89771805	89771 827
chr11	7686919 9	76869221	chr20	21609437	21609459	chrX	11458399 7	11458 4020
chr11	7689173 7	76891759	chr3	15056861	15056883	chrX	24592372	24592 393
chr11	8578094 9	85780971	chr3	16247219 7	16247221 8	chrX	26644776	26644 797
chr11	8864047 3	88640495	chr3	19214403 8	19214405 9	chrX	55695885	55695 906
chr11	9236684 2	92366863	chr3	19397296 7	19397298 8	chrX	6695896	66959 17
chr12	1040311 67	10403118 8	chr3	31318637	31318658	chrX	97311438	97311 459
chr12	1311540 18	13115403 9	chr3	33928700	33928721	chrX	9977092	99771 14
chr12	1315070 86	13150710 7	chr3	66347945	66347967	chrY	11353457	11353 478
chr12	2221048 0	22210502	chr4	17213798 3	17213800 5	chr11	9031037	90310 63
chr12	2412249	2412270	chr4	37832335	37832356	chr2	13514258 4	13514 2611
chr12	3756910 1	37569123	chr4	53708420	53708441	chr2	16628171 0	16628 1737
chr12	5020917 1	50209193	chr5	13327835 4	13327837 5	chr2	16628655 5	16628 6581
chr12	7967294 0	79672961	chr5	15533774 9	15533777 0	chr2	16628655 5	16628 6582
chr12	9364117 7	93641198	chr5	39782986	39783009	chr4	13986481 0	13986 4837
chr12	9567269 2	95672713	chr5	67714762	67714784	chr5	16317345 4	16317 3480
chr13	2122239	21222415	chr6	35730038	35730059	chr17	63959375	63959

	3							402
chr13	2465149 6	24651519	chr6	44811459	44811480	chr2	16627825 0	16627 8277
chr13	2965105 9	29651081	chr7	14992559 7	14992561 8	chr4	46082495	46082 522
chr13	8411554 9	84115570	chr7	15276724 8	15276726 9	chr2	16628478 5	16628 4812
chr14	3499432 1	34994343	chr7	15640801 3	15640803 4	chr5	12044004 7	12044 0073
chr14	7555423 2	75554254	chr7	28741171	28741192	chrX	14856242 7	14856 2453
chr15	3621119 6	36211217	chr8	29989405	29989427	chr19	13426131	13426 157
chr15	6212291 0	62122931	chr8	34718643	34718664	chr2	16628479 2	16628 4819
chr15	7679394 6	76793968	chr8	43134646	43134667	chr12	12324864 5	12324 8671
chr15	9802258 3	98022605	chr8	752973	752994	chr2	16628462 1	16628 4647
chr16	1711445 0	17114472	chr9	74554912	74554934	chr2	16628462 1	16628 4648
chr16	2398065	2398087	chr9	81540528	81540550	chr14	38705215	38705 242
chr16	2973340 9	29733431	chrX	15264978 7	15264981 0	chr2	16629335 6	16629 3383
chr16	5648821 5	56488237	chr1	10802098 4	10802100 6	chr2	16531374 0	16531 3766
chr16	8103391 8	81033940	chr1	15760753 8	15760756 0	chr2	16629322 5	16629 3252
chr17	2232503 6	22325058	chr1	51964038	51964059	chr11	95324148	95324 174
chr17	2793828 4	27938305	chr1	75514790	75514811	chr12	10741806 3	10741 8089
chr17	2838409	28384119	chr10	48281408	48281430	chr12	51699625	51699

	7							652
chr17	4527007 0	45270092	chr11	11624144 4	11624146 5	chr13	10559280 2	10559 2828
chr17	5613386 6	56133888	chr11	30474472	30474493	chr2	16516274 7	16516 2773
chr18	1228294 9	12282971	chr12	12913621 5	12913623 6	chr2	16531037 8	16531 0404
chr18	3838840 0	38388422	chr13	22491824	22491845	chr2	16605190 7	16605 1933
chr19	3676980 0	36769822	chr13	48042239	48042260	chr2	16630322 0	16630 3247
chr19	5758837 7	57588398	chr13	76397102	76397123	chr2	21766290 8	21766 2934
chr2	1621521 61	16215218 4	chr14	72859229	72859251	chr2	22636849 3	22636 8519
chr2	2387260 0	23872621	chr14	87684513	87684536	chr6	68609343	68609 369
chr2	2392985 84	23929860 6	chr15	39766578	39766601	chr7	30750602	30750 628
chr2	4614845 1	46148472	chr16	1615112	1615133	chr2	16630580 4	16630 5831
chr2	8819001 0	88190032	chr16	48745003	48745024	chr3	38771291	38771 318
chr20	2584328 8	25843310	chr18	57051391	57051412	chr3	38752265	38752 292
chr20	2601259 2	26012614	chr19	51986606	51986627	chr7	10755206	10755 234
chr20	3445312 8	34453149	chr19	52276544	52276565	chrX	13300605 8	13300 6084
chr21	4255530 2	42555323	chr2	13073000 7	13073002 8	chr3	38752213	38752 240
chr3	2313129 7	23131319	chr2	16628632 1	16628634 3	chr3	38752415	38752 442
chr3	3879374	38793763	chr2	18414869	18414872	chr8	28147462	28147

	1			8	1			488
chr3	3920939 9	39209421	chr2	44473938	44473960	chr3	38793739	38793 766
chr3	4329846 9	43298491	chr2	69785973	69785994	chr3	38793953	38793 980
chr4	1103743 39	11037436 1	chr3	10015137 0	10015139 2	chr3	38750104	38750 131
chr4	1371609 17	13716093 9	chr3	17283094 4	17283096 7	chr11	13372942 4	13372 9450
chr4	1382594 57	13825947 8	chr3	26459710	26459731	chr3	38771273	38771 300
chr4	1502152 52	15021527 4	chr3	38378001	38378022	chr10	11250342 0	11250 3446
chr4	1753175 7	17531779	chr4	69868253	69868274	chr3	38757064	38757 091
chr5	1412001 9	14120040	chr4	99790429	99790450	chr4	17599800 6	17599 8032
chr5	1413094 28	14130945 0	chr5	10163425 5	10163427 6	chr4	80646320	80646 347
chr5	1690456 2	16904584	chr5	13508579 6	13508581 7	chrX	13780722	13780 748
chr5	2814663 2	28146653	chr5	17371427 0	17371429 2	chr1	10583544 9	10583 5475
chr6	1045569 41	10455696 3	chr6	14948292 3	14948294 4	chr16	59275323	59275 349
chr6	1069882 2	10698843	chr6	16922332 3	16922334 4	chr3	38739609	38739 636
chr6	1578133 72	15781339 5	chr6	73397278	73397299	chr4	96421786	96421 812
chr6	3097596 9	30975991	chr7	13941291 6	13941293 7	chr7	14395432	14395 458
chr6	4531543	4531565	chr7	5354372	5354393	chr13	45392357	45392 383
chr6	5716528	5716550	chr7	7420448	7420469	chr15	80242156	80242

								184
chr6	7305547 6	73055497	chr8	10154295	10154317	chr3	38739575	38739 602

### Результаты

#### *Скрининг нРНК SpCas9 и SaCas9, нацеленных на SCN9A и SCN10A в iPSC*

После двух раундов скрининга нРНК в iPSC и анализа секвенирования, средняя эффективность разрезания была рассчитана на основе четырех реплик для каждого образца с учетом общего процента инсерций и делеций (инделов) в предсказанном сайте разрезания каждой нРНК. Для целей нокаутирования генов SCN9A и SCN10A был также рассчитан средний процент инделов, приводящих к мутации со сдвигом рамки считывания. Направляющие РНК были ранжированы как по среднему общему проценту инделов, так и по среднему проценту инделов, вызывающих сдвиг рамки. Направляющие РНК перечислены в порядке убывания на основании среднего процента инделов, вызывающих сдвиг рамки, а скремблированная нецелевая нРНК, а также необработанные клетки были включены в качестве отрицательного контроля (таблицы 8-11).

**Таблица 8: Средний общий процент инделов и средний процент инделов, вызывающих сдвиг рамки, генерируемых нРНК SpCas9, нацеленными на SCN9A в iPSC**

Название нРНК	Целевой ген	Мишень экзон	Cas9	Средний общий процент инделов	Средний процент инделов, вызывающих сдвиг рамки считывания	Ранжирование на основе общего количества инделов	Ранжирование на основе вызывающих сдвиг рамки инделов
Scn9a_Sp_Экзон_11_T9	SCN9A	11	SpCas9	81,86%	76,55%	3	1
Scn9a_Sp_Экзон_12_T25	SCN9A	12	SpCas9	80,50%	76,05%	4	2
Scn9a_Sp_Экзон_11_T6	SCN9A	11	SpCas9	78,51%	74,56%	5	3
Scn9a_Sp_Экзон_11_T11	SCN9A	11	SpCas9	83,29%	73,18%	1	4
Scn9a_Sp_Экзон	SCN9	12	SpC	81,94%	73,08%	2	5

_12_T20	A		as9				
Scn9a_Sp_Экзон _11_T14	SCN9 A	11	SpC as9	76,90%	72,51%	8	6
Scn9a_Sp_Экзон _11_T13	SCN9 A	11	SpC as9	78,01%	70,14%	7	7
Scn9a_Sp_Экзон _14_T1	SCN9 A	14	SpC as9	75,27%	69,46%	9	8
Scn9a_Sp_Экзон _7_T5	SCN9 A	7	SpC as9	74,45%	69,19%	11	9
Scn9a_Sp_Экзон _2_T10	SCN9 A	2	SpC as9	73,68%	69,08%	12	10
Scn9a_Sp_Экзон _12_T11	SCN9 A	12	SpC as9	71,34%	69,01%	16	11
Scn9a_Sp_Экзон _12_T17	SCN9 A	12	SpC as9	75,20%	68,85%	10	12
Scn9a_Sp_Экзон _12_T12	SCN9 A	12	SpC as9	70,60%	67,13%	17	13
Scn9a_Sp_Экзон _9_T10	SCN9 A	9	SpC as9	70,41%	66,70%	18	14
Scn9a_Sp_Экзон _11_T2	SCN9 A	11	SpC as9	72,32%	64,90%	13	15
Scn9a_Sp_Экзон _15_T1	SCN9 A	15	SpC as9	70,07%	64,78%	19	16
Scn9a_Sp_Экзон _9_T14	SCN9 A	9	SpC as9	66,06%	60,75%	27	17
Scn9a_Sp_Экзон 12_T28	SCN9 A	12	SpC as9	68,39%	60,72%	20	18
Scn9a_Sp_Экзон _12_T13	SCN9 A	12	SpC as9	64,19%	60,35%	31	19
Scn9a_Sp_Экзон _11_T5	SCN9 A	11	SpC as9	71,86%	59,88%	15	20
Scn9a_Sp_Экзон _12_T24	SCN9 A	12	SpC as9	68,22%	58,77%	22	21
Scn9a_Sp_Экзон	SCN9	2	SpC	62,59%	58,70%	35	22

_2_T2	A		as9				
Scn9a_Sp_Экзон _12_T21	SCN9 A	12	SpC as9	78,19%	58,69%	6	23
Scn9a_Sp_Экзон 12_T27	SCN9 A	12	SpC as9	67,28%	58,34%	25	24
Scn9a_Sp_Экзон _9_T11	SCN9 A	9	SpC as9	63,22%	57,35%	34	25
Scn9a_Sp_Экзон _12_T1	SCN9 A	12	SpC as9	61,57%	57,18%	37	26
Scn9a_Sp_Экзон _12_T23	SCN9 A	12	SpC as9	64,98%	56,37%	29	27
Scn9a_Sp_Экзон _14_T3	SCN9 A	14	SpC as9	68,34%	55,35%	21	28
Scn9a_Sp_Экзон _10_T2	SCN9 A	10	SpC as9	64,20%	54,01%	30	29
Scn9a_Sp_Экзон _12_T4	SCN9 A	12	SpC as9	61,66%	53,77%	36	30
Scn9a_Sp_Экзон _12_T8	SCN9 A	12	SpC as9	59,99%	53,24%	41	31
Scn9a_Sp_Экзон _11_T10	SCN9 A	11	SpC as9	59,73%	52,88%	42	32
Scn9a_Sp_Экзон _2_T14	SCN9 A	2	SpC as9	63,45%	52,60%	32	33
Scn9a_Sp_Экзон _5_T3	SCN9 A	5	SpC as9	56,95%	51,72%	49	34
Scn9a_Sp_Экзон _12_T2	SCN9 A	12	SpC as9	57,05%	51,39%	48	35
Scn9a_Sp_Экзон _11_T15	SCN9 A	11	SpC as9	67,51%	51,11%	24	36
Scn9a_Sp_Экзон _11_T3	SCN9 A	11	SpC as9	54,46%	50,05%	54	37
Scn9a_Sp_Экзон _9_T6	SCN9 A	9	SpC as9	63,44%	49,88%	33	38
Scn9a_Sp_Экзон	SCN9	9	SpC	53,89%	49,71%	56	39

_9_T5	A		as9				
Scn9a_Sp_Экзон _7_T2	SCN9 A	7	SpC as9	54,86%	47,44%	52	40
Scn9a_Sp_Экзон _2_T4	SCN9 A	2	SpC as9	57,70%	46,83%	47	41
Scn9a_Sp_Экзон _2_T1	SCN9 A	2	SpC as9	66,37%	45,78%	26	42
Scn9a_Sp_Экзон _9_T2	SCN9 A	9	SpC as9	58,26%	45,73%	46	43
Scn9a_Sp_Экзон _4_T5	SCN9 A	4	SpC as9	49,69%	45,71%	62	44
Scn9a_Sp_Экзон _7_T6	SCN9 A	7	SpC as9	60,22%	45,52%	40	45
Scn9a_Sp_Экзон _12_T10	SCN9 A	12	SpC as9	53,94%	45,27%	55	46
Scn9a_Sp_Экзон _4_T3	SCN9 A	4	SpC as9	50,92%	45,04%	58	47
Scn9a_Sp_Экзон _11_T12	SCN9 A	11	SpC as9	59,05%	43,60%	45	48
Scn9a_Sp_Экзон _9_T13	SCN9 A	9	SpC as9	60,77%	43,49%	39	49
Scn9a_Sp_Экзон _11_T7	SCN9 A	11	SpC as9	50,76%	43,49%	59	50
Scn9a_Sp_Экзон _15_T2	SCN9 A	15	SpC as9	59,54%	43,34%	44	51
Scn9a_Sp_Экзон _12_T16	SCN9 A	12	SpC as9	61,29%	42,92%	38	52
Scn9a_Sp_Экзон _12_T19	SCN9 A	12	SpC as9	59,59%	42,45%	43	53
Scn9a_Sp_Экзон _2_T15	SCN9 A	2	SpC as9	44,47%	41,45%	67	54
Scn9a_Sp_Экзон _14_T2	SCN9 A	14	SpC as9	46,19%	40,97%	64	55
Scn9a_Sp_Экзон	SCN9	2	SpC	55,38%	40,79%	51	56

_2_T13	A		as9				
Scn9a_Sp_Экзон _9_T12	SCN9 A	9	SpC as9	44,16%	39,70%	68	57
Scn9a_Sp_Экзон _9_T4	SCN9 A	9	SpC as9	50,13%	39,54%	61	58
Scn9a_Sp_Экзон _2_T11	SCN9 A	2	SpC as9	53,70%	39,17%	57	59
Scn9a_Sp_Экзон _10_T5	SCN9 A	10	SpC as9	55,73%	38,73%	50	60
Scn9a_Sp_Экзон _5_T1	SCN9 A	5	SpC as9	66,04%	37,17%	28	61
Scn9a_Sp_Экзон 12_T7	SCN9 A	12	SpC as9	72,23%	37,12%	14	62
Scn9a_Sp_Экзон _7_T1	SCN9 A	7	SpC as9	50,50%	37,01%	60	63
Scn9a_Sp_Экзон _15_T3	SCN9 A	15	SpC as9	54,50%	36,77%	53	64
Scn9a_Sp_Экзон _12_T3	SCN9 A	12	SpC as9	42,40%	35,16%	71	65
Scn9a_Sp_Экзон _7_T3	SCN9 A	7	SpC as9	46,33%	34,84%	63	66
Scn9a_Sp_Экзон _9_T9	SCN9 A	9	SpC as9	38,80%	34,59%	77	67
Scn9a_Sp_Экзон _5_T2	SCN9 A	5	SpC as9	39,80%	34,24%	74	68
Scn9a_Sp_Экзон _2_T9	SCN9 A	2	SpC as9	45,47%	33,41%	65	69
Scn9a_Sp_Экзон 12_T9	SCN9 A	12	SpC as9	38,68%	33,01%	79	70
Scn9a_Sp_Экзон _12_T5	SCN9 A	12	SpC as9	33,67%	31,96%	82	71
Scn9a_Sp_Экзон _14_T5	SCN9 A	14	SpC as9	44,55%	31,78%	66	72
Scn9a_Sp_Экзон	SCN9	2	SpC	38,76%	31,73%	78	73

_2_T8	A		as9				
Scn9a_Sp_Экзон _9_T15	SCN9 A	9	SpC as9	39,98%	31,56%	73	74
Scn9a_Sp_Экзон 12_T14	SCN9 A	12	SpC as9	33,90%	31,22%	81	75
Scn9a_Sp_Экзон _2_T12	SCN9 A	2	SpC as9	39,76%	31,02%	75	76
Scn9a_Sp_Экзон 12_T18	SCN9 A	12	SpC as9	68,21%	30,76%	23	77
Scn9a_Sp_Экзон 12_T15	SCN9 A	12	SpC as9	39,07%	30,33%	76	78
Scn9a_Sp_Экзон _12_T26	SCN9 A	12	SpC as9	43,78%	30,13%	70	79
Scn9a_Sp_Экзон _5_T4	SCN9 A	5	SpC as9	38,57%	27,51%	80	80
Scn9a_Sp_Экзон _12_T6	SCN9 A	12	SpC as9	31,83%	26,92%	84	81
Scn9a_Sp_Экзон _9_T1	SCN9 A	9	SpC as9	40,20%	25,44%	72	82
Scn9a_Sp_Экзон _2_T7	SCN9 A	2	SpC as9	33,06%	25,35%	83	83
Scn9a_Sp_Экзон _4_T7	SCN9 A	4	SpC as9	26,35%	24,78%	88	84
Scn9a_Sp_Экзон _4_T1	SCN9 A	4	SpC as9	28,34%	23,77%	86	85
Scn9a_Sp_Экзон _2_T3	SCN9 A	2	SpC as9	44,01%	23,46%	69	86
Scn9a_Sp_Экзон _12_T22	SCN9 A	12	SpC as9	24,59%	22,80%	92	87
Scn9a_Sp_Экзон _14_T4	SCN9 A	14	SpC as9	27,07%	22,67%	87	88
Scn9a_Sp_Экзон _4_T2	SCN9 A	4	SpC as9	25,94%	22,12%	89	89
Scn9a_Sp_Экзон	SCN9	4	SpC	24,59%	19,81%	93	90

_4_T4	A		as9				
Scn9a_Sp_Экзон _2_T5	SCN9 A	2	SpC as9	21,60%	19,28%	95	91
Scn9a_Sp_Экзон _9_T3	SCN9 A	9	SpC as9	24,82%	18,98%	90	92
Scn9a_Sp_Экзон _9_T8	SCN9 A	9	SpC as9	31,39%	18,79%	85	93
Scn9a_Sp_Экзон _10_T4	SCN9 A	10	SpC as9	22,68%	16,55%	94	94
Scn9a_Sp_Экзон _9_T7	SCN9 A	9	SpC as9	24,72%	15,94%	91	95
Scn9a_Sp_Экзон _14_T6	SCN9 A	14	SpC as9	17,72%	12,91%	96	96
Scn9a_Sp_Экзон _4_T6	SCN9 A	4	SpC as9	9,53%	7,42%	97	97
Scn9a_Sp_Экзон _2_T6	SCN9 A	2	SpC as9	7,09%	5,35%	98	98
Scn9a_Sp_Экзон _10_T1	SCN9 A	10	SpC as9	1,29%	1,22%	99	99
Зашифрованный контроль	н.д.	н.д.	SpC as9	0,27%	0,23%	н.д.	н.д.
Без обработки	н.д.	н.д.	н.д.	0,18%	0,16%	н.д.	н.д.

**Таблица 9: Средний общий процент инделов и средний процент инделов, вызывающих сдвиг рамки, генерируемых нРНК SaCas9, нацеленными на SCN9A в iPSC**

<b>Название нРНК</b>	<b>Целевой ген</b>	<b>Целевой экзон</b>	<b>Cas9</b>	<b>Средний общий процент инделов в</b>	<b>Средний процент инделов, вызывающих сдвиг рамки считывания</b>	<b>Ранжирование на основе общего количества инделов</b>	<b>Ранжирование на основе вызывающих сдвиг рамки инделов</b>
Scn9a_Sa_Экзон	SCN9	11	SaCa	55,50%	49,49%	2	1

_11_T3	A		s9				
Scn9a_Sa_ЭкзОН _12_T2	SCN9 A	12	SaCa s9	61,96%	49,44%	1	2
Scn9a_Sa_ЭкзОН _5_T6	SCN9 A	5	SaCa s9	54,10%	42,37%	3	3
Scn9a_Sa_ЭкзОН _9_T3	SCN9 A	9	SaCa s9	48,41%	34,60%	4	4
Scn9a_Sa_ЭкзОН _13_T3	SCN9 A	13	SaCa s9	42,29%	33,08%	5	5
Scn9a_Sa_ЭкзОН _12_T1	SCN9 A	12	SaCa s9	33,66%	28,42%	7	6
Scn9a_Sa_ЭкзОН _7_T1	SCN9 A	7	SaCa s9	30,86%	25,39%	8	7
Scn9a_Sa_ЭкзОН _9_T2	SCN9 A	9	SaCa s9	27,99%	24,43%	11	8
Scn9a_Sa_ЭкзОН _15_T3	SCN9 A	15	SaCa s9	28,33%	23,51%	10	9
Scn9a_Sa_ЭкзОН _9_T1	SCN9 A	9	SaCa s9	41,10%	21,52%	6	10
Scn9a_Sa_ЭкзОН _12_T3	SCN9 A	12	SaCa s9	24,81%	20,49%	16	11
Scn9a_Sa_ЭкзОН _7_T5	SCN9 A	7	SaCa s9	25,26%	20,32%	15	12
Scn9a_Sa_ЭкзОН _14_T1	SCN9 A	14	SaCa s9	20,70%	19,06%	20	13
Scn9a_Sa_ЭкзОН _2_T2	SCN9 A	2	SaCa s9	23,85%	18,85%	18	14
Scn9a_Sa_ЭкзОН _11_T1	SCN9 A	11	SaCa s9	26,58%	17,84%	14	15
Scn9a_Sa_ЭкзОН _8_T2	SCN9 A	8	SaCa s9	27,04%	16,09%	13	16
Scn9a_Sa_ЭкзОН _9_T4	SCN9 A	9	SaCa s9	21,90%	15,56%	19	17
Scn9a_Sa_ЭкзОН	SCN9	15	SaCa	19,09%	15,54%	22	18

_15_T6	A		s9				
Scn9a_Sa_Экзон _12_T4	SCN9 A	12	SaCa s9	28,51%	14,30%	9	19
Scn9a_Sa_Экзон _5_T1	SCN9 A	5	SaCa s9	17,45%	14,16%	23	20
Scn9a_Sa_Экзон _5_T3	SCN9 A	5	SaCa s9	16,87%	13,67%	24	21
Scn9a_Sa_Экзон _11_T4	SCN9 A	11	SaCa s9	14,96%	12,34%	26	22
Scn9a_Sa_Экзон _5_T2	SCN9 A	5	SaCa s9	20,59%	10,46%	21	23
Scn9a_Sa_Экзон _7_T6	SCN9 A	7	SaCa s9	12,55%	9,60%	27	24
Scn9a_Sa_Экзон _11_T6	SCN9 A	11	SaCa s9	27,75%	9,21%	12	25
Scn9a_Sa_Экзон _12_T5	SCN9 A	12	SaCa s9	16,55%	8,77%	25	26
Scn9a_Sa_Экзон _4_T4	SCN9 A	4	SaCa s9	9,89%	8,22%	30	27
Scn9a_Sa_Экзон _11_T2	SCN9 A	11	SaCa s9	24,15%	6,75%	17	28
Scn9a_Sa_Экзон _13_T1	SCN9 A	13	SaCa s9	9,03%	6,63%	32	29
Scn9a_Sa_Экзон _10_T2	SCN9 A	10	SaCa s9	12,12%	6,59%	29	30
Scn9a_Sa_Экзон _10_T1	SCN9 A	10	SaCa s9	8,74%	6,55%	33	31
Scn9a_Sa_Экзон _2_T1	SCN9 A	2	SaCa s9	9,69%	6,54%	31	32
Scn9a_Sa_Экзон _5_T4	SCN9 A	5	SaCa s9	12,16%	6,43%	28	33
Scn9a_Sa_Экзон _4_T7	SCN9 A	4	SaCa s9	7,54%	6,35%	36	34
Scn9a_Sa_Экзон	SCN9	15	SaCa	8,00%	5,84%	35	35

_15_T5	A		s9				
Scn9a_Sa_Экзон _5_T5	SCN9 A	5	SaCa s9	7,19%	5,07%	37	36
Scn9a_Sa_Экзон _14_T2	SCN9 A	14	SaCa s9	6,97%	4,96%	39	37
Scn9a_Sa_Экзон _6_T5	SCN9 A	6	SaCa s9	5,78%	4,90%	42	38
Scn9a_Sa_Экзон _15_T7	SCN9 A	15	SaCa s9	8,29%	4,68%	34	39
Scn9a_Sa_Экзон _13_T4	SCN9 A	13	SaCa s9	5,71%	4,33%	44	40
Scn9a_Sa_Экзон _5_T7	SCN9 A	5	SaCa s9	6,54%	4,33%	40	41
Scn9a_Sa_Экзон _14_T6	SCN9 A	14	SaCa s9	5,88%	4,17%	41	42
Scn9a_Sa_Экзон _4_T6	SCN9 A	4	SaCa s9	7,13%	4,00%	38	43
Scn9a_Sa_Экзон _13_T2	SCN9 A	13	SaCa s9	4,50%	3,54%	46	44
Scn9a_Sa_Экзон _4_T5	SCN9 A	4	SaCa s9	5,75%	3,42%	43	45
Scn9a_Sa_Экзон _10_T3	SCN9 A	10	SaCa s9	4,96%	3,34%	45	46
Scn9a_Sa_Экзон _8_T1	SCN9 A	8	SaCa s9	3,76%	3,00%	48	47
Scn9a_Sa_Экзон _7_T4	SCN9 A	7	SaCa s9	4,43%	2,72%	47	48
Scn9a_Sa_Экзон _15_T4	SCN9 A	15	SaCa s9	3,31%	2,53%	49	49
Scn9a_Sa_Экзон _11_T5	SCN9 A	11	SaCa s9	1,53%	1,28%	51	50
Scn9a_Sa_Экзон _15_T1	SCN9 A	15	SaCa s9	1,69%	1,17%	50	51
Scn9a_Sa_Экзон	SCN9	3	SaCa	1,40%	1,05%	52	52

_3_T1	A		s9				
Scn9a_Sa_Экзон _15_T2	SCN9 A	15	SaCa s9	1,27%	0,83%	53	53
Scn9a_Sa_Экзон _2_T3	SCN9 A	2	SaCa s9	1,18%	0,79%	54	54
Scn9a_Sa_Экзон _14_T7	SCN9 A	14	SaCa s9	0,54%	0,48%	56	55
Scn9a_Sa_Экзон _4_T1	SCN9 A	4	SaCa s9	0,40%	0,40%	57	56
Scn9a_Sa_Экзон _6_T2	SCN9 A	6	SaCa s9	0,27%	0,24%	60	57
Scn9a_Sa_Экзон _7_T7	SCN9 A	7	SaCa s9	0,26%	0,22%	61	58
Scn9a_Sa_Экзон _7_T2	SCN9 A	7	SaCa s9	0,27%	0,22%	59	59
Scn9a_Sa_Экзон _7_T8	SCN9 A	7	SaCa s9	0,22%	0,21%	62	60
Scn9a_Sa_Экзон _14_T4	SCN9 A	14	SaCa s9	0,96%	0,20%	55	61
Scn9a_Sa_Экзон _14_T8	SCN9 A	14	SaCa s9	0,31%	0,18%	58	62
Scn9a_Sa_Экзон _14_T10	SCN9 A	14	SaCa s9	0,16%	0,15%	64	63
Scn9a_Sa_Экзон _14_T3	SCN9 A	14	SaCa s9	0,17%	0,14%	63	64
Scn9a_Sa_Экзон _2_T4	SCN9 A	2	SaCa s9	0,15%	0,10%	65	65
Scn9a_Sa_Экзон _8_T3	SCN9 A	8	SaCa s9	0,09%	0,09%	66	66
Scn9a_Sa_Экзон _14_T5	SCN9 A	14	SaCa s9	0,04%	0,04%	67	67
Scn9a_Sa_Экзон _14_T9	SCN9 A	14	SaCa s9	0,02%	0,02%	68	68
Зашифрованный	н.д.	н.д.	SaCa	0,27%	0,23%	н.д.	н.д.

контроль			s9				
Без обработки	н.д.	н.д.	н.д.	0,18%	0,16%	н.д.	н.д.

**Таблица 10: Средний общий процент инделов и средний процент инделов, вызывающих сдвиг рамки, генерируемых нРНК SpCas9, нацеленными на SCN10A в iPSC**

Название нРНК	Целевой ген	Целевой экзон	Cas9	Средний общий процент инделов	Средний процент инделов, вызывающих сдвиг рамки считывания	Ранжирование на основе общего количества инделов	Ранжирование на основе вызывающих сдвиг рамки инделов
Scn10a_Sp_Экзон_1_T15	SCN10A	1	SpCas9	75,77%	73,46%	1	1
Scn10a_Sp_Экзон_9_T2	SCN10A	9	SpCas9	70,79%	67,64%	5	2
Scn10a_Sp_Экзон_14_T3	SCN10A	14	SpCas9	75,21%	67,26%	2	3
Scn10a_Sp_Экзон_10_T7	SCN10A	10	SpCas9	69,16%	66,79%	7	4
Scn10a_Sp_Экзон_7_T6	SCN10A	7	SpCas9	69,47%	65,31%	6	5
Scn10a_Sp_Экзон_1_T30	SCN10A	1	SpCas9	68,89%	63,21%	8	6
Scn10a_Sp_Экзон_11_T10	SCN10A	11	SpCas9	72,63%	62,38%	3	7
Scn10a_Sp_Экзон_1_T17	SCN10A	1	SpCas9	64,42%	61,62%	18	8
Scn10a_Sp_Экзон_4_T2	SCN10A	4	SpCas9	66,31%	61,10%	12	9
Scn10a_Sp_Экзон_10	SCN10A	10	SpCas9	66,83%	60,57%	9	10

10_T3	A		9				
Scn10a_Sp_Экзон_8_T3	SCN10 A	8	SpCas 9	66,35%	59,76%	11	11
Scn10a_Sp_Экзон_1_T18	SCN10 A	1	SpCas 9	65,19%	59,51%	15	12
Scn10a_Sp_Экзон_1_T16	SCN10 A	1	SpCas 9	66,52%	59,43%	10	13
Scn10a_Sp_Экзон_11_T24	SCN10 A	11	SpCas 9	62,43%	58,84%	24	14
Scn10a_Sp_Экзон_12_T3	SCN10 A	12	SpCas 9	64,78%	58,60%	17	15
Scn10a_Sp_Экзон_8_T8	SCN10 A	8	SpCas 9	65,43%	58,01%	14	16
Scn10a_Sp_Экзон_4_T4	SCN10 A	4	SpCas 9	61,86%	57,86%	25	17
Scn10a_Sp_Экзон_1_T14	SCN10 A	1	SpCas 9	63,17%	57,59%	22	18
Scn10a_Sp_Экзон_14_T1	SCN10 A	14	SpCas 9	71,62%	56,93%	4	19
Scn10a_Sp_Экзон_13_T4	SCN10 A	13	SpCas 9	61,76%	55,63%	26	20
Scn10a_Sp_Экзон_8_T10	SCN10 A	8	SpCas 9	60,22%	54,64%	33	21
Scn10a_Sp_Экзон_7_T2	SCN10 A	7	SpCas 9	60,19%	54,34%	34	22
Scn10a_Sp_Экзон_13_T5	SCN10 A	13	SpCas 9	57,14%	53,58%	44	23
Scn10a_Sp_Экзон_10_T2	SCN10 A	10	SpCas 9	58,03%	53,29%	38	24
Scn10a_Sp_Экзон_7_T7	SCN10 A	7	SpCas 9	56,45%	52,36%	48	25
Scn10a_Sp_Экзон_13_T17	SCN10 A	13	SpCas 9	56,62%	51,99%	47	26
Scn10a_Sp_Экзон_9	SCN10	9	SpCas	63,41%	51,82%	20	27

9_T14	A		9				
Scn10a_Sp_Экзон_1_T25	SCN10 A	1	SpCas 9	60,51%	51,36%	32	28
Scn10a_Sp_Экзон_12_T6	SCN10 A	12	SpCas 9	56,11%	50,72%	50	29
Scn10a_Sp_Экзон_12_T8	SCN10 A	12	SpCas 9	57,60%	50,69%	41	30
Scn10a_Sp_Экзон_2_T3	SCN10 A	2	SpCas 9	63,38%	50,51%	21	31
Scn10a_Sp_Экзон_13_T18	SCN10 A	13	SpCas 9	57,69%	49,95%	40	32
Scn10a_Sp_Экзон_11_T14	SCN10 A	11	SpCas 9	59,24%	49,80%	36	33
Scn10a_Sp_Экзон_11_T19	SCN10 A	11	SpCas 9	53,70%	49,80%	67	34
Scn10a_Sp_Экзон_13_T9	SCN10 A	13	SpCas 9	65,73%	49,73%	13	35
Scn10a_Sp_Экзон_8_T1	SCN10 A	8	SpCas 9	56,68%	49,55%	46	36
Scn10a_Sp_Экзон_1_T10	SCN10 A	1	SpCas 9	54,89%	49,53%	60	37
Scn10a_Sp_Экзон_2_T7	SCN10 A	2	SpCas 9	60,11%	49,29%	35	38
Scn10a_Sp_Экзон_11_T25	SCN10 A	11	SpCas 9	62,96%	49,26%	23	39
Scn10a_Sp_Экзон_1_T3	SCN10 A	1	SpCas 9	55,92%	48,35%	51	40
Scn10a_Sp_Экзон_14_T2	SCN10 A	14	SpCas 9	57,55%	48,19%	42	41
Scn10a_Sp_Экзон_10_T10	SCN10 A	10	SpCas 9	52,18%	48,08%	77	42
Scn10a_Sp_Экзон_13_T13	SCN10 A	13	SpCas 9	54,65%	47,73%	61	43
Scn10a_Sp_Экзон_11_T1	SCN10 A	11	SpCas 9	60,69%	47,45%	31	44

11_T28	A		9				
Scn10a_Sp_Экзон_5_T4	SCN10 A	5	SpCas 9	50,66%	47,09%	87	45
Scn10a_Sp_Экзон_9_T3	SCN10 A	9	SpCas 9	51,41%	46,55%	81	46
Scn10a_Sp_Экзон_2_T5	SCN10 A	2	SpCas 9	50,44%	46,45%	88	47
Scn10a_Sp_Экзон_5_T1	SCN10 A	5	SpCas 9	52,12%	46,30%	78	48
Scn10a_Sp_Экзон_11_T16	SCN10 A	11	SpCas 9	60,99%	45,94%	30	49
Scn10a_Sp_Экзон_11_T18	SCN10 A	11	SpCas 9	61,41%	45,75%	28	50
Scn10a_Sp_Экзон_4_T1	SCN10 A	4	SpCas 9	54,98%	45,45%	58	51
Scn10a_Sp_Экзон_12_T5	SCN10 A	12	SpCas 9	61,45%	45,41%	27	52
Scn10a_Sp_Экзон_2_T8	SCN10 A	2	SpCas 9	54,37%	45,09%	63	53
Scn10a_Sp_Экзон_11_T21	SCN10 A	11	SpCas 9	55,63%	44,13%	54	54
Scn10a_Sp_Экзон_11_T17	SCN10 A	11	SpCas 9	54,96%	44,09%	59	55
Scn10a_Sp_Экзон_11_T15	SCN10 A	11	SpCas 9	48,65%	44,08%	95	56
Scn10a_Sp_Экзон_13_T19	SCN10 A	13	SpCas 9	51,06%	43,61%	83	57
Scn10a_Sp_Экзон_6_T3	SCN10 A	6	SpCas 9	54,41%	43,58%	62	58
Scn10a_Sp_Экзон_10_T1	SCN10 A	10	SpCas 9	57,92%	43,50%	39	59
Scn10a_Sp_Экзон_11_T11	SCN10 A	11	SpCas 9	55,69%	43,45%	53	60
Scn10a_Sp_Экзон_	SCN10	10	SpCas	49,04%	43,14%	93	61

10_T6	A		9				
Scn10a_Sp_Экзон_12_T7	SCN10 A	12	SpCas 9	52,96%	43,13%	71	62
Scn10a_Sp_Экзон_1_T5	SCN10 A	1	SpCas 9	48,50%	43,07%	97	63
Scn10a_Sp_Экзон_13_T16	SCN10 A	13	SpCas 9	50,90%	42,78%	86	64
Scn10a_Sp_Экзон_9_T13	SCN10 A	9	SpCas 9	64,98%	42,52%	16	65
Scn10a_Sp_Экзон_6_T7	SCN10 A	6	SpCas 9	58,51%	42,38%	37	66
Scn10a_Sp_Экзон_7_T4	SCN10 A	7	SpCas 9	52,52%	42,37%	75	67
Scn10a_Sp_Экзон_9_T4	SCN10 A	9	SpCas 9	53,88%	42,24%	66	68
Scn10a_Sp_Экзон_9_T9	SCN10 A	9	SpCas 9	52,53%	42,19%	74	69
Scn10a_Sp_Экзон_10_T9	SCN10 A	10	SpCas 9	47,84%	42,05%	100	70
Scn10a_Sp_Экзон_8_T2	SCN10 A	8	SpCas 9	47,46%	41,70%	102	71
Scn10a_Sp_Экзон_1_T9	SCN10 A	1	SpCas 9	50,32%	41,44%	90	72
Scn10a_Sp_Экзон_13_T15	SCN10 A	13	SpCas 9	55,09%	41,15%	57	73
Scn10a_Sp_Экзон_1_T26	SCN10 A	1	SpCas 9	48,17%	40,83%	99	74
Scn10a_Sp_Экзон_6_T8	SCN10 A	6	SpCas 9	50,36%	40,76%	89	75
Scn10a_Sp_Экзон_1_T4	SCN10 A	1	SpCas 9	51,44%	40,43%	80	76
Scn10a_Sp_Экзон_11_T22	SCN10 A	11	SpCas 9	52,25%	40,22%	76	77
Scn10a_Sp_Экзон_1	SCN10	1	SpCas	50,94%	40,09%	85	78

1_T8	A		9				
Scn10a_Sp_Экзон_1_T28	SCN10 A	1	SpCas 9	55,88%	40,04%	52	79
Scn10a_Sp_Экзон_1_T23	SCN10 A	1	SpCas 9	48,87%	39,94%	94	80
Scn10a_Sp_Экзон_12_T14	SCN10 A	12	SpCas 9	53,67%	39,85%	68	81
Scn10a_Sp_Экзон_10_T5	SCN10 A	10	SpCas 9	45,47%	39,07%	104	82
Scn10a_Sp_Экзон_8_T9	SCN10 A	8	SpCas 9	53,65%	38,83%	69	83
Scn10a_Sp_Экзон_10_T4	SCN10 A	10	SpCas 9	53,90%	38,71%	65	84
Scn10a_Sp_Экзон_2_T6	SCN10 A	2	SpCas 9	45,38%	38,38%	105	85
Scn10a_Sp_Экзон_8_T6	SCN10 A	8	SpCas 9	57,30%	38,26%	43	86
Scn10a_Sp_Экзон_12_T9	SCN10 A	12	SpCas 9	42,87%	38,17%	107	87
Scn10a_Sp_Экзон_2_T10	SCN10 A	2	SpCas 9	47,78%	37,61%	101	88
Scn10a_Sp_Экзон_12_T1	SCN10 A	12	SpCas 9	49,42%	36,83%	91	89
Scn10a_Sp_Экзон_14_T4	SCN10 A	14	SpCas 9	61,35%	35,92%	29	90
Scn10a_Sp_Экзон_2_T9	SCN10 A	2	SpCas 9	53,15%	35,54%	70	91
Scn10a_Sp_Экзон_1_T19	SCN10 A	1	SpCas 9	48,57%	35,36%	96	92
Scn10a_Sp_Экзон_13_T19	SCN10 A	11	SpCas 9	42,69%	34,85%	108	93
Scn10a_Sp_Экзон_11_T20	SCN10 A	13	SpCas 9	39,77%	34,85%	120	94
Scn10a_Sp_Экзон_	SCN10	13	SpCas	40,55%	34,73%	117	95

13_T10	A		9				
Scn10a_Sp_Экзон_12_T4	SCN10 A	12	SpCas 9	42,32%	34,32%	111	96
Scn10a_Sp_Экзон_11_T29	SCN10 A	11	SpCas 9	55,45%	34,29%	55	97
Scn10a_Sp_Экзон_1_T6	SCN10 A	1	SpCas 9	41,41%	33,80%	114	98
Scn10a_Sp_Экзон_11_T5	SCN10 A	11	SpCas 9	36,79%	33,61%	127	99
Scn10a_Sp_Экзон_8_T4	SCN10 A	8	SpCas 9	48,33%	33,60%	98	100
Scn10a_Sp_Экзон_1_T20	SCN10 A	1	SpCas 9	40,84%	33,49%	116	101
Scn10a_Sp_Экзон_11_T23	SCN10 A	11	SpCas 9	52,78%	33,30%	73	102
Scn10a_Sp_Экзон_6_T4	SCN10 A	6	SpCas 9	38,65%	33,10%	121	103
Scn10a_Sp_Экзон_1_T7	SCN10 A	1	SpCas 9	44,90%	32,82%	106	104
Scn10a_Sp_Экзон_2_T2	SCN10 A	2	SpCas 9	51,23%	32,78%	82	105
Scn10a_Sp_Экзон_1_T24	SCN10 A	1	SpCas 9	42,10%	32,67%	112	106
Scn10a_Sp_Экзон_4_T5	SCN10 A	4	SpCas 9	56,88%	32,61%	45	107
Scn10a_Sp_Экзон_9_T11	SCN10 A	9	SpCas 9	52,09%	32,18%	79	108
Scn10a_Sp_Экзон_9_T1	SCN10 A	9	SpCas 9	41,37%	32,00%	115	109
Scn10a_Sp_Экзон_11_T27	SCN10 A	11	SpCas 9	55,20%	31,85%	56	110
Scn10a_Sp_Экзон_11_T1	SCN10 A	11	SpCas 9	50,96%	31,76%	84	111
Scn10a_Sp_Экзон_11_T1	SCN10 A	11	SpCas 9	34,52%	31,72%	133	112

11_T30	A		9				
Scn10a_Sp_Экзон_13_T1	SCN10 A	13	SpCas 9	37,55%	31,55%	125	113
Scn10a_Sp_Экзон_9_T8	SCN10 A	9	SpCas 9	52,96%	31,47%	72	114
Scn10a_Sp_Экзон_4_T3	SCN10 A	4	SpCas 9	36,31%	31,31%	130	115
Scn10a_Sp_Экзон_1_T21	SCN10 A	1	SpCas 9	42,58%	31,22%	109	116
Scn10a_Sp_Экзон_8_T5	SCN10 A	8	SpCas 9	49,09%	30,85%	92	117
Scn10a_Sp_Экзон_13_T12	SCN10 A	13	SpCas 9	42,38%	30,40%	110	118
Scn10a_Sp_Экзон_12_T13	SCN10 A	12	SpCas 9	35,97%	30,38%	131	119
Scn10a_Sp_Экзон_6_T9	SCN10 A	6	SpCas 9	34,43%	30,28%	134	120
Scn10a_Sp_Экзон_11_T4	SCN10 A	11	SpCas 9	54,02%	30,26%	64	121
Scn10a_Sp_Экзон_11_T3	SCN10 A	11	SpCas 9	38,32%	30,19%	123	122
Scn10a_Sp_Экзон_12_T10	SCN10 A	12	SpCas 9	63,89%	29,99%	19	123
Scn10a_Sp_Экзон_7_T3	SCN10 A	7	SpCas 9	38,44%	29,43%	122	124
Scn10a_Sp_Экзон_7_T5	SCN10 A	7	SpCas 9	35,95%	28,88%	132	125
Scn10a_Sp_Экзон_8_T7	SCN10 A	8	SpCas 9	40,06%	28,67%	118	126
Scn10a_Sp_Экзон_1_T11	SCN10 A	1	SpCas 9	36,94%	28,57%	126	127
Scn10a_Sp_Экзон_11_T33	SCN10 A	11	SpCas 9	36,65%	27,54%	129	128
Scn10a_Sp_Экзон_6_T9	SCN10 A	6	SpCas 9	32,46%	26,95%	137	129

6_T10	A		9				
Scn10a_Sp_Экзон_11_T12	SCN10 A	11	SpCas 9	32,19%	26,77%	138	130
Scn10a_Sp_Экзон_11_T7	SCN10 A	11	SpCas 9	29,15%	26,06%	143	131
Scn10a_Sp_Экзон_1_T29	SCN10 A	1	SpCas 9	46,08%	25,89%	103	132
Scn10a_Sp_Экзон_10_T13	SCN10 A	10	SpCas 9	33,89%	25,37%	135	133
Scn10a_Sp_Экзон_13_T8	SCN10 A	13	SpCas 9	37,57%	25,01%	124	134
Scn10a_Sp_Экзон_13_T11	SCN10 A	13	SpCas 9	29,76%	24,56%	142	135
Scn10a_Sp_Экзон_5_T2	SCN10 A	5	SpCas 9	31,74%	24,55%	139	136
Scn10a_Sp_Экзон_11_T13	SCN10 A	11	SpCas 9	36,77%	24,35%	128	137
Scn10a_Sp_Экзон_5_T3	SCN10 A	5	SpCas 9	30,72%	23,38%	140	138
Scn10a_Sp_Экзон_12_T12	SCN10 A	12	SpCas 9	41,69%	22,51%	113	139
Scn10a_Sp_Экзон_9_T5	SCN10 A	9	SpCas 9	56,19%	22,49%	49	140
Scn10a_Sp_Экзон_2_T1	SCN10 A	2	SpCas 9	30,63%	22,14%	141	141
Scn10a_Sp_Экзон_11_T26	SCN10 A	11	SpCas 9	28,87%	22,10%	144	142
Scn10a_Sp_Экзон_11_T8	SCN10 A	11	SpCas 9	39,80%	21,90%	119	143
Scn10a_Sp_Экзон_11_T32	SCN10 A	11	SpCas 9	26,86%	20,23%	148	144
Scn10a_Sp_Экзон_13_T14	SCN10 A	13	SpCas 9	25,54%	20,20%	151	145
Scn10a_Sp_Экзон_1	SCN10	1	SpCas	23,64%	20,09%	155	146

1_T27	A		9				
Scn10a_Sp_Экзон_6_T2	SCN10 A	6	SpCas 9	24,45%	19,92%	153	147
Scn10a_Sp_Экзон_13_T21	SCN10 A	13	SpCas 9	26,89%	19,88%	147	148
Scn10a_Sp_Экзон_11_T2	SCN10 A	11	SpCas 9	33,54%	19,60%	136	149
Scn10a_Sp_Экзон_11_T31	SCN10 A	11	SpCas 9	22,87%	18,35%	156	150
Scn10a_Sp_Экзон_11_T20	SCN10 A	11	SpCas 9	28,68%	17,60%	145	151
Scn10a_Sp_Экзон_1_T2	SCN10 A	1	SpCas 9	21,35%	17,50%	158	152
Scn10a_Sp_Экзон_2_T4	SCN10 A	2	SpCas 9	22,73%	16,87%	157	153
Scn10a_Sp_Экзон_14_T5	SCN10 A	14	SpCas 9	26,01%	16,71%	150	154
Scn10a_Sp_Экзон_9_T10	SCN10 A	9	SpCas 9	24,38%	16,58%	154	155
Scn10a_Sp_Экзон_11_T6	SCN10 A	11	SpCas 9	17,51%	13,60%	160	156
Scn10a_Sp_Экзон_9_T6	SCN10 A	9	SpCas 9	16,03%	12,46%	161	157
Scn10a_Sp_Экзон_1_T22	SCN10 A	1	SpCas 9	25,18%	12,18%	152	158
Scn10a_Sp_Экзон_7_T1	SCN10 A	7	SpCas 9	27,05%	11,69%	146	159
Scn10a_Sp_Экзон_12_T2	SCN10 A	12	SpCas 9	26,39%	11,56%	149	160
Scn10a_Sp_Экзон_9_T12	SCN10 A	9	SpCas 9	18,60%	10,73%	159	161
Scn10a_Sp_Экзон_13_T6	SCN10 A	13	SpCas 9	9,77%	7,31%	163	162
Scn10a_Sp_Экзон_1	SCN10	1	SpCas	8,22%	6,02%	164	163

1_T12	A		9				
Scn10a_Sp_Экзон_9_T7	SCN10 A	9	SpCas 9	12,54%	5,44%	162	164
Scn10a_Sp_Экзон_13_T22	SCN10 A	13	SpCas 9	6,59%	4,29%	165	165
Scn10a_Sp_Экзон_11_T34	SCN10 A	11	SpCas 9	3,63%	2,42%	166	166
Зашифрованный контроль	н.д.	н.д.	SpCas 9	0,27%	0,23%	н.д.	н.д.
Без обработки	н.д.	н.д.	н.д.	0,18%	0,16%	н.д.	н.д.

**Таблица 11: Средний общий процент инделов и средний процент инделов, вызывающих сдвиг рамки, генерируемых нРНК SaCas9, нацеленными на SCN10A в iPSC**

<b>Название нРНК</b>	<b>Целевой ген</b>	<b>Целевой экзон</b>	<b>Cas9</b>	<b>Средний общий процент инделов</b>	<b>Средний процент инделов, вызывающих сдвиг рамки считывания</b>	<b>Ранжирование на основе общего количества инделов</b>	<b>Ранжирование на основе вызывающих сдвиг рамки инделов</b>
Scn10a_Sa_Экзон_1_1_T1	SCN10 A	11	SaCas 9	44,86%	42,68%	2	1
Scn10a_Sa_Экзон_1_T7	SCN10 A	1	SaCas 9	42,84%	40,36%	4	2
Scn10a_Sa_Экзон_8	SCN10	8	SaCas	37,46%	35,32%	7	3

_T5	A		9				
Scn10a_Sa_ЭкзОН_1 2_T2	SCN10 A	12	SaCas 9	43,31%	32,36%	3	4
Scn10a_Sa_ЭкзОН_1 4_T1	SCN10 A	14	SaCas 9	45,19%	31,27%	1	5
Scn10a_Sa_ЭкзОН_1 4_T2	SCN10 A	14	SaCas 9	39,18%	27,17%	5	6
Scn10a_Sa_ЭкзОН_4 _T5	SCN10 A	4	SaCas 9	33,11%	25,46%	9	7
Scn10a_Sa_ЭкзОН_1 _T3	SCN10 A	1	SaCas 9	28,02%	24,67%	13	8
Scn10a_Sa_ЭкзОН_1 1_T2	SCN10 A	11	SaCas 9	31,11%	23,87%	11	9
Scn10a_Sa_ЭкзОН_1 1_T5	SCN10 A	11	SaCas 9	29,04%	23,03%	12	10
Scn10a_Sa_ЭкзОН_1 3_T9	SCN10 A	13	SaCas 9	34,53%	20,42%	8	11
Scn10a_Sa_ЭкзОН_3 _T1	SCN10 A	3	SaCas 9	27,38%	19,18%	14	12
Scn10a_Sa_ЭкзОН_1 3_T2	SCN10 A	13	SaCas 9	31,25%	18,78%	10	13
Scn10a_Sa_ЭкзОН_1 0_T6	SCN10 A	10	SaCas 9	20,74%	17,76%	20	14
Scn10a_Sa_ЭкзОН_1 1_T10	SCN10 A	11	SaCas 9	20,36%	17,65%	22	15
Scn10a_Sa_ЭкзОН_2 _T1	SCN10 A	2	SaCas 9	19,59%	17,00%	27	16
Scn10a_Sa_ЭкзОН_8 _T1	SCN10 A	8	SaCas 9	25,69%	16,98%	16	17
Scn10a_Sa_ЭкзОН_4 _T7	SCN10 A	4	SaCas 9	20,06%	16,79%	24	18
Scn10a_Sa_ЭкзОН_1 3_T4	SCN10 A	13	SaCas 9	19,68%	15,79%	26	19
Scn10a_Sa_ЭкзОН_1	SCN10	11	SaCas	20,35%	15,76%	23	20

1_T4	A		9				
Scn10a_Sa_ЭкзОН_1_T6	SCN10 A	1	SaCas 9	26,38%	15,31%	15	21
Scn10a_Sa_ЭкзОН_7_T4	SCN10 A	7	SaCas 9	22,50%	15,28%	17	22
Scn10a_Sa_ЭкзОН_1_T8	SCN10 A	1	SaCas 9	21,83%	14,52%	18	23
Scn10a_Sa_ЭкзОН_1_1_T9	SCN10 A	11	SaCas 9	38,57%	13,91%	6	24
Scn10a_Sa_ЭкзОН_7_T3	SCN10 A	7	SaCas 9	20,06%	13,70%	25	25
Scn10a_Sa_ЭкзОН_1_1_T8	SCN10 A	11	SaCas 9	21,79%	13,40%	19	26
Scn10a_Sa_ЭкзОН_5_T2	SCN10 A	5	SaCas 9	16,95%	13,18%	29	27
Scn10a_Sa_ЭкзОН_1_T4	SCN10 A	1	SaCas 9	18,11%	13,04%	28	28
Scn10a_Sa_ЭкзОН_6_T6	SCN10 A	6	SaCas 9	20,70%	10,65%	21	29
Scn10a_Sa_ЭкзОН_1_T5	SCN10 A	1	SaCas 9	14,58%	10,63%	32	30
Scn10a_Sa_ЭкзОН_4_T2	SCN10 A	4	SaCas 9	13,82%	10,55%	33	31
Scn10a_Sa_ЭкзОН_1_0_T2	SCN10 A	10	SaCas 9	15,04%	9,94%	31	32
Scn10a_Sa_ЭкзОН_1_0_T7	SCN10 A	10	SaCas 9	16,61%	8,83%	30	33
Scn10a_Sa_ЭкзОН_1_3_T3	SCN10 A	13	SaCas 9	12,36%	8,21%	35	34
Scn10a_Sa_ЭкзОН_1_0_T5	SCN10 A	10	SaCas 9	10,62%	7,87%	37	35
Scn10a_Sa_ЭкзОН_1_0_T3	SCN10 A	10	SaCas 9	13,45%	7,63%	34	36
Scn10a_Sa_ЭкзОН_8	SCN10	8	SaCas	7,75%	6,06%	41	37

_T4	A		9				
Scn10a_Sa_ЭкзОН_1 1_T7	SCN10 A	11	SaCas 9	6,42%	5,61%	46	38
Scn10a_Sa_ЭкзОН_7 _T2	SCN10 A	7	SaCas 9	7,54%	5,53%	42	39
Scn10a_Sa_ЭкзОН_1 3_T5	SCN10 A	13	SaCas 9	5,84%	5,42%	48	40
Scn10a_Sa_ЭкзОН_1 3_T8	SCN10 A	13	SaCas 9	7,45%	5,16%	43	41
Scn10a_Sa_ЭкзОН_3 _T2	SCN10 A	3	SaCas 9	6,18%	5,14%	47	42
Scn10a_Sa_ЭкзОН_4 _T4	SCN10 A	4	SaCas 9	10,64%	4,88%	36	43
Scn10a_Sa_ЭкзОН_6 _T3	SCN10 A	6	SaCas 9	8,43%	4,83%	39	44
Scn10a_Sa_ЭкзОН_1 0_T8	SCN10 A	10	SaCas 9	6,74%	4,64%	44	45
Scn10a_Sa_ЭкзОН_1 _T9	SCN10 A	1	SaCas 9	5,42%	4,53%	49	46
Scn10a_Sa_ЭкзОН_1 3_T1	SCN10 A	13	SaCas 9	6,56%	4,34%	45	47
Scn10a_Sa_ЭкзОН_6 _T8	SCN10 A	6	SaCas 9	8,25%	3,89%	40	48
Scn10a_Sa_ЭкзОН_4 _T3	SCN10 A	4	SaCas 9	4,37%	3,72%	51	49
Scn10a_Sa_ЭкзОН_5 _T4	SCN10 A	5	SaCas 9	5,02%	3,69%	50	50
Scn10a_Sa_ЭкзОН_6 _T5	SCN10 A	6	SaCas 9	4,27%	3,66%	52	51
Scn10a_Sa_ЭкзОН_1 3_T7	SCN10 A	13	SaCas 9	9,36%	2,84%	38	52
Scn10a_Sa_ЭкзОН_1 0_T4	SCN10 A	10	SaCas 9	2,67%	2,40%	54	53
Scn10a_Sa_ЭкзОН_5	SCN10	5	SaCas	2,76%	2,36%	53	54

_T1	A		9				
Scn10a_Sa_ЭкзОН_2 _T2	SCN10 A	2	SaCas 9	2,29%	1,87%	55	55
Scn10a_Sa_ЭкзОН_1 4_T3	SCN10 A	14	SaCas 9	2,16%	1,62%	57	56
Scn10a_Sa_ЭкзОН_3 _T3	SCN10 A	3	SaCas 9	2,17%	1,53%	56	57
Scn10a_Sa_ЭкзОН_1 2_T4	SCN10 A	12	SaCas 9	2,07%	1,52%	59	58
Scn10a_Sa_ЭкзОН_7 _T5	SCN10 A	7	SaCas 9	2,12%	1,42%	58	59
Scn10a_Sa_ЭкзОН_6 _T1	SCN10 A	6	SaCas 9	1,69%	1,21%	61	60
Scn10a_Sa_ЭкзОН_1 1_T3	SCN10 A	11	SaCas 9	1,93%	0,77%	60	61
Scn10a_Sa_ЭкзОН_6 _T4	SCN10 A	6	SaCas 9	0,73%	0,53%	64	62
Scn10a_Sa_ЭкзОН_9 _T1	SCN10 A	9	SaCas 9	0,79%	0,47%	63	63
Scn10a_Sa_ЭкзОН_1 0_T1	SCN10 A	10	SaCas 9	0,46%	0,45%	65	64
Scn10a_Sa_ЭкзОН_1 4_T4	SCN10 A	14	SaCas 9	1,24%	0,33%	62	65
Scn10a_Sa_ЭкзОН_9 _T3	SCN10 A	9	SaCas 9	0,28%	0,20%	67	66
Scn10a_Sa_ЭкзОН_1 _T1	SCN10 A	1	SaCas 9	0,20%	0,17%	68	67
Scn10a_Sa_ЭкзОН_1 3_T6	SCN10 A	13	SaCas 9	0,35%	0,17%	66	68
Scn10a_Sa_ЭкзОН_1 2_T1	SCN10 A	12	SaCas 9	0,18%	0,16%	69	69
Scn10a_Sa_ЭкзОН_8 _T2	SCN10 A	8	SaCas 9	0,11%	0,10%	70	70
Scn10a_Sa_ЭкзОН_1	SCN10	12	SaCas	0,06%	0,06%	71	71

2_T5	A		9				
Scn10a_Sa_Экзон_8_T3	SCN10 A	8	SaCas 9	0,03%	0,03%	72	72
Scn10a_Sa_Экзон_6_T7	SCN10 A	6	SaCas 9	0,00%	0,00%	73	73
Зашифрованный контроль	н.д.	н.д.	SaCas 9	0,27%	0,23%	н.д.	н.д.
Без обработки	н.д.	н.д.	н.д.	0,18%	0,14%	н.д.	н.д.

*Скрининг находящихся в верху ранга нРНК, нацеленных на SCN9A и SCN10A в iPSC, стабильно экспрессирующих SpCas9 или SaCas9, и в iPSC-произведенных сенсорных нейронах*

Исходя из целевой эффективности в первоначальных скринингах нРНК в iPSC, 40 гидов были выбраны в качестве приоритетных для дальнейших исследований целевого редактирования в дополнительных клеточных моделях, таких как iPSC, стабильно экспрессирующие Cas9, и iPSC-произведенные сенсорные нейроны (iSN) (ФИГ. 1A-1D). В частности, были отобраны десять гидов из каждой из четырех категорий: 1) десять нРНК для SpCas9, направленных на SCN9A, 2) десять нРНК для SpCas9, направленных на SCN10a, 3) десять нРНК для SaCas9, направленных на SCN9A, и 4) десять нРНК для SaCas9, направленных на SCN10a (Таблицы 12 и 13).

Эти 40 приоритетных нРНК были проверены в сконструированных iPSC, стабильно экспрессирующих SpCas9 или SaCas9. Синтетические нРНК были электропорированы в соответствующую клеточную линию. Эти 40 нРНК уже были проверены на эффективность целевого редактирования в iSN. В iSN комплексы РНП для всех 40 нРНК были электрофоретированы в адгезивные культуры нейронов. Кроме того, 20 нРНК SaCas9 были также доставлены в iSN с помощью универсальных векторов AAV, экспрессирующих SaCas9 и нРНК. Геномная ДНК была очищена из обработанных клеток для анализа секвенирования, как описано в способах.

В каждой модели было проведено два независимых эксперимента. Средняя эффективность разрезания была рассчитана на основе четырех реплик для каждого образца с учетом общего процента инсерций и делеций (инделов) в предсказанном сайте разрезания каждой нРНК. Для целей нокаутирования генов SCN9A и SCN10A был также рассчитан средний процент инделов, приводящих к мутации со сдвигом рамки считывания. Направляющие РНК были ранжированы по среднему проценту инделов, вызывающих сдвиг рамки. Сводная информация об эффективности редактирования по мишени этих 40 приоритетных нРНК в различных клеточных моделях представлена на ФИГ. 1A-1D, а также в таблицах 12 и 13.

**Таблица 12: Сводная информация эффективности целевого редактирования приоритетных нРНК SpCas9 в различных моделях клеток**

Название нРНК	SEQ ID NO:	Последовательность	% Инделы со сдвигом рамки			Ранг iPSC	Ранг стабильности iPSC	Ранг iSN
			iPSC	стабильные iPSC Cas9	iSN (электропорация РНП)			
<b>SCN9A SpCas9</b>								
Экзон Scn9a Sp 11_T9	1	CAAuuGGGuGGuACCuGAu	76,55%	78,18%	15,83%	1	7	8
Экзон Scn9a Sp 12_T25	2	GCuuCGCCuuGCAGAAAACA	76,05%	80,74%	33,90%	2	4	3
Экзон Scn9a Sp 11_T6	3	GCCuAuGCCCuCGACACCA	74,56%	85,16%	32,52%	3	2	4
Экзон Scn9a Sp 11_T14	4	AuAGGCGAGCACAuGAAAAG	72,51%	75,68%	9,20%	4	9	10
Экзон Scn9a Sp 11_T13	5	CGGCuGAAuAuACAAGuAuu	70,14%	79,25%	26,04%	5	5	5
Экзон Scn9a Sp 14_T1	6	GGAACACCACCCAAuGACuG	69,46%	78,77%	22,14%	6	6	6
Экзон Scn9a Sp 7_T5	7	CAGGCCuGAAGACAAuuGuA	69,19%	81,38%	44,42%	7	3	1
Экзон Scn9a Sp 2_T10	8	GGAAuGuCCCCAuAGAuGAA	69,08%	86,34%	37,78%	8	1	2
Экзон Scn9a Sp 12_T11	9	CCACCAAuGCuGCCGuGAA	69,01%	77,06%	14,40%	9	8	9
Экзон Scn9a Sp 12_T17	10	CAGuCACCACuCAGCAuuCG	68,85%	70,36%	17,25%	10	10	7
<b>SCN10A SpCas9</b>								
Экзон Scn10a Sp 1_T15	21	GCuCCCCGAuCAGuuCuGCu	73,46%	79,12%	21,33%	1	6	2
Экзон Scn10a Sp 9_T2	22	uGuAGuCACCAuGGCGuAuG	67,64%	80,40%	22,50%	2	4	1
Экзон Scn10a Sp 14_T3	23	GGAAGCuCCGCAGCACAGAC	67,26%	82,00%	20,91%	3	3	3

Экзон Scn10a Sp 10_T7	24	uCCuuACAACCA GCGCAGGA	66,7 9%	85,44%	20,77%	4	1	4
Экзон Scn10a Sp 7_T6	25	ACuuCuGACCCC uuACuGuG	65,3 1%	78,28%	19,31%	5	7	6
Экзон Scn10a Sp 1_T30	26	GAGCuCCCAGC AGAACuGAu	63,2 1%	71,66%	17,33%	6	9	7
Экзон Scn10a Sp 11_T10	27	CCGAGACuCG ACAGCuCCA	62,3 8%	76,53%	16,60%	7	8	9
Экзон Scn10a Sp 1_T17	28	AuCCGuuCuACA GCACACAC	61,6 2%	83,60%	20,25%	8	2	5
Экзон Scn10a Sp 4_T2	29	uCACGuACCuGA GAGAuCCu	61,1 0%	65,50%	8,80%	9	10	10
Экзон Scn10a Sp 10_T3	30	CGCAGGuGCuA GCAGCACuA	60,5 7%	79,22%	17,04%	10	5	8

**Таблица 13: Сводная информация эффективности целевого редактирования приоритетных нРНК SaCas9 в различных моделях клеток**

Название нРНК	S E Q U E N C E :	Последовательность	% Инделы со сдвигом рамки				P a n g i P S C	P a n g s t a b i l i t y i P S C	P a n g i S N (P H P)	P a n g i S N (A A V)
			iP S C	стаб ильн ые iPSC Cas9	iSN (электр опорац ия PHP)	iSN (тран сдукц ия AAV)				
<b>SCN9A SaCas9</b>										
Экзон Scn9a Sa 11_T3	1 1	AAGCAGAAuu AuGGGCCuCu CA	49, 49 %	66,77 %	7,87%	14,87 %	1	1	4	3
Экзон Scn9a Sa 12_T2	1 2	GCCuuGCAGA AAACAAGGA GCC	49, 44 %	57,62 %	14,87%	23,22 %	2	2	1	1
Экзон Scn9a Sa 5_T6	1 3	ACGACAAAu CCAGCCAGuu CC	42, 37 %	54,16 %	11,97%	3,79%	3	3	3	10
Экзон	1	CuGGGAAAAC	34,	48,90	13,50%	6,20%	4	7	2	8

Scn9a Sa 9_T3	4	CuuuACCAAC AG	60 %	%							
Экзон Scn9a Sa 13_T3	1 5	uCCCAACCuC AGACAGAGA GCA	33, 08 %	51,37 %	4,33%	13,04 %	5	5	7	4	
Экзон Scn9a Sa 12_T1	1 6	GAuGuuACuGC uGCGuCGCuC C	28, 42 %	52,96 %	7,57%	9,96%	6	4	5	6	
Экзон Scn9a Sa 7_T1	1 7	CAuGAuCCuG ACuGuGuuCuG u	25, 39 %	40,83 %	4,22%	5,70%	7	10	8	9	
Экзон Scn9a Sa 9_T2	1 8	CuCGuGuGuAG uCAGuGuCCA G	24, 43 %	51,04 %	3,84%	12,52 %	8	6	9	5	
Экзон Scn9a Sa 15_T3	1 9	AAACuGAuuG CCAuGGAuCC Au	23, 51 %	48,59 %	5,07%	8,54%	9	8	6	7	
Экзон Scn9a Sa 12_T3	2 0	AGAAAACAA GGAGCCACG AAuG	20, 49 %	46,80 %	3,51%	17,10 %	10	9	10	2	
<b>SCN10A SaCas9</b>											
Экзон Scn10a Sa 11_T1	3 1	CCCuGGAGCu GuCGAuGuCuC G	42, 68 %	0,00 %	0,00%	0,39%	1	10	10	10	
Экзон Scn10a Sa 1_T7	3 2	uAGAuCCGuuC uACAGCACAC A	40, 36 %	71,64 %	6,10%	7,31%	2	2	3	5	
Экзон Scn10a Sa 8_T5	3 3	AGuGAGAGG AAAGCCCAA GCAA	35, 32 %	73,07 %	7,37%	25,44 %	3	1	2	2	
Экзон Scn10a Sa 12_T2	3 4	ACCuuuCCGG GCCCAAAGG GCA	32, 36 %	63,10 %	11,88%	36,91 %	4	3	1	1	
Экзон	3	CuuuGACuGCA	31,	48,68	3,67%	0,72%	5	8	5	9	

Scn10a Sa 14_T1	5	uCAuCGuCACu	27 %	%						
Экзон Scn10a Sa 14_T2	3 6	CACuuCuuCuG GAAAuAAuAG u	27, 17 %	39,07 %	3,16%	3,03%	6	9	7	6
Экзон Scn10a Sa 4_T5	3 7	AuuuuAGCGuC AuuACCCuGG C	25, 46 %	49,54 %	1,86%	2,52%	7	7	9	8
Экзон Scn10a Sa 1_T3	3 8	AACAACuuCC GuCGCuuuACu C	24, 67 %	57,17 %	2,36%	2,87%	8	4	8	7
Экзон Scn10a Sa 11_T2	3 9	GCCGAGAuAu CuCACuCCCuG A	23, 87 %	56,97 %	4,61%	12,23 %	9	5	4	4
Экзон Scn10a Sa 11_T5	4 0	uGGuGuuCAuC uuCuCCAuGCC	23, 03 %	54,02 %	3,32%	13,89 %	10	6	6	3

*Оценка внецелевой оценки нРНК SpCas9 и SaCas9, нацеленных на SCN9A и SCN10A в iPSC*

Исходя из целевой эффективности в первоначальных скринингах нРНК в iPSC, 40 гидов также были выбраны в качестве приоритетных для оценки внецелевой эффективности. В частности, были отобраны десять гидов из каждой из четырех категорий: 1) десять нРНК для SpCas9, направленных на SCN9A, 2) десять нРНК для SpCas9, направленных на SCN10a, 3) десять нРНК для SaCas9, направленных на SCN9A, и 4) десять нРНК для SaCas9, направленных на SCN10a.

Из 40 нРНК, включенных в исследование, 29 нРНК были отнесены к категории "Уровень 1" (Таблица 14), где ни один из включенных в исследование внецелевых сайтов не вошел в статистическое тестирование; Эти 29 нРНК включали 4 нРНК, для которых не было предсказано ни одного внецелевого сайта в соответствии с критериями сходства последовательностей. На основании данного исследования эти 29 нРНК считаются не имеющими признаков внецелевого редактирования. Кроме того, семь нРНК были отнесены к категории "Уровень 2" (Таблица 15), где по меньшей мере один внецелевой сайт, связанный с этой нРНК, мог участвовать в статистическом тестировании, но не был признан статистически значимым. Внецелевой Профиль этих нРНК считается неудовлетворительным по результатам данного исследования. Кроме того, четыре нРНК были отнесены к категории "Уровень 3" (Таблица 16), где по меньшей мере один внецелевой сайт имел статистически значимое внецелевое редактирование. Эти нРНК

были сильно деприоритизированы, исходя из результатов внецелевого редактирования. Все комбинации генов-мишеней (SCN9A или SCN10A) и ферментов (SpCas9 или SaCas9) были признаны имеющими не менее 5 гидов Уровня 1.

**Таблица 14: 29 нРНК отнесены к Уровню 1 без признаков внецелевого редактирования**

<b>Название нРНК</b>	<b>SEQ ID NO:</b>	<b>кол-во протестированных сайтов</b>	<b>кол-во сайтов с любыми признаками редактирования</b>
Экзон Scn9a Sp 11_T9	1	44	0
Экзон Scn9a Sp 11_T6	3	42	0
Экзон Scn9a Sp 11_T14	4	83	0
Экзон Scn9a Sp 11_T13	5	40	0
Экзон Scn9a Sp 12_T11	9	42	0
Экзон Scn10a Sp 10_T3	30	42	0
Экзон Scn10a Sp 9_T2	22	54	0
Экзон Scn10a Sp 14_T3	23	104	0
Экзон Scn10a Sp 7_T6	25	117	0
Экзон Scn9a Sa 12_T3	20	1	0
Экзон Scn9a Sa 12_T1	16	1	0
Экзон Scn9a Sa 12_T2	12	2	0
Экзон Scn9a Sa 5_T6	13	1	0
Экзон Scn9a Sa 9_T3	14	1	0
Экзон Scn9a Sa 13_T3	15	2	0
Экзон Scn9a Sa 11_T3	11	2	0
Экзон Scn9a Sa 9_T2	18	1	0
Экзон Scn9a Sa 15_T3	19	2	0
Экзон Scn10a Sa 11_T5	40	2	0
Экзон Scn10a Sa 8_T5	33	4	0
Экзон Scn10a Sa 14_T1	35	2	0
Экзон Scn10a Sa 14_T2	36	4	0
Экзон Scn10a Sa 4_T5	37	1	0
Экзон Scn10a Sa 11_T2	39	1	0
Экзон Scn10a Sp 10_T7	24	68	1*
Экзон Scn10a Sa 11_T1	31	0	0
Экзон Scn10a Sa 1_T7	32	0	0

Экзон Scn10a Sa 12_T2	34	0	0
Экзон Scn10a Sa 1_T3	38	0	0

\*В Scn10a Sp Экзон 10\_T7 был протестирован один сайт в связи с пороговым требованием в 0,2%, но этот сайт был в конечном итоге исключен из-за мутации зародышевой линии.

**Таблица 15: Семь нРНК, отнесенных к уровню 2 с неудовлетворительными профилями внецелевого редактирования**

Название нРНК	SE Q ID NO:	ID сайта	Знач. р, T-тест	Знач. р, хи-квадрат	Обработано (% инделов)	Необработано (% инделов)	кол-во несоответствий	кол-во генов
Экзон Scn10a Sp 11_T10	27	xp8:3193432-3193453	0,0981	0	0,89%	0,00%	2	1
Экзон Scn9a Sa 7_T1	17	xp2:165162747-165162773	0,0715	0	0,67%	0,00%	1	1
Экзон Scn9a Sp 7_T5	7	xp12:51699567-51699588	0,2293	0	0,62%	0,00%	0	1
Экзон Scn9a Sp 7_T5	7	xp17:49809267-49809289	0,1707	0,0006	0,35%	0,00%	2	0
Экзон Scn9a Sp 12_T25	2	xp5:139982158-139982180	0,0769	0	0,53%	0,00%	3	0
Экзон Scn9a Sp 14_T1	6	xp18:34382228-34382250	0,0929	0,0140	0,17%	0,00%	3	0
Экзон Scn9a Sp 12_T17	10	xp4:41330183-41330205	0,0841	0,0114	0,16%	0,00%	2	0
Экзон Scn10a Sp 4_T2	29	xp1:191298075-191298097	0,1989	0,0107	0,15%	0,00%	3	0

**Таблица 16: Четыре нРНК, отнесенные к Уровню 3, с подтвержденным ( $p < 0,05$ ) внецелевым редактированием на одном или более сайтах**

Название нРНК	SE Q	ID сайта	Знач. р, T-	Знач. р, хи-	Обработано	Необработано	кол-во	кол-во
---------------	------	----------	-------------	--------------	------------	--------------	--------	--------

	ID NO :		тест	квадрат	(% индел ов)	(% инделов )	несо впад ений	гэп ов
Экзон Scn9a Sp 2_T10	8	xp12:516630 13-51663035	0,020	3,52E-18	1,80%	0,00%	2	0
Экзон Scn9a Sp 2_T10	8	xp4:6474929 7-64749319	0,030	6,26E- 116	8,50%	0,00%	3	0
Экзон Scn10a Sp 1_T15	21	xp15:311794 89-31179511	0,050	1,74E-13	3,90%	0,00%	3	0
Экзон Scn10a Sp 1_T15	21	xp16:895661 97-89566218	0,080	3,48E-07	0,70%	0,00%	2	1
Экзон Scn10a Sp 1_T30	26	xp2:1807854 04- 180785426	0,010	9,20E-07	3,20%	0,00%	3	0
Экзон Scn10a Sp 1_T30	26	xp5:1119252 20- 111925241	0,090	7,59E-09	0,60%	0,00%	2	1
Экзон Scn10a Sp 1_T17	28	xp1:1743474 5-17434767	0,000	7,48E-75	6,10%	0,00%	2	0
Экзон Scn10a Sp 1_T17	28	xp9:1344289 17- 134428939	0,030	0,000920 453	0,40%	0,00%	3	0

#### ДРУГИЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Все признаки, раскрытые в данном описании, могут быть объединены в любой комбинации. Каждый признак, раскрытый в данном описании, может быть заменен альтернативным признаком, служащим той же, эквивалентной или аналогичной цели. Таким образом, если четко не указано иное, каждый раскрытый признак является только примером общей серии эквивалентных или аналогичных признаков.

Из приведенного выше описания специалист в данной области техники может легко установить существенные характеристики настоящего изобретения, не отступая от его сущности и объема, может внести различные изменения и модификации изобретения, чтобы адаптировать его к различным применениям и условиям. Таким образом, другие варианты осуществления также находятся в пределах формулы изобретения.

## ЭКВИВАЛЕНТЫ

Несмотря на то, что несколько патентоспособных вариантов осуществления были описаны и проиллюстрированы в данном документе, специалисты в данной области техники легко определяют множество других способов, и/или структур для обеспечения функции, и/или получения результатов, и/или одного или более преимуществ, описанных в настоящем документе, и каждый из таких вариантов и/или модификаций считается находящимся в пределах объема вариантов осуществления описанного в настоящем документе изобретения. В более общем смысле специалистам в данной области техники будет понятно, что все параметры, размеры, материалы и конфигурации, описанные в данном документе, предназначены для иллюстрации и что фактические параметры, размеры, материалы и/или конфигурации будут зависеть от конкретного применения или применений, для которых используются идеи изобретения. Специалисты в данной области техники узнают или смогут установить, используя не более чем обычные эксперименты, многие эквиваленты конкретных патентоспособных вариантов осуществления изобретения, описанных в данном документе. Следовательно, следует понимать, что вышеупомянутые варианты осуществления представлены только в качестве примера и что в рамках прилагаемой формулы изобретения и ее эквивалентов варианты осуществления изобретения могут быть реализованы иначе, чем конкретно описано и заявлено. Патентоспособные варианты осуществления настоящего изобретения направлены на каждый отдельный признак, систему, изделие, материал, набор и/или способ, описанный в данном документе. Кроме того, любая комбинация двух или более таких признаков, систем, изделий, материалов, наборов и/или способов, если такие признаки, системы, изделия, материалы, наборы и/или способы не противоречат друг другу, включается в объем настоящего изобретения.

Все определения, как они определены и используются в данном документе, следует понимать как контролирующие определения словаря, определения в документах, включенных посредством ссылки, и/или общепринятые значения определенных терминов.

Все ссылки, патенты и патентные заявки, раскрытые в данном документе, включены посредством ссылки в отношении объекта, для которого каждый из них цитируется, что в некоторых случаях может охватывать весь документ.

Упоминания единственного числа в описании и формуле изобретения, если явно не указано иное, следует понимать как означающие «по меньшей мере один».

Фразу «и/или», употребляемую в данном документе в описании и в формуле изобретения, следует понимать как означающую «любой из или оба вместе» для элементов, соединенных таким образом, *т. е.* элементов, которые в одних случаях присутствуют вместе, а в других - отдельно. Множественные элементы, перечисленные с помощью «и/или», должны толковаться одинаково, *то есть* «один или более» из элементов, соединенных таким образом. Необязательно могут присутствовать другие элементы, отличные от элементов, конкретно обозначенных фразой «и/или», независимо

от того, связаны они или не связаны с этими конкретно указанными элементами. Таким образом, в качестве неограничивающего примера ссылка на «А и/или В» при использовании в сочетании с неограничивающей формулировкой, такой как «содержащий», может относиться в одном варианте осуществления только к А (необязательно включая элементы, отличные от В); в другом варианте осуществления только к В (необязательно включая элементы, отличные от А); в еще одном варианте осуществления как к А, так и к В (необязательно включая другие элементы); и *т.п.*

Используемый в данном документе в описании и в формуле изобретения «или» следует понимать как имеющий то же значение, что и «и/или», как определено выше. Например, при разделении элементов в списке «или» или «и/или» следует интерпретировать как включающее, *т. е.*, включение по меньшей мере одного, но также и более одного, из количества или списка элементов, и, необязательно, дополнительных элементов, не внесенных в список. Только термины, явно указывающие на обратное, такие как «только один из» или «ровно один из» или, при использовании в формуле изобретения, «состоящий из» будут относиться к включению ровно одного элемента из количества или списка элементов. Как правило, термин «или», используемый в данном документе, должен интерпретироваться только как указывающий на исключительные альтернативы (*т. е.* «один или другой, но не оба»), когда ему предшествуют условия исключительности, такие как «либо», «один из», «только один из» или «ровно один из». «Состоящий по существу из» при использовании в формуле изобретения имеет свое обычное значение, используемое в области патентного права.

Используемая в данном документе в описании и формуле изобретения фраза «по меньшей мере один» в отношении списка из одного или более элементов должна пониматься как означающая по меньшей мере один элемент, выбранный из любого одного или более элементов в списке элементов, но не обязательно включая по меньшей мере один из каждого элемента, конкретно перечисленного в списке элементов, и не исключая любые комбинации элементов в списке элементов. Это определение также допускает, что могут необязательно присутствовать другие элементы помимо элементов, специально указанных в списке элементов, к которым относится фраза «по меньшей мере один», независимо от того, связаны они или не связаны с этими конкретно указанными элементами. Таким образом, в качестве неограничивающего примера «по меньшей мере один из А и В» (или, эквивалентно, «по меньшей мере один из А или В» или, что эквивалентно, «по меньшей мере один из А и/или В») может относиться в одном варианте осуществления по меньшей мере к одному, необязательно включающему более одного, А, при отсутствии В (и необязательно включая элементы, отличные от В); в другом варианте осуществления по меньшей мере к одному, необязательно включающему более одного, В, при отсутствии А (и необязательно включая элементы, отличные от А); в еще одном варианте осуществления по меньшей мере к одному, необязательно включающему более одного, А, и по меньшей мере к одному, необязательно включающему более одного, В (и необязательно включающему другие элементы); и *т.п.*

Также следует понимать, что, если явно не указано иное, в любых заявленных в данном документе способах, которые включают более одной стадии или действия, порядок стадий или действий способа не обязательно ограничивается порядком, в котором стадии или действия способа указаны.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Система редактирования генов для модификации гена альфа-субъединицы 9 натриевого потенциалзависимого канала (SCN9A), содержащая:

(a) РНК-направленную ДНК-эндонуклеазу или первый полинуклеотидный фрагмент, который содержит первую нуклеотидную последовательность, кодирующую РНК-направленную ДНК-эндонуклеазу; и

(b) второй полинуклеотидный фрагмент, который содержит вторую нуклеотидную последовательность, кодирующую направляющую РНК (нРНК), причем нРНК содержит нуклеотидную последовательность любой из SEQ ID NO: 1-20.

2. Система редактирования генов по п. 1, в которой: (i) РНК-направленная ДНК-эндонуклеаза из (a) представляет собой Cas9 *Staphylococcus pyogenes* (SpCas9); и (ii) нРНК из (b) содержит нуклеотидную последовательность любой из SEQ ID NO: 1-10.

3. Система редактирования генов по п. 2, в которой нРНК из (b) содержит нуклеотидную последовательность любой из SEQ ID NO: 1, 3-5 и 9.

4. Система редактирования генов по п. 1, в которой: (i) РНК-направленная ДНК-эндонуклеаза (a) представляет собой Cas9 *Staphylococcus aureus* (SaCas9); и (ii) нРНК из (b) содержит нуклеотидную последовательность любой из SEQ ID NO: 11-20.

5. Система редактирования генов по п. 4, в которой нРНК из (b) содержит нуклеотидную последовательность любой из SEQ ID NO: 11-16 и 18-20.

6. Система редактирования генов по любому из пп. 1-5, в которой нРНК из (b) дополнительно содержит каркасную последовательность.

7. Система редактирования генов по любому из пп. 4-6, в которой нРНК из (b) содержит нуклеотидную последовательность любой из SEQ ID NO: 11-20, а каркасная последовательность содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 41.

8. Система редактирования генов по любому из пп. 1-7, в которой первая нуклеотидная последовательность, кодирующая РНК-направленную эндонуклеазу из (a), дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую сигнал ядерной локализации (NLS), который слит в рамке с РНК-направленной ДНК-эндонуклеазой.

9. Система редактирования генов по п. 8, в которой NLS представляет собой NLS SV40.

10. Система редактирования генов по любому из пп. 1-9, в которой первый полинуклеотидный фрагмент из (a) и второй полинуклеотидный фрагмент из (b) представляют собой разные полинуклеотиды.

11. Система редактирования генов по п. 10, в которой по меньшей мере один из разных полинуклеотидов представляет собой вирусный вектор.

12. Система редактирования генов по п. 11, в которой вирусный вектор (векторы) представляет собой аденоассоциированный вирусный (AAV) вектор (векторы).

13. Система редактирования генов по любому из пп. 1-12, в которой единичный полинуклеотид содержит первый полинуклеотидный фрагмент из (a) и второй

полинуклеотидный фрагмент из (b).

14. Система редактирования генов по п. 13, в которой единичный полинуклеотид представляет собой вирусный вектор.

15. Система редактирования генов по п. 14, в которой вирусный вектор представляет собой аденоассоциированный вирусный (AAV) вектор.

16. Нуклеиновая кислота, содержащая единичный полинуклеотид по п. 14.

17. Вирусная частица или набор вирусных частиц, которые в совокупности содержат систему редактирования генов по любому из пп. 1-15.

18. Вирусная частица или набор вирусных частиц по п. 17, представляющая собой аденоассоциированную вирусную (AAV) частицу (частицы).

19. Способ редактирования гена альфа-субъединицы 9 натриевого потенциалзависимого канала (SCN9A), включающий приведение в контакт клетки с:

(a) системой редактирования генов по любому из пп. 1-15;

(b) нуклеиновой кислотой по п. 16; или

(c) вирусной частицей или набором вирусных частиц по пп. 17 или 18.

20. Способ по п. 19, в котором стадию приведения в контакт осуществляют путем введения системы редактирования генов из (a), нуклеиновой кислоты из (b) или вирусной частицы (частиц) из (c) нуждающемуся в этом субъекту.

21. Способ по п. 20, в котором субъект представляет собой пациента-человека, испытывающего боль.

22. Способ по п. 21, в котором клетка представляет собой нейрон периферической нервной системы.

23. Способ по п. 19, в котором клетка представляет собой аутологичную клетку.

24. Способ по п. 19, в котором клетка представляет собой гетерологичную клетку.

25. Способ по пп. 23 или 24, в котором клетка представляет собой стволовую клетку.

26. Способ по п. 25, в котором стволовая клетка представляет собой клетку iPSC или мезенхимальную стволовую клетку.

27. Способ по любому из пп. 23-26, дополнительно включающий введение клетки нуждающемуся в этом субъекту.

28. Способ по п. 27, в котором субъект представляет собой пациента-человека, испытывающего боль.

29. Система редактирования генов для модификации гена альфа-субъединицы 10 натриевого потенциалзависимого канала (SCNA10), содержащая:

(a) РНК-направленную ДНК-эндонуклеазу или первый полинуклеотидный фрагмент, который содержит первую нуклеотидную последовательность, кодирующую РНК-направленную ДНК-эндонуклеазу; и

(b) второй полинуклеотидный фрагмент, который содержит вторую нуклеотидную последовательность, кодирующую направляющую РНК (нРНК), причем нРНК содержит нуклеотидную последовательность любой из SEQ ID NO: 21-40.

30. Система редактирования генов по п. 29, в которой: (i) РНК-направленная ДНК-эндонуклеаза из (a) представляет собой Cas9 *Staphylococcus pyogenes* (SpCas9); и (ii) нРНК из (b) содержит нуклеотидную последовательность любой из SEQ ID NO: 21-30.

31. Система редактирования генов по п. 30, в которой нРНК из (b) содержит нуклеотидную последовательность любой из SEQ ID NO: 22-25 и 30.

32. Система редактирования генов по п. 29, в которой: (i) РНК-направленная ДНК-эндонуклеаза (a) представляет собой Cas9 *Staphylococcus aureus* (SaCas9); и (iii) нРНК из (b) содержит нуклеотидную последовательность любой из SEQ ID NO: 31-40.

33. Система редактирования генов по любому из пп. 29-32, в которой нРНК из (b) дополнительно содержит каркасную последовательность.

34. Система редактирования генов по пп. 32 или 33, в которой нРНК из (b) содержит нуклеотидную последовательность любой из SEQ ID NO: 31-40, а каркасная последовательность содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 41.

35. Система редактирования генов по любому из пп. 29-34, в которой первая нуклеотидная последовательность, кодирующая РНК-направленную эндонуклеазу из (a), дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую сигнал ядерной локализации (NLS), который слит в рамке с РНК-направленной ДНК-эндонуклеазой.

36. Система редактирования генов по п. 35, в которой NLS представляет собой NLS SV40.

37. Система редактирования генов по любому из пп. 29-36, в которой первый полинуклеотидный фрагмент из (a) и второй полинуклеотидный фрагмент из (b) представляют собой разные полинуклеотиды.

38. Система редактирования генов по п. 37, в которой по меньшей мере один из разных полинуклеотидов представляет собой вирусный вектор.

39. Система редактирования генов по п. 38, в которой вирусный вектор (векторы) представляет собой аденоассоциированный вирусный (AAV) вектор (векторы).

40. Система редактирования генов по любому из пп. 29-39, в которой единичный полинуклеотид содержит первый полинуклеотидный фрагмент из (a) и второй полинуклеотидный фрагмент из (b).

41. Система редактирования генов по п. 40, в которой единичный полинуклеотид представляет собой вирусный вектор.

42. Система редактирования генов по п. 41, в которой вирусный вектор представляет собой аденоассоциированный вирусный (AAV) вектор.

43. Нуклеиновая кислота, содержащая единичный полинуклеотид по п. 41.

44. Вирусная частица или набор вирусных частиц, которые в совокупности содержат систему редактирования генов по любому из пп. 29-42.

45. Вирусная частица или набор вирусных частиц по п. 44, представляющая собой аденоассоциированную вирусную (AAV) частицу (частицы).

46. Способ редактирования целевого гена, включающий приведение в контакт

клетки с:

(а) системой редактирования генов по любому из пп. 29-42;

(b) нуклеиновой кислотой по п. 43; или

(с) вирусной частицей или набором вирусных частиц по пп. 44 или 45.

47. Способ по п. 46, в котором стадию приведения в контакт осуществляют путем введения системы редактирования генов из (а), нуклеиновой кислоты из (b) или вирусной частицы (частиц) из (с) нуждающемуся в этом субъекту.

48. Способ по п. 47, в котором субъект представляет собой пациента-человека, испытывающего боль.

49. Способ по п. 48, в котором клетка представляет собой нейрон периферической нервной системы.

50. Способ по п. 46, в котором клетка представляет собой аутологичную клетку.

51. Способ по п. 46, в котором клетка представляет собой гетерологичную клетку.

52. Способ по пп. 50 или 51, в котором клетка представляет собой стволовую клетку.

53. Способ по п. 52, в котором стволовая клетка представляет собой клетку iPSC или мезенхимальную стволовую клетку.

54. Способ по любому из пп. 50-53, дополнительно включающий введение клетки нуждающемуся в этом субъекту.

55. Способ по п. 54, в котором субъект представляет собой пациента-человека, испытывающего боль.

56. Способ лечения субъекта, испытывающего боль, включающий введение субъекту:

(а) системы редактирования генов по любому из пп. 1-15 и 29-42;

(b) нуклеиновой кислоты по пп. 16 или 43; или

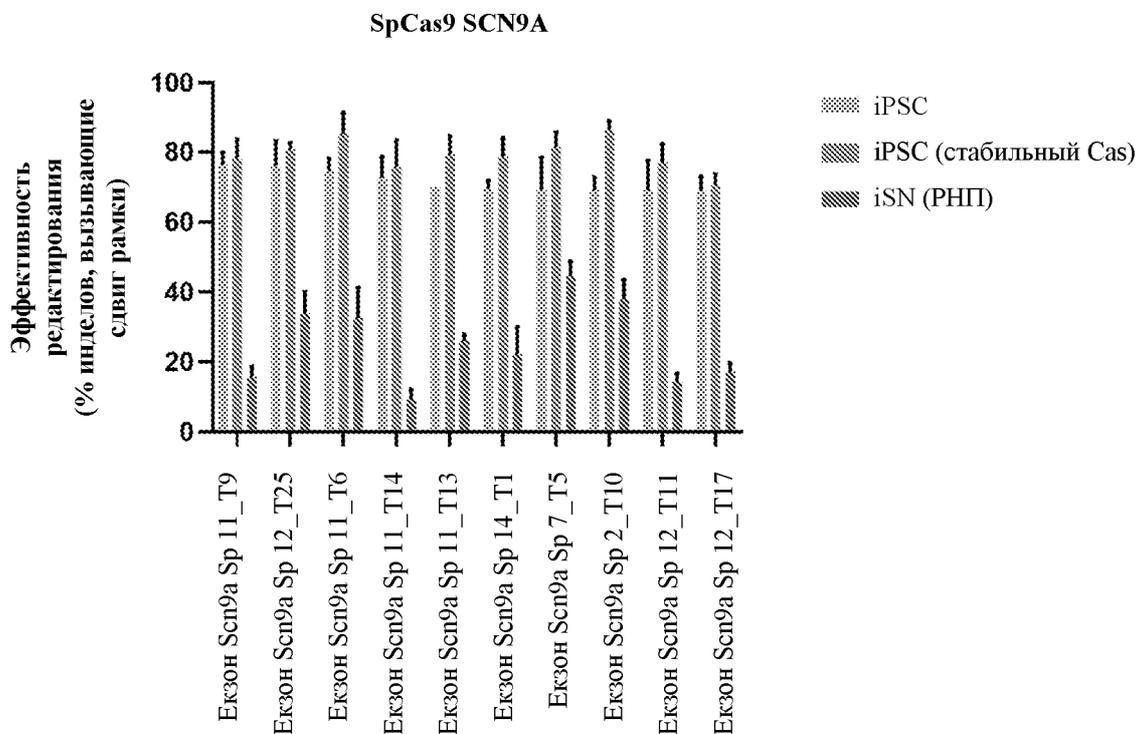
(с) вирусной частицы или набора вирусных частиц по любому из пп. 17, 18, 44 и 45.

57. Способ по п. 56, в котором стадию приведения в контакт осуществляют путем введения системы редактирования генов из (а), нуклеиновой кислоты из (b) или вирусной частицы (частиц) из (с) нуждающемуся в этом субъекту.

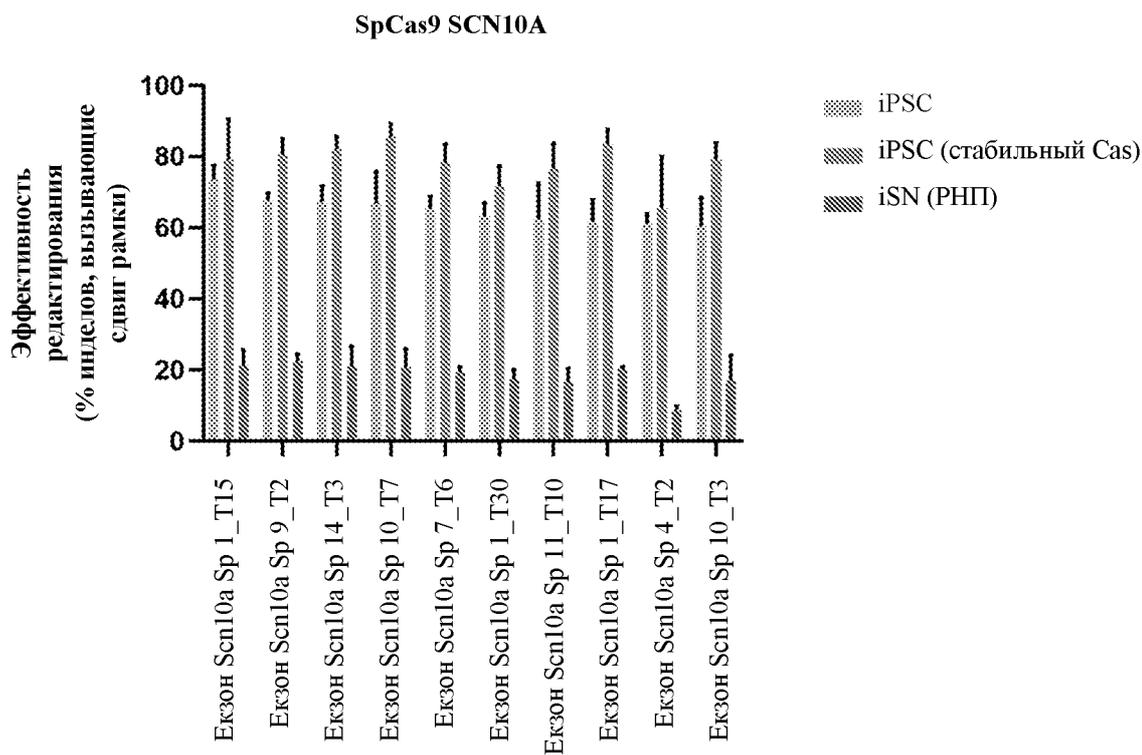
По доверенности

1/2

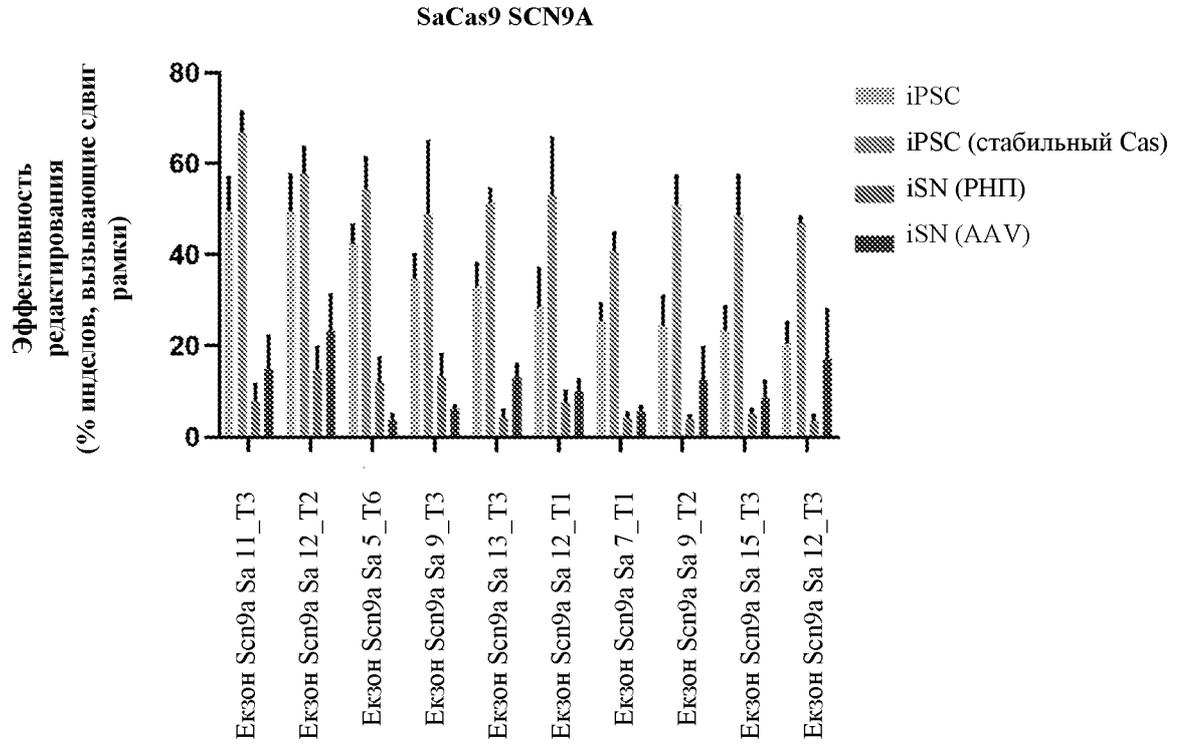
Фиг. 1А



Фиг. 1В



Фиг. 1С



Фиг. 1D

