(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202291201 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.07.20

(22) Дата подачи заявки
2018.09.20

(51) Int. Cl. ***C12N 15/85*** (2006.01)
C12N 15/10 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)
C12N 9/22 (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01)
C12N 9/64 (2006.01)
A01K 67/027 (2006.01)

(54) КРОЛИКИ С НОКАУТОМ ГЕНА ФАКТОРА VIII ИЛИ ФАКТОРА IX, СПОСОБЫ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) **10-2017-0126068**
(32) **2017.09.28**
(33) **KR**
(62) **202090635; 2018.09.20**

(71) Заявитель:
ГРИН КРОСС КОРПОРЕЙШН; МОГАМ ИНСТИТЬЮТ ФОР БАЙОМЕДИКАЛ РИСЕРЧ (KR)

(72) Изобретатель:
Ким Со На, Чон Мён Ын, Ким Мин Чон, Чо Сон Хён, Хван Сон Хо, Квак Хи Чхон, Ли Су Мин, Нам Хён Ча (KR)

(74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)

(57) Изобретение касается кроликов с нокаутом гена фактора VIII или фактора IX, способа их получения и их применения, в частности трансгенных кроликов с нокаутом гена фактора VIII или фактора IX при помощи системы CRISPR/Cas9, способа их получения и их применения. В соответствии с изобретением у трансгенных кроликов с нокаутом гена фактора VIII и/или фактора IX ингибируется функция фактора VIII и/или фактора IX, т.е. белков, играющих важную роль в возникновении гемофилии, поэтому эти трансгенные кролики применимы для разработки способов лечения гемофилии.

202291201 A1

202291201 A1

КРОЛИКИ С НОКАУТОМ ГЕНА ФАКТОРА VIII ИЛИ ФАКТОРА IX, СПОСОБЫ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение касается кроликов с нокаутом гена фактора VIII или фактора IX, способа их получения и их применения. В частности, настоящее изобретение касается трансгенных кроликов с нокаутом гена фактора VIII или фактора IX с помощью системы CRISPR/Cas9, способа их получения и их применения.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Свертывание крови – сложный и важный процесс, который происходит в ответ на повреждение кровеносных сосудов. Оно происходит путем образования тромба, который останавливает кровотечение и начинает восстановление поврежденных кровеносных сосудов; поврежденный участок покрывается фибрином и тромбоцитами, включая тромб. Процесс начинается почти сразу после повреждения.

Процесс свертывания крови включает два типа ингредиентов: клеточные ингредиенты, называемые “тромбоциты”, и белковые ингредиенты, называемые “факторы коагуляции”. Тромбоциты сразу же образуют пробки на месте повреждения, что называется “первичный гемостаз”. Вторичный гемостаз означает явление, при котором белки в плазме, которые появляются одновременно и называются факторами коагуляции или факторами свертывания крови, реагируют посредством сложного каскадного процесса с образованием нитей фибрина, которые усиливают пробки тромбоцитов.

Коагуляционный каскад вторичного гемостаза подразделяется на два пути: эндогенный путь, также называемый “путь контактной активации”, и экзогенный путь, также называемый “путь тканевого фактора”. В поддержании точности процесса участвуют кофакторы и модуляторы, а также целый ряд факторов свертывания крови.

Например, важным фактором в основном механизме регуляции свертывания крови, называемом “антикоагулянтный путь”, является белок С. Активная форма белка С (активированный белок С) представляет собой сериновую протеазу, которая расщепляет два фактора коагуляционного каскада, а именно факторы Va и VIIIa, которые необходимы для массовой продукции тромбина в ассоциации с другими кофакторами (белком S). Разрушение (расщепление) этих факторов отрицательно регулирует количество образующегося тромбина, что дает антикоагулянтный эффект. Известно, что этот белок обладает плейотропным биологическим действием, в частности, антитромботическим действием, противовоспалительным действием, антиапоптотическим действием и профибринолитическим действием.

Фактор IX (в дальнейшем именуется “FIX”) представляет собой сериновую протеазу, которая необходима для свертывания крови. Дефицит этого белка вызывает нарушение свертываемости крови, называемое “гемофилия B”. При свертывании крови активированный FIX (FIXa) объединяется со своим активированным кофактором, фактором VIIIa (в дальнейшем именуется “FVIIIa”), который превращает специфический субстратный фактор X (в дальнейшем именуется “FX”) в активированный фактор X (в дальнейшем именуется “FXa”), который является его активированным производным.

Фактор X является еще одним важным фактором коагуляционного каскада. Активированная форма FX (FXa) является единственной сериновой протеазой, которая способна в сочетании со своим кофактором (коагулирующим фактором Va) активировать протромбин в тромбин. Кроме того, фактор X, который долгое время считался пассивным наблюдателем, является тем ингредиентом, который непосредственно вовлечен в целый ряд типов клеток через активацию двух его главных рецепторов, а именно активируемого протеазой рецептора-1 (PAR-1) и PAR-2. Недавние результаты свидетельствуют, что PAR-2 является важным медиатором, который регулирует взаимодействие между свертыванием крови и течением заболевания и выполняет важные функции в отношении фактора X и при таких фиброзных заболеваниях, как фиброз, ремоделирование тканей и рак (Borensztajn et al., Am. J. Pathol. 2008, 172: 309-20).

Среди различных факторов свертывания крови, ответственных за гемостаз в организме человека, недостаточность фактора VIII именуется “гемофилией A”, а недостаточность фактора IX – “гемофилией B”. Гемофилия A является самым распространенным наследственным заболеванием свертывания крови в мире, за исключением болезни фон Виллебранда, на неё приходится от 80 до 85% всех случаев гемофилии и она встречается у 1 из 5000-10000 живорожденных мальчиков. Гемофилия B встречается реже, она составляет примерно 1/5 от гемофилии A.

У нормальных субъектов активность фактора VIII и фактора IX составляет от 50 до 150%, а при гемофилии A и B проявляется снижение активности при анализах крови. В зависимости от активности факторов свертывания гемофилия классифицируется как тяжелая (активность фактора VIII или фактора IX составляет 1% или менее), умеренная (активность фактора от 1 до 5%), легкая (активность фактора от 5 до 30%) и субнормальная (активность фактора от 30 до 50%), а симптомы варьируются в зависимости от степени тяжести. Например, у пациентов с тяжелой гемофилией A в любое время может возникнуть спонтанное кровотечение без особой травмы. До разработки терапевтического средства (концентрата фактора VIII) средняя продолжительность жизни составляла всего 25 лет из-за кровоизлияния в мозг. Касательно распределения степени

тяжести, частота случаев тяжелой, средней и легкой степени тяжести у пациентов с гемофилией А составляла около 70%, 15% и 15%, соответственно, а частота случаев тяжелой, средней и легкой степени тяжести у пациентов с гемофилией В составляет около 50%, 30% и 20%, соответственно. Обычно частота кровотечений составляет один раз в неделю для тяжелых пациентов, один раз в месяц для умеренных пациентов и один раз в год для легких пациентов. Наиболее распространенные места кровотечения – суставы и мышцы. В частности, кровотечение в суставах особенно отмечается в возрасте от 15 до 25 лет, а когда кровотечение повторяется, то пациент страдает артрогрипозом вследствие гемофильной артропатии в среднем в течение 50 лет.

При лечении гемофилии с помощью лекарств очень важно прогнозировать реакцию появления ингибитора (выработки антител). Частотность реакции появления ингибиторов составляет около 30% и около 3% у пациентов с гемофилией А и пациентов с гемофилией В, соответственно (Kessler CM, Hematology. Am. Soc. Hematol. Educ. Program. 2005: 429-35). Антитела к лекарствам от гемофилии вырабатываются чаще всего в пределах 50 дней после воздействия лекарств и обычно подразделяются на группу, продуцирующую антитела с 0,6 и более единиц Bethesda (BU), и группу, гиперпродуцирующую антитела с 5 и более BU (Kasper CK et al., Thromb. Diath. Haemorrh. 1975, 34(2): 612; Verbruggen B et al., Thromb. Haemost. 1995, 73(2): 247-51; Viel KR et al., N. Engl. J. Med. 2009, 360(16): 1618-27; Kemton CL et al., Blood. 2009, 113(1): 11-7). Очень трудно лечить пациентов с реакцией выработки антител, в частности, они часто страдают от суставных осложнений из-за частых кровотечений (Park YS, J Korean Med. Assoc. 2009, 52(12): 1201-6). Альтернативные методы лечения включают введение обходящих факторы средств типа активирующих протромбин комплексов и рекомбинантного фактора VII, но более предпочтительным может быть удаление антител из группы с реакцией выработки антител посредством иммунотолерантности (Kemton CL et al., Blood 2009, 113(1)): 11-7; Park YS, J. Korean Med. Assoc. 2009, 52(12): 1201-6). Степень успешности иммунотолерантности составляет от 30 до 80%, а после иммунотолерантности пациенты могут продолжать прием обычных препаратов фактора VIII или фактора IX (Park YS, J. Korean Med. Assoc. 2009, 52(12): 1201-6).

Проводилось несколько исследований по основным прогностическим параметрам или причинам реакции выработки антител при лечении гемофилии. Известно, что среди генетических предикторов основной причиной являются дефекты гена F8 (Schwaab R et al., Thromb. Haemost. 1995, 74(6): 1402-6; Oldenburg J et al., Thromb. Haemost. 1997, 77 (2): 238-42), а мутации типа однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) в таких генах, как MHCII, TNF-α, IL-10 и CTLA-4, также имеют существенные статистические ассоциации,

но предполагается, что имеется целый ряд генетических предикторов, которые пока еще не идентифицированы (Hay CR et al., Thromb. Haemost. 1997, 77(2): 234-7; Oldenburg J et al., Thromb. Haemost. 1997, 77(2): 238-42; Astermark J et al., Blood 2006a, 107(8): 3167-72; Astermark J et al., Blood 2006b, 108(12): 3739-45; Astermark J et al., J. Thromb. Haemost. 2007, 5(2): 263-5).

Между тем, с тех пор, как в 2012 г. в гетерологичные клетки была введена система CRISPR/Cas – иммунная система, защищающая микроорганизмы от вирусов, оказалось, что эта система может применяться для избирательного разрезания целевой последовательности нуклеотидов и для редактирования генома у широкого спектра клеток от микроорганизмов до клеток человека, поэтому ожидается, что система CRISPR/Cas будет применяться более эффективно и удобно для биологического усовершенствования в качестве технологии редактирования генов (Jinek et al., Science, 337 (6096): 816-821, 2012).

В методе редактирования генов система CRISPR/Cas9 из числа систем CRISPR/Cas создает двухцепочечные разрывы (DSB) на целевой ДНК под действием Cas9 и единой направляющей РНК (sgРНК), составляющих систему CRISPR/Cas9, и клетка распознает DSB как участки повреждения, индуцируя негомологичное соединение концов (NHEJ) или же типичную репарацию ДНК путем репарации по гомологии (HDR). При этом возможна нормализация посредством мутации или замены гена, что позволяет редактировать геном таким образом. Механизм негомологичного соединения концов (NHEJ) включает компоновку DSB, образовавшихся под действием системы CRISPR/Cas, с последующим простым сращиванием. При этом вводится мутация со сдвигом рамки с тем, чтобы можно было легко индуцировать делецию гена. В то же время в присутствии фрагментов, гомологичных отсекаемым участкам, может происходить репарация по механизму гомологии (HDR), что может привести к нормализации или делеции путем замены гена.

Эта система CRISPR/Cas очень выгодна для получения трансгенных животных, так как она может удалять целевые гены в точном положении. Предпринимались усилия для получения трансгенных животных на основе системы CRISPR/Cas для исследования гемофилии. Недавно сообщалось о мышах с нокаутом по FVIII/FIX, полученных путем применения системы CRISPR/Cas к мышам NSG (Nod/Scid^{-}Il2$\gamma^{-/-}$) (Ching-Tzu Yen et al., Thrombosis Journal, Vol. 14: 22, 2016). Кролики представляют перспективную модель на животных для биомедицинских исследований, так как кролики больше похожи на людей по физиологии и анатомии, чем мыши, требуют меньших затрат на содержание и имеют более короткий период беременности, чем свиньи или обезьяны. Однако пока еще не было известно ни одной модели гемофилии на кроликах с использованием системы

CRISPR/Cas.

На этом фоне, в результате интенсивных усилий по получению кроликов с нокаутом фактора VIII и/или фактора IX, авторы настоящего изобретения обнаружили, что кроликов с нокаутом фактора VIII и/или фактора IX можно получить с помощью системы CRISPR/Cas, включающей sgРНК, способную комплементарно связываться с участком экзона фактора VIII и/или фактора IX, и тем самым совершили настоящее изобретение.

Приведенная выше информация, изложенная в разделе «Уровень техники», приводится только для лучшего понимания предыстории изобретения, поэтому она может включать в себя информацию, которая не входит в предшествующий уровень техники и уже известна в данной стране рядовым специалистам в данной области.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Техническая проблема

Одной из целей настоящего изобретения является получение sgРНК, содержащей наводящий домен, комплементарно связывающийся с областью экзона 1 и экзона 2 фактора VIII (FVIII) или фактора IX (FIX), содержащего её вектора и системы CRISPR/Cas9, включающей этот вектор.

Другой целью настоящего изобретения является получение трансгенных кроликов с нокаутом фактора VIII и/или фактора IX, полученных с помощью системы CRISPR/Cas9, и способа их получения.

Еще одной целью настоящего изобретения является обеспечение применения трансгенных кроликов с нокаутом фактора VIII и/или фактора IX в качестве модели для исследования гемофилии.

Техническое решение

В соответствии с одним аспектом настоящего изобретения вышеуказанные и другие цели могут быть достигнуты путем получения sgРНК, включающей наводящий домен, комплементарно связывающийся с экзонной областью фактора VIII (FVIII) или фактора IX (FIX).

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрены полинуклеотиды, кодирующие sgРНК, векторы, в которые вставлен полинуклеотид, система CRISPR/Cas9, включающая вектор, и трансгенные кролики с нокаутом фактора VIII и/или фактора IX, полученные с помощью системы CRISPR/Cas9.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрен способ получения трансгенных кроликов с нокаутом фактора VIII и/или фактора IX, который включает (a) транскрипцию системы CRISPR/Cas9 для получения sgРНК и мРНК Cas9, (b) введение

мРНК, полученной на стадии (a), в эмбрион и культивирование эмбриона, и (c) пересадку эмбриона, полученного на стадии (b), суррогатной матери для получения трансгенного кролика.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрены клетки, ткани и побочные продукты, выделенные из трансгенных кроликов с нокаутом фактора VIII и/или фактора IX.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

На фиг. 1 представлена схематическая диаграмма (A), показывающая расположение гена фактора VIII, на который нацелена sgРНК, приготовленная для получения трансгенных кроликов в соответствии с одним вопощением настоящего изобретения, и схематическая диаграмма (B), показывающая расположение гена фактора IX, на который нацелена sgРНК, приготовленная для получения трансгенных кроликов в соответствии с одним воплощением настоящего изобретения.

На фиг. 2 представлена (A) последовательность ампликона, используемого при анализе по секвенированию на основе NGS для выявления нокаута фактора VIII у трансгенных кроликов, полученных по настоящему изобретению, и (B) последовательность ампликона, используемого при анализе по секвенированию на основе NGS для выявления нокаута фактора IX у трансгенных кроликов, полученных по настоящему изобретению.

На фиг. 3 представлен (A) результат, подтверждающий делецию 4 п.н. гена фактора VIII у второго кролика с нокаутом фактора VIII (#2), полученного по настоящему изобретению, и (B) результат, подтверждающий делеционную мутацию гена фактора VIII у третьего кролика с нокаутом фактора VIII (#3), полученного по настоящему изобретению.

На фиг. 4 представлен (A) результат, подтверждающий делеционную мутацию гена фактора IX у шестого кролика с нокаутом фактора IX (#6), полученного по настоящему изобретению, (B) результат, подтверждающий делеционную мутацию гена фактора IX у седьмого кролика с нокаутом фактора IX (#7), полученного по настоящему изобретению, и (C) результат, подтверждающий делеционную мутацию гена фактора IX у восьмого кролика с нокаутом фактора IX (#8), полученного по настоящему изобретению.

На фиг. 5 представлен (A) результат, подтверждающий делеционную мутацию гена фактора IX у девятого кролика с нокаутом фактора IX (#9), полученного по настоящему изобретению, и (B) результат, подтверждающий делеционную мутацию гена фактора IX у одиннадцатого кролика с нокаутом фактора IX (#11), полученного по настоящему изобретению.

На фиг. 6 представлен (A) результат, подтверждающий делеционную мутацию гена фактора IX у двенадцатого кролика с нокаутом фактора IX (#12), полученного по настоящему изобретению, (B) результат, подтверждающий делеционную мутацию гена фактора IX у тринадцатого кролика с нокаутом фактора IX (#13), полученного по настоящему изобретению, и (C) результат, подтверждающий делеционную мутацию гена фактора IX у пятого кролика с нокаутом фактора IX (#5), полученного по настоящему изобретению.

На фиг. 7 представлен (A) график, показывающий результаты анализа APTT у трансгенных кроликов с нокаутом фактора VIII или фактора IX, при этом эксперименты проводили два или три раза с плазмой от 4 нормальных кроликов, 2 кроликов с нокаутом фактора VIII и 7 кроликов с нокаутом фактора IX, и (B) график, показывающий результаты анализа TGA, проводившегося два или три раза с плазмой от 9 нормальных кроликов, 3 кроликов с нокаутом фактора VIII и 8 кроликов с нокаутом фактора IX, причем результаты выражали в виде среднего ± SEM, а статистическую значимость определяли с помощью двустороннего непарного t-критерия, ** означает $p < 0{,}01$, а *** означает $p < 0{,}001$.

На фиг. 8 представлена родословная скрещивания для получения поколений F1 и F2.

На фиг. 9 представлен результат, подтверждающий генную мутацию Indel у женского потомства, полученного при скрещивании второго самца кролика с нокаутом фактора VIII (#2), полученного в соответствии с настоящим изобретением, с нормальной самкой.

На фиг. 10 представлен результат, подтверждающий делеционную мутацию гена у женского потомства, полученного при скрещивании шестого самца кролика с нокаутом фактора IX (#6), полученного в соответствии с настоящим изобретением, с нормальной самкой.

На фиг. 11 представлен результат, подтверждающий генную мутацию Indel у самца F2, полученного при скрещивании самки (X′X) поколения F1 от кролика с нокаутом фактора VIII, полученной в соответствии с настоящим изобретением, с нормальным самцом.

На фиг. 12 представлен результат, подтверждающий генную мутацию Indel у самца F2, полученного при скрещивании самки-носителя (X′X) поколения F1 от кролика с нокаутом фактора IX, полученной в соответствии с настоящим изобретением, с нормальным самцом.

На фиг. 13 представлена схема, иллюстрирующая получение модели кровотечения

из когтей кролика.

На фиг. 14 представлен уровень гемоглобина в крови при измерении в гемолизированных образцах.

ОСУЩЕСТВЛЕНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Если не указано иначе, все используемые здесь технические и научные термины имеют такие же значения, которые известны специалистам в той области, к которой относится настоящее изобретение. В общем, используемая здесь номенклатура хорошо известна в данной области и обычно она и применяется.

В настоящем изобретении термины “нуклеиновая кислота” и “полинуклеотид” относятся к дезоксирибонуклеотидным или рибонуклеотидным полимерам в линейном или циклическом трехмерном виде и в одно- или двухцепочечном виде. В целях настоящего изобретения эти термины не следует истолковывать как ограничение длины полимеров. Эти термины могут охватывать известные аналоги природных нуклеотидов, равно как и нуклеотиды, модифицированные по основаниям, сахарам и/или фосфатным группировкам (напр., фосфоротиоатным остовам). В общем, аналоги определенных нуклеотидов обладают такой же специфичностью спаривания оснований, то есть аналоги A образуют пары оснований с T.

В настоящем изобретении термин “нуклеотид” относится к дезоксирибонуклеотидам или рибонуклеотидам. Нуклеотиды могут представлять собой стандартные нуклеотиды (т.е. аденозин, гуанозин, цитидин, тимидин и уридин) или аналоги нуклеотидов. Аналоги нуклеотидов – это нуклеотиды, содержащие модифицированные пуриновые или пиримидиновые основания, либо модифицированные рибозные группировки. Аналоги нуклеотидов могут представлять собой природные нуклеотиды (напр., инозин) или же искусственно полученные нуклеотиды. Неограничительные примеры модификаций группировок сахаридов или оснований нуклеотидов включают добавление (или удаление) ацетильных групп, аминогрупп, карбоксильных групп, карбоксиметильных групп, гидроксильных групп, метильных групп, фосфорильных групп и тиоловых групп, а также замены атомов углерода и азота в основаниях другими атомами (напр., 7-деазапурин). Аналоги нуклеотидов также включают дидезоксинуклеотиды, 2′-O-метилнуклеотиды, блокированные нуклеиновые кислоты (LNA), пептидные нуклеиновые кислоты (PNA) и морфолиновые нуклеотиды.

В настоящем изобретении термин “sgРНК” (единая направляющая РНК) означает первый участок, комплементарно связывающийся с целевым участком, в направляющей РНК, направляющей белок Cas в системе CRISPR/Cas на целевой участок.

В настоящем изобретении направляющая РНК взаимодействует с белком Cas и

направляет белок Cas на определенный целевой сайт, причем 5′-конец направляющей РНК образует пару оснований с последовательностью определенного протоспейсера в хромосомной последовательности.

Каждая направляющая РНК включает в себя три участка: первый участок на 5′-конце, который комплементарен целевому сайту в хромосомной последовательности, второй внутренний участок, который образует структуру типа шпильки, и третий 3′-участок, который в основном остается в виде одноцепочечного домена. Первые участки соответствующих направляющих РНК отличаются с тем, что каждая направляющая РНК направляет слитый белок на определенный целевой сайт. Второй и третий участки каждой направляющей РНК могут быть одинаковыми во всех направляющих РНК.

Первый участок направляющей РНК комплементарен последовательности (т.е. последовательности протоспейсера) в целевом сайте хромосомной последовательности с тем, чтобы первый участок направляющей РНК смог образовывать пары оснований с целевым сайтом. В различных воплощениях первый участок направляющей РНК может включать около 10 нуклеотидов или же более 25 нуклеотидов. Например, длина участка спаривания оснований между первым участком направляющей РНК и целевым сайтом в хромосомной последовательности может составлять 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22. 23, 24 или 25 нуклеотидов или же более 25 нуклеотидов. В типичном воплощении длина первого участка направляющей РНК составляет 19, 20 или 21 нуклеотид.

Направляющая РНК также содержит второй участок, который образует вторичную структуру. В некоторых воплощениях вторичная структура включает в себя стебелек (или шпильку) и петлю. Длина петли и стебля может варьироваться. Например, длина петли может составлять от 3 до 10 нуклеотидов, а длина стебля может составлять от 6 до 20 пар оснований. Стебель может включать один или несколько выступов от 1 до 10 нуклеотидов. Таким образом, общая длина второго участка может составлять от 16 до 60 нуклеотидов. В типичном воплощении длина петли составляет около 4 нуклеотидов, а стебель включает около 12 пар оснований.

Направляющая РНК также содержит третий участок на 3′-конце, который в основном остается в виде одноцепочечной нити. Таким образом, третий участок не имеет комплементарности с какой-либо хромосомной последовательностью в данных клетках и не имеет комплементарности с остальной частью направляющей РНК. Длина третьего участка может варьироваться. Как правило, длина третьего участка составляет более 4 нуклеотидов. Например, длина третьего участка может составлять от 5 до 60 нуклеотидов.

Общая длина второго и третьего участков (также называемых “универсальными или скелетными участками”) направляющей РНК может составлять от 30 до 120

нуклеотидов. В одном аспекте общая длина второго и третьего участков направляющей РНК составляет от 70 до 100 нуклеотидов.

В настоящем изобретении определяли, можно ли получить кроликов с нокаутом фактора VIII и/или фактора IX с помощью системы CRISPR/Cas.

А именно, в одном воплощении настоящего изобретения получают sgРНК, содержащую наводящий домен, который комплементарно связывается с частью экзонной области фактора VIII (FVIII) или фактора IX (FIX), транскрибируют содержащую её систему CRISPR/Cas и вводят sgРНК в эмбрион кролика, культивируют и пересаживают суррогатной матери для получения кролика. Результаты показывают, что у полученного кролика в экзонной области фактора VIII или фактора IX происходят делеционные мутации (фиг. 3-7).

Так, в одном аспекте настоящего изобретения предусмотрена sgРНК, содержащая наводящий домен, который комплементарно связывается с частью экзонной области фактора VIII (FVIII) или фактора IX (FIX).

В настоящем изобретении экзонная область гена фактора VIII (FVIII) может представлять собой экзонную область, представленную нуклеотидной последовательностью по SEQ ID NO: 1, но не ограничивается этим.

В настоящем изобретении экзонная область гена фактора IX (FIX) может представлять собой экзонную область, представленную нуклеотидной последовательностью по SEQ ID NO: 2, но не ограничивается этим.

Настоящим изобретением также предусмотрены полинуклеотиды, кодирующие sgРНК.

В настоящем изобретении полинуклеотид может быть представлен нуклеотидной последовательностью по любой из SEQ ID NO: 3-6, но не ограничивается этим.

В настоящем изобретении полинуклеотид, кодирующий sgРНК, обычно функционально связан по меньшей мере с одной контролирующей транскрипцию последовательностью для экспрессии sgРНК в данных клетках или эмбрионах. Например, ДНК, кодирующая sgРНК, может быть функционально связана с последовательностью промотора, распознаваемого РНК-полимеразой III (Pol III). Примеры подходящих промоторов Pol III включают, без ограничения, РНК-промоторы U6, U3, H1 и 7SL млекопитающих.

Настоящим изобретением также предусмотрены векторы, в которые вставляются полинуклеотиды.

Молекулы ДНК, кодирующие sgРНК, могут быть линейными или циклическими. В некоторых воплощениях последовательность ДНК, кодирующая sgРНК, может быть

частью вектора. Подходящие векторы включают плазмидные векторы, фагмиды, космиды, искусственные/мини-хромосомы, транспозоны и вирусные векторы. В типичном воплощении ДНК, кодирующая белок Cas, находится в плазмидном векторе. Неограничительные примеры подходящих плазмидных векторов включают pUC, pBR322, pET, pBluescript и их варианты. Векторы могут содержать дополнительные контролирующие экспрессию последовательности (напр., последовательности энхансеров, последовательности Козака, последовательности полиаденилирования или последовательности терминации транскрипции), последовательности селектируемых маркеров (напр., генов устойчивости к антибиотикам), начала репликации и т.п.

В определенных воплощениях, в которых и белок Cas, и sgРНК вводятся в клетки в виде молекул ДНК, каждая из них может быть частью отдельной молекулы (напр., одного вектора, включающего последовательность, кодирующую слитый белок, и второго вектора, включающего последовательность, кодирующую sgРНК), или же обе могут быть частью одной и той же молекулы (напр., одного вектора, включающего кодирующие (и контролирующие) последовательности как для слитого белка, так и для направляющей РНК).

Настоящим изобретением также предусмотрена система CRISPR/Cas, включающая в себя вектор.

В настоящем изобретении система CRISPR/Cas может быть системой I типа, II типа или III типа. Неограничительные примеры подходящих белков CRISPR/Cas включают Cas3, Cas4, Cas5, Cas5e (или CasD), Cas6, Cas6e, Cas6f, Cas7, Cas8a1, Cas8a2, Cas8b, Cas8c, Cas9, Cas10, Cas10d, CasF, CasG, CasH, Csy1, Csy2, Csy3, Cse1 (или CasA), Cse2 (или CasB), Cse3 (или CasE), Cse4 (или CasC), Csc1, Csc2, Csa5, Csn2, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csm6, Cmr1, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Csb1, Csb2, Csb3, Csx17, Csx14, Csx10, Csx16, CsaX, Csx3, Csz1, Csx15, Csf1, Csf2, Csf3, Csf4 и Cu1966.

В настоящем изобретении белок CRISPR/Cas получают из белка Cas9. Белок Cas9 получают из Streptococcus pyogenes, Streptococcus thermophilus, Streptococcus sp., Nocardiopsis dassonvillei, Streptomyces pristinaespiralis, Streptomyces viridochromogenes, Streptosporangium roseum, Alicyclobacillus acidocaldarius, Bacillus pseudomycoides, Bacillus selenitireducens, Exiguobacterium sibiricum, Lactobacillus delbrueckii, Lactobacillus salivarius, Microscilla marina, Burkholderiales sp., Polaromonas naphthalenivorans, Polaromonas sp., Crocosphaera watsonii, Cyanothece sp., Microcystis aeruginosa, Synechococcus sp., Acetohalobium arabaticum, Ammonifex degensii, Caldicellulosiruptor bescii, Candidatus desulforudis, Clostridium botulinum, Clostridium difficile, Finegoldia magna, Natranaerobius thermophilus, Pelotomaculum thermopropionicum, Acidithiobacillus caldus, Acidithiobacillus

ferrooxidans, Allochromatium vinosum, Marinobacter sp., Nitrosococcus halophilus, Nitrosococcus watsonii, Pseudoalteromonas haloplanktis, Ktedonobacter racemifer, Methanohalobium evestigatum, Anabaena variabilis, Nodularia spumigena, Nostoc sp., Arthrospira maxima, Arthrospira platensis, Arthrospira sp., Lyngbya sp., Microcoleus chthonoplastes, Oscillatoria sp., Petrotoga mobilis, Thermosipho africanus или Acaryochloris marina.

Как правило, белки CRISPR/Cas содержат по меньшей мере один распознающий РНК и/или РНК-связывающий домен. Распознающий РНК и/или связывающий РНК домен взаимодействует с направляющей РНК. Белки CRISPR/Cas также содержат нуклеазные домены (т.е. ДНКазные или РНКазные домены), ДНК-связывающие домены, геликазные домены, РНКазные домены, домены межбелкового взаимодействия, домены димеризации и другие домены. CRISPR/Cas-подобный белок может представлять собой белок CRISPR/Cas дикого типа, модифицированный белок CRISPR/Cas или фрагмент белка CRISPR/Cas дикого типа. CRISPR/Cas-подобные белки могут быть модифицированы для улучшения сродства и/или специфичности связывания нуклеиновой кислоты, изменения ферментативной активности и/или изменения других свойств белка. Например, нуклеазный (т.е. ДНКазный, РНКазный) домен CRISPR/Cas-подобного белка может быть модифицирован, удален или инактивирован. С другой стороны, CRISPR/Cas-подобные белки могут быть укорочены для удаления доменов, которые не являются необходимыми для функции слитого белка. CRISPR/Cas-подобные белки также могут быть укорочены или модифицированы для оптимизации активности эффекторного домена слитого белка.

В некоторых воплощениях CRISPR/Cas-подобный белок может происходить из белка Cas9 дикого типа или его фрагмента. В других воплощениях CRISPR/Cas-подобный белок может происходить из модифицированного белка Cas9. Например, аминокислотная последовательность белка Cas9 может быть модифицирована для изменения одного или нескольких свойств белка (напр., нуклеазной активности, аффинности и стабильности). С другой стороны, домены белка Cas9, которые не участвуют в РНК-индуцированном расщеплении, могут быть удалены из белка, так что модифицированный белок Cas9 будет меньше, чем белок Cas9 дикого типа.

Как правило, белок Cas9 содержит по меньшей мере два нуклеазных (т.е. ДНКазных) домена. Например, белок Cas9 может включать RuvC-подобный нуклеазный домен и HNH-подобный нуклеазный домен. Домены RuvC и HNH работают вместе, разрезая отдельные нити и тем самым производя двухцепочечные разрывы в ДНК (Jinek et al., Science, 337: 816-821). В некоторых воплощениях происходящий из Cas9 белок может быть модифицирован с тем, чтобы он включал лишь один функциональный нуклеазный

домен (либо RuvC-подобный домен, либо HNH-подобный нуклеазный домен). Например, происходящий из Cas9 белок может быть модифицирован таким образом, чтобы один из нуклеазных доменов был удален или мутирован и поэтому больше не функционировал (т.е. так, чтобы не проявлялась нуклеазная активность). В некоторых воплощениях, в которых один из нуклеазных доменов неактивен, происходящий из Cas9 белок может вводить пробел в двухцепочечную нуклеиновую кислоту (такой белок называется “никазой”), но не расщепляет двухцепочечную ДНК. Например, превращение аспартата в аланин (D10A) в RuvC-подобном домене преобразует происходящие из Cas9 белки в никазы. Точно так же превращение гистидина в аланин (H840A или H839A) в домене HNH преобразует полученные из Cas9 белки в никазы. Каждый нуклеазный домен может быть модифицирован хорошо известными методами типа сайт-направленного мутагенеза, опосредованного ПЦР мутагенез и полного синтеза генов, а также другими методами, известными в данной области.

В настоящем изобретении ДНК, кодирующая белок Cas, может быть функционально связана по меньшей мере с одной контролирующей последовательностью промотора. В некоторых воплощениях кодирующая последовательность ДНК может быть функционально связана с контролирующей последовательностью промотора для экспрессии в эукариотических клетках или представляющих интерес животных. Контролирующая последовательность промотора может быть структурной, регулируемой или тканеспецифичной. Подходящие контролирующие последовательности структурных промоторов включают, без ограничения, ранние промоторы цитомегаловируса (CMV), промоторы обезьяньего вируса (SV40), главные поздние промоторы аденовируса, промоторы вируса саркомы Рауса (RSV), промоторы вируса рака молочной железы мыши (MMTV), промоторы фосфоглицераткиназы (PGK), промоторы α-фактора элонгации (ED1), промоторы убиквитина, промоторы актина, промоторы тубулина, промоторы иммуноглобулинов, их фрагменты либо их комбинации. Примеры подходящих контролирующих последовательностей регулируемых промоторов включают, без ограничения, промоторы, регулируемые тепловым шоком, металлами, стероидами, антибиотиками или спиртами. Неограничительные примеры тканеспецифичных промоторов включают промоторы B29, промоторы CD14, промоторы CD43, промоторы CD45, промоторы CD68, промоторы десмина, промоторы эластазы-1, промоторы эндоглина, промоторы фибронектина, промоторы Flt-1, промоторы GFAP, промоторы GPIIb, промоторы ICAM-2, промоторы INF-β, промоторы Mb, промоторы NphsI, промоторы OG-2, промоторы SP-B, промоторы SYN1 и промоторы WASP. Последовательности промоторов могут быть дикого типа или модифицированы для более

действенной или эффективной экспрессии. В одном типичном воплощении кодирующая ДНК может быть функционально связана с промотором CMV для структурной экспрессии в клетках млекопитающих.

В настоящем изобретении последовательность, кодирующая белок Cas, может быть функционально связана с последовательностью промотора, распознаваемого РНК-полимеразой фага для синтеза мРНК in vitro. В таких воплощениях транскрибированная in vitro РНК может быть очищена и использована хорошо известными способами. Например, последовательность промотора может быть мутантной последовательностью промотора T7, T3 или SP6 либо последовательностью промотора T7, T3 или SP6. В типичном воплощении ДНК, кодирующая белок Cas, функционально связана с промотором T7 для синтеза мРНК in vitro с помощью РНК-полимеразы T7.

В альтернативных воплощениях последовательность, кодирующая белок Cas, может быть функционально связана с последовательностью промотора для экспрессии белка Cas in vitro в бактериальных или эукариотических клетках. В таких воплощениях экспрессированный белок может быть очищен и использован известными методами. Подходящие бактериальные промоторы включают, без ограничения, промоторы T7, промоторы lac-оперона, промоторы trp, их варианты и их комбинации. Типичным бактериальным промотором является tac, который представляет собой гибрид промоторов trp и lac. Неограничительные примеры подходящих эукариотических промоторов приведены выше. В другом аспекте ДНК, кодирующая белок Cas, также может быть связана с сигналом полиаденилирования (напр., сигналом поли-А SV40 или сигналом поли-А бычьего гормона роста (BGH)) и/или по меньшей мере с одной последовательностью терминации транскрипции.

В различных воплощениях ДНК, кодирующая белок Cas, может находиться в векторе. Подходящие векторы включают плазмидные векторы, фагемиды, космиды, искусственные/мини-хромосомы, транспозоны и вирусные векторы (напр., лентивирусные векторы, аденоассоциированные вирусные векторы). В типичном воплощении ДНК, кодирующая белок Cas, находится в плазмидном векторе. Неограничительные примеры подходящих плазмидных векторов включают pUC, pBR322, pET, pBluescript и их варианты. Векторы могут содержать дополнительные контролирующие экспрессию последовательности (напр., последовательности энхансеров, последовательности Козака, последовательности полиаденилирования, последовательности терминации транскрипции), последовательности селектируемых маркеров (напр., генов устойчивости к антибиотикам), начала репликации и т.п. Дополнительная информация представлена в “Current Protocols in Molecular Biology” Ausubel et al., John Wiley & Sons, New York, 2003;

или “Molecular Cloning: A Laboratory Manual” Sambrook & Russell, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 3rd edition, 2001.

Белок Cas вместе с направляющей РНК направляется к целевому сайту в хромосомной последовательности, где белок Cas вводит двухцепочечный разрыв в хромосомную последовательность. Целевой сайт не имеет ограничений в отношении последовательности за исключением того, что за этой последовательностью сразу же следует (нижележащая) консенсусная последовательность. Эта консенсусная последовательность также известна как прилегающий к протоспейсеру мотив (PAM). Примеры PAM включают, без ограничения, NGG, NGGNG и NNAGAAW, где N означает любой нуклеотид, а W означает A или T. Как изложено выше, первый участок (на 5′-конце) направляющей РНК комплементарен протоспейсеру целевой последовательности.

Как правило, первый участок направляющей РНК имеет длину от 19 до 21 нуклеотида. Так, в некоторых аспектах последовательность целевого сайта в хромосомной последовательности представлена 5′-N19-21-NGG-3′. PAM выделен курсивом. Целевой сайт может находиться в кодирующей области гена, интроне гена, контролирующем участке гена, некодирующей области между генами и т.п. Ген может представлять собой ген, кодирующий белок, или ген, кодирующий РНК. Ген может быть представлен любым геном, представляющим интерес, а предпочтительно это ген фактора VIII или IX.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрены трансформированные кролики, полученные с помощью системы CRISPR/Cas9, включающей вектор со вставленным полинуклеотидом, кодирующим sgРНК, содержащую наводящий домен, который комплементарно связывается с частью экзонной области фактора VIII (FVIII) или фактора IX (FIX).

В другом аспекте трансгенных кроликов получают способом, включающим:

(a) транскрибирование системы CRISPR/Cas9 по настоящему изобретению для получения sgРНК и мРНК Cas9;

(b) введение мРНК, полученной на стадии (a), в эмбрион и культивирование эмбриона; и

(c) пересадку эмбриона, полученного на стадии (b), суррогатной матери для получения трансгенного кролика.

В настоящем изобретении трансгенных кроликов можно получать способом, который дополнительно включает определение того, происходила или нет трансформация при получении кролика.

В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрено потомство трансгенного кролика, полученное способом, включающим скрещивание трансгенного кролика для

получения потомства трансгенного кролика.

В настоящем изобретении “потомство” означает любое жизнеспособное потомство трансгенному кролика, полученное при скрещивании с трансгенным кроликом, более конкретно оно может представлять собой поколение F1, полученное при скрещивании трансгенного кролика с другим трансгенным кроликом в качестве родителей, поколение F2, полученное при скрещивании кролика-носителя поколения F1 с нормальным кроликом, или последующее поколение, без ограничения.

В настоящем изобретении скрещивание может проводиться путем скрещивания с трансгенным кроликом или с нормальным кроликом.

В настоящем изобретении у трансгенных кроликов или у потомства трансгенных кроликов может проявляться фенотип гемофилии, так как у них отключен фактор VIII или фактор IX.

Настоящим изобретением также предусмотрены клетки, ткани и побочные продукты, выделенные из трансгенных кроликов или потомства трансгенных кроликов.

В настоящем изобретении побочным продуктом является любое вещество, полученное из трансгенных кроликов, но предпочтительно оно выбрано из группы, состоящей из крови, сыворотки, мочи, кала, слюны, органов и кожи, без ограничения. В другом аспекте настоящего изобретения предусмотрен способ получения трансгенных кроликов с нокаутом фактора VIII или фактора IX, который включает:

(a) транскрибирование системы CRISPR/Cas9 по настоящему изобретению для получения sgРНК и мРНК Cas9;

(b) введение мРНК, полученной на стадии (a), в эмбрион и культивирование эмбриона; и

(c) пересадку эмбриона, полученного на стадии (b), суррогатной матери для получения трансгенного кролика.

Настоящим изобретением также предусмотрен способ получения потомства трансгенных кроликов, включающий скрещивание трансгенных кроликов, полученных данным способом, для получения потомства трансгенных кроликов.

В настоящем изобретении скрещивание может проводиться путем скрещивания с трансгенным кроликом или нормальным кроликом.

Настоящим изобретением также предусмотрены трансгенные кролики, проявляющие фенотип гемофилии A по необходимости, так как у них отключен фактор VIII, и способ их получения.

Настоящим изобретением также предусмотрены трансгенные кролики, проявляющие фенотип гемофилии B при необходимости путем отключения у них фактора

IX, и способ их получения.

Настоящим изобретением также предусмотрены трансгенные кролики, полученные путем скрещивания кроликов с нокаутом фактора VIII или кроликов с нокаутом фактора IX, которые применимы для изучения иммунных реакций при инъекции фактора VIII или IX человека, и способ их получения.

Кролики с нокаутом фактора VIII или фактора IX не проявляет активности, связанной с фактором VIII или фактором IX, поэтому они применимы для изучения иммунных реакций при инъекции фактора VIII или IX человека и разработки лекарств от гемофилии.

ПРИМЕРЫ

Далее настоящее изобретение будет описано более подробно на примерах. Однако специалистам в данной области техники должно быть ясно, что эти примеры приводятся только для иллюстрации настоящего изобретения и не должны рассматриваться как ограничивающие объем настоящего изобретения.

Пример 1. Разработка sgРНК, конструирование вектора для CRISPR/Cas9 и транскрипция in vitro

1-1. Разработка sgРНК

В случае фактора VIII были разработаны sgРНК, представленные нуклеотидными последовательностями SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4, используя последовательность, представленную следующей SEQ ID NO: 1 в области экзона 1 (фиг. 1).

SEQ ID NO: 1

ATGCAAATAGAGCTCTCCACCTGTTTCTTTGTGTGTATTTTACAATTGA
GCTTTAGTGCCACCAGAAGATACTACCTGGGTGCAGTGAACTGTCCTGGGACTATAT
GCACAGTGACCTGCTCAGTGA

SEQ ID NO: 3 (sgРНК-1, “+”-нить)

5′-GCCACCAGAAGATACTACCTGGG-3′

SEQ ID NO: 4 (sgРНК-2, “–”-нить)

5′-GTCACTGTGCATATAGTCCCAGG-3′

В случае фактора IX были разработаны sgРНК, представленные нуклеотидными последовательностями SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 6, используя последовательность, представленную следующей SEQ ID NO: 2 в области экзона 2.

SEQ ID NO: 2

TTTTTCTTGATCATGAAAATGCCACCAAAATTCTGAATCGGGCAAAGA
GGTACAATTCAGGTAAACTGGAAGAGTTTGTTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAATGT
ATAGAAGAAAGGTGTAGTTTTGAAGAAGCTCGAGAAGTTTTTGAAAACACTGAAAA

AACT

SEQ ID NO: 5 (sgРНК-1, “+”-нить)

5′-ATGCCACCAAAATTCTGAATCGG-3′

SEQ ID NO: 6 (sgРНК-2, “+”-нить)

5′-CGGGCAAAGAGGTACAATTCAGG-3′

1-2. Транскрипция sgРНК и мРНК Cas9

Составляли олигонуклеотиды, подходящие для последовательностей sgРНК, разработанных в Примере 1-1, и клонировали в вектор pUC57-T7 (Addgene, ID 51306), а полученную sgРНК с расположенным в ней промотором T7 амплифицировали методом ПЦР с праймерами по SEQ ID NOs: 7 и 8.

Получали продукт ПЦР-амплификации с помощью РНК-полимеразы T7 (набор Maxiscript T7, Ambion), а затем очищали (набор RNeasy Mini, Qiagen).

SEQ ID NO: 7 (T7-F)

5′-GAAATTAATACGACTCACTAT-3′

SEQ ID NO: 8 (T7-R)

5′-AAAAAAAGCACCGACTCGGTGCCAC-3′

В случае мРНК Cas9 линеаризировали экспрессирующий Cas9 вектор, а затем получали кэппированую мРНК с помощью набора Message Machine SP6 (Ambion) и очищали с помощью набора RNeasy Mini (Qiagen).

Пример 2. Введение транскрибированной Cas9/sgРНК в эмбрионы

Полученную в примере 1 sgРНК Cas9/FVIII или sgРНК Cas9/FIX вводили в оплодотворенные яйцеклетки кролика известным методом (Sci. Rep. 2016, 6: 222024).

Примерно через 18-20 часов после оплодотворения переносили оплодотворенные яйцеклетки кроликов в среду для культивирования эмбрионов (9,5 г TCM-119, 0,05 г $NaHCO_3$ (Sigma, S4019), 0,75 г Hepes (Sigma, H3784), 0,05 г пенициллина, 0,06 г стрептомицина, 1,75 г NaCl, 3,0 г BSA и 1 л дистиллированной воды Milli Q), вводили в цитоплазму эмбриона sgРНК FVIII (25 нг/мкл) и мРНК Cas9 (100 нг/мкл) или sgРНК FIX (25 нг/мкл) и мРНК Cas9 (100 нг/мкл), а затем культивировали эмбрионы в культуральной среде при 5% диоксида углерода в течение 30-60 минут при 38,5°C, а затем пересаживали эмбрионы суррогатным матерям для получения кроликов.

Пример 3. Генотипирование трансгенных кроликов

3-1. Генотипирование кроликов с нокаутом фактора VIII

Ампликоны, представленные в (a) на фиг. 2, амплифицировали с помощью праймеров SEQ ID NO: 9 и 10, прикрепляли адаптеры и метки с помощью вторичной и третичной ПЦР, проводили глубокое секвенирование с помощью MiSeq (Illumina, набор

MiSeq Reagent Kit V) и анализировали результаты с помощью Cas-Analyzer (Bioinformatics, 2017 Jan 15, 333(2): 286-288).

SEQ ID NO: 9 (F8-F)

5′-GAGCCATGCAAATAGAGCTC-3′

SEQ ID NO: 10 (F8-R)

5′-ATCTTTCTCCAGCCAGAGTC-3′

Результаты показали, что в генах FVIII выявляются индели у субъектов #2 и #3, как видно из табл. 1 и фиг. 3.

Таблица 1

Образец кролика		Ген	Общее число прочтений	Число прочтений со вставками	Число прочтений с делециями	Число прочтений с инделями (%)	Профиль инделей
#2	кровь	F8	61151	0	61128	61128 (100,0%)	-4
#3	кровь	F8	55016	0	54919	54919 (99,8%)	-3, -12

Иными словами, у субъекта #2 выявлялась мутация, при которой был удален фрагмент нуклеиновой кислоты длиной в 4 п.н., вызывая преждевременные стоп-кодоны и нонсенс-опосредованный распад и тем самым подавляя экспрессию генов. У субъекта #3 выявлялись мутации, при которых были удалены фрагменты нуклеиновой кислоты длиной в 3 п.н. и 12 п.н. (фиг. 3).

3-2. Генотипирование кроликов с нокаутом фактора IX

Ампликоны, представленные в (b) на фиг. 2, амплифицировали с помощью праймеров SEQ ID NO: 11 и 12, прикрепляли адаптеры и метки с помощью вторичной и третичной ПЦР, проводили глубокое секвенирование с помощью MiSeq (Illumina, набор MiSeq Reagent Kit V) и анализировали результаты с помощью Cas-Analyzer (Bioinformatics, 2017 Jan 15, 333(2): 286-288). Первичную амплификацию у субъекта #5 проводили с помощью праймера F9-R2 по SEQ ID NO: 13.

SEQ ID NO: 11 (F9-F)

5′-TTGGCTTTGGGATTAGTTGG-3′

SEQ ID NO: 12 (F9-R)

5′-TCAAAAACTTCTCGAGCTTC-3′

SEQ ID NO: 13 (F9-R2)

5′-TCTCTGTCTGTAACTCTACC-3′

Результаты показали, что в генах IX выявляются индели у субъектов #5, #6, #7, #8, #9, #11, #12 и #13, как видно из табл. 2 и фиг. 4-6.

Таблица 2

Образец кролика		Ген	Общее число прочтений	Число прочтений со вставками	Число прочтений с делециями	Число прочтений с инделями (%)	Главная мутация
5	кровь	F9	28	0	12	12 (42,9%)	
6	кровь	F9	46377	0	46358	46358 (100,0%)	-6
7	кровь	F9	38728	0	38728	38728 (100,0%)	-6, -11
8	кровь	F9	12386	0	12386	12386 (100,0%)	-60
9	кровь	F9	19659	0	19659	19659 (100,0%)	-9, +2, -5
11	кровь	F9	28955	2934	26021	28955 (100,0%)	-20
12	кровь	F9	27447	0	27447	27447 (100,0%)	
13	кровь	F9	52827	93	52689	52782 (99,9%)	-37

Пример 4. Фенотипирование гемофилии у трансгенных кроликов

4-1. Анализ активированного частичного тромбопластинового времени (APTT)

Для проведения анализа APTT наблюдали сигналы сгустков при APTT в режиме реального времени на анализаторе Start 4Hemostasis Analyzer (Stago Inc., США). А именно, в кювете смешивали 50 мкл раствора реагента APTT (Dade® Actin FSL, Siemens Medical Solutions Inc., США) и 50 мкл плазмы, выделенной из трансгенного кролика, и инкубировали при 37°C в течение 3 мин, добавляли в кювету 50 мкл водного раствора хлорида кальция ($CaCl_2$) (конечная концентрация: 25 мМ), а затем измеряли время до образования сгустка.

В результате, как видно из фиг. 7A, время образования сгустка составляло 19,4 ± 1,1 сек для кролика с нокаутом FVIII и 18,9 ± 2,5 сек для кролика с нокаутом FIX. Эти значения указывают на то, что оба кролика страдают гемофилией.

4-2. Анализ образования тромбина (TGA)

Измеряли продукцию тромбина путем анализа флуоресценции на считывающем устройстве Fluoroskan Ascent (Thermo Scientific) с помощью программы Thrombinoscope BV. А именно, смешивали 80 мкл плазмы трансгенного кролика и 2 мкл PPP-реагента LOW, содержащего тканевой фактор и фосфолипид, и инкубировали при 37°C в 96-луночном планшете Immulon 2HB с высоким уровнем связывания (Thermo Nunc). В контрольной лунке инкубировали смесь 80 мкл кроличьей плазмы и 20 мкл реагента для калибровки тромбина, добавляли флуоресцентный субстрат тромбина и предварительно нагретый реагент Flu-Ca и перемешивали до однородного состояния перед реакцией. Для запуска реакции вносили 20 мкл реагента Flu-Ca и анализировали количество образовавшегося тромбина с помощью Thrombinoscope Analysis Version 3.0.

В результате, как видно из фиг. 7, в контрольной группе образовалось 36,9 ± 1,8 нМ тромбина, тогда как у трансгенного кролика с нокаутом FVIII образовалось 0,1 ± 0,1 нМ тромбина, а у трансгенного кролика с нокаутом FIX тромбин не образовывался.

Таким образом, оказалось, что трансгенные кролики, у которых были удалены гены

FVIII или FIX, имеют фенотип гемофилии.

Пример 5. Родословная скрещивания для получения поколений F1 и F2

Кроликов с гемофилией, полученных в примере 2, именовали “P” (или F0), а для получения их потомства F1 и F2 проводили следующий процесс. Для получения потомства трансгенных кроликов с нокаутом фактора VIII или фактора IX их разводили так, как показано на фиг. 8. А именно, поскольку гемофилия является связанным с полом наследственным заболеванием, при котором ген гемофилии находится на X-хромосоме, трансгенных кроликов-отцов с нокаутом фактора VIII или нокаутом фактора IX (P, X′Y), полученных в примере 2, скрещивали с нормальными самками кролика (XX), получая потомство. Самок потомства F1, полученных при первом скрещивании, идентифицировали как носителей (X′X) посредством генетического анализа, а затем носителей (X′X) скрещивали с нормальными самцами (XY), получая самцов трансгенных кроликов (F2, X′Y) с нокаутом фактора VIII или фактора IX.

Пример 6. Генотипирование трансгенных кроликов поколения F1

6-1. Генотипирование кроликов-носителей нокаута фактора VIII

Самца кролика (X′Y), а именно субъекта #2, у которого была выявлена делеционная мутация нуклеиновой кислоты в 4 п.н., приведенная в табл. 1, скрещивали с нормальными самками (XX) возрастом 10-12 недель и весом 2 кг или больше, приобретенными у Samtako Inc., получая потомство. Потомство идентифицировали как самок-носителей (X′X) поколения F1 посредством генетического анализа таким же образом, как в Примере 3-1. Как видно из табл. 3 и фиг. 9, в генах FVIII у субъектов #1 и #5 выявлялись профили инделей.

Таблица 3

Образец кролика		Ген	Общее число прочтений	Число прочтений со вставками	Число прочтений с делециями	Число прочтений с инделями (%)	Профиль инделей
#1	кровь	F8	37549	0	18812	18812 (50,1%)	-4
#5	кровь	F8	56305	0	27308	27308 (48,5%)	-4

6-2. Генотипирование кроликов-носителей нокаута фактора IX

Самца (X′Y), а именно субъекта #6 с делеционной мутацией нуклеиновой кислоты в 6 п.н., приведенной в табл. 2, скрещивали с нормальными самками (XX), получая потомство F1, а потомство F1 идентифицировали как самок-носителей (X′X) посредством генетического анализа таким же образом, как в Примере 3-2. Как видно из табл. 4 и фиг. 10, в гене FIX субъектов #4 выявлялись профили инделей, а именно делеция -6 п.н. и вставка 1 п.н.

Таблица 4

Образец кролика		Ген	Общее число прочтений	Число прочтений со вставками	Число прочтений с делециями	Число прочтений с инделями (%)	Профиль инделей
#4	кровь	F9	17299	0	4587	4587 (66,8%)	-6, +1

Пример 7. Генотипирование трансгенных кроликов поколения F2

7-1. Генотипирование кроликов-носителей нокаута фактора VIII

Самок-носителей (X′X) поколения F1 скрещивали с нормальными самцами (XY) возрастом 10-12 недель и весом 2 кг или больше, приобретенными у Samtako Inc., получая самцов F2 (X'Y). Самцов F2 (X'Y) идентифицировали как самок-носителей (X′X) поколения F1 посредством генетического анализа таким же образом, как в Примере 3-1. Как видно из табл. 5 и фиг. 11, в генах FVIII субъектов #1-4 и #5-1 выявлялись профили инделей.

Таблица 5

Образец кролика		Ген	Общее число прочтений	Число прочтений со вставками	Число прочтений с делециями	Число прочтений с инделями (%)	Профиль инделей
#1-4	кровь	F8	5850	0	4587	4587 (78,4%)	-4
#5-1	кровь	F8	5865	0	5467	5467 (93,2%)	-4

7-2. Генотипирование кроликов-носителей нокаута фактора IX

Самца F2 (X′Y), полученного при скрещивании самок-носителей (X′X) поколения F1 с нормальными самцами (XY), подвергали анализу генов таким же образом, как в Примере 3-2. Как видно из табл. 6 и фиг. 12, в гене FIX субъекта #4-1 выявлялись профили инделей, которые включали делеции в 6 п.н., 7 п.н. и 27 п.н., но делеции в 7 п.н. и 27 п.н. были только у 0,023% и 0,001%, соответственно, поэтому их посчитали ошибками секвенирования. Таким образом, субъекта #4-1 идентифицировали как мутанта с делецией нуклеиновой кислоты в 6 п.н.

Таблица 6

Образец кролика		Ген	Общее число прочтений	Число прочтений со вставками	Число прочтений с делециями	Число прочтений с инделями (%)	Профиль инделей
#4-1	кровь	F9	279860	0	278366	278298 (99,4%)	-6

Пример 8. Фенотипирование трансгенных кроликов поколения F2

8-1. Модель кровотечения из когтя

Для получения модели кровотечения из когтей на кроликах, кроликов с гемофилией из Примера 7 возрастом 12 недель или больше и весом 2 кг или больше и нормальных кроликов возрастом 10-12 недель и весом 2 кг или больше, приобретенных у Samtako Inc., анестезировали введением 0,4 мг/кг диазепама и 25 мг/кг пентобарбитала натрия в ушную вену. Одну переднюю лапу анестезированного кролика депилировали с помощью машинки для стрижки волос и отмечали проксимальный участок в 2 мм от

дистального конца пульпы когтя среднего пальца с помощью масляной ручки и штангенциркуля Digimatic, а затем отрезали кусачками (фиг. 13). Сразу же после разрезания когтя его помещали на 60 мин в коническую пробирку на 50 мл, содержащую стерильный физраствор при 37°C, собирали кровь в течение 60 мин, удаляли супернатант центрифугированием при 1500×g в течение 5 мин, добавляли в коническую пробирку трижды дистиллированную воду до 20 мл с помощью пипетки на 10 мл и полностью гемолизировали кровь на вибромешалке.

8-2. Анализ уровня гемоглобина (HB)

Для измерения потери крови определяли содержание гемоглобина в крови с помощью набора для анализа гемоглобина (Sigma-Aldrich, MAK115-1KT, #BF03A26V), используя образцы, гемолизованные в Примере 8-1. Как оказалось, концентрация гемоглобина от нормальных кроликов составляла 1014 нМ (диапазон: 502-1503), концентрация гемоглобина от кроликов с нокаутом фактора VIII составляла 45787 нМ, а концентрация гемоглобина от кроликов с нокаутом фактора IX составляла 4620 нМ (фиг. 14).

Хотя определенные конфигурации настоящего изобретения были описаны подробно, однако специалистам в данной области должно быть ясно, что это описание приведено для того, чтобы изложить предпочтительные воплощения в иллюстративных целях, и его не следует рассматривать как ограничение объема настоящего изобретения. Следовательно, существенный объем настоящего изобретения определяется прилагаемой формулой изобретения и её эквивалентами.

Промышленная применимость

У трансгенных кроликов с нокаутом фактора VIII и/или фактора IX по настоящему изобретению ингибируется функция фактора VIII и/или фактора IX, то есть белков, играющих важную роль в возникновении гемофилии, поэтому они применимы для разработки лекарств от гемофилии либо исследования гемофилии.

Перечень последовательностей, свободный текст

Прилагается электронный файл.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Единая направляющая РНК (sgРНК), содержащая наводящий домен, комплементарно связывающийся с экзонной областью фактора IX (FIX), где sgRNA представлена нуклеотидной последовательностью согласно SEQ ID NO: 5 или 6.

2. sgРНК по п. 1, при этом экзонная область гена фактора IX (FIX) является экзонной областью представленной нуклеотидной последовательностью по SEQ ID NO: 2.

3. Вектор в который встроена sgRNA согласно п.1.

4. Система CRISPR/Cas, содержащая sgRNA согласно п.1 и белок Cas9 или кодирующую его ДНК.

5. Трансгенный кролик, полученный с помощью системы CRISPR/Cas9 по п. 4, где трансгенный кролик проявляет фенотип гемофилии посредством нокаута фактора IX (FIX).

6. Трансгенный кролик по п. 5, при этом трансгенный кролик получен способом, включающим:

(a) транскрибирование системы CRISPR/Cas9 по п. 4 для получения sgРНК и мРНК Cas9;

(b) введение мРНК, полученной на стадии (a), в эмбрион и культивирование эмбриона; и

(c) пересадку эмбриона, полученного на стадии (b), суррогатной матери для получения трансгенного кролика.

7. Трансгенный кролик по п. 6, при этом трансгенный кролик получен способом, дополнительно включающим определение того, происходила или нет трансформация при получении кролика.

8. Трансгенный кролик-потомок, полученный способом, включающим скрещивание трансгенного кролика по п. 5 для получения потомка трансгенного кролика, где трансгенный кролик-потомок проявляет фенотип гемофилии посредством нокаута фактора IX (FIX).

9. Трансгенный кролик-потомок по п. 8, при этом скрещивание трансгенного кролика проводится путем скрещивания с трансгенным кроликом по п. 5 или с нормальным кроликом.

10. Клетка, выделенная из трансгенного кролика по п. 5 или трансгенного кролика-потомка по п. 8.

11. Ткань, выделенная из трансгенного кролика по п. 5 или трансгенного кролика-потомка по п. 8.

12. Побочный продукт, выделенный из трансгенного кролика по п. 5 или

трансгенного кролика-потомка по п. 8.

13. Побочный продукт по п. 12, при этом побочный продукт выбран из группы, состоящей из крови, сыворотки, мочи, кала, слюны, органов и кожи.

14. Способ получения трансгенного кролика, включающий:

(a) транскрибирование системы CRISPR/Cas9 по п. 4 для получения sgРНК и мРНК Cas9;

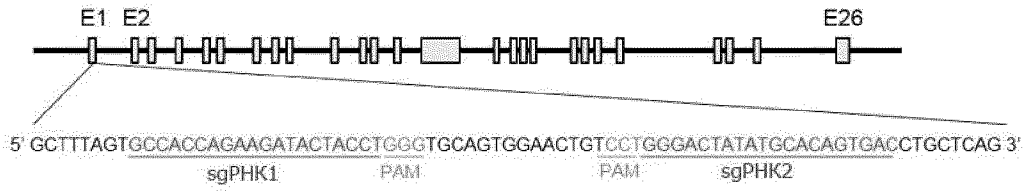
(b) введение мРНК, полученной на стадии (a), в эмбрион и культивирование эмбриона; и

(c) пересадку эмбриона, полученного на стадии (b), суррогатной матери для получения трансгенного кролика.

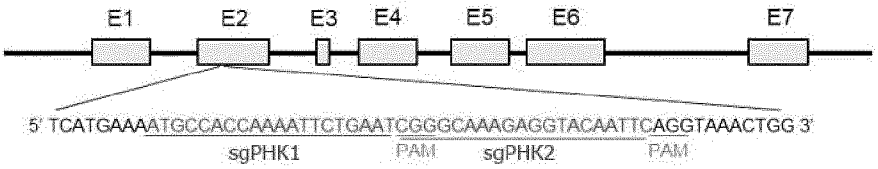
15. Способ получения потомка трансгенного кролика, включающий скрещивание трансгенного кролика, полученного способом по п. 14, для получения потомка трансгенного кролика.

16. Способ по п. 15, при этом скрещивание трансгенного кролика проводится путем скрещивания с трансгенным кроликом, полученным способом по п. 14, или с нормальным кроликом.

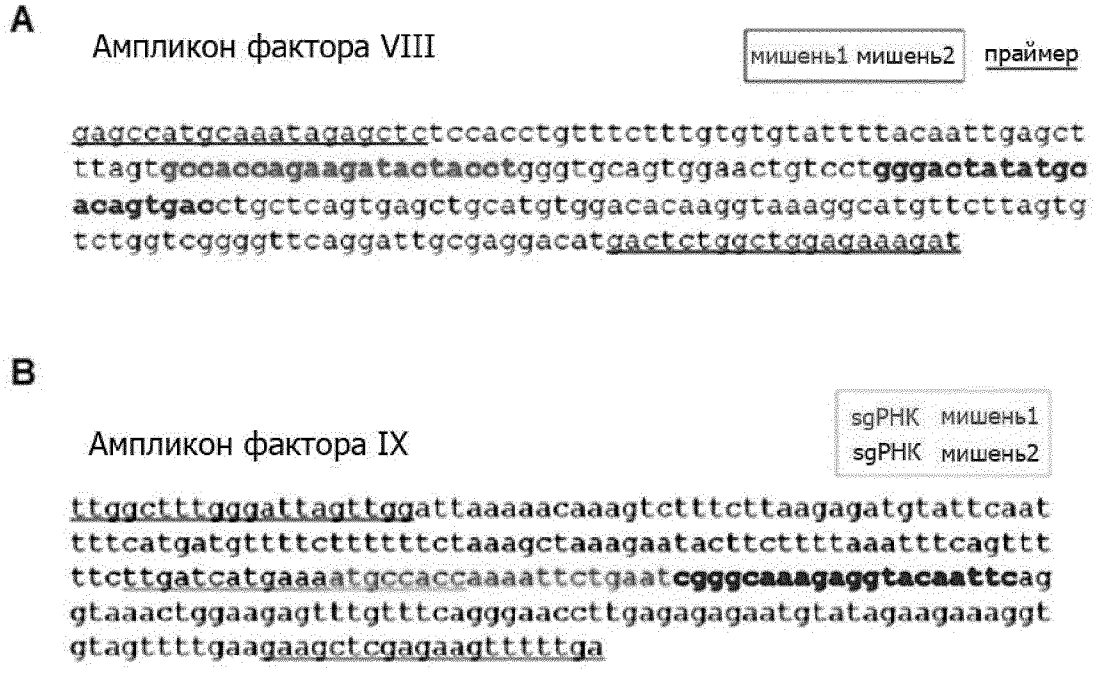
A Структура гена фактора VIII



B Структура гена фактора IX



Фиг. 1


A
Ампликон фактора VIII
мишень1 мишень2
праймер
gagccatgcaaatagagctctccacctgtttctttgtgtgtattttacaattgagct
ttagtgccaccagaagatactacctgggtgcagtggaactgtcctgggactatatgc
acagtgacctgctcagtgagctgcatgtggacacaaggtaaaggcatgttcttagtg
tctggtcggggttcaggattgcgaggacatgactctggctggagaaaagat
B
Ампликон фактора IX
sgPHK мишень1
sgPHK мишень2
ttggctttgggattagttggattaaaaacaaagtctttcttaagagatgtattcaat
tttcatgatgttttctttttctaaagctaaagaatacttcttttaaatttcagttt
ttcttgatcatgaaaatgccaccaaaattctgaatcgggcaaagaggtacaattcag
gtaaactggaagagtttgtttcagggaaccttgagagagaatgtatagaagaaaggt
gtagttttgaagaagctcgagaagtttttga

Фиг. 2

A. F8 #2

#ID	Последовательность мишени-1 CRISPR/Cas9	Длина	Счет	Тип	Соотношение
1	AAATAGAGCTCTCCAACTGTTTCTTTGTGTGTATTTTACAATTGAGCTTTAGTGCCACCAGAAGATACTACCTGGGTGCAGTGGAACTGTCCTGGGACTATATGCACAGTGACCTGCTCAGTGAGCTGCATGTGGACACA AAATAGAGCTCTCCAACTGTTTCTTTGTGTGTATTTTACAATTGAGCTTTAGTGCCACCAGAAGATA----CTGGGTGCAGTGGAACTGTCCTGGGACTATATGCACAGTGACCTGCTCAGTGAGCTGCATGTGGACACA	136 (-4)	57916	делеция	94.7

B. F8 #3

#ID	Последовательность мишени-1 CRISPR/Cas9	Длина	Счет	Тип	Соотношение
1	AAATAGAGCTCTCCAACTGTTTCTTTGTGTGTATTTTACAATTGAGCTTTAGTGCCACCAGAAGATACTACCTGGGTGCAGTGGAACTGTCCTGGGACTATATGCACAGTGACCTGCTCAGTGAGCTGCATGTGGACACA AAATAGAGCTCTCCAACTGTTTCTTTGTGTGTATTTTACAATTGAGCTTTAGTGCCACCAGAAGA---TACCTGGGTGCAGTGGAACTGTCCTGGGACTATATGCACAGTGACCTGCTCAGTGAGCTGCATGTGGACACA	137 (-3)	31758	делеция	57.8
2	AAATAGAGCTCTCCAACTGTTTCTTTGTGTGTATTTTACAATTGAGCTTTAGTGCCACCAGAAGATACTACCTGGGTGCAGTGGAACTGTCCTGGGACTATATGCACAGTGACCTGCTCAGTGAGCTGCATGTGGACACA AAATAGAGCTCTCCAACTGTTTCTTTGTGTGTATTTTACAATTGAGCTTTAGTGCCAC----------CCTGGGTGCAGTGGAACTGTCCTGGGACTATATGCACAGTGACCTGCTCAGTGAGCTGCATGTGGACACA	128 (-12)	12088	делеция	22.0
3	AAATAGAGCTCTCCAACTGTTTCTTTGTGTGTATTTTACAATTGAGCTTTAGTGCCACCAGAAGATACTACCTGGGTGCAGTGGAACTGTCCTGGGACTATATGCACAGTGACCTGCTCAGTGAGCTGCATGTGGACACA AAATAGAGCTCTCCAACTGTTTCTTTGTGTGTATTTTACAATTGAGCTTTAGTGCCACCAGAAGA---TACCTGGGTGCAGTGGAACTGTCCTGGGACTATATGCACAGTGACCTGCTCAGTGAGCTGCATGTGGACACA	135 (-3)	4891	делеция	8.9
4	AAATAGAGCTCTCCAACTGTTTCTTTGTGTGTATTTTACAATTGAGCTTTAGTGCCACCAGAAGATACTACCTGGGTGCAGTGGAACTGTCCTGGGACTATATGCACAGTGACCTGCTCAGTGAGCTGCATGTGGACACA AAATAGAGCTCTCCAACTGTTTCTTTGTGTGTATTTTACAATTGAGCTTTAGTGCCACCAGAAGA---TACCTGGGTGCAGTGGAACTGTCCTGGGACTATATGCACAGTGACCTGCTCAGTGAGCTGCATGTGGACACA	138 (-3, +1)	2041	делеция	3.7
5	AAATAGAGCTCTCCAACTGTTTCTTTGTGTGTATTTTACAATTGAGCTTTAGTGCCACCAGAAGATACTACCTGGGTGCAGTGGAACTGTCCTGGGACTATATGCACAGTGACCTGCTCAGTGAGCTGCATGTGGACACA AAATAGAGCTCTCCAACTGTTTCTTTGTGTGTATTTTACAATTGAGCTTTAGTGCCACCAGAAGA---TACCTGGGTGCAGTGGAACTGTCCTGGG-CTATATGCACAGTGACCTGCTCAGTGAGCTGCATGTGGACACA	136 (-3, -1)	1395	делеция	2.5

Фиг. 3

A. F9 #6

#ID	Последовательность мишени-1 CRISPR/Cas9	Длина	Счет	Тип	Соотношение
1	TTCTAAAGCTAAAGAATACTTCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCACCAAAATTCTGAATCGGGCAAAGAGGTAC-AATTCAGGTAAACTGGAAGAGTTTGTTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTA TTCTAAAGCTAAAGAATACTTCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCACCAAAAT------TCGGGCAAAGAGGTACAAATTCAGGTAAACTGGAAGAGTTTGTTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTA	135 (-6bp)	25669	делеция	55.3
2	TTCTAAAGCTAAAGAATACTTCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCACCAAAATTCTGAATCGGGCAAAGAGGTACAATTCAGGTAAACTGGAAGAGTTTGTTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTA TTCTAAAGCTAAAGAATACTTCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCAC----------CAAAGAGGTAC----------AACTGGAAGAGTTTGTTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTA	113 (-17bp, -10bp)	14726	делеция	31.8
3	TTCTAAAGCTAAAGAATACTTCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCACCAAAATTCTGAATCGGGCAAAGAGGTACAATTCAGGTAAACTGGAAGAGTTTGTTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTA TTCTAAAGCTAAAGAATACTTCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCACCAA-------AATCGGGCAAAGAGGTAC----------AACTGGAAGAGTTTGTTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTA	123 (-7bp, -10bp)	2077	делеция	4.5
4	TTCTAAAGCTAAAGAATACTTCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCACCAAAATTCTGAATCGGGCAAAGAGGTACAATTCAGGTAAACTGGAAGAGTTTGTTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTA TTCTAAAGCTAAAGAATACTTCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCACCAAAAT------TCGGGCAAAGAGGTAC----------AACTGGAAGAGTTTGTTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTA	124 (-6bp,-10bp)	1075	делеция	2.3
5	TTCTAAAGCTAAAGAATACTTCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCACCAAAATTCTGAATCGGGCAAAGAGGTAC-AATTCAGGTAAACTGGAAGAGTTTGTTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTA TTCTAAAGCTAAAGAATACTTCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCACCAA-------AATCGGGCAAAGAGGTACAAATTCAGGTAAACTGGAAGAGTTTGTTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTA	134 (-7bp)	553	делеция	1.2
6	TTCTAAAGCTAAAGAATACTTCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCACCAAAATTCTGAATCGGGCAAAGAGGTAC-AATTCAGGTAAACTGGAAGAGTTTGTTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTA TTCTAAAGCTAAAGAATACTTCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCAC----------CAAAGAGGTACAAATTCAGGTAAACTGGAAGAGTTTGTTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTA	124 (-17bp)	430	делеция	0.9

B. F9 #7

#ID	Последовательность мишени-1 CRISPR/Cas9	Длина	Счет	Тип	Соотношение
1	TTCTAAAGCTAAAGAATACTTCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCACCAAAATTCTGAATCGGGCAAAGAGGTACAATTCAGGTAAACTGGAAGAGTTTGTTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTA TTCTAAAGCTAAAGAATACTTCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCACCAAAAT------TCGGGCAAAG----------AGGTAAACTGGAAGAGTTTGTTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTA	123 (-6bp, -11bp)	30946	делеция	79.9
2	TTCTAAAGCTAAAGAATACTTCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCACCAAAATTCTGAATCGGGCAAAGAGGTACAATTCAGGTAAACTGGAAGAGTTTGTTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTA TTCTAAAGCTAAAGAATACTTCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCACCAAAAT------TCGGGCAAAGAGGTA-----CAGGTAAACTGGAAGAGTTTGTTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTA	129 (-6bp, -5bp)	6557	делеция	16.9

C. F9 #8

#ID	Последовательность мишени-1 CRISPR/Cas9	Длина	Счет	Тип	Соотношение
1	TTCTAAAGCTAAAGAATACTTCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCACCAAAATTCTGAATCGGGCAAAGAGGTACAATTCAGGTAAACTGGAAGAGTTTGTTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTA TTCTAAAGCTAAAGAATACTTCTTTTAAAT----------TTCAGGTAAACTGGAAGAGTTTGTTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTA	80 (-60bp)	12192	делеция	98.4

Фиг. 4

A. F9 #9

#ID	Последовательность мишени-1 CRISPR/Cas9	Длина	Счет	Тип	Соотношение
1	TTCTAAAGCTAAAGAATACTTCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCACCAAAATTCTGAATCG--GGCAAAGAGGTACAATTCAGGTAAACTGGAAGAGTTTGTTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTA	128 (-9bp,+2bp,-5bp)	5222	делеция	26.6
	TTCTAAAGCTAAAGAATACTTCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCACCAAGA---------GGTGGCAAAGAGGTA-----CAGGTAAACTGGAAGAGTTTGTTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTA				
2	TTCTAAAGCTAAAGAATACTTCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCACCAAAATTCTGAATCGGGCAAAGAGGTACAATTCAGGTAAACTGGAAGAGTTTGTTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTA	114 (-21bp,-5bp)	4888	делеция	24.9
	TTCTAAAGCTAAAGAATACTTCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAAT----------GCAAAGAGGTA-----CAGGTAAACTGGAAGAGTTTGTTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTA				
3	TTCTAAAGCTAAAGAATACTTCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCACCAAAATTCTGAATCGGGCAAAGAGGTACAATTCAGGTAAACTGGAAGAGTTTGTTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTA	128 (-7bp,-5bp)	2730	делеция	13.9
	TTCTAAAGCTAAAGAATACTTCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCACCAA-------AATCGGGCAAAGAGGTA-----CAGGTAAACTGGAAGAGTTTGTTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTA				
4	TTCTAAAGCTAAAGAATACTTCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCACCAAAATTCTGAATCGGGCAAAGAGGTACAATTCAGGTAAACTGGAAGAGTTTGTTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTA	125 (-5bp, -10bp)	2482	делеция	12.6
	TTCTAAAGCTAAAGAATACTTCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCACCAAAA-----AATCGGGCAAAGAGGTAC----------AACTGGAAGAGTTTGTTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTA				
5	TTCTAAAGCTAAAGAATACTTCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCACCAAAATTCTGAATCGGGCAAAGAGGTACAATTCAGGTAAACTGGAAGAGTTTGTTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTA	124 (-5bp,-11bp)	1594	делеция	8.1
	TTCTAAAGCTAAAGAATACTTCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCACCAAAA-----AATCGGGCAAAG----------AGGTAAACTGGAAGAGTTTGTTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTA				
6	TTCTAAAGCTAAAGAATACTTCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCACCAAAATTCTGAATCGGGCAAAGAGGTACAATTCAGGTAAACTGGAAGAGTTTGTTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTA	130 (-5bp, -5bp)	760	делеция	3.9
	TTCTAAAGCTAAAGAATACTTCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCACCAAAA-----AATCGGGCAAAGAGGTA-----CAGGTAAACTGGAAGAGTTTGTTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTA				
7	TTCTAAAGCTAAAGAATACTTCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCACCAAAATTCTGAATCGGGCAAAGAGGTACAATTCAGGTAAACTGGAAGAGTTTGTTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTA	129 (-6bp, -5bp)	461	делеция	2.3
	TTCTAAAGCTAAAGAATACTTCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCACCAAAAT------TCGGGCAAAGAGGTA-----CAGGTAAACTGGAAGAGTTTGTTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTA				
8	TTCTAAAGCTAAAGAATACTTCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCACCAAAATTCTGAATCGGGCAAAGAGGTACAATTCAGGTAAACTGGAAGAGTTTGTTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTA	123 (-7bp, -10bp)	416	делеция	2.1
	TTCTAAAGCTAAAGAATACTTCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCACCAA-------AATCGGGCAAAGAGGTAC----------AACTGGAAGAGTTTGTTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTA				
9	TTCTAAAGCTAAAGAATACTTCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCACCAAAATTCTGAATCGGGCAAAGAGGTACAATTCAGGTAAACTGGAAGAGTTTGTTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTA	122 (-7bp, -11bp)	238	делеция	1.2
	TTCTAAAGCTAAAGAATACTTCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCACCAA-------AATCGGGCAAAG----------AGGTAAACTGGAAGAGTTTGTTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTA				
10	TTCTAAAGCTAAAGAATACTTCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCACCAAAATTCTGAATCG--GGCAAAGAGGTACAATTCAGGTAAACTGGAAGAGTTTGTTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTA	123 (-9bp,+2bp,-10bp)	233	делеция	1.2
	TTCTAAAGCTAAAGAATACTTCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCACCAAGA---------GGTGGCAAAGAGGTAC----------AACTGGAAGAGTTTGTTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTA				
11	TTCTAAAGCTAAAGAATACTTCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCACCAAAATTCTGAATCGGGCAAAGAGGTACAATTCAGGTAAACTGGAAGAGTTTGTTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTA	109 (-21bp,-10bp)	136	делеция	0.7
	TTCTAAAGCTAAAGAATACTTCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAAT----------GCAAAGAGGTAC----------AACTGGAAGAGTTTGTTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTA				

B. F9 #11

#ID	Последовательность мишени-1 CRISPR/Cas9	Длина	Счет	Тип	Соотношение
1	TTCTAAAGCTAAAGAATACTTCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCACCAAAATTCTGAATCGGGCAAAGAGGTACAATTCAGGTAAACTGGAAGAGTTTGTTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTA	120 (-20bp)	15910	делеция	54.9
	TTCTAAAGCTAAAGAATACTTCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCACCAAAATTCTG----------TTCAGGTAAACTGGAAGAGTTTGTTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTA				
2	TTCTAAAGCTAAAGAATACTTCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCACCAAAATTCTGAATCGGGCAAAGAGGTACAATTCAGGTAAACTGGAAGAGTTTGTTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTA	119 (-20bp,-1bp)	7377	делеция	25.5
	TTCTAAAGCTAAAGAATACTTCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGC----------CAAAGAGGTACAA-TCAGGTAAACTGGAAGAGTTTGTTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTA				
3	TTCTAAAGCTAAAGAATACTTCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCACCAAAATTCTGAATCGGGCAAAGAGGTACA----------ATTCAGGTAAACTGGAAGAGTTTGTTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTA	161 (+21bp)	2505	дикий тип или замена	8.7
	TTCTAAAGCTAAAGAATACTTCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCACCAAAATTCTGAATCGGGCAAAGAGGTACACTGGAAAGAGGGCAAAGAGGTACACTGGTAAACTGGAAGAGTTTGTTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTA				
4	TTCTAAAGCTAAAGAATACTTCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCACCAAAATTCTGAATCGGGCAAAGAGGTAC-AATTCAGGTAAACTGGAAGAGTTTGTTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTA	135 (-6bp,+1bp)	1621	делеция	5.6
	TTCTAAAGCTAAAGAATACTTCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCACCAAAATTCT------GGCAAAGAGGTACAAATTCAGGTAAACTGGAAGAGTTTGTTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTA				
5	TTCTAAAGCTAAAGAATACTTCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCACCAAAATTCTG----------AATCGGGCAAAGAGGTACAATTCAGGTAAACTGGAAGAGTTTGTTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTA	155 (-6bp,+29bp)	128	делеция	0.4
	TTCTAAAGCTAAAGAATACTTCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCACCAAAATTCTGGCAAAGAGGTACACTGGAAAGAGGCAAAGAGGTACA---CTGGTAAACTGGAAGAGTTTGTTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTA				
6	TTCTAAAGCTAAAGAATACTTCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCACCAAAATTCTGAATCGGGCAAAGAGGTAC-AATTCAGGTAAACTGGAAGAGTTTGTTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTA	121 (-20bp,+1bp)	115	делеция	0.4
	TTCTAAAGCTAAAGAATACTTCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGC----------CAAAGAGGTACAAATTCAGGTAAACTGGAAGAGTTTGTTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTA				
7	TTCTAAAGCTAAAGAATACTTCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCACCAAAATTCTGAATCGGGCAAAGAGGTACAATTCAGGTAAACTGGAAGAGTTTGTTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTA	133 (-6bp,-1bp)	107	делеция	0.4
	TTCTAAAGCTAAAGAATACTTCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCACCAAAATTCT------GGCAAAGAGGTACAA-TCAGGTAAACTGGAAGAGTTTGTTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTA				
8	TTCTAAAGCTAAAGAATACTTCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCACCAAAATTCTGAATCGGGCAAAGAGGTACAATTCAGGTAAACTGGAAGAGTTTGTTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTA	117 (-20bp,-3bp)	100	делеция	0.3
	TTCTAAAGCTAAAGAATACTTCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGC----------CAAAGAGGTACA---CTGGTAAACTGGAAGAGTTTGTTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTA				

Фиг. 5

A. F9 #12

#ID	Последовательность мишени-2 CRISPR/Cas9	Длина	Счет	Тип	Соотношение
1	TCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCACCAAAATTCTGAATCGGGCAAAGAGGTACAATTCAGGTAAACTGGAAGAGTTTGTTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAAATGTATAGAAGAAAAGGTGTAGTTTT TCTTTTAAAT----------TTCAGGTAAACTGGAAGAGTTTGTTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAAATGTATAGAAGAAAAGGTGTAGTTTT	80 (-60bp)	25368	делеция	92.4
2	TCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCACCAAAATTCTGAATCGGGCAAAGAGGTACAATTCAGGTAAACTGGAAGAGTTTGTTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAAATGTATAGAAGAAAAGGTGTAGTTTT TCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCACCAAAATTCTGAATCGGGCAAAG----------AGGTAAACTGGAAGAGTTTGTTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAAATGTATAGAAGAAAAGGTGTAGTTTT	129 (-11bp)	1226	делеция	4.5
3	TCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCACCAAAATTCTGAATCGGGCAAAGAGGTACAATTCAGGTAAACTGGAAGAGTTTGTTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAAATGTATAGAAGAAAAGGTGTAGTTTT TCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCACCAAAAT------TCGGGCAAAG----------AGGTAAACTGGAAGAGTTTGTTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAAATGTATAGAAGAAAAGGTGTAGTTTT	123 (-6bp,-11bp)	225	делеция	0.8

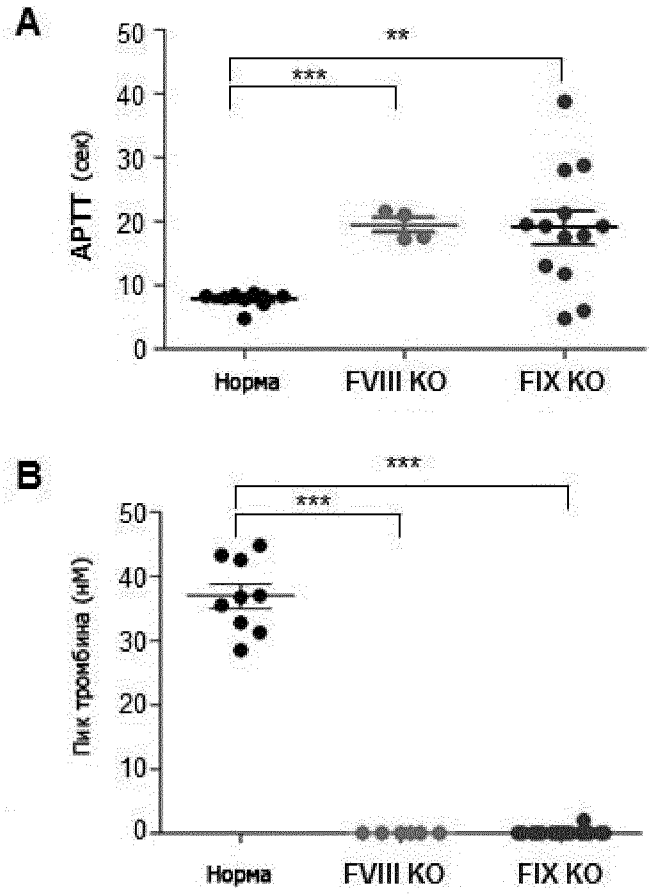
B. F9 #13

#ID	Последовательность мишени-2 CRISPR/Cas9	Длина	Счет	Тип	Соотношение
1	TCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCACCAAAATTCTGAATCGGGCAAAGAGGTACAATTCAGGTAAACTGGAAGAGTTTGTTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAAATGTATAGAAGAAAAGGTGTAGTTTT TCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCACC----------AACTGGAAGAGTTTGTTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAAATGTATAGAAGAAAAGGTGTAGTTTT	103 (-37bp)	22845	делеция	43.2
2	TCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCACCAAAATTCTGAATCGGGCAAAGAGGTACAATTCAGGTAAACTGGAAGAGTTTGTTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAAATGTATAGAAGAAAAGGTGTAGTTTT TCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCACCAAAATTCT-----GGGCAAAGAGGTAAA---CAGGTAAACTGGAAGAGTTTGTTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAAATGTATAGAAGAAAAGGTGTAGTTTT	132 (-5bp, 3bp)	14126	делеция	26.7
3	TCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCACCAAAATTCTGAATCGGGCAAAGAGGTACAATTCAGGTAAACTGGAAGAGTTTGTTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAAATGTATAGAAGAAAAGGTGTAGTTTT TCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCACCAAAATTCTGAATCGGGCAAAG----------AGGTAAACTGGAAGAGTTTGTTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAAATGTATAGAAGAAAAGGTGTAGTTTT	129 (-11bp)	8122	делеция	15.4
4	TCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCACCAAAATTCTGAATCGGGCAAAGAGGTACAATTCAGGTAAACTGGAAGAGTTTGTTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAAATGTATAGAAGAAAAGGTGTAGTTTT TCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCACCAAAATTCT-----GGGCAAAG----------AGGTAAACTGGAAGAGTTTGTTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAAATGTATAGAAGAAAAGGTGTAGTTTT	124 (-5bp, -11bp)	1566	делеция	3.0
5	TCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCACCAAAATTCTGAATCGGGCAAAGAGGTACAATTCAGGTAAACTGGAAGAGTTTGTTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAAATGTATAGAAGAAAAGGTGTAGTTTT TCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCACCAAAATTCTGAATCGGGCAAAGAGGTAAA---CAGGTAAACTGGAAGAGTTTGTTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAAATGTATAGAAGAAAAGGTGTAGTTTT	137 (-3bp)	1062	делеция	2.0
6	TCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCACCAAAATTCTGAATCGGGCAAAGAGGTACAATTCAGGTAAACTGGAAGAGTTTGTTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAAATGTATAGAAGAAAAGGTGTAGTTTT TCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCACC----------AACTGGAAGAGTTTGTTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAAATGTAAAGAAGAAAAGGTGTAGTTTT	103 (-37bp)	847	делеция	1.6
7	TCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCACCAAAATTCTG--------AATCGGGCAAAGAGGTACAATTCAGGTAAACTGGAAGAGTTTGTTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAAATGTATAGAAGAAAAGGTG TAGTTTT TCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCACCAAAATTCTGCCACCAAAAATCGGGCAAAG----------AGGTAAACTGGAAGAGTTTGTTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAAATGTATAGAAGAAAAGGTG TAGTTTT	137(+8bp, -11bp)	643	делеция	1.2
8	TCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCACCAAAATTCTGAATCGGGCAAAGAGGTACAATTCAGGTAAACTGGAAGAGTTTGTTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAAATGTATAGAAGAAAAGGTGTAGTTTT TCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCACCAAAATTCT-----GGGCAAAGAGGTAAA---CAGGTAAACTGGAAGAGTTTGTTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAAATGTAAAGAAGAAAAGGTGTAGTTTT	132 (-5bp, 3bp)	564	делеция	1.1
9	TCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCACCAAAATTCTGAATCGGGCAAAGAGGTACAATTCAGGTAAACTGGAAGAGTTTGTTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAAATGTATAGAAGAAAAGGTGTAGTTTT TCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCACCAAAATTCTGAATCGGGCAAAG----------AGGTAAACTGGAAGAGTTTGTTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAAATGTAAAGAAGAAAAGGTGTAGTTTT	129 (-11bp)	282	делеция	0.5
10	TCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCACCAAAATTCTGAATCGGGCAAAGAGGTACAATTCAGGTAAACTGGAAGAGTTTGTTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAAATGTATAGAAGAAAAGGTGTAGTTTT TCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCACCAAA------AATCGGGCAAAG----------AGGTAAACTGGAAGAGTTTGTTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAAATGTATAGAAGAAAAGGTGTAGTTTT	123 (-6bp, -11bp)	180	делеция	0.3

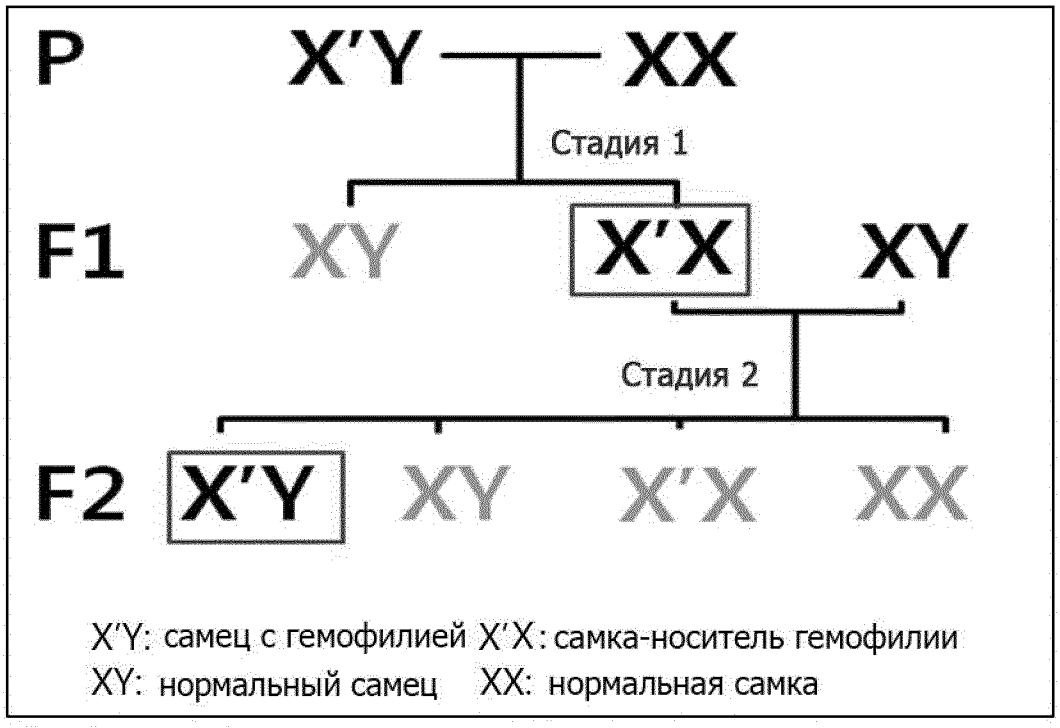
C. F9 #5

#ID	Последовательность мишени-2 CRISPR/Cas9	Длина	Счет	Тип	Соотношение
1	ATGATGTTTTCTTTTTTCTAAAGCTAAAGAATACTTCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCACCAAAATTCTGAACTGTGAGTATTTCCACATAATAACTTTTTTTTTTTTTATTTTGACAGGTAGAGT ATGATGTTTTCTTTTTTCTAAAGCTAAAGAATACTTCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCACCAAAATTCTGAACTGTGAGTATTTCCACATAATAAC--TTTTTTTTTTTATTTTGACAGGTAGAGT	138	33806	делеция	82.8
2	ATGATGTTTTCTTTTTTCTAAAGCTAAAGAATACTTCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCACCAAAATTCTGAACTGTGAGTATTTCCACATAATAACTTTTTTTTTTTTTATTTTGACAGGTAGAGT ATGATGTTTTCTTTTTTCTAAAGCTAAAGAATACTTCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCACCAAAATTCTGAACTGTGAGTATTTCCACATAATAAC---TTTTTTTTTTATTTTGACAGGTAGAGT	137	3564	делеция	8.7
3	ATGATGTTTTCTTTTTTCTAAAGCTAAAGAATACTTCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCACCAAAATTCTGAACTGTGAGTATTTCCACATAATAACTTTTTTTTTTTTTATTTTGACAGGTAGAGT ATGATGTTTTCTTTTTTCTAAAGCTAAAGAATACTTCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCACCAAAATTCTGAACTGTGAGTATTTCCACATAATAAC-TTTTTTTTTTTATTTTGACAGGTAGAGT	139	705	делеция	1.7
4	ATGATGTTTTCTTTTTTCTAAAGCTAAAGAATACTTCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCACCAAAATTCTGAACTGTGAGTATTTCCACATAATAACTTTTTTTTTTTTTATTTTGACAGGTAGAGT ATGATGTTTTCTTTTTTCTAAAGCTAAAGAATACTTCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCACCAAAATTCTGAACTGTGAGTATTTCCACATAATAAC--TTTTTTTTTTATTTTGACAGGTAGAGT	138	233	делеция	0.6
5	ATGATGTTTTCTTTTTTCTAAAGCTAAAGAATACTTCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCACCAAAATTCTGAACTGTGAGTATTTCCACATAATAACTTTTTTTTTTTTTATTTTGACAGGTAGAGT ATGATGTTTTCTTTTTTCTAAAGCTAAAGAATACTTCTTTTAAATTTCAGTTTTTCTTGATCATGAAAATGCCACCAAAATTCTGAACTGTGAGTATTTCCACATAATAAC----TTTTTTTTTATTTTGACAGGTAGAGT	136	153	делеция	0.4

Фиг. 6


A
50
40
30
20
10
0
АРТТ (сек)
**
***
Норма
FVIII KO
FIX KO
B
50
40
30
20
10
0
Пик тромбина (нМ)
***
***
Норма
FVIII KO
FIX KO

Фиг. 7


P
X'Y
XX
Стадия 1
F1
XY
X'X
XY
Стадия 2
F2
X'Y
XY
X'X
XX
X'Y: самец с гемофилией X'X: самка-носитель гемофилии
XY: нормальный самец XX: нормальная самка

Фиг. 8

#D	Последовательность	Длина	Счет	Тип	%
1	CTTTAGTGCCACCAGAAGATACTACCTGGGTGCAGTGGAACTGTCCTGGGACTATATGCACAGTGACCTGCTCA	136 (-4)	18812	делеция	50.1
	CTTTAGTGCCACCAGAAGATA----CTGGGTGCAGTGGAACTGTCCTGGGACTATATGCACAGTGACCTGCTCA				
5	CTTTAGTGCCACCAGAAGATACTACCTGGGTGCAGTGGAACTGTCCTGGGACTATATGCACAGTGACCTGCTCA	136 (-4)	27308	делеция	48.5
	CTTTAGTGCCACCAGAAGATA----CTGGGTGCAGTGGAACTGTCCTGGGACTATATGCACAGTGACCTGCTCA				

Фиг. 9

#ID	Последовательность	Длина	Счет	Тип	%
4	TCATGAAAATGCCACCAAAATTCTGAATCGGGCAAAGAGGTAC-AATTCAGGTAAACTGGAA	135 (-6 делеция,+1 инсерция)	14273	делеция/ инсерция	66.1
	TCATGAAAATGCCACCAAAAT------TCGGGCAAAGAGGTACAAATTCAGGTAAACTGGAA				
	TCATGAAAATGCCACCAAAATTCTGAATCGGGCAAAGAGGTACAATTCAGGTAAACTGGAA	134 (-6 делеция)	1660	делеция	6.4
	TCATGAAAATGCCACCAAAAT------TCGGGCAAAGAGGTACAATTCAGGTAAACTGGAA				
	TCATGAAAATGCCACCAAAATTCTGAATCGGGCAAAGAGGTAC-AATTCAGGTAAACTGGAA	141 (+1 инсерция)	1366	инсерция	5.3
	TCATGAAAATGCCACCAAAATTCTGAATCGGGCAAAGAGGTACAAATTCAGGTAAACTGGAA				

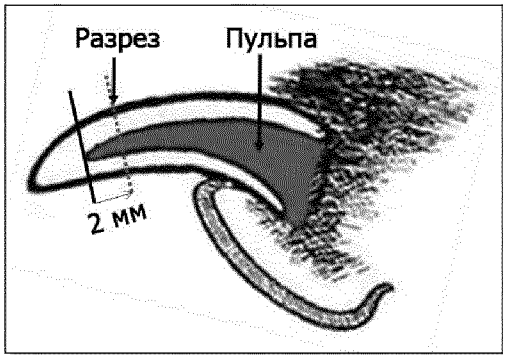
Фиг. 10

#ID	Последовательность	Длина	Счет	Тип	%
1-4	GAGCTTTAGTGCCACCAGAAGATA----CTGGGTGCAGTGGAACTGTCCTGGGACTATATGCACAGTGACCTGCTCAGTG	136 (-4)	4587	делеция	78.4
	GAGCTTTAGTGCCACCAGAAGATA----CTGGGTGCAGTGGAACTGTCCTGGG-CTATATGCACAGTGACCTGCTCAGTG				
5-1	CTTTAGTGCCACCAGAAGATACTACCTGGGTGCAGTGGAACTGTCCTGGGACTATATGCACAGTGACCTGCTCA	136 (-4)	5467	делеция	93.2
	CTTTAGTGCCACCAGAAGATA----CTGGGTGCAGTGGAACTGTCCTGGGACTATATGCACAGTGACCTGCTCA				

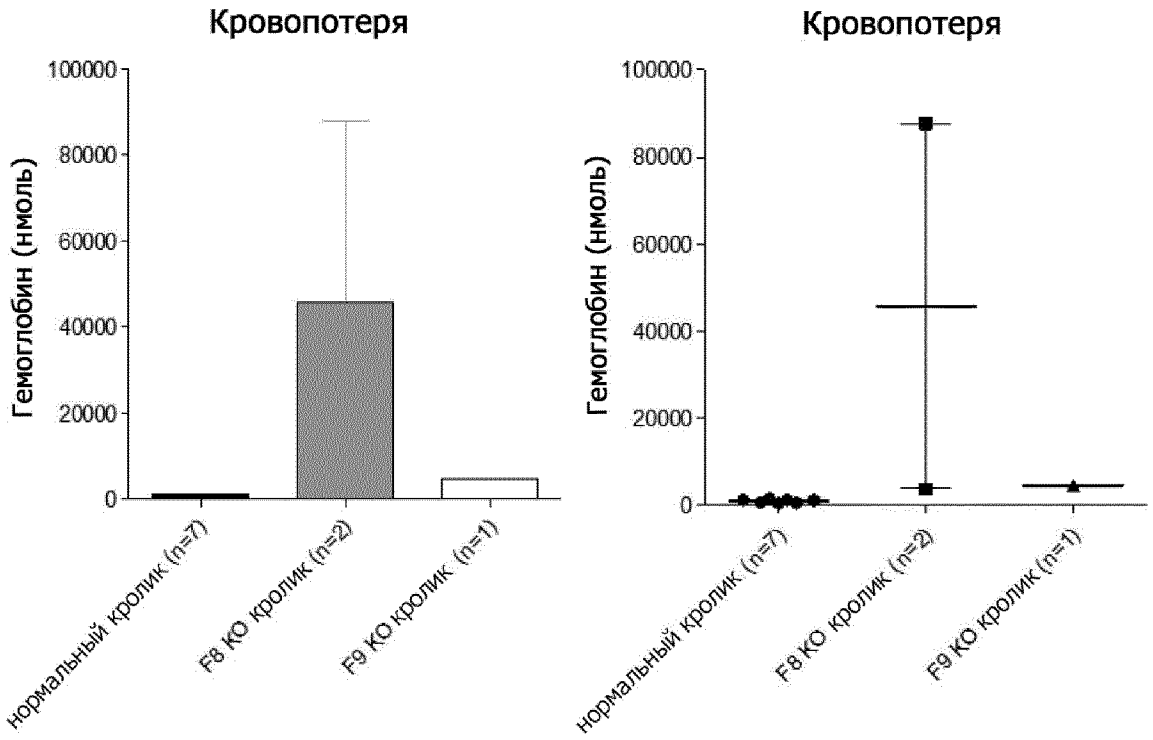
Фиг. 11

#ID	Последовательность	Длина	Счет	Тип	%
4-1	TTGATCATGAAAATGCCACCAAAATTCTGAATCGGGCAAAGAGGTACAAATTCAGGTAAACTGGA TTGATCATGAAAATGCCACCAAAAT------TCGGGCAAAGAGGTACAAATTCAGGTAAACTGGA	114 (-6 делеция)	278,298	делеция	99.4

Фиг. 12


Разрез
Пульпа
2 мм

Фиг. 13


Кровопотеря
Гемоглобин (нмоль)
100000
80000
60000
40000
20000
0
нормальный кролик (n=7)
F8 KO кролик (n=2)
F9 KO кролик (n=1)
Кровопотеря
Гемоглобин (нмоль)
100000
80000
60000
40000
20000
0
нормальный кролик (n=7)
F8 KO кролик (n=2)
F9 KO кролик (n=1)

Фиг. 14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2018/011118

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: **15**
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Claim 15 refers to a multiple dependent claim not meeting the requirement of PCT Rule 6.4(a).

3. ☒ Claims Nos.: **13, 14**
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2018/011118

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/85(2006.01)i, C12N 15/10(2006.01)i, C12N 15/113(2010.01)i, C12N 9/22(2006.01)i, C12N 9/10(2006.01)i, C12N 9/64(2006.01)i, A01K 67/027(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 15/85; C07C 229/04; C12N 15/09; C12N 15/10; C12N 15/113; C12N 9/22; C12N 9/10; C12N 9/64; A01K 67/027

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above
Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: eighth factor, ninth factor, CRISPR-CAS9, knock out, sgRNA, rabbit, crossbreeding, descendant

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	YEN, C.-T. et al., "Current Animal Models of Hemophilia: the State of the Art", Thrombosis Journal, 2016, vol. 14, article no. 22, pages 101-106 See abstract; page 104; figure 1.	1,4,6,7
Y		2,3,5,8-12,16-18
Y	NCBI, GenBank accession no. NM_001171271.1 (26 June 2016) See all sequences.	2,5
Y	NCBI, GenBank accession no. NM_001195725.1 (27 May 2017) See all sequences.	3,5
Y	YUAN, L. et al., "CRISPR/Cas9-mdiated GJA8 Knockout in Rabbits Recapitulates Human Congenital Cataracts", Scientific Reports, 25 February 2016, vol. 6, article no. 22024, pages 1-9 See abstract; pages 2-4.	8-12,16-18
A	PRYKHOZHIJ, S. V. et al., "CRISPR Multitargeter: A Web Tool to Find Common and Unique CRISPR Single Guide RNA Targets in a Set of Similar Sequences", Plos One, 05 March 2015, vol. 10, no. 3, article no. e0119372, pages 1-18 See the entire document.	1-12,16-18

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
02 JANUARY 2019 (02.01.2019)	**02 JANUARY 2019 (02.01.2019)**

Name and mailing address of the ISA/KR	Authorized officer
Korean Intellectual Property Office Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon, 35208, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2018/011118

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	W0 2017-131237 A1 (BONAC CORPORATION) 03 August 2017 See the entire document.	1-12,16-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2018/011118

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
WO 2017-131237 A1	03/08/2017	AU 2017-213405 A1	13/09/2018
		CA 3013179 A1	03/08/2017
		EP 3409776 A1	05/12/2018
		KR 10-2018-0100692 A	11/09/2018