

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202292272** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.11.09

(51) Int. Cl. *C12N 15/113* (2010.01)
A61K 31/712 (2006.01)
A61K 31/7125 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.02.05

(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНА КАЛЛИКРЕИНА (KLKB1)

(31) 62/971,906; 62/981,965; 63/019,076

(32) 2020.02.07; 2020.02.26; 2020.05.01

(33) US

(86) PCT/US2021/016730

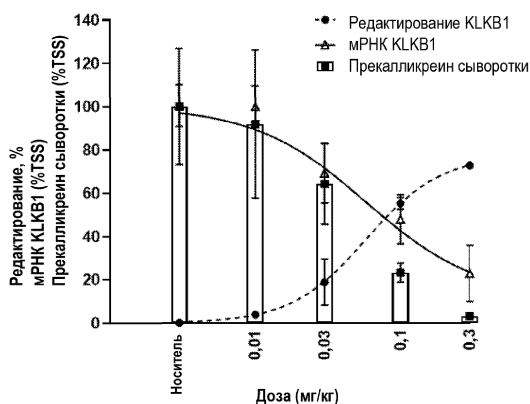
(87) WO 2021/158858 2021.08.12

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

(72) Изобретатель:
Одате Сёбу, Сайцер Джессика Линн
(US)

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

(57) Представлены композиции и способы редактирования, например введения двухцепочечных разрывов в ген KLKB1. Представлены композиции и способы лечения субъектов, страдающих от наследственного ангионевротического отека (НАЕ).



A1

202292272

202292272

A1

**КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНА КАЛЛИКРЕИНА
(*KLKB1*)**

[001] В данной патентной заявке заявляется приоритет по предварительной патентной заявке США № 62/971906, поданной 7 февраля 2020 г., предварительной патентной заявке США № 62/981965, поданной 26 февраля 2020 г., и предварительной патентной заявке США № 63/019076, поданной 1 мая 2020 г., содержание каждой из которых включено в данный документ в полном объеме посредством ссылки для всех целей.

[002] Данная заявка содержит Перечень последовательностей, представленный в электронном виде в формате ASCII и в полном объеме включенный в данный документ посредством ссылки. Копия указанного файла ASCII, созданная 4 февраля 2021 г., называется 01155-0031-00PCT_ST25.txt и имеет размер 184584 байта.

[003] Наследственный ангионевротический отек (НАЕ) поражает одного среди 50000 людей и дает вклад в от 15000 до 30000 посещений отделения скорой помощи в год. НАЕ представляет собой редкое аутосомное, наследуемое по доминантному признаку расстройство крови, характеризующееся повторяющимися эпизодами тяжелого отека (ангионевротического отека). Наиболее распространенные области тела, в которых развивается отек, представляют собой конечности, лицо, ЖКТ и дыхательные пути. Небольшие травмы или стресс могут запустить приступ, но отек обычно происходит без известного триггера. Эпизоды, вовлекающие желудочно-кишечный тракт, вызывают сильную боль в области брюшины, тошноту и рвоту. Отек дыхательных путей может ограничивать дыхание и приводить к угрожающей жизни обструкции дыхательных путей и асфиксии. Симптомы НАЕ, как правило, начинаются в детстве и ухудшаются в подростковом возрасте. В среднем, у индивидов, не получающих лечение, приступ наблюдается каждые 1-2 недели, и большинство эпизодов длится в течение около 3-4 дней. Существует три типа наследственного ангионевротического отека, называемые типы I, II и III, и различные типы обладают различными признаками и симптомами.

[004] Наследственный ангионевротический отек возникает из-за избытка брадикинина в крови, стимулируя проницаемость сосудов и эпизоды отека. Большинство пациентов с НАЕ имеют дефицит белка ингибитора C1 (также называемый ингибитор эстеразы C1 или C1-INH). В отсутствие C1-INH уровни брадикинина могут повышаться, инициировать протекание сосудов и вызывать приступы отека. Его продуцирование контролируется посредством пути калликреин-кинин (контакт), который эндогенно ингибируется посредством C1-INH. Пептид брадикинин образуется, когда высокомолекулярный кининоген (HMWK) расщепляется калликреином плазмы (pKal), активированной формой белка прекалликреина. Прекалликреин кодируется *KLKB1* и также называется белком KLKB1. Белок KLKB1 продуцируется в печени и секретируется в плазму, где он может быть активирован фактором XIIa. После активации KLKB1 pKal

может повышать уровни брадикинина. Избыточное количество брадикинина в крови приводит к утечке жидкости через стенки кровеносных сосудов в ткани организма. Избыточное накопление жидкости в тканях организма вызывает эпизоды отека, наблюдаемые у индивидов с НАЕ.

[005] Было разработано несколько лекарственных средств, нацеленных на путь калликреин-кинин, в том числе ингибиторы эстеразы C1 (Berinert®, Cinryze®), заместительная терапия рекомбинантным C1-INH (rhC1INH; конестат-альфа (Rhucin®, Ruconest®)), и антагонист рецептора брадикинина (икатибант, Firazyr®). Также были разработаны подходы, использующие ингибиторы калликреина или прекалликреина (KLKB1) (экаллантинид, Kalbitor®; ланаделумаб, Takhzyro™).

[006] В данном изобретении представлены композиции и способы применения системы CRISPR/Cas для нокаута гена *KLKB1*, вызывая таким образом снижение продуцирования прекалликреина (KLKB1), снижение калликреина и снижение продуцирования брадикинина у субъектов с НАЕ.

[007] Соответственно, представлены следующие варианты осуществления изобретения. В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении представлены композиции и способы применения гидовой РНК с управляемым РНК ДНК-связывающим агентом, таким как система CRISPR/Cas, для значительного снижения или нокаута экспрессии гена *KLKB1*, таким образом снижая или устараяя продуцирование брадикинина. Значительное снижение или устранение продуцирования брадикинина посредством изменения гена *KLKB1* может представлять собой длительное или постоянное лечение.

[008] В данном документе представлены следующие варианты осуществления изобретения.

[009] Вариант осуществления изобретения A1 представляет собой гидовую РНК, содержащую:

- а. гидовую последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 90% или 85% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID №: 15, 8 и 41;
- б. гидовую последовательность, содержащую по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов подряд из последовательности, выбранной из SEQ ID №: 15, 8 и 41; или
- с. гидовую последовательность, выбранную из SEQ ID №: 15, 8 и 41.

[0010] Вариант осуществления изобретения A2 представляет собой гидовую РНК по варианту осуществления A1, дополнительно содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID №: 202.

[0011] Вариант осуществления изобретения A3 представляет собой гидовую РНК по варианту осуществления A1, причем гидовая РНК дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из SEQ ID №: 170, 171, 172 и 173, при этом последовательность SEQ ID №: 170, 171, 172 или 173 представляет собой 3' гидовой последовательности.

[0012] Вариант осуществления изобретения A4 представляет собой гидовую РНК по любому из вариантов осуществления A1-A3, причем гидовая РНК дополнительно содержит 3'-хвост.

[0013] Вариант осуществления изобретения A5 представляет собой гидовую РНК по любому из вариантов осуществления A1-A4, причем гидовая РНК содержит по меньшей мере одну модификацию.

[0014] Вариант осуществления изобретения A6 представляет собой гидовую РНК по варианту осуществления A5, причем модификация включает модификацию на 5'-конце.

[0015] Вариант осуществления изобретения A7 представляет собой гидовую РНК по варианту осуществления A5 или A6, причем модификация включает модификацию на 3'-конце.

[0016] Вариант осуществления изобретения A8 представляет собой гидовую РНК по любому из вариантов осуществления A1-A7, причем гидовая РНК содержит модификацию в области шпильки.

[0017] Вариант осуществления изобретения A9 представляет собой гидовую РНК по любому из вариантов осуществления A1-A8, причем модификация включает 2'-О-метил-(2'-О-Me) модифицированный нуклеотид.

[0018] Вариант осуществления изобретения A10 представляет собой гидовую РНК по любому из вариантов осуществления A1-A9, причем модификация включает фосфоротиоатную (PS) связь между нуклеотидами.

[0019] Вариант осуществления изобретения A11 представляет собой гидовую РНК по любому из вариантов осуществления A1-A10, причем модификация включает 2'-фтор-(2'F) модифицированный нуклеотид.

[0020] Вариант осуществления изобретения A12 представляет собой гидовую РНК по любому из вариантов осуществления A1 или A3-A11, дополнительно содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID №: 171.

[0021] Вариант осуществления изобретения A13 представляет собой гидовую РНК по варианту осуществления A12, модифицированную в соответствии со схемой нуклеотидной последовательности SEQ ID №: 405.

[0022] Вариант осуществления изобретения A14 представляет собой гидовую РНК по любому из вариантов осуществления A1 или A3-A11, дополнительно содержащую нуклеотидную последовательность SEQ ID №: 173.

[0023] Вариант осуществления изобретения A15 представляет собой гидовую РНК по варианту осуществления A14, модифицированную в соответствии со схемой SEQ ID №: 248-255 или 450.

[0024] Вариант осуществления изобретения A16 представляет собой гидовую РНК по любому из вариантов осуществления A12-A15, при этом гидовая последовательность представляет собой SEQ ID №: 15.

[0025] Вариант осуществления изобретения A17 представляет собой гидовую РНК по любому из вариантов осуществления A12-A15, при этом гидовая последовательность представляет собой SEQ ID №: 8.

[0026] Вариант осуществления изобретения A18 представляет собой гидовую РНК по любому из вариантов осуществления A12-A15, при этом гидовая последовательность представляет собой SEQ ID №: 41.

[0027] Вариант осуществления изобретения A19 представляет собой гидовую РНК по любому из вариантов осуществления A1 или A4-A11, при этом гидовая РНК модифицирована в соответствии со схемой SEQ ID №: 300, где N вместе представляют собой гидовую последовательность по варианту осуществления A1.

[0028] Вариант осуществления изобретения A20 представляет собой гидовую РНК по варианту осуществления A16, причем каждый N в SEQ ID №: 300 представляет собой любой природный или неприродный нуклеотид.

[0029] Вариант осуществления изобретения A21 представляет собой гидовую РНК по варианту осуществления A19, при этом гидовая последовательность представляет собой SEQ ID №: 15, и гидовая РНК модифицирована в соответствии с $mG^*mG^*mA^*UUGCGUAUGGGACACAAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU^*mU^*mU^*mU$, где «mA», «mC», «mU» или «mG» обозначают нуклеотид, который был модифицирован 2'-O-Me, * обозначает фосфоротиоатную связь, и N представляет собой природный нуклеотид.

[0030] Вариант осуществления изобретения A22 представляет собой гидовую РНК по варианту осуществления A19, при этом гидовая последовательность представляет собой SEQ ID №: 8, и гидовая РНК модифицирована в соответствии с $mU^*mA^*mC^*CCGGGAGUUGACUUUGGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU^*mU^*mU^*mU$, где «mA», «mC», «mU» или «mG» обозначают нуклеотид, который был модифицирован 2'-O-Me, * обозначает фосфоротиоатную связь, и N представляет собой природный нуклеотид.

[0031] Вариант осуществления изобретения A23 представляет собой гидовую РНК по варианту осуществления A19, при этом гидовая последовательность представляет собой SEQ ID №: 41, и гидовая РНК модифицирована в соответствии с $mU^*mA^*mU^*UAUCAAUACAUAUACCGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU^*mU^*mU^*mU$, где «mA», «mC», «mU» или «mG» обозначают нуклеотид, который был модифицирован 2'-O-Me, * обозначает фосфоротиоатную связь, и N представляет собой природный нуклеотид.

[0032] Вариант осуществления изобретения A24 представляет собой композицию, содержащую гидовую РНК по любому из вариантов осуществления A1-A23.

[0033] Вариант осуществления изобретения A25 представляет собой композицию по варианту осуществления A24, дополнительно содержащую управляемый РНК ДНК-связывающий агент или нуклеиновую кислоту, кодирующую управляемый РНК ДНК-связывающий агент.

[0034] Вариант осуществления изобретения A26 представляет собой композицию по варианту осуществления A25, в которой нуклеиновая кислота, кодирующая управляемый РНК ДНК-связывающий агент, содержит мРНК, содержащую открытую рамку считывания (ORF), кодирующую управляемый РНК ДНК-связывающий агент.

[0035] Вариант осуществления изобретения A27 представляет собой композицию по варианту осуществления A25 или A26, в которой управляемый РНК ДНК-связывающий агент представляет собой Cas9.

[0036] Вариант осуществления изобретения A28 представляет собой композицию по варианту осуществления A27, в которой Cas9 представляет собой Cas9 *S. pyogenes*.

[0037] Вариант осуществления изобретения A29 представляет собой композицию по любому из вариантов осуществления A26-A28, в которой ORF представляет собой модифицированную ORF.

[0038] Вариант осуществления изобретения A30 представляет собой композицию по любому из вариантов осуществления A24-A29, дополнительно содержащую фармацевтическое вспомогательное вещество.

[0039] Вариант осуществления изобретения A31 представляет собой композицию по любому из вариантов осуществления A24-A30, в которой гидовая РНК связана с липидной наночастицей (LNP).

[0040] Вариант осуществления изобретения A32 представляет собой композицию по варианту осуществления A31, в которой LNP содержит катионный липид.

[0041] Вариант осуществления изобретения A33 представляет собой композицию по варианту осуществления A32, при этом катионный липид представляет собой (9Z,12Z)-3-((4,4-бис(октилокси)бутаноил)окси)-2-(((3-(диэтиламино)пропокси)карбонил)окси)метил)пропилоктадека-9,12-диеноат, также называемый 3-((4,4-бис(октилокси)бутаноил)окси)-2-(((3-(диэтиламино)пропокси)карбонил)окси)метил)пропил-(9Z,12Z)-октадека-9,12-диеноат.

[0042] Вариант осуществления изобретения A34 представляет собой композицию по любому из вариантов осуществления A31-A33, при этом LNP содержит (9Z,12Z)-3-((4,4-бис(октилокси)бутаноил)окси)-2-(((3-(диэтиламино)пропокси)карбонил)окси)метил)пропилоктадека-9,12-диеноат, также называемый 3-((4,4-бис(октилокси)бутаноил)окси)-2-(((3-(диэтиламино)пропокси)карбонил)окси)метил)пропил-(9Z,12Z)-октадека-9,12-диеноат, DSPC, холестерин и PEG2k-DMG.

[0043] Вариант осуществления изобретения A35 представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую гидовую РНК по любому из вариантов осуществления A1-A23 или композицию по любому из вариантов осуществления A24-A34.

[0044] Вариант осуществления изобретения A36 представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую гидовую РНК по любому из вариантов осуществления A1-A23 или композицию по любому из вариантов осуществления A24-A34, или их применение для индуцирования двухцепочечного разрыва или одноцепочечного разрыва в гене KLKB1 в клетке или снижения экспрессии KLKB1 в клетке.

[0045] Вариант осуществления изобретения A37 представляет собой фармацевтическую композицию или применение по варианту осуществления A36 для снижения экспрессии гена KLKB1 в клетке или у субъекта.

[0046] Вариант осуществления изобретения A38 представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую гидовую РНК по любому из вариантов осуществления A1-A23 или композицию по любому из вариантов осуществления A24-A34 или их применение для лечения субъекта с наследственным ангионевротическим отеком (НАЕ).

[0047] Вариант осуществления изобретения A39 представляет собой фармацевтическую композицию или применение по варианту осуществления A38, включающие снижение частоты и/или тяжести приступов НАЕ.

[0048] Вариант осуществления изобретения A40 представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую гидовую РНК по любому из вариантов осуществления A1-A23 или композицию по любому из вариантов осуществления A24-A34 для лечения или профилактики ангионевротического отека, связанного с НАЕ, продуцирования или накопления брадикинина, отека, вызванного брадикинином, обструкции дыхательных путей, вызванной ангионевротическим отеком, или асфиксии.

[0049] Вариант осуществления изобретения A41 представляет собой фармацевтическую композицию или применение гидовой РНК по любому из вариантов осуществления A1-A23 или композиции по любому из вариантов осуществления A24-A34 для снижения общей активности калликреина в плазме или снижения уровней прекалликреина и/или калликреина у субъекта.

[0050] Вариант осуществления изобретения A42 представляет собой фармацевтическую композицию или применение по варианту осуществления A41, при этом общая активность калликреина в плазме уменьшена на более чем 60%.

[0051] Вариант осуществления изобретения A43 представляет собой способ индуцирования двухцепочечного разрыва или одноцепочечного разрыва в гене KLKB1 в клетке или снижения экспрессии KLKB1 в клетке, включающий приведение клетки в контакт с гидовой РНК по любому из вариантов осуществления A1-A23 или композицией по любому из вариантов осуществления A24-A34.

[0052] Вариант осуществления изобретения A44 представляет собой способ по варианту осуществления A43, при этом клетка принадлежит субъекту.

[0053] Вариант осуществления изобретения A45 представляет собой способ лечения субъекта с наследственным ангионевротическим отеком (НАЕ), включающий введение

гидовой РНК по любому из вариантов осуществления A1-A23 или композиции по любому из вариантов осуществления A24-34, осуществляя таким образом лечение субъекта.

[0054] Вариант осуществления изобретения A46 представляет собой способ по варианту осуществления A45, при этом лечение субъекта включает снижение частоты и/или тяжести приступов НАЕ.

[0055] Вариант осуществления изобретения A47 представляет собой способ лечения или профилактики ангионевротического отека, связанного с НАЕ, продуцирования и накопления брадикинина, отека, вызванного брадикинином, обструкции дыхательных путей, вызванной брадикинином, или асфиксии, включающий введение субъекту гидовой РНК по любому из вариантов осуществления A1-A23 или композиции по любому из вариантов осуществления A24-A34, осуществляя таким образом лечение или профилактику ангионевротического отека, связанного с НАЕ, продуцирования и накопления брадикинина, отека, вызванного брадикинином, обструкции дыхательных путей, вызванной брадикинином, или асфиксии у субъекта.

[0056] Вариант осуществления изобретения A48 представляет собой способ снижения общей активности калликреина в плазме у субъекта, включающий введение гидовой РНК по любому из вариантов осуществления A1-A23 или композиции по любому из вариантов осуществления A24-A34, таким образом снижая общую активность калликреина в плазме у субъекта.

[0057] Вариант осуществления изобретения A49 представляет собой способ по варианту осуществления A48, при этом общая активность калликреина в плазме снижена у субъекта более чем на 60%.

[0058] Вариант осуществления изобретения A50 представляет собой применение гидовой РНК по любому из вариантов осуществления A1-A23 или композиции по любому из вариантов осуществления A24-A34 в получении лекарственного препарата для практического осуществления любого из способов по вариантам осуществления A43-A49.

[0059] В данном документе представлены дополнительные варианты осуществления изобретения.

[0060] Вариант осуществления изобретения 1 представляет собой способ индуцирования двухцепочечного разрыва (DSB) или одноцепочечного разрыва (SSB) в гене KLKB1, включающий доставку композиции в клетку, при этом композиция содержит:

- a. гидовую РНК, содержащую
 - i. гидовую последовательность, выбранную из SEQ ID №: 1-149; или
 - ii. по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов подряд из последовательности, выбранной из SEQ ID №: 1-149; или
 - iii. гидовую последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 90% или 85% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID №: 1-149; или
 - iv. гидовую последовательность, содержащую любую из SEQ ID №: 1, 7, 8, 15, 26, 27, 28, 41, 42, 46, 51, 52, 53, 56, 69, 71; или
 - v. гидовую последовательность, содержащую любую из SEQ ID №: 8, 15, 41, 51, 69;

или

vi. последовательность, которая содержит 15 нуклеотидов подряд ± 10 нуклеотидов с координатами в геноме, перечисленными в Таблице 1; или

vii. по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов подряд последовательности из (vi); или

viii. гидовую последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 90% или 85% идентична последовательности, выбранной из (vi); и необязательно

b. управляемый РНК ДНК-связывающий агент или нуклеиновую кислоту, кодирующую управляемый РНК ДНК-связывающий агент.

[0061] Вариант осуществления изобретения 2 представляет собой способ снижения экспрессии гена *KLKB1*, включающий доставку композиции в клетку, при этом композиция содержит:

a. гидовую РНК, содержащую

i. гидовую последовательность, выбранную из SEQ ID №: 1-149; или

ii. по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов подряд из последовательности, выбранной из SEQ ID №: 1-149; или

iii. гидовую последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 90% или 85% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID №: 1-149; или

iv. гидовую последовательность, содержащую любую из SEQ ID №: 1, 7, 8, 15, 26, 27, 28, 41, 42, 46, 51, 52, 53, 56, 69, 71; или

v. гидовую последовательность, содержащую любую из SEQ ID №: 8, 15, 41, 51, 69; или

vi. последовательность, которая содержит 15 нуклеотидов подряд ± 10 нуклеотидов с координатами в геноме, перечисленными в Таблице 1; или

vii. по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов подряд последовательности из (vi); или

viii. гидовую последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 90% или 85% идентична последовательности, выбранной из (vi); и необязательно

b. управляемый РНК ДНК-связывающий агент или нуклеиновую кислоту, кодирующую управляемый РНК ДНК-связывающий агент.

[0062] Вариант осуществления изобретения 3 представляет собой способ лечения или профилактики наследственного ангионевротического отека (НАЕ), включающий введение композиции субъекту, нуждающемуся в этом, при этом композиция содержит:

a. гидовую РНК, содержащую

i. гидовую последовательность, выбранную из SEQ ID №: 1-149; или

ii. по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов подряд из последовательности, выбранной из SEQ ID №: 1-149; или

iii. гидовую последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 90% или 85% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID №: 1-149; или

iv. гидовую последовательность, содержащую любую из SEQ ID №: 1, 7, 8, 15, 26,

27, 28, 41, 42, 46, 51, 52, 53, 56, 69, 71; или

v. гидовую последовательность, содержащую любую из SEQ ID №: 8, 15, 41, 51, 69; или

vi. последовательность, которая содержит 15 нуклеотидов подряд ± 10 нуклеотидов с координатами в геноме, перечисленными в Таблице 1; или

vii. по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов подряд последовательности из (vi); или

viii. гидовую последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 90% или 85% идентична последовательности, выбранной из (vi); и необязательно

b. управляемый РНК ДНК-связывающий агент или нуклеиновую кислоту, кодирующую управляемый РНК ДНК-связывающий агент, осуществляя таким образом лечение или профилактику НАЕ.

[0063] Вариант осуществления изобретения 4 представляет собой способ лечения или профилактики ангионевротического отека, вызванного или связанного с НАЕ, включающий введение композиции субъекту, нуждающемуся в этом, при этом композиция содержит:

a. гидовую РНК, содержащую

i. гидовую последовательность, выбранную из SEQ ID №: 1-149; или

ii. по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов подряд из последовательности, выбранной из SEQ ID №: 1-149; или

iii. гидовую последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 90% или 85% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID №: 1-149; или

iv. гидовую последовательность, содержащую любую из SEQ ID №: 1, 7, 8, 15, 26, 27, 28, 41, 42, 46, 51, 52, 53, 56, 69, 71; или

v. гидовую последовательность, содержащую любую из SEQ ID №: 8, 15, 41, 51, 69; или

vi. последовательность, которая содержит 15 нуклеотидов подряд ± 10 нуклеотидов с координатами в геноме, перечисленными в Таблице 1; или

vii. по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов подряд последовательности из (vi); или

viii. гидовую последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 90% или 85% идентична последовательности, выбранной из (vi); и необязательно

b. управляемый РНК ДНК-связывающий агент или нуклеиновую кислоту, кодирующую управляемый РНК ДНК-связывающий агент, осуществляя таким образом лечение или профилактику ангионевротического отека, вызванного или связанного с НАЕ.

[0064] Вариант осуществления изобретения 5 представляет собой способ лечения или профилактики любого из продуцирования и накопления брадикинина, отека, вызванного брадикинином, обструкции дыхательных путей, вызванной ангионевротическим отеком, или асфиксии, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, композиции, при этом композиция содержит:

- a. гидовую РНК, содержащую
 - i. гидовую последовательность, выбранную из SEQ ID №: 1-149; или
 - ii. по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов подряд из последовательности, выбранной из SEQ ID №: 1-149; или
 - iii. гидовую последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 90% или 85% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID №: 1-149; или
 - iv. гидовую последовательность, содержащую любую из SEQ ID №: 1, 7, 8, 15, 26, 27, 28, 41, 42, 46, 51, 52, 53, 56, 69, 71; или
 - v. гидовую последовательность, содержащую любую из SEQ ID №: 8, 15, 41, 51, 69; или
 - vi. последовательность, которая содержит 15 нуклеотидов подряд ± 10 нуклеотидов с координатами в геноме, перечисленными в Таблице 1; или
 - vii. по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов подряд последовательности из (vi); или
 - viii. гидовую последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 90% или 85% идентична последовательности, выбранной из (vi); и необязательно
- b. управляемый РНК ДНК-связывающий агент или нуклеиновую кислоту, кодирующую управляемый РНК ДНК-связывающий агент, осуществляя таким образом лечение или профилактику любого из продуцирования и накопления брадикинина, отека, вызванного брадикинином, обструкции дыхательных путей, вызванной ангионевротическим отеком, или асфиксии.

[0065] Вариант осуществления изобретения 6 представляет собой способ снижения частоты и/или тяжести приступов НАЕ, включающий введение композиции субъекту, нуждающемуся в этом, при этом композиция содержит:

- a. гидовую РНК, содержащую
 - i. гидовую последовательность, выбранную из SEQ ID №: 1-149; или
 - ii. по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов подряд из последовательности, выбранной из SEQ ID №: 1-149; или
 - iii. гидовую последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 90% или 85% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID №: 1-149; или
 - iv. гидовую последовательность, содержащую любую из SEQ ID №: 1, 7, 8, 15, 26, 27, 28, 41, 42, 46, 51, 52, 53, 56, 69, 71; или
 - v. гидовую последовательность, содержащую любую из SEQ ID №: 8, 15, 41, 51, 69; или
 - vi. последовательность, которая содержит 15 нуклеотидов подряд ± 10 нуклеотидов с координатами в геноме, перечисленными в Таблице 1; или
 - vii. по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов подряд последовательности из (vi); или
 - viii. гидовую последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 90% или 85% идентична последовательности, выбранной из (vi); и необязательно

б. управляемый РНК ДНК-связывающий агент или нуклеиновую кислоту, кодирующую управляемый РНК ДНК-связывающий агент, осуществляя таким образом снижение частоты и/или тяжести приступов НАЕ.

[0066] Вариант осуществления изобретения 7 представляет собой способ снижения частоты и/или тяжести приступов ангионевротического отека или достижения ремиссии приступов ангионевротического отека у субъекта, включающий введение композиции субъекту, нуждающемуся в этом, при этом композиция содержит:

- а. гидовую РНК, содержащую
 - i. гидовую последовательность, выбранную из SEQ ID №: 1-149; или
 - ii. по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов подряд из последовательности, выбранной из SEQ ID №: 1-149; или
 - iii. гидовую последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 90% или 85% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID №: 1-149; или
 - iv. гидовую последовательность, содержащую любую из SEQ ID №: 1, 7, 8, 15, 26, 27, 28, 41, 42, 46, 51, 52, 53, 56, 69, 71; или
 - v. гидовую последовательность, содержащую любую из SEQ ID №: 8, 15, 41, 51, 69; или
 - vi. последовательность, которая содержит 15 нуклеотидов подряд ± 10 нуклеотидов с координатами в геноме, перечисленными в Таблице 1; или
 - vii. по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов подряд последовательности из (vi); или
 - viii. гидовую последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 90% или 85% идентична последовательности, выбранной из (vi); и необязательно

б. управляемый РНК ДНК-связывающий агент или нуклеиновую кислоту, кодирующую управляемый РНК ДНК-связывающий агент, осуществляя таким образом снижение частоты и/или тяжести приступов ангионевротического отека или достижения ремиссии приступов ангионевротического отека у субъекта.

[0067] Вариант осуществления изобретения 8 представляет собой способ снижения общей активности калликреина в плазме, включающий введение композиции субъекту, нуждающемуся в этом, при этом композиция содержит:

- а. гидовую РНК, содержащую
 - i. гидовую последовательность, выбранную из SEQ ID №: 1-149; или
 - ii. по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов подряд из последовательности, выбранной из SEQ ID №: 1-149; или
 - iii. гидовую последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 90% или 85% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID №: 1-149; или
 - iv. гидовую последовательность, содержащую любую из SEQ ID №: 1, 7, 8, 15, 26, 27, 28, 41, 42, 46, 51, 52, 53, 56, 69, 71; или
 - v. гидовую последовательность, содержащую любую из SEQ ID №: 8, 15, 41, 51, 69; или

vi. последовательность, которая содержит 15 нуклеотидов подряд ± 10 нуклеотидов с координатами в геноме, перечисленными в Таблице 1; или

vii. по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов подряд последовательности из (vi); или

viii. гидовую последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 90% или 85% идентична последовательности, выбранной из (vi); и необязательно

b. управляемый РНК ДНК-связывающий агент или нуклеиновую кислоту, кодирующую управляемый РНК ДНК-связывающий агент, таким образом достигая ремиссии приступов ангионевротического отека у субъекта, при этом общая активность калликреина в плазме снижена.

[0068] Вариант осуществления изобретения 9 представляет собой способ по варианту осуществления 8, дополнительно включающий стадию активации для превращения прекалликреина в его активную форму, pKal.

[0069] Вариант осуществления изобретения 10 представляет собой способ по варианту осуществления 8, при этом общая активность калликреина в плазме снижена более чем на 60%, более чем на 85% или более чем на 60-80%.

[0070] Вариант осуществления изобретения 11 представляет собой способ снижения общих уровней калликреина в плазме, включающий введение композиции субъекту, нуждающемуся в этом, при этом композиция содержит:

a. гидовую РНК, содержащую

i. гидовую последовательность, выбранную из SEQ ID №: 1-149; или

ii. по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов подряд из последовательности, выбранной из SEQ ID №: 1-149; или

iii. гидовую последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 90% или 85% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID №: 1-149; или

iv. гидовую последовательность, содержащую любую из SEQ ID №: 1, 7, 8, 15, 26, 27, 28, 41, 42, 46, 51, 52, 53, 56, 69, 71; или

v. гидовую последовательность, содержащую любую из SEQ ID №: 8, 15, 41, 51, 69; или

vi. последовательность, которая содержит 15 нуклеотидов подряд ± 10 нуклеотидов с координатами в геноме, перечисленными в Таблице 1; или

vii. по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов подряд последовательности из (vi); или

viii. гидовую последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 90% или 85% идентична последовательности, выбранной из (vi); и необязательно

b. управляемый РНК ДНК-связывающий агент или нуклеиновую кислоту, кодирующую управляемый РНК ДНК-связывающий агент, осуществляя таким образом снижение общих уровней калликреина в плазме.

[0071] Вариант осуществления изобретения 12 представляет собой способ снижения уровней прекалликреина и/или калликреина, включающий введение композиции субъекту, нуждающемуся в этом, при этом композиция содержит:

- a. гидовую РНК, содержащую
 - i. гидовую последовательность, выбранную из SEQ ID №: 1-149; или
 - ii. по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов подряд из последовательности, выбранной из SEQ ID №: 1-149; или
 - iii. гидовую последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 90% или 85% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID №: 1-149; или
 - iv. гидовую последовательность, содержащую любую из SEQ ID №: 1, 7, 8, 15, 26, 27, 28, 41, 42, 46, 51, 52, 53, 56, 69, 71; или
 - v. гидовую последовательность, содержащую любую из SEQ ID №: 8, 15, 41, 51, 69; или
 - vi. последовательность, которая содержит 15 нуклеотидов подряд ± 10 нуклеотидов с координатами в геноме, перечисленными в Таблице 1; или
 - vii. по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов подряд последовательности из (vi); или
 - viii. гидовую последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 90% или 85% идентична последовательности, выбранной из (vi); и необязательно
- b. управляемый РНК ДНК-связывающий агент или нуклеиновую кислоту, кодирующую управляемый РНК ДНК-связывающий агент, осуществляя таким образом снижение уровней прекалликреина и/или калликреина.

[0072] Вариант осуществления изобретения 13 представляет собой способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, при этом наблюдается дозозависимое повышение процента редактирования.

[0073] Вариант осуществления изобретения 14 представляет собой способ по варианту осуществления 13, при этом наблюдается дозозависимое уменьшение общих уровней калликреина в плазме.

[0074] Вариант осуществления изобретения 15 представляет собой способ по варианту осуществления 13 или 14, при этом наблюдается дозозависимое уменьшение активности калликреина в плазме.

[0075] Вариант осуществления изобретения 16 представляет собой способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, при этом эффект длится в течение по меньшей мере 1 месяца, 2 месяцев, 4 месяцев, 6 месяцев, 1 года, 2 лет, 5 лет, 10 лет или более после введения.

[0076] Вариант осуществления изобретения 17 представляет собой способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, при этом эффект длится по меньшей мере 6 месяцев.

[0077] Вариант осуществления изобретения 18 представляет собой способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, при этом эффект длится по меньшей мере 1 год.

[0078] Вариант осуществления изобретения 19 представляет собой способ по варианту осуществления 6, при этом частота приступов НАЕ снижена.

[0079] Вариант осуществления изобретения 20 представляет собой способ по варианту осуществления 19, при этом частота снижена по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 60-80% или по меньшей мере на 40-90%.

[0080] Вариант осуществления изобретения 21 представляет собой способ по варианту осуществления 20, при этом частота снижена по меньшей мере на 60-80%.

[0081] Вариант осуществления изобретения 22 представляет собой способ по варианту осуществления 20, при этом частота снижена по меньшей мере на 40-90%.

[0082] Вариант осуществления изобретения 23 представляет собой способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, при этом эффект длится в течение по меньшей мере 1 месяца, 2 месяцев, 4 месяцев, 6 месяцев, 1 года, 2 лет, 5 лет, 10 лет или более после введения.

[0083] Вариант осуществления изобретения 24 представляет собой способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, при этом эффект длится по меньшей мере 6 месяцев после введения.

[0084] Вариант осуществления изобретения 25 представляет собой способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, при этом эффект длится по меньшей мере 1 год после введения.

[0085] Вариант осуществления изобретения 26 представляет собой способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, при этом эффект сравнивают с исходным уровнем.

[0086] Вариант осуществления изобретения 27 представляет собой способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, при этом эффект сравнивают с исходным уровнем субъекта.

[0087] Вариант осуществления изобретения 28 представляет собой способ по любому из предыдущих вариантов осуществления, при этом вводят управляемый РНК ДНК-связывающий агент или нуклеиновую кислоту, кодирующую управляемый РНК ДНК-связывающий агент.

[0088] Вариант осуществления изобретения 29 представляет собой композицию, содержащую:

- а. гидовую РНК, содержащую
 - i. гидовую последовательность, выбранную из SEQ ID №: 1-149; или
 - ii. по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов подряд из последовательности, выбранной из SEQ ID №: 1-149; или

iii. гидовую последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 90% или 85% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID №: 1-149; или

iv. гидовую последовательность, содержащую любую из SEQ ID №: 1, 7, 8, 15, 26, 27, 28, 41, 42, 46, 51, 52, 53, 56, 69, 71; или

v. гидовую последовательность, содержащую любую из SEQ ID №: 8, 15, 41, 51, 69; или

vi. последовательность, которая содержит 15 нуклеотидов подряд ± 10 нуклеотидов с координатами в геноме, перечисленными в Таблице 1; или

vii. по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов подряд последовательности из (vi); или

viii. гидовую последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 90% или 85% идентична последовательности, выбранной из (vi); и необязательно

b. управляемый РНК ДНК-связывающий агент или нуклеиновую кислоту, кодирующую управляемый РНК ДНК-связывающий агент.

[0089] Вариант осуществления изобретения 30 представляет собой композицию, содержащую короткую единую гидовую РНК (короткую sgRNA), содержащую:

a. гидовую последовательность, содержащую

i. гидовую последовательность, выбранную из SEQ ID №: 1-149; или

ii. по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов подряд из последовательности, выбранной из SEQ ID №: 1-149; или

iii. гидовую последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 90% или 85% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID №: 1-149; или

iv. гидовую последовательность, содержащую любую из SEQ ID №: 1, 7, 8, 15, 26, 27, 28, 41, 42, 46, 51, 52, 53, 56, 69, 71; или

v. гидовую последовательность, содержащую любую из SEQ ID №: 8, 15, 41, 51, 69; или

vi. последовательность, которая содержит 15 нуклеотидов подряд ± 10 нуклеотидов с координатами в геноме, перечисленными в Таблице 1; или

vii. по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов подряд последовательности из (vi); или

viii. гидовую последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 90% или 85% идентична последовательности, выбранной из (vi); и

b. консервативную часть sgRNA, содержащую область шпильки, причем в области шпильки отсутствует по меньшей мере 5-10 нуклеотидов и необязательно при этом короткая sgRNA содержит одну или более из модификации на 5'-конце и модификации на 3'-конце.

[0090] Вариант осуществления изобретения 31. Композиция по варианту осуществления 29, содержащая последовательность SEQ ID №: 202.

[0091] Вариант осуществления изобретения 32 представляет собой композицию по варианту осуществления 29 или варианту осуществления 30, содержащую модификацию на 5'-конце.

[0092] Вариант осуществления изобретения 33 представляет собой композицию по любому из вариантов осуществления 29-32, при этом короткая sgRNA содержит модификацию на 3'-конце.

[0093] Вариант осуществления изобретения 34 представляет собой композицию по любому из вариантов осуществления 29-33, при этом короткая sgRNA содержит модификацию на 5'-конце и модификацию на 3'-конце.

[0094] Вариант осуществления изобретения 35 представляет собой композицию по любому из вариантов осуществления 29-34, при этом короткая sgRNA дополнительно содержит 3'-хвост.

[0095] Вариант осуществления изобретения 36 представляет собой композицию по варианту осуществления 35, при этом 3'-хвост содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов.

[0096] Вариант осуществления изобретения 37 представляет собой композицию по варианту осуществления 35, при этом 3'-хвост содержит около 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-7, 1-10, по меньшей мере 1-2, по меньшей мере 1-3, по меньшей мере 1-4, по меньшей мере 1-5, по меньшей мере 1-7 или по меньшей мере 1-10 нуклеотидов.

[0097] Вариант осуществления изобретения 38 представляет собой композицию по любому из вариантов осуществления 29-37, при этом короткая sgRNA не содержит 3'-хвост.

[0098] Вариант осуществления изобретения 39 представляет собой композицию по любому из вариантов осуществления 29-38, содержащую модификацию в области шпильки.

[0099] Вариант осуществления изобретения 40 представляет собой композицию по любому из вариантов осуществления 29-39, содержащую модификацию на 3'-конце и модификацию в области шпильки.

[00100] Вариант осуществления изобретения 41 представляет собой композицию по любому из вариантов осуществления 29-40, содержащую модификацию на 3'-конце, модификацию в области шпильки и модификацию на 5'-конце.

[00101] Вариант осуществления изобретения 42 представляет собой композицию по любому из вариантов осуществления 29-41, содержащую модификацию на 5'-конце и модификацию в области шпильки.

[00102] Вариант осуществления изобретения 43 представляет собой композицию по любому из вариантов осуществления 29-42, при этом в области шпильки отсутствует по меньшей мере 5 нуклеотидов подряд.

[00103] Вариант осуществления изобретения 44 представляет собой композицию по любому из вариантов осуществления 29-43, при этом по меньшей мере 5-10 отсутствующих нуклеотидов:

а. находятся в шпильке 1;

б. находятся в шпильке 1 и представляют собой «N» между шпилькой 1 и шпилькой

2;

b. находятся в шпильке 1 и представляют собой два нуклеотида сразу в 3'-направлении от шпильки 1;

d. включают по меньшей мере часть шпильки 1;

e. находятся в шпильке 2;

f. включают по меньшей мере часть шпильки 2;

g. находятся в шпильке 1 и шпильке 2;

h. включают по меньшей мере часть шпильки 1 и включают «N» между шпилькой 1 и шпилькой 2;

i. включают по меньшей мере часть шпильки 2 и включают «N» между шпилькой 1 и шпилькой 2;

j. включают по меньшей мере часть шпильки 1, включают «N» между шпилькой 1 и шпилькой 2, и включают по меньшей мере часть шпильки 2;

k. находятся в шпильке 1 или шпильке 2, необязательно включая «N» между шпилькой 1 и шпилькой 2;

l. идут подряд;

m. идут подряд и включают «N» между шпилькой 1 и шпилькой 2;

n. идут подряд и охватывают по меньшей мере часть шпильки 1 и по меньшей мере часть шпильки 2;

o. идут подряд и охватывают по меньшей мере часть шпильки 1 и «N» между шпилькой 1 и шпилькой 2;

p. идут подряд и охватывают по меньшей мере часть шпильки 1 и два нуклеотида сразу в 3'-направлении от шпильки 1;

q. состоят из 5-10 нуклеотидов;

r. состоят из 6-10 нуклеотидов;

s. состоят из 5-10 нуклеотидов подряд;

t. состоят из 6-10 нуклеотидов подряд; или

u. состоят из нуклеотидов 54-58 SEQ ID №: 400.

[00104] Вариант осуществления изобретения 45 представляет собой композицию по любому из вариантов осуществления 29-44, содержащую консервативную часть sgRNA, содержащей область некнуса, при этом в области некнуса отсутствует по меньшей мере один нуклеотид.

[00105] Вариант осуществления изобретения 46 представляет собой композицию по варианту осуществления 45, при этом нуклеотиды, отсутствующие в области некнуса, включают один или более из:

a. по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов в области некнуса;

b. по меньшей мере или именно 1-2 нуклеотида, 1-3 нуклеотида, 1-4 нуклеотида, 1-5 нуклеотидов, 1-6 нуклеотидов, 1-10 нуклеотидов или 1-15 нуклеотидов в области некнуса;
и

c. каждый нуклеотид в области некнуса.

[00106] Вариант осуществления изобретения 47 представляет собой композицию, содержащую модифицированную единую гидовую РНК (sgRNA), содержащую:

- a. гидовую последовательность, содержащую
 - i. гидовую последовательность, выбранную из SEQ ID №: 1-149; или
 - ii. по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов подряд из последовательности, выбранной из SEQ ID №: 1-149; или
 - iii. гидовую последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 90% или 85% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID №: 1-149; или
 - iv. гидовую последовательность, содержащую любую из SEQ ID №: 1, 7, 8, 15, 26, 27, 28, 41, 42, 46, 51, 52, 53, 56, 69, 71; или
 - v. гидовую последовательность, содержащую любую из SEQ ID №: 8, 15, 41, 51, 69; или
 - vi. последовательность, которая содержит 15 нуклеотидов подряд ± 10 нуклеотидов с координатами в геноме, перечисленными в Таблице 1; или
 - vii. по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов подряд последовательности из (vi); или
 - viii. гидовую последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 90% или 85% идентична последовательности, выбранной из (vi); и дополнительно содержащую
- b. одну или более модификаций, выбранных из:
 1. модификации YA в одном или более сайтах YA гидовой области;
 2. модификации YA в одном или более сайтах YA консервативной области;
 3. модификации YA в одном или более сайтах YA гидовой области и одном или более сайтах YA консервативной области;
 4. i) модификации YA в двух или более сайтах YA гидовой области;
 - ii) модификации YA в одном или более сайтах YA 2, 3, 4 и 10 консервативной области; и
 - iii) модификации YA в одном или более сайтах YA 1 и 8 консервативной области;
 или
 5. i) модификации YA в одном или более сайтах YA гидовой области, при этом сайт YA гидовой области находится в или после нуклеотида 8 из 5'-конца 5' концевой фрагмента;
 - ii) модификации YA в одном или более сайтах YA 2, 3, 4 и 10 консервативной области; и необязательно
 - iii) модификации YA в одном или более сайтах YA 1 и 8 консервативной области;
 или
 6. i) модификации YA в одном или более сайтах YA гидовой области, при этом сайт YA гидовой области находится среди 13 нуклеотидов 3'-концевого нуклеотида гидовой области;
 - ii) модификации YA в одном или более сайтах YA 2, 3, 4 и 10 консервативной

области; и

iii) модификации YA в одном или более сайтах YA 1 и 8 консервативной области;

или

7. i) модификации 5'-конца и модификации 3'-конца;

ii) модификации YA в одном или более сайтах YA 2, 3, 4 и 10 консервативной области; и

iii) модификации YA в одном или более сайтах YA 1 и 8 консервативной области;

или

8. i) модификации YA в сайте YA гидовой области, при этом модификация сайта YA гидовой области содержит модификацию, которую по меньшей мере один нуклеотид, расположенный в 5'-направлении от сайта YA гидовой области, не содержит;

ii) модификации YA в одном или более сайтах YA 2, 3, 4 и 10 консервативной области; и

iii) модификации YA в одном или более сайтах YA 1 и 8 консервативной области;

или

9. i) модификации YA в одном или более сайтах YA 2, 3, 4 и 10 консервативной области; и

ii) модификации YA в сайтах YA 1 и 8 консервативной области; или

10. i) модификации YA в одном или более сайтах YA гидовой области, при этом сайт YA находится в или после нуклеотида 8 из 5'-концевого фрагмента;

ii) модификации YA в одном или более сайтах YA 2, 3, 4 и 10 консервативной области; и

iii) модификации в одном или более из H1-1 и H2-1; или

11. i) модификации YA в одном или более сайтах YA 2, 3, 4 и 10 ; ii) модификации YA в одном или более сайтах YA 1, 5, 6, 7, 8 и 9 консервативной области; и iii) модификации в одном или более из H1-1 и H2-1; или

12. i) модификации, такой как модификация YA, в одном или более нуклеотидах, расположенных в положении или после нуклеотида 6 от 5'-конца;

ii) модификации YA в одном или более сайтах YA гидовой последовательности;

iii) модификации в одном или более из B3, B4 и B5, при этом B6 не содержит модификацию 2'-ОМе или содержит модификацию, отличную от 2'-ОМе;

iv) модификации в положении LS10, при этом LS10 содержит модификацию, отличную от 2'-фтор; и/или

v) модификации в положении N2, N3, N4, N5, N6, N7, N10 или N11; и по меньшей мере одно из следующего является истиной:

i. модификация YA в одном или более сайтах YA гидовой области;

ii. модификация YA в одном или более сайтах YA консервативной области;

iii. модификация YA в одном или более сайтах YA гидовой области и одном или более сайтах YA консервативной области;

iv. по меньшей мере один из нуклеотидов 8-11, 13, 14, 17 или 18 от 5'-конца 5'-

концевого фрагмента не содержат модификацию 2'-фтор;

v. по меньшей мере один из нуклеотидов 6-10 от 5'-конца 5'-концевого фрагмента не содержит фосфоротиоатную связь;

vi. по меньшей мере один из B2, B3, B4 или B5 не содержит модификацию 2'-ОМе;

vi. по меньшей мере один из LS1, LS8 или LS10 не содержит модификацию 2'-ОМе;

viii. по меньшей мере один из N2, N3, N4, N5, N6, N7, N10, N11, N16 или N17 не содержит модификацию 2'-ОМе;

ix. H1-1 содержит модификацию;

x. H2-1 содержит модификацию; или

xi. по меньшей мере один из H1-2, H1-3, H1-4, H1-5, H1-6, H1-7, H1-8, H1-9, H1-10, H2-1, H2-2, H2-3, H2-4, H2-5, H2-6, H2-7, H2-8, H2-9, H2-10, H2-11, H2-12, H2-13, H2-14 или H2-15 не содержит фосфоротиоатную связь.

[00107] Вариант осуществления изобретения 48 представляет собой композицию по варианту осуществления изобретения 47, содержащую SEQ ID №: 450.

[00108] Вариант осуществления изобретения 49 представляет собой композицию по любому из вариантов осуществления 29-48 для применения при индуцировании двухцепочечного разрыва (DSB) или одноцепочечного разрыва в гене KLKB1 в клетке или у субъекта.

[00109] Вариант осуществления изобретения 50 представляет собой композицию по любому из вариантов осуществления 29-48 для применения при снижении экспрессии гена KLKB1 в клетке или у субъекта.

[00110] Вариант осуществления изобретения 51 представляет собой композицию по любому из вариантов осуществления 29-48 для применения при лечении или профилактике НАЕ у субъекта.

[00111] Вариант осуществления изобретения 52 представляет собой композицию по любому из вариантов осуществления 29-48 для применения при снижении концентрации брадикинина в сыворотке и/или плазме у субъекта.

[00112] Вариант осуществления изобретения 53 представляет собой композицию по любому из вариантов осуществления 29-48 для применения при уменьшении вазодилатации, опосредованной брадикинином, у субъекта.

[00113] Вариант осуществления изобретения 54 представляет собой композицию по любому из вариантов осуществления 29-48 для применения при лечении или профилактике продуцирования и накопления брадикинина, вазодилатации, опосредованной брадикинином, отека или ангионевротического отека, обструкции дыхательных путей или асфиксии.

[00114] Вариант осуществления изобретения 55 представляет собой композицию по любому из вариантов осуществления 29-48 для применения при лечении или профилактике ангионевротического отека, вызванного или связанного с НАЕ.

[00115] Вариант осуществления изобретения 56 представляет собой композицию по любому из вариантов осуществления 29-48 для применения при уменьшении частоты приступов ангионевротического отека.

[00116] Вариант осуществления изобретения 57 представляет собой композицию по любому из вариантов осуществления 29-48 для применения при уменьшении тяжести приступов ангионевротического отека.

[00117] Вариант осуществления изобретения 58 представляет собой композицию по любому из вариантов осуществления 29-48 для применения при уменьшении частоты и/или тяжести приступов.

[00118] Вариант осуществления изобретения 59 представляет собой композицию по любому из вариантов осуществления 29-48 для применения при достижении ремиссии приступов ангионевротического отека.

[00119] Вариант осуществления изобретения 60 представляет собой композицию по любому из вариантов осуществления 29-48 для применения при уменьшении частоты и/или тяжести приступов НАЕ.

[00120] Вариант осуществления изобретения 61 представляет собой композицию по варианту осуществления 60 для применения при уменьшении частоты приступов НАЕ.

[00121] Вариант осуществления изобретения 62 представляет собой композицию по варианту осуществления 61, при этом частота снижена по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 60-80% или по меньшей мере на 40-90%.

[00122] Вариант осуществления изобретения 63 представляет собой способ по варианту осуществления 61, при этом частота снижена по меньшей мере на 60-80%.

[00123] Вариант осуществления изобретения 64 представляет собой способ по варианту осуществления 61, при этом частота снижена по меньшей мере на 40-90%.

[00124] Вариант осуществления изобретения 65 представляет собой композицию по варианту осуществления 60 для применения при снижении общей активности калликреина в плазме.

[00125] Вариант осуществления изобретения 66 представляет собой композицию по варианту осуществления 60 для применения при снижении общих уровней калликреина в плазме.

[00126] Вариант осуществления изобретения 67 представляет собой композицию по варианту осуществления 60 для применения при снижении уровней прекалликреина и/или калликреина в плазме.

[00127] Вариант осуществления изобретения 68 представляет собой композицию по любому из вариантов осуществления 65-67, при этом наблюдается дозозависимое повышение процента редактирования.

[00128] Вариант осуществления изобретения 69 представляет собой композицию по любому из вариантов осуществления 65-68, при этом наблюдается дозозависимое снижение общих уровней калликреина в плазме.

[00129] Вариант осуществления изобретения 70 представляет собой композицию по любому из вариантов осуществления 65-69, при этом наблюдается дозозависимое снижение активности калликреина в плазме.

[00130] Вариант осуществления изобретения 71 представляет собой композицию по любому из вариантов осуществления 29-70, при этом эффект длится в течение по меньшей мере 1 месяца, 2 месяцев, 4 месяцев, 6 месяцев, 1 года, 2 лет, 5 лет, 10 лет или более после введения.

[00131] Вариант осуществления изобретения 72 представляет собой композицию по любому из вариантов осуществления 29-71, при этом эффект длится по меньшей мере 6 месяцев.

[00132] Вариант осуществления изобретения 73 представляет собой композицию по любому из вариантов осуществления 29-72, при этом эффект длится по меньшей мере 1 год.

[00133] Вариант осуществления изобретения 74 представляет собой способ по варианту осуществления 1-28, дополнительно включающий:

- a. индуцирование двухцепочечного разрыва (DSB) в гене *KLKB1* в клетке или у субъекта;
- b. снижение экспрессии гена *KLKB1* в клетке или у субъекта;
- c. лечение или профилактика НАЕ у субъекта;
- d. снижение концентрации брадикинина в сыворотке и/или плазме у субъекта;
- e. снижение продуцирования брадикинина;
- f. уменьшение вазодилатации, опосредованной брадикинином;
- g. лечение или профилактику отека или ангионевротического отека, опосредованного брадикинином; и/или
- h. лечение или профилактику обструкции дыхательных путей или асфиксии, вызванной отеком.

[00134] Вариант осуществления изобретения 75 представляет собой способ, композицию или композицию для применения по любому из предыдущих вариантов осуществления, при этом композиция снижает продуцирование мРНК *KLKB1*.

[00135] Вариант осуществления изобретения 76 представляет собой способ, композицию или композицию для применения по любому из предыдущих вариантов осуществления, при этом композиция снижает уровни белка прекалликреина в плазме или сыворотке.

[00136] Вариант осуществления изобретения 77 представляет собой способ, композицию или композицию для применения по любому из предыдущих вариантов осуществления, при этом композиция снижает общие уровни белка прекалликреина (прекалликреин и pKal) в плазме или сыворотке.

[00137] Вариант осуществления изобретения 78 представляет собой способ, композицию или композицию для применения по любому из предыдущих вариантов осуществления, при этом композиция снижает долю расщепленного HMWK (сHMWK) в кровотоке по сравнению с общим HMWK в цитратной сыворотке или цитратной плазме.

[00138] Вариант осуществления изобретения 79 представляет собой способ, композицию или композицию для применения по любому из предыдущих вариантов осуществления, при этом композиция снижает долю сHMWK в цитратной плазме субъекта до более чем 30% от общего HMWK.

[00139] Вариант осуществления изобретения 80 представляет собой способ, композицию или композицию для применения по любому из предыдущих вариантов осуществления, при этом композиция снижает спонтанную активность pK_{al} в сыворотке или плазме.

[00140] Вариант осуществления изобретения 81 представляет собой способ, композицию или композицию для применения по любому из предыдущих вариантов осуществления, при этом композиция снижает активность калликреина.

[00141] Вариант осуществления изобретения 82 представляет собой способ, композицию или композицию для применения по любому из предыдущих вариантов осуществления, при этом активность калликреина включает общую активность калликреина, активность прекалликреина и/или активность pK_{al}.

[00142] Вариант осуществления изобретения 83 представляет собой способ, композицию или композицию для применения по любому из предыдущих вариантов осуществления, при этом композиция снижает активность pK_{al} субъекта по меньшей мере на около 40% до применения способа или композиции.

[00143] Вариант осуществления изобретения 84 представляет собой способ, композицию или композицию для применения по любому из предыдущих вариантов осуществления, при этом композиция снижает активность pK_{al} субъекта по меньшей мере на около 50% до применения способа или композиции.

[00144] Вариант осуществления изобретения 85 представляет собой способ, композицию или композицию для применения по любому из предыдущих вариантов осуществления, при этом композиция снижает активность pK_{al} субъекта по меньшей мере на около 60% до применения способа или композиции.

[00145] Вариант осуществления изобретения 86 представляет собой способ, композицию или композицию для применения по любому из предыдущих вариантов осуществления, при этом композиция снижает активность pK_{al} субъекта на менее чем около 40% от исходных уровней.

[00146] Вариант осуществления изобретения 87 представляет собой способ, композицию или композицию для применения по любому из предыдущих вариантов осуществления, при этом композиция снижает активность pK_{al} субъекта на около 40-50% от исходных уровней.

[00147] Вариант осуществления изобретения 88 представляет собой способ, композицию или композицию для применения по любому из предыдущих вариантов осуществления, при этом композиция снижает активность рK_{al} субъекта на около 20-40% или 20-50% от исходных уровней.

[00148] Вариант осуществления изобретения 89 представляет собой способ, композицию или композицию для применения по любому из предыдущих вариантов осуществления, при этом композиция повышает уровни брадикинина в сыворотке и/или плазме.

[00149] Вариант осуществления изобретения 90 представляет собой способ, композицию или композицию для применения по любому из предыдущих вариантов осуществления, при этом композиция приводит к редактированию гена KLKB1.

[00150] Вариант осуществления изобретения 91 представляет собой способ, композицию или композицию для применения по варианту осуществления 90, при этом редактирование рассчитывают как процент популяции, которую редактируют (процент редактирования).

[00151] Вариант осуществления изобретения 92 представляет собой способ, композицию или композицию для применения по варианту осуществления 91, при этом процент редактирования составляет от 30 до 99% популяции.

[00152] Вариант осуществления изобретения 93 представляет собой способ, композицию или композицию для применения по варианту осуществления 91, при этом процент редактирования составляет от 30 до 35%, от 35 до 40%, от 40 до 45%, от 45 до 50%, от 50 до 55%, от 55 до 60%, от 60 до 65%, от 65 до 70%, от 70 до 75%, от 75 до 80%, от 80 до 85%, от 85 до 90%, от 90 до 95% или от 95 до 99% популяции.

[00153] Вариант осуществления изобретения 94 представляет собой способ, композицию или композицию для применения по любому из предыдущих вариантов осуществления, при этом композиция снижает концентрацию брадикинина в сыворотке и/или плазме.

[00154] Вариант осуществления изобретения 95 представляет собой способ, композицию или композицию для применения по любому из предыдущих вариантов осуществления, при этом композиция снижает концентрацию брадикинина в сыворотке и/или плазме, и при этом снижение уровня брадикинина в сыворотке и/или плазме приводит к снижению отека в тканях органов, в том числе конечностях, лице, ЖКТ или дыхательных путях.

[00155] Вариант осуществления изобретения 96 представляет собой способ, композицию для применения или композицию по любому из предыдущих вариантов осуществления, при этом гидовая последовательность выбрана из

- a. SEQ ID №: 1-149; или
- b. SEQ ID №: 1, 7, 8, 15, 26, 27, 28, 41, 42, 46, 51, 52, 53, 56, 69, 71; или
- c. любой из SEQ ID №: 8, 15, 41, 51, 69; или
- d. последовательность, которая содержит 15 нуклеотидов подряд ± 10 нуклеотидов с

координатами в геноме, перечисленными в Таблице 1; или

е. по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов подряд последовательности из (d);
или

f. гидовую последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 90% или 85% идентична последовательности, выбранной из (d).

[00156] Вариант осуществления изобретения 97 представляет собой способ, композицию для применения или композицию по любому из предыдущих вариантов осуществления, при этом композиция содержит sgRNA, содержащую:

a. SEQ ID №: 1, 7, 8, 15, 26, 27, 28, 41, 42, 46, 51, 52, 53, 56, 69, 71; или

b. любую из SEQ ID №: 8, 15, 41, 51, 69; или

c. последовательность, которая содержит 15 нуклеотидов подряд ± 10 нуклеотидов с координатами в геноме, перечисленными в Таблице 1; или

d. по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов подряд последовательности из (c);
или

e. гидовую последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 90% или 85% идентична последовательности, выбранной из (c).

[00157] Вариант осуществления изобретения 98 представляет собой способ, композицию для применения или композицию по любому из предыдущих вариантов осуществления, при этом целевая последовательность находится в экзоне 1, экзоне 3, экзоне 4, экзоне 5, экзоне 6 или экзоне 8, экзоне 9, экзоне 10, экзоне 11, экзоне 12, экзоне 13, экзоне 14 или экзоне 15 гена KLKB1 человека.

[00158] Вариант осуществления изобретения 99 представляет собой способ, композицию для применения или композицию по варианту осуществления 98, при этом целевая последовательность находится в экзоне 1 гена KLKB1 человека.

[00159] Вариант осуществления изобретения 100 представляет собой способ, композицию для применения или композицию по варианту осуществления 98, при этом целевая последовательность находится в экзоне 3 гена KLKB1 человека.

[00160] Вариант осуществления изобретения 101 представляет собой способ, композицию для применения или композицию по варианту осуществления 98, при этом целевая последовательность находится в экзоне 4 гена KLKB1 человека.

[00161] Вариант осуществления изобретения 102 представляет собой способ, композицию для применения или композицию по варианту осуществления 98, при этом целевая последовательность находится в экзоне 5 гена KLKB1 человека.

[00162] Вариант осуществления изобретения 103 представляет собой способ, композицию для применения или композицию по варианту осуществления 98, при этом целевая последовательность находится в экзоне 6 гена KLKB1 человека.

[00163] Вариант осуществления изобретения 104 представляет собой способ, композицию для применения или композицию по варианту осуществления 98, при этом целевая последовательность находится в экзоне 8 гена KLKB1 человека.

[00164] Вариант осуществления изобретения 105 представляет собой способ, композицию для применения или композицию по варианту осуществления 98, при этом целевая последовательность находится в экзоне 9 гена KLKB1 человека.

[00165] Вариант осуществления изобретения 106 представляет собой способ, композицию для применения или композицию по варианту осуществления 98, при этом целевая последовательность находится в экзоне 10 гена KLKB1 человека.

[00166] Вариант осуществления изобретения 107 представляет собой способ, композицию для применения или композицию по варианту осуществления 98, при этом целевая последовательность находится в экзоне 11 гена KLKB1 человека.

[00167] Вариант осуществления изобретения 108 представляет собой способ, композицию для применения или композицию по варианту осуществления 98, при этом целевая последовательность находится в экзоне 12 гена KLKB1 человека.

[00168] Вариант осуществления изобретения 109 представляет собой способ, композицию для применения или композицию по варианту осуществления 98, при этом целевая последовательность находится в экзоне 13 гена KLKB1 человека.

[00169] Вариант осуществления изобретения 110 представляет собой способ, композицию для применения или композицию по варианту осуществления 98, при этом целевая последовательность находится в экзоне 14 гена KLKB1 человека.

[00170] Вариант осуществления изобретения 111 представляет собой способ, композицию для применения или композицию по варианту осуществления 98, при этом целевая последовательность находится в экзоне 15 гена KLKB1 человека.

[00171] Вариант осуществления изобретения 112 представляет собой способ, композицию для применения или композицию по любому из предыдущих вариантов осуществления, при этом гидовая последовательность комплементарна целевой последовательности в положительной цепи KLKB1.

[00172] Вариант осуществления изобретения 113 представляет собой способ, композицию для применения или композицию по любому из предыдущих вариантов осуществления, при этом гидовая последовательность комплементарна целевой последовательности в отрицательной цепи KLKB1.

[00173] Вариант осуществления изобретения 114 представляет собой способ, композицию для применения или композицию по любому из предыдущих вариантов осуществления, при этом первая гидовая последовательность комплементарна первой целевой последовательности в положительной цепи гена KLKB1, а композиция дополнительно содержит вторую гидовую последовательность, которая комплементарна второй целевой последовательности в отрицательной цепи гена KLKB1.

[00174] Вариант осуществления изобретения 115 представляет собой способ, композицию для применения или композицию по любому из предыдущих вариантов осуществления, при этом гидовая РНК содержит гидовую последовательность, выбранную из любой из SEQ ID № 1-149, и дополнительно содержит нуклеотидную

последовательность SEQ ID №: 170, причем нуклеотиды SEQ ID №: 170 следуют за гидовой последовательностью на ее 3'-конце.

[00175] Вариант осуществления изобретения 116 представляет собой способ, композицию для применения или композицию по любому из предыдущих вариантов осуществления, при этом гидовая РНК содержит гидовую последовательность, выбранную из любой из SEQ ID №: 1-149, и дополнительно содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID №: 171, SEQ ID №: 172, SEQ ID №: 173 или любую из SEQ ID №: 400-450, причем нуклеотиды SEQ ID №: 171, SEQ ID №: 172, SEQ ID №: 173, или любой из консервативных участков sgRNA из Таблицы 4 следуют за гидовой последовательностью на ее 3'-конце.

[00176] Вариант осуществления изобретения 117 представляет собой способ, композицию для применения или композицию по любому из предыдущих вариантов осуществления, при этом гидовая РНК представляет собой единую гидовую РНК (sgRNA).

[00177] Вариант осуществления изобретения 118 представляет собой способ, композицию для применения или композицию по варианту осуществления 117, при этом sgRNA содержит гидовую последовательность, содержащую любую из SEQ ID №: 8, 15, 41, 51, 69.

[00178] Вариант осуществления изобретения 119 представляет собой способ, композицию для применения или композицию по любому из предыдущих вариантов осуществления, при этом гидовая РНК модифицирована в соответствии со схемой SEQ ID №: 300, где N вместе представляют собой любую из гидовых последовательностей Таблицы 1 (SEQ ID №: 1-149).

[00179] Вариант осуществления изобретения 120 представляет собой способ, композицию для применения или композицию по варианту осуществления 119, при этом каждый N в SEQ ID №: 300 представляет собой любой природный или неприродный нуклеотид, причем N образуют гидовую последовательность, и гидовая последовательность нацеливает Cas9 на ген KLKB1.

[00180] Вариант осуществления изобретения 121 представляет собой способ, композицию для применения или композицию по любому из предыдущих вариантов осуществления, при этом sgRNA содержит любую из гидовых последовательностей SEQ ID №: 1-149, и нуклеотиды SEQ ID №: 171, SEQ ID №: 172, SEQ ID №: 173, или любой из консервативных участков sgRNA из Таблицы 4, при этом нуклеотиды SEQ ID №: 171, SEQ ID №: 172, SEQ ID №: 173, или любой из консервативных участков sgRNA из Таблицы 4 следуют за гидовой последовательностью на ее 3'-конце.

[00181] Вариант осуществления изобретения 122 представляет собой способ, композицию для применения или композицию по любому из предыдущих вариантов осуществления, при этом sgRNA содержит гидовую последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 90% или 85% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID №: 1-149.

[00182] Вариант осуществления изобретения 123 представляет собой способ, композицию для применения или композицию по варианту осуществления 122, при этом sgRNA содержит последовательность, выбранную из SEQ ID №: 8, 15, 41, 51, 69.

[00183] Вариант осуществления изобретения 124 представляет собой способ, композицию для применения или композицию по любому из предыдущих вариантов осуществления, при этом гидовая РНК содержит по меньшей мере одну модификацию.

[00184] Вариант осуществления изобретения 125 представляет собой способ, композицию для применения или композицию по варианту осуществления 124, при этом по меньшей мере одна модификация включает 2'-О-метил- (2'-О-Me) модифицированный нуклеотид.

[00185] Вариант осуществления изобретения 126 представляет собой способ, композицию для применения или композицию по любому из вариантов осуществления 124-125, содержащие фосфоротиоатную (PS) связь между нуклеотидами.

[00186] Вариант осуществления изобретения 127 представляет собой способ, композицию для применения или композицию по любому из вариантов осуществления 124-126, содержащие 2'-фтор- (2'-F) модифицированный нуклеотид.

[00187] Вариант осуществления изобретения 128 представляет собой способ, композицию для применения или композицию по любому из вариантов осуществления 124-127, содержащие модификацию в одном или более из первых пяти нуклеотидов на 5'-конце гидовой РНК.

[00188] Вариант осуществления изобретения 129 представляет собой способ, композицию для применения или композицию по любому из вариантов осуществления 124-128, содержащие модификацию в одном или более из последних пяти нуклеотидов на 3'-конце гидовой РНК.

[00189] Вариант осуществления изобретения 130 представляет собой способ, композицию для применения или композицию по любому из вариантов осуществления 124-129, содержащие PS связь между первыми четырьмя нуклеотидами гидовой РНК.

[00190] Вариант осуществления изобретения 131 представляет собой способ, композицию для применения или композицию по любому из вариантов осуществления 124-130, содержащие PS связь между последними четырьмя нуклеотидами гидовой РНК.

[00191] Вариант осуществления изобретения 132 представляет собой способ, композицию для применения или композицию по любому из вариантов осуществления 124-131, содержащие 2'-О-Me-модифицированный нуклеотид в первых трех нуклеотидах на 5'-конце гидовой РНК.

[00192] Вариант осуществления изобретения 133 представляет собой способ, композицию для применения или композицию по любому из вариантов осуществления 124-132, содержащие 2'-О-Me-модифицированный нуклеотид в последних трех нуклеотидах на 3'-конце гидовой РНК.

[00193] Вариант осуществления изобретения 134 представляет собой способ, композицию для применения или композицию по любому из вариантов осуществления 124-133, при этом гидовая РНК содержит модифицированные нуклеотиды SEQ ID №: 300.

[00194] Вариант осуществления изобретения 135 представляет собой способ, композицию для применения или композицию по любому из предыдущих вариантов осуществления, при этом композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

[00195] Вариант осуществления изобретения 136 представляет собой способ, композицию для применения или композицию по любому из предыдущих вариантов осуществления, при этом гидовая РНК связана с липидной наночастицей (LNP).

[00196] Вариант осуществления изобретения 137 представляет собой способ, композицию для применения или композицию по варианту осуществления 136, при этом LNP содержит катионный липид.

[00197] Вариант осуществления изобретения 138 представляет собой способ, композицию для применения или композицию по варианту осуществления 137, при этом катионный липид представляет собой (9Z,12Z)-3-((4,4-бис(октилокси)бутаноил)окси)-2-(((3-(диэтиламино)пропокси)карбонил)окси)метил)пропил-октадека-9,12-диеноат, также называемый 3-((4,4-бис(октилокси)бутаноил)окси)-2-(((3-(диэтиламино)пропокси)карбонил)окси)метил)пропил-(9Z,12Z)-октадека-9,12-диеноат.

[00198] Вариант осуществления изобретения 139 представляет собой способ, композицию для применения или композицию по любому из вариантов осуществления 136-138, при этом LNP содержит нейтральный липид.

[00199] Вариант осуществления изобретения 140 представляет собой способ, композицию для применения или композицию по варианту осуществления 139, при этом нейтральный липид представляет собой DSPC.

[00200] Вариант осуществления изобретения 141 представляет собой способ, композицию для применения или композицию по любому из вариантов осуществления 136-140, при этом LNP содержит хелперный липид.

[00201] Вариант осуществления изобретения 142 представляет собой способ, композицию для применения или композицию по варианту осуществления 141, при этом хелперный липид представляет собой холестерин.

[00202] Вариант осуществления изобретения 143 представляет собой способ, композицию для применения или композицию по любому из вариантов осуществления 136-142, при этом LNP содержит липид-невидимку.

[00203] Вариант осуществления изобретения 144 представляет собой способ, композицию для применения или композицию по варианту осуществления 143, при этом липид-невидимка представляет собой PEG2k-DMG.

[00204] Вариант осуществления изобретения 145 представляет собой способ, композицию для применения или композицию по любому из предыдущих вариантов

осуществления, при этом композиция дополнительно содержит управляемый РНК ДНК-связывающий агент.

[00205] Вариант осуществления изобретения 146 представляет собой способ, композицию для применения или композицию по любому из предыдущих вариантов осуществления, при этом композиция дополнительно содержит мРНК, которая кодирует управляемый РНК ДНК-связывающий агент.

[00206] Вариант осуществления изобретения 147 представляет собой способ, композицию для применения или композицию по варианту осуществления 145 или 146, при этом управляемый РНК ДНК-связывающий агент представляет собой Cas9.

[00207] Вариант осуществления изобретения 148 представляет собой способ, композицию для применения или композицию по любому из предыдущих вариантов осуществления, при этом композиция представляет собой фармацевтический состав и дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель.

[00208] Вариант осуществления изобретения 149 представляет собой способ, композицию для применения или композицию по любому из предыдущих вариантов осуществления, при этом композиция, содержащая последовательность, выбранную из SEQ ID №: 1-149, представляет собой SEQ ID №: 1.

[00209] Вариант осуществления изобретения 150 представляет собой способ, композицию для применения или композицию по любому из предыдущих вариантов осуществления, при этом композиция, содержащая последовательность, выбранную из SEQ ID №: 1-149, представляет собой SEQ ID №: 2.

[00210] Вариант осуществления изобретения 151 представляет собой способ, композицию для применения или композицию по любому из предыдущих вариантов осуществления, при этом композиция, содержащая последовательность, выбранную из SEQ ID №: 1-149, представляет собой SEQ ID №: 3.

[00211] Вариант осуществления изобретения 152 представляет собой способ, композицию для применения или композицию по любому из предыдущих вариантов осуществления, при этом композиция, содержащая последовательность, выбранную из SEQ ID №: 1-149, представляет собой SEQ ID №: 4.

[00212] Вариант осуществления изобретения 153 представляет собой способ, композицию для применения или композицию по любому варианту осуществления 1-89, при этом последовательность, выбранная из SEQ ID №: 1-149, представляет собой SEQ ID №: 5.

[00213] Вариант осуществления изобретения 154 представляет собой способ, композицию для применения или композицию по любому варианту осуществления 1-89, при этом последовательность, выбранная из SEQ ID №: 1-149, представляет собой SEQ ID №: 6.

[00214] Вариант осуществления изобретения 155 представляет собой способ, композицию для применения или композицию по любому варианту осуществления 1-89,

осуществления, при этом композиция, содержащая последовательность, выбранную из SEQ ID №: 1-149, представляет собой SEQ ID №: 147.

[00355] Вариант осуществления изобретения 296 представляет собой способ, композицию для применения или композицию по любому из предыдущих вариантов осуществления, при этом композиция, содержащая последовательность, выбранную из SEQ ID №: 1-149, представляет собой SEQ ID №: 148.

[00356] Вариант осуществления изобретения 297 представляет собой способ, композицию для применения или композицию по любому из предыдущих вариантов осуществления, при этом композиция, содержащая последовательность, выбранную из SEQ ID №: 1-149, представляет собой SEQ ID №: 149.

[00357] Вариант осуществления изобретения 298 представляет собой способ, композицию для применения или композицию по любому из предыдущих вариантов осуществления, при этом гидовая последовательность выбрана из SEQ ID №: 310-386.

[00358] Вариант осуществления изобретения 299 представляет собой способ, композицию для применения или композицию по любому из предыдущих вариантов осуществления, при этом гидовая последовательность выбрана из SEQ ID №: 310-311, 313-326, 329-337, 339-342, 344-346, 348, 350, 352-356, 361, 362, 364, 365, 366, 367, 369-374, 376-380 и 382-386.

[00359] Вариант осуществления изобретения 300 представляет собой способ, композицию для применения или композицию по любому из предыдущих вариантов осуществления, при этом гидовая последовательность выбрана из SEQ ID №: 310-386, представляет собой SEQ ID №: 310.

[00360] Вариант осуществления изобретения 301 представляет собой способ, композицию для применения или композицию по любому из предыдущих вариантов осуществления, содержащие sgRNA, которые содержат гидовую последовательность с любой из SEQ ID №: 1-149 и любую из консервативных частей sgRNA из Таблицы 4, необязательно содержащих схему модификации SEQ ID №: 450 или любую из схем модификации из Таблицы 4, при этом необязательно sgRNA содержит модификацию на 5'- и 3'-конце.

[00361] Вариант осуществления изобретения 302 представляет собой способ, композицию или композицию для применения по любому из вариантов осуществления 1-301, при этом композицию вводят в виде единой дозы.

[00362] Вариант осуществления изобретения 303 представляет собой способ, композицию или композицию для применения по любому из вариантов осуществления 1-301, при этом композицию вводят однократно.

[00363] Вариант осуществления изобретения 304 представляет собой способ, композицию или композицию для применения по любому из вариантов осуществления 302 или 303, при этом единая доза или однократное введение осуществляют:

а. индуцирование двухцепочечного разрыва (DSB) в гене *KLKB1* в клетке или у субъекта; и/или

- b. снижение экспрессии гена *KLKB1* в клетке или у субъекта; и/или
- c. лечение или профилактику НАЕ у субъекта; и/или
- d. лечение или профилактику ангионевротического отека, вызванного или связанного с НАЕ, у субъекта; и/или
- e. снижение концентрации брадикинина в сыворотке и/или плазме у субъекта;
- f. уменьшение вазодилатации, опосредованной брадикинином;
- g. лечение или профилактику отека или ангионевротического отека, опосредованного брадикинином; и/или
- h. лечение или профилактику обструкции дыхательных путей или асфиксии, вызванной отеком.

[00364] Вариант осуществления изобретения 305 представляет собой способ или композицию по варианту осуществления 304, при этом единая доза или однократное введение осуществляют одно или более из а) - h) в течение 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 недель.

[00365] Вариант осуществления изобретения 306 представляет собой способ или композицию по варианту осуществления 304, при этом единая доза или однократное введение осуществляют длительный эффект.

[00366] Вариант осуществления изобретения 307 представляет собой способ, композицию или композицию для применения по любому из вариантов осуществления 1-306, дополнительно включающие достижение длительного эффекта.

[00367] Вариант осуществления изобретения 308 представляет собой способ, композицию или композицию для применения по варианту осуществления 307, при этом длительный эффект сохраняется по меньшей мере 1 месяц, по меньшей мере 3 месяца, по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере один год или по меньшей мере 5 лет.

[00368] Вариант осуществления изобретения 309 представляет собой способ, композицию или композицию для применения по любому из вариантов осуществления 1-308, при этом введение композиции приводит к терапевтически значимому снижению активности калликреина, общих уровней калликреина в плазме, уровней прекалликреина и/или калликреина или уровней брадикинина в сыворотке и/или плазме.

[00369] Вариант осуществления изобретения 310 представляет собой способ, композицию или композицию для применения по любому из вариантов осуществления 1-309, при этом введение композиции приводит к уровням брадикинина в сыворотке и/или плазме в терапевтическом диапазоне.

[00370] Вариант осуществления изобретения 311 представляет собой способ, композицию или композицию для применения по любому из предыдущих вариантов осуществления, при этом введение композиции приводит к уровням брадикинина в сыворотке и/или плазме в диапазоне 100, 120 или 150% от нормального диапазона.

[00371] Вариант осуществления изобретения 312 представляет собой применение композиции по любому из предыдущих вариантов осуществления композиций для получения лекарственного препарата для лечения субъекта-человека с НАЕ.

[00372] Вариант осуществления изобретения 313 представляет собой применение композиции по любому из предыдущих вариантов осуществления композиций для получения лекарственного препарата для лечения и профилактики продуцирования и накопления брадикинина, отека, вызванного брадикинином, обструкции дыхательных путей, вызванной ангионевротическим отеком, или асфиксии.

[00373] Вариант осуществления изобретения 314 представляет собой применение композиции по любому из предыдущих вариантов осуществления композиций для получения лекарственного препарата для лечения или профилактики ангионевротического отека, вызванного или связанного с НАЕ.

[00374] Вариант осуществления изобретения 315 представляет собой применение композиции по любому из предыдущих вариантов осуществления композиций для получения лекарственного препарата для снижения частоты приступов ангионевротического отека.

[00375] Вариант осуществления изобретения 316 представляет собой применение композиции по любому из предыдущих вариантов осуществления композиций для получения лекарственного препарата для снижения тяжести приступов ангионевротического отека.

[00376] Вариант осуществления изобретения 317 представляет собой применение композиции по любому из предыдущих вариантов осуществления композиций для получения лекарственного препарата для снижения частоты и/или тяжести приступов НАЕ.

[00377] Вариант осуществления изобретения 318 представляет собой применение композиции по любому из предыдущих вариантов осуществления композиций для получения лекарственного препарата для снижения тяжести приступов ангионевротического отека.

[00378] Вариант осуществления изобретения 319 представляет собой применение композиции по любому из предыдущих вариантов осуществления для получения лекарственного препарата для достижения длительной ремиссии, например поддержание в течение по меньшей мере 1 месяца, 2 месяцев, 4 месяцев, 6 месяцев, 1 года, 2 лет, 5 лет, 10 лет или более.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[00379] Фиг. 1A-1D иллюстрируют процент редактирования (частота вставок-делений), обнаруженный в различных сайтах в локусе *KLKB1* с использованием гидовых РНК в первичных гепатоцитах человека (РНН) (Фиг. 1A-1B) и первичных гепатоцитах яванского макака (РСН) (Фиг. 1C-1D).

[00380] Фиг. 2A-2D иллюстрируют процент редактирования (частота вставок-делений) sgRNAs *KLKB1* в РНН (Фиг. 2A-2B) и РСН (Фиг. 2C-2D).

[00381] Фиг. 3A-3E иллюстрируют процент редактирования (частота вставок-делений) (Фиг. 3A), уровни секретируемого белка *KLKB1* (Фиг. 3B) и графики корреляции (Фиг. 3C-E) после трансфекции РНН гидовыми РНК, нацеленными на *KLKB1*, в трех различных сериях РНН (HU8300, HU8284 и HU8296).

[00382] Фиг. 4A-4D иллюстрируют процент редактирования гидовых последовательностей *KLKB1* в первичных гепатоцитах человека (РНН) (Фиг. 4A-4B) и процент редактирования гидовых последовательностей *KLKB1* в первичных гепатоцитах яванского макака (РСН) (Фиг. 4C-4D).

[00383] Фиг. 5A-5J иллюстрируют данные доза-ответ для процента редактирования и секретируемого калликреина для некоторых гидовых последовательностей в РНН (Фиг. 5A-5D) и РСН (Фиг. 5E-5H) и кривые корреляции процента редактирования и секретируемого белка в РНН и РСН (Фиг. 5I-5J).

[00384] Фиг. 6A-6D представляют данные кривой доза-ответ для частоты вставок-делений для некоторых гидовых последовательностей в РНН (Фиг. 6A-6B) и РСН (Фиг. 6C-6D).

[00385] Фиг. 7A-7E иллюстрируют данные кривой доза-ответ для частоты вставок-делений (Фиг. 7A и 7B) и секреции *KLKB1* (Фиг. 7C и 7D) для некоторых гидовых последовательностей в РНН (Фиг. 7A и 7C) и РСН (Фиг. 7B и 7D) и вестерн-блоттинг для измерения секретируемого белка (Фиг. 7E).

[00386] Фиг. 8A иллюстрирует % редактирования *KLKB1* для различных модифицированных sgRNAs *in vivo* у мышей Hu *KLKB1*.

[00387] Фиг. 8B и 8C иллюстрируют уровни белка *KLKB1*, измеренные с использованием ELISA и матрицы на основе электрохемилюминесценции у мышей Hu *KLKB1* (Пример 6).

[00388] Фиг. 8D иллюстрирует кратность изменения уровней мРНК *KLKB1* для каждой последовательности у мышей Hu *KLKB1*.

[00389] Фиг. 9A-9D иллюстрируют уровни редактирования *KLKB1* (Фиг. 9A), белка *KLKB1* сыворотки (прекалликреин и калликреин) (Фиг. 9B), процент TSS (Фиг. 9C) у мышей, получавших лечение, и корреляцию процента редактирования в печени к проценту белка *KLKB1* (Фиг. 9D).

[00390] Фиг. 10 иллюстрирует зависимые от дозы уровни редактирования гена *KLKB1*, процент нокдауна мРНК *KLKB1* и калликреина в плазме в мышинной модели Hu *KLKB1*.

[00391] Фиг. 11A иллюстрирует уровни редактирования гена *KLKB1* и калликреина плазмы в анализе зависимости от дозы после лечения указанными дозами sgRNA в мышинной модели Hu *KLKB1*.

[00392] Фиг. 11B иллюстрирует уровни поглощения при излучении 600 нм для обнаружения красителя Эванса голубого (ЕВ) из образцов толстой кишки в анализе зависимой от дозы проницаемости сосудов в ответ на лечение пермеабилизирующими агентами после лечения указанными дозами sgRNA в мышинной модели Hu *KLKB1*.

[00393] Фиг. 12A-12B иллюстрируют дозо-зависимые снижения *in vivo* активности общего калликреина в кровотоке (Фиг. 12A) и уровни белка (Фиг. 12B), соответственно, после однократного введения компонентов CRISPR/Cas9 в дозе 1,5 мг/кг, 3 мг/кг или 6 мг/кг с G013901 у яванских макаков.

[00394] Фиг. 13A-13B иллюстрируют снижения *in vivo* активности общего калликрейна в кровотоке (Фиг. 13A) и уровне белка (Фиг. 13B), соответственно, после однократного введения компонентов CRISPR/Cas9 в указанных дозировках с G012267 у яванских макаков.

[00395] На фиг. 14 помечены 10 сайтов YA консервативной области в иллюстративной последовательности sgRNA (SEQ ID №: 201) от 1 до 10. Числа 25, 45, 50, 56, 64, 67 и 83 указывают положение пиримидина сайтов YA 1, 5, 6, 7, 8, 9 и 10 в sgRNA с гидовой областью, указанной как (N)x, например, при этом x необязательно равен 20.

[00396] Фиг. 15 иллюстрирует типичную sgRNA (SEQ ID №: 401; не все модификации показаны) в возможной вторичной структуре с метками, обозначающими отдельные нуклеотиды консервативной области sgRNA, включая нижний стебель, выпуклость, верхний стебель, некрус (нуклеотиды которого можно называть от N1 до N18, соответственно, в направлении от 5' к 3'), области шпильки 1 и шпильки 2. Нуклеотид между шпилькой 1 и шпилькой 2 обозначают n. Гидовая область может быть представлена на sgRNA и указана в этой фигуре как «(N)x», предшествующий консервативной области sgRNA.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[00397] Сейчас будут подробно упомянуты некоторые варианты осуществления изобретения, примеры которых проиллюстрированы в сопутствующих графических материалах. Хотя изобретение описано в связи с иллюстративными вариантами осуществления изобретения, понятно, что они не предназначены для ограничения изобретения этими вариантами осуществления. Наоборот, предполагается, что изобретение охватывает все альтернативы, модификации и эквиваленты, которые могут быть включены в рамки данного изобретения, как определено прилагаемой формулой изобретения и включенными вариантами осуществления.

[00398] Перед описанием идей данного изобретения более подробно, необходимо обозначить, что описание не ограничено конкретными композициями или стадиями способов, которые могут варьироваться. Следует отметить, что при использовании в этом описании и в прилагаемой формуле изобретения, форма единственного числа включает в себя множественное число, если контекст явно не указывает на противоположное. Таким образом, например, упоминание «конъюгата» включает множество конъюгатов, а упоминание «клетки» включает множество клеток и тому подобное.

[00399] Численные диапазоны включают числа, определяющие диапазон. Понимают, что измеренные и измеримые величины являются приблизительными, принимая во внимание значащие цифры и ошибку, связанную с измерением. Также подразумевается, что применение «содержать», «содержит», «содержащий», «вмещать», «вмещает», «вмещающий», «включать», «включает» и «включающий» не является ограничивающим. Необходимо понимать, что как вышеизложенное общее описание, так и подробное описание являются только иллюстративными и объяснительными и не ограничивающими идеи.

[00400] Если специально не указано в описании, подразумевается, что варианты осуществления изобретения в описании, которые перечислены как «содержащие» различные компоненты, также «состоят из» или «состоят по существу из» перечисленных компонентов; варианты осуществления изобретения в описании, которые перечислены как «состоящие из» различных компонентов, также подразумеваются как «содержащие» или «состоящие по существу из» указанных компонентов; и варианты осуществления изобретения в описании, которые перечислены как «состоящие по существу из» различных компонентов, также подразумеваются как «состоящие из» или «содержащие» перечисленные компоненты (эта взаимозаменяемость не применяется к использованию этих терминов в формуле изобретения).

[00401] Термин «или» используется в инклюзивном смысле, т.е. эквивалент «и/или», если контекст явно не указывает на противоположное.

[00402] Заголовки разделов, используемые в данном документе, предназначены только для организационных целей и не должны рассматриваться как ограничение желаемого объекта изобретения каким-либо образом. В случае если любой материал, включенный посредством ссылки, противоречит любому термину, определенному в этой заявке или любом другом кратком содержании этой заявки, эта заявка имеет преимущество. Хотя идеи данного изобретения описаны в сочетании с различными вариантами осуществления изобретения, не предполагается, что идеи данного изобретения ограничены такими вариантами осуществления. Напротив, идеи данного изобретения охватывают различные альтернативы, модификации и эквиваленты, как будет понятно специалисту в данной области техники.

Определения

[00403] Если не указано другим образом, предполагается, что следующие термины и фразы, при использовании в данном документе, имеют следующие значения:

[00404] «Полинуклеотид» и «нуклеиновая кислота» используются в данном документе для обозначения мультимерного соединения, содержащего нуклеозиды или аналоги нуклеозидов, которые имеют азотсодержащие гетероциклические основания или аналоги оснований, соединенные вместе вдоль остова, включая традиционные РНК, ДНК, смешанные РНК-ДНК и полимеры, которые являются их аналогами. «Остов» нуклеиновой кислоты может быть получен с помощью различных связей, включая одну или более сахар-фосфодиэфирных связей, связей пептид-нуклеиновая кислота («пептидные нуклеиновые кислоты» или PNA; PCT № WO 95/32305), фосфоротиоатные связи, метилфосфонатные связи или их комбинации. Фрагменты сахаров нуклеиновых кислот могут представлять собой рибозу, дезоксирибозу или подобные соединения с заменами, например замены 2'-метокси или 2'-галогенид. Азотсодержащие основания могут представлять собой традиционные основания (A, G, C, T, U), их аналоги (например, модифицированные уридины, такие как 5-метоксиуридин, псевдоуридин или N1-метилпсевдоуридин или другие); инозин; производные пуринов или пиримидинов (например, N⁴-метилдезоксигуанозин, деаза- или азапурины, деаза- или азапиримидины, пиримидиновые

основания с группами-заместителями в положении 5 или 6 (например, 5-метилцитозин), пуриновые основания с заместителем в положениях 2, 6 или 8, 2-амино-6-метиламинопурин, O⁶-метилгуанин, 4-тиопиримидины, 4-аминопиримидины, 4-диметилгидразинпиримидины и O⁴-алкилпиримидины; патент США № 5378825 и PCT № WO 93/13121). Общее обсуждение см. в *The Biochemistry of the Nucleic Acids* 5-36, Adams et al., ed., 11th ed., 1992). Нуклеиновые кислоты могут включать один или более «неосновных» остатков, когда остов не включает азотистое основание для положения(-ий) полимера (патент США № 5585481). Нуклеиновая кислота может содержать только традиционные сахара, основания и связи РНК или ДНК или может содержать как традиционные компоненты, так и замены (например, традиционные основания с 2'-метокси связями или полимеры, содержащие как традиционные основания, так и один или более аналогов оснований). Нуклеиновая кислота содержит «замкнутую нуклеиновую кислоту» (ЗНК, LNA), аналог, содержащий один или более мономеров нуклеотидов ЗНК с бициклической единицей фуранозы, замкнутой в конформации сахара, имитирующего РНК, что усиливает аффинность гибридизации по отношению к комплементарным последовательностям РНК и ДНК (Vester and Wengel, 2004, *Biochemistry* 43(42):13233-41). РНК и ДНК обладают различными фрагментами сахаров и могут отличаться наличием урацила или его аналогов в РНК и тимина и его аналогов в ДНК.

[00405] «Гидовая РНК», «гРНК» или просто «гидовая последовательность» используются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения гидовой последовательности, которая направляет управляемый РНК ДНК-связывающий агент на целевую ДНК и может представлять собой или crRNA (также известную как CRISPR RNA), или комбинацию crRNA и trRNA (также известную как tracrRNA). crRNA и trRNA могут быть связаны в единую молекулу РНК (единую гидовую РНК, sgRNA) или могут находиться в двух отдельных молекулах ДНК (двойная гидовая РНК, dgRNA). «Гидовая РНК» или «гРНК» относится к каждому типу. trRNA может представлять собой встречающуюся в природе последовательность или последовательность trRNA с модификациями или вариациями по сравнению с встречающимися в природе последовательностями.

[00406] При использовании в данном документе, «гидовая последовательность» относится к последовательности в пределах гидовой РНК, которая комплементарна целевой последовательности и функционирует для нацеливания гидовой РНК на целевую последовательности для связывания или модификации (например, расщепления) посредством управляемого РНК ДНК-связывающего агента. «Гидовая последовательность» может также называться «нацеливающей последовательностью» или «спейсерной последовательностью». Гидовая последовательность может составлять 20 пар оснований в длину, например в случае *Streptococcus pyogenes* (т.е. Cas9 Spy) и родственных гомологов/ортологов Cas9. Более короткие или более длинные последовательности также могут быть использованы в качестве гидов, например 15, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидов в длину. Например, в некоторых вариантах осуществления изобретения

гидовая последовательность содержит по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов подряд из последовательности, выбранной из SEQ ID №: 1-149. В некоторых вариантах осуществления изобретения целевая последовательность находится, например, в гене или в хромосоме, и комплементарна гидовой последовательности. В некоторых вариантах осуществления изобретения степень комплементарности или идентичности между гидовой последовательностью и ее соответствующей целевой последовательностью может составлять около 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%. Например, в некоторых вариантах осуществления изобретения гидовая последовательность содержит последовательность, которая на около 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 нуклеотидам подряд последовательности, выбранной из SEQ ID №: 1-149. В некоторых вариантах осуществления изобретения гидовая последовательность и целевая область могут быть на 100% комплементарными или идентичными. В других вариантах осуществления изобретения гидовая последовательность и целевая область могут содержать по меньшей мере одно несоответствие. Например, гидовая последовательность и целевая последовательность могут содержать 1, 2, 3 или 4 несоответствия, когда общая длина целевой последовательности составляет по меньшей мере 17, 18, 19, 20 или более пар оснований. В некоторых вариантах осуществления изобретения гидовая последовательность и целевая область могут содержать 1-4 несоответствия, при этом гидовая последовательность содержит по меньшей мере 17, 18, 19, 20 или более нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения гидовая последовательность и целевая область может содержать 1, 2, 3 или 4 несоответствия, при этом гидовая последовательность содержит 20 нуклеотидов.

[00407] Целевые последовательности для управляемых РНК ДНК-связывающих агентов включают как положительные, так и отрицательные цепи геномной ДНК (т.е. данная последовательность и обратный комплимент последовательности), поскольку субстрат нуклеиновой кислоты для управляемого РНК ДНК-связывающего агента представляет собой двухцепочечную нуклеиновую кислоту. Следовательно, когда говорят, что гидовая последовательность «комплементарна целевой последовательности», необходимо понимать, что гидовая последовательность может направлять гидовую РНК, чтобы она связывалась с обратным комплементом целевой последовательности. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения, когда гидовая последовательность связывается с обратным комплементом целевой последовательности, гидовая последовательность идентична определенным нуклеотидам целевой последовательности (например, целевой последовательности, не включая РАМ), за исключением замены U на Т в гидовой последовательности.

[00408] При использовании в данном документе, «управляемый РНК ДНК-связывающий агент» означает полипептид или комплекс полипептидов, имеющих активность связывания РНК и ДНК, или ДНК-связывающую субъединицу такого комплекса, при этом ДНК-связывающая активность является специфичной к

последовательности и зависит от последовательности РНК. Иллюстративные управляемые РНК ДНК-связывающие агенты включают клевазы/никазы Cas и их инактивированные формы («ДНК-связывающие агенты dCas»). «Нуклеаза Cas», также называемая «белок Cas», при использовании в данном документе, охватывает клевазы Cas, никазы Cas и ДНК-связывающие агенты dCas. Клевазы/никазы Cas ДНК-связывающих агентов включают комплекс Csm или Cmr системы CRISPR III типа, их субъединицы Cas10, Csm1 и Cmr2, каскадный комплекс системы CRISPR I типа или его субъединицу Cas3 и нуклеазы Cas 2 класса. При использовании в данном документе, «нуклеаза Cas 2 класса» представляет собой одноцепочечный полипептид с управляемой РНК активностью связывания ДНК. Нуклеазы Cas 2 класса включают клевазы/никазы Cas 2 класса (например, варианты H840A, D10A или N863A), которые дополнительно обладают активностью РНК-управляемой клевазы или никазы ДНК, и ДНК-связывающие агенты dCas 2 класса, в которых активность клевазы/никазы инактивирована. Нуклеазы Cas 2 класса включают, например, белки Cas9, Cpf1, C2c1, C2c2, C2c3, HF Cas9 (например, варианты N497A, R661A, Q695A, Q926A), НураCas9 (например, варианты N692A, M694A, Q695A, H698A), eSPCas9(1.0) (например, варианты K810A, K1003A, R1060A) и eSPCas9(1.1) (например, варианты K848A, K1003A, R1060A) и их модификации. Белок Cpf1, Zetsche et al., *Cell*, 163: 1-13 (2015), гомологичен Cas9 и содержит RuvC-подобный нуклеазный домен. Последовательности Cpf1 в соответствии с Zetsche включены в полном объеме посредством ссылки. См., например, Zetsche, Таблицы S1 и S3. См., например, Makarova et al., *Nat Rev Microbiol*, 13(11): 722-36 (2015); Shmakov et al., *Molecular Cell*, 60:385-397 (2015).

[00409] При использовании в данном документе, «рибонуклеопротеин» (RNP) или «комплекс RNP» относится к гидовой РНК вместе с управляемым РНК ДНК-связывающим агентом, таким как нуклеаза Cas, например клеваза Cas, никаза Cas или ДНК-связывающий агент dCas (например, Cas9). В некоторых вариантах осуществления изобретения гидовая РНК управляет управляемым РНК ДНК-связывающим агентом, таким как Cas9, для нацеливания на последовательность, и гидовая РНК гибридизуется с, а агент связывается с целевой последовательностью; в случае, когда агент представляет собой клевазу или никазу, связывание может следовать за расщеплением или никированием.

[00410] При использовании в данном документе, первая последовательность считается «содержит последовательность, которая по меньшей мере на X% идентична» второй последовательности, если выравнивание первой последовательности относительно второй последовательности демонстрирует, что X% или более положений второй последовательности в целом соответствуют первой последовательности. Например, последовательность AAGA содержит последовательность, которая на 100% идентична последовательности AAG, поскольку выравнивание будет давать 100%-ую идентичность, поскольку существуют совпадения по всем трем положениям второй последовательности. Различия между РНК и ДНК (в общем замена уридина на тимидин или наоборот) и наличие нуклеозидных аналогов, таких как модифицированные уридины, не дают вклад в различия в идентичности или комплементарности среди полинуклеотидов, поскольку уместные

нуклеотиды (такие как тимидин, уридин или модифицированный уридин) обладают тем же комплементом (например, аденозин для всех из тимидина, уридина или модифицированного уридина; другой пример представляет собой цитозин и 5-метилцитозин, для обоих из которых гуанозин или модифицированный гуанозин является комплементом). Таким образом, например, последовательность 5'-AXG, где X представляет собой любой модифицированный уридин, такой как псевдоуридин, N1-метилпсевдоуридин или 5-метоксиуридин, считают на 100% идентичной AUG, поскольку они идеально комплементарны одной и той же последовательности (5'-CAU). Иллюстративные алгоритмы выравнивания представляют собой алгоритмы Смита-Ватермана и Нидлмана-Вунча, которые хорошо известны в данной области техники. Специалист в данной области техники понимает, что выбор алгоритма и установка параметров соответствующая для данной пары последовательностей, подлежащих выравниванию; для последовательностей в общем подобной длины и ожидаемой идентичности >50% для аминокислот или >75% для нуклеотидов, алгоритм Нидлмана-Вунча с параметрами по умолчанию интерфейса алгоритма Нидлмана-Вунча, представленного EBI на веб-сервере www.ebi.ac.uk, в общем является подходящим.

[00411] «мРНК» используется в данном документе для обозначения полинуклеотида и содержит открытую рамку считывания, которую можно транслировать в полипептид (т.е. может служить в качестве субстрата для трансляции рибосомой и аминокислотами (тРНК)). мРНК может содержать остов из фосфат-сахаров, включая остатки рибозы или их аналоги, например остатки 2'-метоксирибозы. В некоторых вариантах осуществления сахара остов из фосфат-сахаров мРНК по существу состоит из остатков рибозы, остатков 2'-метоксирибозы или их комбинации.

[00412] Гидовые последовательности, пригодные в композициях на основе гидовых РНК и способах, описанных в данном документе, показаны в Таблице 1 или Таблице 2 и повсюду в заявке.

[00413] При использовании в данном документе, «вставки-делеции» относятся к мутациям вставкам/делециям, состоящим из ряда нуклеотидов, которые или вставлены, или удалены в сайте двухцепочечных разрывов (DSB) в целевой нуклеиновой кислоте.

[00414] При использовании в данном документе, «нокдаун» относится к снижению экспрессии конкретного генного продукта (например, белка, мРНК или обоих). Нокдаун белка может быть измерен по детектированию общего клеточного количества белка из образца, такого как представляющие интерес ткань, жидкость или популяция клеток. Также он может быть измерен путем измерения суррогата, маркера или активности белка. Способы измерения нокдауна мРНК известны и включают секвенирование мРНК, выделенной из представляющего интерес образца. В некоторых вариантах осуществления изобретения «нокдаун» может относиться к некоторой потере экспрессии конкретного генного продукта, например снижению количества транскрибируемой мРНК или снижению количества белка, экспрессируемого популяцией клеток (включая популяции *in vivo*, такие как те, которые обнаружены в тканях).

[00415] При использовании в данном документе, «нокаун» относится к потере экспрессии конкретного гена или конкретного белка в клетке. Нокаут можно измерить или посредством детектирования общего клеточного количества белка в клетке, ткани или популяции клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения способы по изобретению «нокаутуют» *KLKB1* в одном или более образцах, например сыворотке, плазме, ткани или клетках (например, в популяции клеток, включая *in vivo* популяции, такие как те, которые обнаруживаются в тканях). В некоторых вариантах осуществления изобретения нокаут не представляет собой образование мутантного белка *KLKB1*, например, созданного за счет вставок-делеций, а скорее полную потерю экспрессии белка *KLKB1* в клетке. При использовании в данном документе, «*KLKB1*» в общем относится к прекалликреину, который представляет собой генный продукт гена *KLKB1*. Прекалликреин процессируется до калликреина плазмы (pKal), и антитела могут детектировать pKal, прекалликреин и как первое, так и второе. Последовательность *KLKB1* человека дикого типа доступна в NCBI, ID гена: 3818; Ensembl: ENSG00000164344. «PKK», «PPK», «KLK3» и «PKKD» представляют собой синонимы генов. Транскрипт *KLKB1* человека доступен в Ensembl: ENST00000264690, а последовательность *KLKB1* яванского макака дикого типа доступна в Ensembl: ENSMFAT00000002355.

[00416] «Наследственный ангионевротический отек» (НАЕ) представляет собой воспалительное расстройство, которое характеризуется повторяющимися эпизодами тяжелого отека (ангионевротического отека), вследствие инактивации мутаций гена *SERPING1*, который кодирует белок-ингибитор эстеразы C1 (C1-INH). C1-INH блокирует активность некоторых белков, которые стимулируют воспаление (например, в системе кинина). Дефицитные уровни C1-INH приводят к неконтролируемым уровням фактора XII (FXII) и высоким уровням активации калликреина (pKal, процессированный из белка *KLKB1* (прекалликреин)). Калликреин расщепляет высокомолекулярный кининоген (HMWK) с высвобождением брадикинина, пептида, который влияет на проницаемость сосудов. Избыточное количество брадикинина в крови приводит к утечке жидкости через стенки кровеносных сосудов в ткани организма, вызывая отек, наблюдаемый у индивидов с НАЕ. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения представлены способы снижения активности *KLKB1*, причем после снижения уменьшается продуцирование брадикинина, а также снижаются приступы отека. Уровни белков прекалликреина/калликреина, HMWK и продуктов его расщепления и меченых суррогатом субстратов HMWK можно измерить для оценки эффективности нокаута *KLKB1*.

[00417] При использовании в данном документе, «целевая последовательность» относится к последовательности нуклеиновой кислоты в целевом гене, которая обладает комплементарностью к гидовой последовательности гРНК. Взаимодействие целевой последовательности и гидовой последовательности направляет управляемый РНК ДНК-связывающий агент связываться и возможно никировать или расщеплять (в зависимости от активности агента) целевую последовательность.

[00418] При использовании в данном документе, «сайт YA» относится к 5'-пиримидинаденин-3'-динуклеотиду. «Сайт YA консервативной области» присутствует в консервативной области sgRNA. «Сайт YA гидовой области» присутствует в гидовой области sgRNA. Немодифицированный сайт YA в sgRNA может быть подвержен расщеплению РНКазы-А-подобными эндонуклеазами, например РНКазой-А. В некоторых вариантах осуществления изобретения sgRNA содержит около 10 сайтов YA в ее консервативной области. В некоторых вариантах осуществления изобретения sgRNA содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 сайтов YA в ее консервативной области. Иллюстративные сайты YA консервативной области показаны на Фиг. 14 (SEQ ID №: 201), в связи со структурой sgRNA (Фиг. 15). Иллюстративные сайты YA гидовой области показаны на Фиг. 14, поскольку гидовая область может представлять собой любую последовательность, в том числе любое количество сайтов YA. В некоторых вариантах осуществления изобретения sgRNA содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 сайтов YA, указанных на Фиг. 14. В некоторых вариантах осуществления изобретения sgRNA содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 сайтов YA в следующих положениях или их подгруппе: LS5-LS6; US3-US4; US9-US10; US12-B3; LS7-LS8; LS12-N1; N6-N7; N14-N15; N17-N18; и от H2-2 до H2-3. В некоторых вариантах осуществления изобретения сайт YA содержит модификацию, что означает, что по меньшей мере один нуклеотид сайта YA модифицирован. В некоторых вариантах осуществления изобретения пиримидин (также называемый положением пиримидина) сайта YA содержит модификацию (которая включает модификацию, изменяющую интернуклеозидную связь непосредственно 3'-положения сахара пиримидина). В некоторых вариантах осуществления изобретения аденин (также называемый положением аденина) сайта YA содержит модификацию (которая включает модификацию, изменяющую интернуклеозидную связь непосредственно 3'-положения сахара аденина). В некоторых вариантах осуществления изобретения положение пиримидина и положение аденина сайта YA содержит модификации.

[00419] При использовании в данном документе, «лечение» относится к любому введению или применению терапевтического препарата для заболевания или расстройства у субъекта и включает ингибирование заболевания, остановку его развития, ослабление одного или более симптомов заболевания, излечение заболевания или профилактику повторного возникновения одного или более симптомов заболевания. Например, лечение НАЕ может включать ослабление симптомов НАЕ.

[00420] Термин «терапевтически значимое снижение активности KLKB1» может означать снижение активности KLKB1 в плазме на более чем около 60% по сравнению с исходным уровнем. См. Banerji et al., N Engl J Med, 2017, 376:717-728; Ferrone et al., Nucleic Acid Therapeutics, 2019, 82-917. Активность KLKB1 часто измеряют как общую активность калликреина, когда прекалликреин превращают в калликреин в образце и для образца измеряют общую активность калликреина. В некоторых случаях диапазон снижения активности KLKB1 может означать снижение на около 60-80% активности KLKB1 в плазме

по сравнению с исходным уровнем. Для расчета снижения анализита у субъекта можно получить исходную величину исходную величину путем сбора образца до лечения у субъекта. В некоторых случаях образец представляет собой образец сыворотки. В некоторых аспектах целевое снижение активности KLKB1 составляет около 60% для общей активности калликреина (прекалликреин и калликреин в плазме) по сравнению с исходным уровнем. Например, достижение уровней активности KLKB1 в терапевтическом интервале может означать снижение общей активности калликреина на около >60% от исходного уровня. В некоторых вариантах осуществления изобретения «нормальный уровень калликреина» или «нормальный диапазон калликреина» снижен. В некоторых вариантах осуществления изобретения терапевтически значимое снижение активности калликреина достигает уровней около 0-60%, 0-50%, 0-40%, 0-30%, 0-25%, 0-20%, 0-15%, 0-10% от исходной величины для субъекта или 10-60%, 10-50%, 10-40%, 10-30%, 10-20% или 20-60%, 20-50%, 20-40% или 20-30% от нормального уровня активности калликреина. Активность KLKB1 можно измерить с помощью анализов, известных в данной области, включая анализы, описанные в данном документе.

[00421] Термин «целевое снижение белка KLKB1», при использовании в данном документе, означает целевой уровень рКал по сравнению с исходным уровнем. Уровни белка KLKB1 можно измерить с помощью анализов, известных в данной области, таких как ELISA или вестерн-блоттинг, как описано в данном документе. Общий белок KLKB1 можно измерить с помощью антитела, которое детектирует как прекалликреин, так и калликреин и/или после превращения прекалликреина в калликреин в образце. В некоторых случаях образец представляет собой образец сыворотки. В некоторых аспектах целевое снижение белка KLKB1 составляет около 60% для общего калликреина (прекалликреин и калликреин в плазме) по сравнению с исходным уровнем. В некоторых вариантах осуществления изобретения терапевтически значимое снижение общего белка калликреина достигает уровней около 0-60%, 0-50%, 0-40%, 0-30%, 0-25%, 0-20%, 0-15%, 0-10% от исходной величины для субъекта или 10-60%, 10-50%, 10-40%, 10-30%, 10-20% или 20-60%, 20-50%, 20-40% или 20-30% от нормального уровня общего белка калликреина.

[00422] Уровни сНМWK в плазме ниже около 30% от общего НМWK были связаны с уменьшением приступов НАЕ у пациентов, которых лечили ланаделумабом (см. Banerji, et al, 2017). В этом исследовании здоровые контрольные субъекты обладали уровнями в плазме сНМWK около 8,3% от общего НМWK. В другом исследовании Suffritti и коллеги обнаружили уровни сНМWK в плазме в среднем около 34,8% у здоровых контрольных субъектов, около 41,4% у пациентов с НАЕ в ремиссии и около 58,1% у пациентов с НАЕ во время приступа (Suffritti, et al. Clin Exp Allergy 2014;44:1503-14). Терапевтическое лечение может быть нацелено на отношение сНМWK в плазме кровотока к общему НМWK, составляющее менее около 60%. В некоторых вариантах осуществления изобретения соотношение сНМWK к НМWK составляет менее около 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 50% или более.

[00423] Термин «около» или «приблизительно» означает приемлемую ошибку для

конкретной величины, как определено специалистом в данной области техники, которая частично зависит от того, как величину измеряют или определяют.

Композиции

Композиции, содержащие гидовую РНК (гРНК, gRNA)

[00424] В данном изобретении представлены композиции, пригодные для индуцирования двухцепочечного разрыва (DSB), одноцепочечного разрыва и/или сайт-специфического связывания, что приводит к модификации нуклеиновой кислоты в гене *KLKB1*, например с использованием гидовой РНК в управляемом РНК ДНК-связывающем агенте (например, системе CRISPR/Cas). Композиции можно вводить субъектам, которые имеют или у которых подозревается наличие НАЕ. Композиции могут быть введены субъектам, у которых наблюдается повышенная концентрация брадикинина в сыворотке и/или плазме, как измерено, например, по снижению уровней белка прекалликреина в плазме или сыворотке, по снижению общих уровней белка калликреина (прекалликреина и pKal) в плазме и сыворотке, по снижению доли расщепленного HMWK (сHMWK) в кровотоке или по снижению доли сHMWK в цитратной плазме. Композиции можно вводить субъектам, у которых наблюдается повышенная концентрация прекалликреина и/или калликреина в сыворотке и/или плазме. Композиции можно вводить субъектам, у которых наблюдается повышенная общая концентрация калликреина в сыворотке и/или плазме. Композиции можно вводить субъектам, у которых наблюдается повышенная активность калликреина в сыворотке и/или плазме. Гидовые последовательности, нацеленные на ген *KLKB1*, показаны в Таблице 1 с SEQ ID №: 1-149.

[00425] Каждая из гидовых последовательностей, показанных в Таблице 1, с SEQ ID №: 1-149 может дополнительно содержать дополнительные нуклеотиды для образования crRNA, например, со следующей иллюстративной нуклеотидной последовательностью после гидовой последовательности на ее 3'-конце: GUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG (SEQ ID №: 167) в ориентации от 5' к 3'. В случае sgRNA вышеуказанные гидовые последовательности могут дополнительно содержать дополнительные нуклеотиды для образования sgRNA, например, со следующей иллюстративной нуклеотидной последовательностью после 3'-конца гидовой последовательности: GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGA AAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (SEQ ID №: 171) или GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGA AAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC (SEQ ID №: 172, которая представляет собой SEQ ID №: 171 без четырех концевых U) в ориентации от 5' к 3'. В некоторых вариантах осуществления изобретения четыре концевых U в SEQ ID №: 171 не представлены. В некоторых вариантах осуществления изобретения представлены только 1, 2 или 3 из четырех концевых U в SEQ ID №: 171.

[00426] В некоторых вариантах осуществления изобретения sgRNA содержит любую из гидовых последовательностей SEQ ID №: 1-149 и дополнительные нуклеотиды для образования crRNA, например, со следующей иллюстративной нуклеотидной

последовательностью после гидовой последовательности на ее 3'-конце:
 GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAUUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGG
 CACCGAGUCGGUGCUUUU (SEQ ID №: 170) или
 GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAUUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGG
 CACCGAGUCGGUGC (SEQ ID №: 173) в ориентации от 5' к 3'. В SEQ ID №: 173
 отсутствует 8 нуклеотидов относительно консервативной последовательности гидовой
 РНК дикого типа:
 GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAUUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGA
 AAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC (SEQ ID №: 172).

[00427] В некоторых вариантах осуществления изобретения представлены короткие единые гидовые РНК *KLKB1* (короткие sgRNA *KLKB1*), содержащие гидовую последовательность, как описано в данном документе, и «консервативную часть sgRNA», содержащую область шпильки, причем в области шпильки отсутствует по меньшей мере 5-10 нуклеотидов или 6-10 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения в области шпильки коротких единых гидовых РНК *KLKB1* отсутствует 5-10 нуклеотидов относительно консервативной части sgRNA, например нуклеотиды от H1-1 до H2-15 в Таблице 3В и на Фиг. 15. В некоторых вариантах осуществления изобретения в области шпильки 1 коротких единых гидовых РНК *KLKB1* отсутствует 5-10 нуклеотидов относительно консервативной части sgRNA, например нуклеотиды от H1-1 до H2-12 в Таблице 3В и на Фиг. 15. См., например, WO2019/237069, содержание которого включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме, например, в пунктах 1-15 формулы изобретения.

[00428] Иллюстративная «консервативная часть sgRNA» показана в Таблице 3А (см. также Фиг. 15), которая иллюстрирует «консервативную область» sgRNA Cas9 *S. pyogenes* («spyCas9» (также называемая «spCas9»)). Первая строка показывает нумерование нуклеотидов, вторая строка показывает последовательность (SEQ ID №: 500); и третья строка показывает «домены». *Briner AE et al., Molecular Cell* 56:333-339 (2014) описывает функциональные домены sgRNA, называемые в данном документе «домены», включая «спейсерный» домен, ответственный за нацеливание, «нижний стебель», «выпуклость», «верхний стебель» (который может включать тетрапетлю), «нексус» и домены «шпильки 1» и «шпильки 2». См., Briner et al. на странице 334, Фигура 1А.

[00429] В Таблице 3В представлена схема доменов sgRNA, как используется в данном документе. В Таблице 3В «n» между областями представляет переменное число нуклеотидов, например, от 0 до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более. В некоторых вариантах осуществления изобретения n равен 0. В некоторых вариантах осуществления изобретения n равен 1.

[00430] В некоторых вариантах осуществления изобретения sgRNA *KLKB1* происходит от Cas9 *S. pyogenes* («spyCas9») или эквивалента spyCas9. В некоторых вариантах осуществления изобретения sgRNA не происходит от *S. pyogenes* («не-spyCas9»).

В некоторых вариантах осуществления изобретения 5-10 нуклеотидов или 6-10 нуклеотидов идут подряд.

[00431] В некоторых вариантах осуществления изобретения в короткой sgRNA *KLKB1* отсутствуют по меньшей мере нуклеотиды 54-58 (AAAAA) консервативной части sgRNA Cas9 *S. pyogenes* («spyCas9»), как показано в Таблице 3А. В некоторых вариантах осуществления изобретения короткая sgRNA *KLKB1* представляет собой sgRNA не от spyCas9, в которой отсутствуют по меньшей мере нуклеотиды, соответствующие нуклеотидам 54-58 (AAAAA) консервативной части spyCas9, как определено, например, с помощью попарного или структурного выравнивания. В некоторых вариантах осуществления изобретения sgRNA не от spyCas9 представляет собой sgRNA Cas9 *Staphylococcus aureus* («saCas9»).

[00432] В некоторых вариантах осуществления изобретения в короткой sgRNA *KLKB1* отсутствуют по меньшей мере нуклеотиды 54-61 (AAAAAGUG) консервативной части sgRNA spyCas9. В некоторых вариантах осуществления изобретения в короткой sgRNA *KLKB1* отсутствуют по меньшей мере нуклеотиды 53-60 (GAAAAAGU) консервативной части sgRNA spyCas9. В некоторых вариантах осуществления изобретения в короткой sgRNA *KLKB1* отсутствуют 4, 5, 6, 7 или 8 нуклеотидов из нуклеотидов 53-60 (GAAAAAGU) или нуклеотидов 54-61 (AAAAAGUG) консервативной части sgRNA spyCas9 или соответствующие нуклеотиды консервативной части sgRNA не от spyCas9, как определено, например, с помощью попарного или структурного выравнивания.

Таблица 1: Гидовая последовательность, нацеленная на *KLKB1* человека, хромосомные координаты, и единые гидовые РНК человека и двойные гидовые РНК, и заменяющие единые гидовые последовательности яванского макака (макак-крабод)

SEQ ID №: (человек)	Иллюстративные геномные координаты (hg38)	гидовая последовательность человека	sgRNA человека	dgRNA человека	sgRNA яванского о макака	Гидовая SEQ ID №: яванского макака
1	chr4:186228230-186228252	ACAGGAAACUGUAGCAAACA	G012253	CR005916	н. д.	н. д.
2	chr4:186228248-186228270	AUAGAUAAUUCACUUACCAC	G012254	CR005917	н. д.	н. д.
3	chr4:186232154-186232176	UACAUCCCCACCUCUGAAGA	G012255	CR005918	н. д.	н. д.
4	chr4:186251256-186251278	UCUUGAGGAGUAGAGGAACU	G012256	CR005922	н. д.	н. д.
5	chr4:186251308-186251330	ACCAGGUAAAGUUCUUUUGC	G012257	CR005924	н. д.	н. д.
6	chr4:186251489-186251511	GGGUAAAUUUUAGAAUGGCA	G012258	CR005925	н. д.	н. д.
7	chr4:186251504-186251526	AUUUACCCGGGAGUUGACUU	G012259	CR005928	н. д.	н. д.
8	chr4:186251507-186251529	UACCCGGGAGUUGACUUUGG	G012260	CR005929	н. д.	н. д.
9	chr4:186251828-186251850	UCUUUGAGAUUGUGUAACAC	G012261	CR005931	н. д.	н. д.
10	chr4:186251829-186251851	CUUUGAGAUUGUGUAACACU	G012262	CR005932	н. д.	н. д.
11	chr4:186251830-186251852	UUUGAGAUUGUGUAACACUG	G012263	CR005933	н. д.	н. д.
12	chr4:186254748-186254770	UACAUACCAGUGUAAUUCAA	G012264	CR005943	н. д.	н. д.
13	chr4:186251784-186251806	CUCCAACUAGGAUUGCGUAU	G012265	CR005949	G013933	373
14	chr4:186251792-186251814	AGGAUUGCGUAUGGGACACA	G012266	CR005951	G013904	344
15	chr4:186251793-186251815	GGAUUGCGUAUGGGACACAA	G012267	CR005952	G013901	341
16	chr4:186238297-186238319	GUUACUCAGCACCUUUAUAG	G012268	CR005956	G013945	385
17	chr4:186238263-186238285	UGCCUAUUAAGUACAGUCC	G012269	CR005959	н. д.	н. д.

18	chr4:186251772-186251794	CUAUGGAUGGUUCUCCAACU	G012270	CR005960	G013922	362
19	chr4:186254601-186254623	GAUGUUUGGCGCAUCUAUAG	G012271	CR005963	G013921	361
20	chr4:186254592-186254614	AUGCGCCAAACAUCCUGCAG	G012272	CR005970	G013885	325
21	chr4:186236785-186236807	CUCCUUUAUAAAUGUCUCGA	G012273	CR005979	G013905	345
22	chr4:186236863-186236885	UGUUACUGGUGCACCUUUUU	G012274	CR005982	н. д.	н. д.
23	chr4:186254593-186254615	GAUGCGCCAAACAUCCUGCA	G012275	CR005983	G013876	316
24	chr4:186232192-186232214	AUCUGGCAGUAUUGGGCAUU	G012276	CR005992	G013915	355
25	chr4:186236893-186236915	GCGUGGCAUAUGAAAAAAC	G012277	CR005994	н. д.	н. д.
26	chr4:186236798-186236820	UAUAAAGGAGUUGAUAUGAG	G012278	CR005995	G013913	353
27	chr4:186236938-186236960	ACACCUUGAAUUGUACUCAC	G012279	CR005998	н. д.	н. д.
28	chr4:186232214-186232236	UGAGGUGCACAUCCACCCA	G012280	н. д.	н. д.	н. д.
29	chr4:186232190-186232212	CUGGCAGUAUUGGGCAUUUG	G012281	н. д.	н. д.	н. д.
30	chr4:186232148-186232170	AAAACGCCUUCUUCAGAGGU	G012282	н. д.	н. д.	н. д.
31	chr4:186232227-186232249	UGAAUAGCAAACACCUUGGG	G012283	н. д.	н. д.	н. д.
32	chr4:186236821-186236843	AGUCAAUUUUAAUGUGUCUA	G012284	н. д.	н. д.	н. д.
33	chr4:186236850-186236872	GUGUUGAAGAAUGCCAAAAA	G012285	н. д.	н. д.	н. д.
34	chr4:186236910-186236932	UGCCUUGUGAAAUGUUUGCG	G012286	н. д.	н. д.	н. д.
35	chr4:186250265-186250287	GCAUCUUGCGUUCUCAGAUG	G012287	н. д.	G013927	367
36	chr4:186250276-186250298	UCUCAGAUGUGGAUGUUGCC	G012288	н. д.	н. д.	н. д.
37	chr4:186250306-186250328	CUCCAGAUGCUUUUGUGUGU	G012289	н. д.	н. д.	н. д.
38	chr4:186251325-186251347	UAUUAUCAAAUCACAUUACC	G012290	н. д.	н. д.	н. д.
39	chr4:186251271-186251293	CCAGAUAUGGUGUUUUCUUG	G012291	н. д.	н. д.	н. д.

40	chr4:186251300-186251322	AAGUUCUUUUGCAGGUUAAA	G012292	н. д.	н. д.	н. д.
41	chr4:186251620-186251642	UUUACUCCCAGAAGACUGUA	G012293	н. д.	н. д.	н. д.
42	chr4:186251492-186251514	UGCCAUUCUAAAAUUUACCC	G012294	н. д.	н. д.	н. д.
43	chr4:186251572-186251594	UCAUCUUUGUGCAAGUCUCU	G012295	н. д.	н. д.	н. д.
44	chr4:186251510-186251532	UCUCCUCCAAAGUCAACUCC	G012296	н. д.	н. д.	н. д.
45	chr4:186252049-186252071	GGAGGAACAAACUCUUCUUG	G012297	н. д.	н. д.	н. д.
46	chr4:186252098-186252120	AGGUGAAGCUGACAGCUCAG	G012298	н. д.	н. д.	н. д.
47	chr4:186256046-186256068	CCAUCCGGUUACCCAACAGU	G012299	н. д.	G013931	371
48	chr4:186256042-186256064	UAUACCAACUGUUGGGUAAAC	G012300	н. д.	G012300	н. д.
49	chr4:186256034-186256056	GCACAAUUUAUACCAACUGU	G012301	н. д.	н. д.	н. д.
50	chr4:186256059-186256081	AACCGGAUGGGGCUUCUCGA	G012302	н. д.	G013932	372
51	chr4:186256047-186256069	CAACUGUUGGGUAACCGGAU	G012303	н. д.	G013882	322
52	chr4:186256035-186256057	CACAAUUUAUACCAACUGUU	G012304	н. д.	G012304	н. д.
53	chr4:186256046-186256068	CCAACUGUUGGGUAACCGGA	G012305	н. д.	G013924	364
54	chr4:186256061-186256083	CUCCUUCGAGAAGCCCAUC	G012306	н. д.	н. д.	н. д.
55	chr4:186256048-186256070	AACUGUUGGGUAACCGGAUG	G012307	н. д.	G013914	354
56	chr4:186256003-186256025	CCAAUAUGCCUACCUUCCAA	G012308	н. д.	н. д.	н. д.
57	chr4:186256015-186256037	GUGCUUGUGUCACCUUUGGA	G012309	н. д.	G013900	340
58	chr4:186256011-186256033	UUGUGUCACCUUUGGAAGGU	G012310	н. д.	н. д.	н. д.
59	chr4:186256019-186256041	AAUUGUGCUUGUGUCACCUU	G012311	н. д.	н. д.	н. д.
60	chr4:186255996-186256018	AAGGUAGGCAUAUUGGUUUU	G012312	н. д.	н. д.	н. д.
61	chr4:186257312-186257334	ACCCAACGGAUGGUCUGUGC	G012313	н. д.	н. д.	н. д.

62	chr4:186257314-186257336	AGCCAGCACAGACCAUCCGU	G012314	н. д.	н. д.	н. д.
63	chr4:186257302-186257324	UUAUAAAAUAACCCAACGGA	G012315	н. д.	G012315	н. д.
64	chr4:186257326-186257348	CUGUGCUGGCUAUAAGAAG	G012316	н. д.	н. д.	н. д.
65	chr4:186257261-186257283	CAUUCUUCAUUUGUUACCAA	G012317	н. д.	н. д.	н. д.
66	chr4:186257284-186257306	UAUAAUCUUGAUUCUUUUC	G012318	н. д.	н. д.	н. д.
67	chr4:186257313-186257335	GCCAGCACAGACCAUCCGUU	G012319	н. д.	н. д.	н. д.
68	chr4:186257324-186257346	GUCUGUGCUGGCUAUAAGA	G012320	н. д.	G012320	н. д.
69	chr4:186257325-186257347	UCUGUGCUGGCUAUAAGAA	G012321	н. д.	н. д.	н. д.
70	chr4:186258130-186258152	GUCCAUGUACUCAGCGACUU	G012322	н. д.	G012322	н. д.
71	chr4:186258128-186258150	CACCAAAGUCGCUGAGUACA	G012323	н. д.	G012323	н. д.
72	chr4:186258050-186258072	ACACAAUGGAAUGUGGCGUU	G012324	н. д.	G012324	н. д.
73	chr4:186258068-186258090	UUUGGUGGGCAUCACCAGCU	G012325	н. д.	G012325	н. д.
74	chr4:186258204-186258226	CUCUGGACUGCUUCAUGC	G012326	н. д.	н. д.	н. д.
75	chr4:186258133-186258155	AAGUCGCUGAGUACAUGGAC	G012327	н. д.	G012327	н. д.
76	chr4:186258089-186258111	GGGUGAAGGCUGUGCCCGCA	G012328	н. д.	G013895	335
77	chr4:186258054-186258076	AAUGGAAUGUGGCGUUUGGU	G012329	н. д.	G012329	н. д.
78	chr4:186258037-186258059	UCCAUUGUGUUUGCAAACUA	G012330	н. д.	G013942	382
79	chr4:186258067-186258089	GUUUGGUGGGCAUCACCAGC	G012331	н. д.	н. д.	н. д.
80	chr4:186258043-186258065	UUUGCAAACACAAUGGAAUG	G012332	н. д.	G013916	356
81	chr4:186258103-186258125	GACACCAGGUUGCUCUCCUGC	G012333	н. д.	н. д.	н. д.
82	chr4:186258009-186258031	ACUGUGACUCAGGGAGAUUC	G012334	н. д.	G013943	383
83	chr4:186258099-186258121	UGUGCCCGCAGGGAGCAACC	G012335	н. д.	н. д.	н. д.

84	chr4:186258036-186258058	CCAUUGUGUUUGCAAACUAA	G012336	н. д.	G013929	369
85	chr4:186258088-186258110	GGGGUGAAGGCUGUGCCCGC	G012337	н. д.	н. д.	н. д.
86	chr4:186258117-186258139	GCGACUUUGGUGUAGACACC	G012338	н. д.	н. д.	н. д.
87	chr4:186258036-186258058	CCCUUAGUUUGCAAACACAA	G012339	н. д.	н. д.	н. д.
88	chr4:186258053-186258075	CAAUGGAAUGUGGCGUUUGG	G012340	н. д.	G012340	н. д.
89	chr4:186232230-186232252	AACUGAAUAGCAAACACCUU	н. д.	CR005919	н. д.	н. д.
90	chr4:186238351-186238373	ACAAUUACCAAUUUCUGAAA	н. д.	CR005920	н. д.	н. д.
91	chr4:186238352-186238374	UACAAUUACCAAUUUCUGAA	н. д.	CR005921	н. д.	н. д.
92	chr4:186251263-186251285	GGUGUUUUCUUGAGGAGUAG	н. д.	CR005923	н. д.	н. д.
93	chr4:186251490-186251512	CGGGUAAAUUUUAGAAUGGC	н. д.	CR005926	G013884	324
94	chr4:186251494-186251516	CUCCCCGGGUAAAUUUUAGAA	н. д.	CR005927	G013925	365
95	chr4:186251801-186251823	UAUGGGACACAAGGGAGCUC	н. д.	CR005930	н. д.	н. д.
96	chr4:186252047-186252069	UUGGAGGAACAAACUCUUCU	н. д.	CR005934	G013912	352
97	chr4:186252048-186252070	UGGAGGAACAAACUCUUCUU	н. д.	CR005935	н. д.	н. д.
98	chr4:186252056-186252078	CAAACUCUUCUUGGGGAGAG	н. д.	CR005936	н. д.	н. д.
99	chr4:186252123-186252145	CUAUGAGUGACCCUCCACAC	н. д.	CR005937	G013886	326
100	chr4:186252124-186252146	CUGUGUGGAGGGUCACUCAU	н. д.	CR005938	G013938	378
101	chr4:186252134-186252156	GGUCACUCAUAGGACACCAG	н. д.	CR005939	G013946	386
102	chr4:186252135-186252157	GUCACUCAUAGGACACCAGU	н. д.	CR005940	G013896	336
103	chr4:186252163-186252185	ACUGCUGCCCACUGCUUUGA	н. д.	CR005941	н. д.	н. д.
104	chr4:186252171-186252193	ACACUUACCCAUCAAAAGCAG	н. д.	CR005942	G013902	342
105	chr4:186238286-186238308	AGGAACACCUACCGCUAUAA	н. д.	CR005944	G013871	311

106	chr4:186238265-186238287	CUCCGGGACUGUACUUUAAU	н. д.	CR005945	G013889	329
107	chr4:186251786-186251808	GUCCCAUACGCAAUCCUAGU	н. д.	CR005946	G013890	330
108	chr4:186238293-186238315	CUCAGCACCUUUUAUAGCGGU	н. д.	CR005947	G013892	332
109	chr4:186238282-186238304	UAUAGCGGUAGGUGUCCUC	н. д.	CR005948	G013874	314
110	chr4:186238266-186238288	CUAUUAAAGUACAGUCCCGG	н. д.	CR005950	G013875	315
111	chr4:186238308-186238330	GUGCUGAGUAACGUGGAAUC	н. д.	CR005953	G013883	323
112	chr4:186238301-186238323	UAUAAAGGUGCUGAGUAACG	н. д.	CR005954	G013878	318
113	chr4:186251783-186251805	UCUCCAACUAGGAUUGCGUA	н. д.	CR005955	G013908	348
114	chr4:186238281-186238303	AUAGCGGUAGGUGUCCUCC	н. д.	CR005957	G013873	313
115	chr4:186233989-186234011	CUGCCAAAAGUACAUCGAAC	н. д.	CR005958	G013877	317
116	chr4:186238345-186238367	ACCAAUUUCUGAAAGGGCAC	н. д.	CR005961	н. д.	н. д.
117	chr4:186251755-186251777	GUGUUUCUUAAGAUUAUCUA	н. д.	CR005962	н. д.	н. д.
118	chr4:186238344-186238366	CCAAUUUCUGAAAGGGCACA	н. д.	CR005964	н. д.	н. д.
119	chr4:186251759-186251781	UUCUUAAGAUUAUCUAUGGA	н. д.	CR005965	G013940	380
120	chr4:186233988-186234010	CUGUUCGAUGUACUUUUGGC	н. д.	CR005966	н. д.	н. д.
121	chr4:186233987-186234009	UGUUCGAUGUACUUUUGGCA	н. д.	CR005967	G013880	320
122	chr4:186232209-186232231	GGUGGAAUGUGCACCUCAUC	н. д.	CR005968	G013939	379
123	chr4:186250308-186250330	GUCCGACACACAAAAGCAUC	н. д.	CR005969	G013894	334
124	chr4:186236877-186236899	AAACUGGCAGCGAAUGUAC	н. д.	CR005971	G013930	370
125	chr4:186236908-186236930	UGCCACGCAAACAUUUCACA	н. д.	CR005972	н. д.	н. д.
126	chr4:186233992-186234014	GCACCUGUUCGAUGUACUUU	н. д.	CR005973	G013870	310
127	chr4:186254594-186254616	AGAUGCGCCAAACAUCUGC	н. д.	CR005974	н. д.	н. д.

128	chr4:186232199-186232221	GCACCUCAUCUGGCAGUAUU	н. д.	CR005975	н. д.	н. д.
129	chr4:186250262-186250284	CAUCUGAGAACGCAAGAUGC	н. д.	CR005976	G013934	374
130	chr4:186232196-186232218	AUGCCCAAUACUGCCAGAUG	н. д.	CR005977	н. д.	н. д.
131	chr4:186232200-186232222	UGCACCUCAUCUGGCAGUAU	н. д.	CR005978	G013944	384
132	chr4:186232258-186232280	AUGUCAUUGAUUGAACUUGC	н. д.	CR005980	G013936	376
133	chr4:186252031-186252053	ACAAGCACACGCAUUGUUGG	н. д.	CR005981	G013893	333
134	chr4:186254723-186254745	UAUCGCCUUGAUAAAACUCC	н. д.	CR005984	G013926	366
135	chr4:186251271-186251293	CCUCAAGAAAACACCAUAUC	н. д.	CR005985	G013906	346
136	chr4:186232149-186232171	AAACGCCUUCUUCAGAGGUG	н. д.	CR005986	н. д.	н. д.
137	chr4:186252028-186252050	AAAACAAGCACACGCAUUGU	н. д.	CR005987	G013891	331
138	chr4:186234001-186234023	CAUCGAACAGGUGCAGUUUC	н. д.	CR005988	G013879	319
139	chr4:186254587-186254609	GGCUUCCCCUGCAGGAUGUU	н. д.	CR005989	G013881	321
140	chr4:186234029-186234051	UUGAUGACCACAUUGC UCA	н. д.	CR005990	G013937	377
141	chr4:186254728-186254750	AGGAGCCUGGAGUUUUAUCA	н. д.	CR005991	н. д.	н. д.
142	chr4:186236783-186236805	UGCCAUCGAGACAUUUAUAA	н. д.	CR005993	G013899	339
143	chr4:186232260-186232282	AGCAAGUUC AAUCAAUGACA	н. д.	CR005996	G013897	337
144	chr4:186234022-186234044	GGACAUUCCUUGAAGCAAUG	н. д.	CR005997	н. д.	н. д.
145	chr4:186250330-186250352	GUUGGGGUGAUAGGUGCAGA	н. д.	CR005999	н. д.	н. д.
146	chr4:186232147-186232169	GAAAACGCCUUCUUCAGAGG	н. д.	CR006000	н. д.	н. д.
147	chr4:186232144-186232166	UAUGAAAACGCCUUCUUCAG	н. д.	CR006001	н. д.	н. д.
148	chr4:186250277-186250299	CUCAGAUGUGGAUGUUGCCA	н. д.	CR006002	н. д.	н. д.
149	chr4:186254579-186254601	CUCUCCUAGGCUUCCCCUGC	н. д.	CR006003	н. д.	н. д.

Таблица 2. Единые гидовые последовательности, нацеленные на KLKB1 яванского макака, хромосомные координаты и гомология гидовой последовательности к человеческой

sgRNA яванского макака	SEQ ID № яванского макака	Иллюстративные геномные координаты (mf5)	гидовая последовательность яванского макака	Процент гомологии к гидовой последовательности человека
G013870	310	chr5:185648888-185648908	GCACCUGCUCGACGUACUUU	90
G013871	311	chr5:185652966-185652986	AGGAACGCCUACCACUAUAA	90
G013872	312	chr5:185688465-185688485	UGAUGGAAACGCUCGGAUGC	н. д.
G013873	313	chr5:185652964-185652984	AUAGUGGUAGGCGUCCUCC	90
G013874	314	chr5:185652965-185652985	UAUAGUGGUAGGCGUCCUC	90
G013875	315	chr5:185652946-185652966	CUCUUAAGCACAGUCCCGG	90
G013876	316	chr5:185684512-185684532	AAUGCGCCAAACAUCCGGUA	100
G013877	317	chr5:185648882-185648902	UUGCCAAAAGUACGUCGAGC	85
G013878	318	chr5:185652981-185653001	UAUAAAGGUGCUGAAUAACG	95
G013879	319	chr5:185648894-185648914	CGUCGAGCAGGUGCAAUUUC	85
G013880	320	chr5:185648883-185648903	UGCUCGACGUACUUUUGGCA	90
G013881	321	chr5:185684503-185684523	GGCUUCCCUUACCGGAUGUU	85
G013882	322	chr4:186256046-186256066	CAACUGUUGGGUAAACUGGAU	100
G013883	323	chr5:185652988-185653008	GUGCUGAAUAACGUGGAAUC	95
G013884	324	chr5:185680852-185680872	CGGGUAAAUUUUAGAAUGGC	100
G013885	325	chr5:185684511-185684531	AUGCGCCAAACAUCCGGUAA	100
G013886	326	chr5:185681472-185681492	CUAUGAGUGACCCUCCACAC	100

G013887	327	chr5:185679339-185679359	GGCAACAUCCACAUCCGAGA	Н. Д.
G013888	328	chr5:185679426-185679446	UUACGUUCUAUACGAAUGCA	85
G013889	329	chr5:185652948-185652968	CUCCGGGACUGUGCUUUAAG	90
G013890	330	chr5:185681135-185681155	GUCCCAUAUGUAAUCCUAGU	90
G013891	331	chr5:185681374-185681394	AAAACAAGCUCACGCAUUGU	95
G013892	332	chr5:185652976-185652996	UUCAGCACCUUUUAUAGUGGU	90
G013893	333	chr5:185681377-185681397	ACAAGCUCACGCAUUGUUGG	95
G013894	334	chr5:185679374-185679394	GUUCGACACACAAAAGCAUC	95
G013895	335	chr4:186258088-186258108	GGGCGAAGGCUGUGCCCGCA	100
G013896	336	chr5:185681481-185681501	GUCACUCAUAGGACACCAGU	100
G013897	337	chr5:185647160-185647180	AGCAAGUCCAUCAAUGACA	95
G013898	338	chr5:185679413-185679433	AACGUAAAGAAGAGGCAGCU	100
G013899	339	chr5:185651465-185651485	UGCCACCGAGACAUUUAUAA	95
G013900	340	chr4:186256017-186256037	GUGUUUGUGUCACCUUUGGA	100
G013901	341	chr4:186251792-186251812	GGAUUACAUAUGGGACACAA	100
G013902	342	chr5:185681520-185681540	ACACUUACCCAUCAAAGCAG	100
G013903	343	chr5:185684660-185684680	CAGUGUAAUUCAAAGGAGCC	100
G013904	344	chr5:185681138-185681158	AGGAUUACAUAUGGGACACA	100
G013905	345	chr5:185651470-185651490	UUCCUUUAUAAAUGUCUCGG	100
G013906	346	chr5:185680632-185680652	CCUCAAGAAAACACCACAUC	95
G013907	347	chr5:185688458-185688478	AGAGCAGUGAUGGAAACGCU	Н. Д.
G013908	348	chr5:185681129-185681149	UCUCCAACUAGGAUUACAUA	90

G013909	349	chr5:185680982-185681002	ACUCCCAGAAGACUGUAAGG	н. д.
G013910	350	chr5:185679360-185679380	AGCAUCUGGGGCGAGAACUC	100
G013911	351	chr5:185679372-185679392	UCGACACACAAAAGCAUCUG	н. д.
G013912	352	chr5:185681393-185681413	UUGGAGGAACAAACUCUUCU	100
G013913	353	chr4:186236797-186236817	UAUAAAGGAAUUGAUUAUGAG	100
G013914	354	chr4:186256047-186256067	AACUGUUGGGUAAACUGGAUG	100
G013915	355	chr5:185647095-185647115	AUCUGGCAGUGCUGGGCGUU	100
G013916	356	chr4:186258042-186258062	CUUGCAAACACAAUGGAAUG	100
G013917	357	chr4:186251628-186251648	UCUCCUCCUACAGUCUUCU	
G013918	358	chr5:185688296-185688316	CUGUGACUCAGGGAGAUUCA	н. д.
G013918	358	chr5:185688296-185688316	CUGUGACUCAGGGAGAUUCA	100
G013919	359	chr4:186258084-186258104	GGCACAGCCUUCGCCCCAGC	100
G013920	360	chr5:185647084-185647104	CUGGGCGUUCGGGGUGUACA	100
G013921	361	chr4:186254600-186254620	GAUGUUUGGCGCAUUUAUAG	100
G013922	362	chr4:186251771-186251791	CUUCGGAUGGUUCUCCAACU	
G013923	363	chr5:185684517-185684537	CUAUAAAUGCGCCAAACAUC	н. д.
G013923	363	chr5:185684517-185684537	CUAUAAAUGCGCCAAACAUC	100
G013924	364	chr4:186256045-186256065	CCAACUGUUGGGUAAACUGGA	
G013925	365	chr5:185680856-185680876	CUCCCGGGUAAAUUUUAGAA	100
G013926	366	chr5:185684639-185684659	UAUCGCCUUAUAUAAAACUCC	95
G013926	366	chr4:186254722-186254742	UAUCGCCUUAUAUAAAACUCC	100
G013927	367	chr4:186250264-186250284	GCAUCUUGCCUUCUCGGAUG	

G013928	368	chr5:185679421-185679441	UCGUAUAGAACGUAAAGAAG	90
G013929	369	chr4:186258038-186258058	CCAUUGUGUUUGCAAGCUAA	100
G013930	370	chr5:185651562-185651582	AAAUUGGCAGCGAAUGUUAU	90
G013930	370	chr4:186236879-186236899	AAAUUGGCAGCGAAUGUUAU	100
G013931	371	chr4:186256048-186256068	CCAUCCAGUUACCCAACAGU	100
G013932	372	chr4:186256058-186256078	AACUGGAUGGGGCUUCUCGA	100
G013933	373	chr5:185681130-185681150	CUCCAACUAGGAUUACAUAU	100
G013934	374	chr5:185679328-185679348	CAUCCGAGAAGGCAAGAUGC	90
G013935	375	chr4:186251536-186251556	UUGAAUGUGACUUUCGUUAA	100
G013936	376	chr5:185647161-185647181	AUGUCAUUGAUGGAACUUGC	95
G013937	377	chr5:185648925-185648945	UUGAUGACCACACUGCUUUA	90
G013938	378	chr5:185681470-185681490	CUGUGUGGAGGGUCACUCAU	100
G013939	379	chr5:185647112-185647132	GGUGGAAUGUGCACAUCAUC	95
G013940	380	chr5:185681105-185681125	UUCUUAAGAUUAUCUUCGGA	90
G013941	381	chr5:185685921-185685941	CCUUUGGAAGGUAGGCAUAU	100
G013942	382	chr4:186258039-186258059	UCCAUUGUGUUUGCAAGCUA	100
G013943	383	chr4:186258008-186258028	CCUGUGACUCAGGGAGAUUC	100
G013944	384	chr5:185647103-185647123	UGCACAUCAUCUGGCAGUGC	85
G013945	385	chr4:186238299-186238319	GUUAUUCAGCACCUUUAUAG	100
G013946	386	chr5:185681480-185681500	GGUCACUCAUAGGACACCAG	100

[00433] Гидовые РНК, идентифицированные выше как «G0XXXXX», представляют собой sgRNA, содержащие идентифицированную нацеливающую последовательность из 20 нуклеотидов Таблицы 1 или Таблицы 2 в гидовой структуре SEQ ID №: 300. В некоторых вариантах осуществления изобретения sgRNA содержит любую из гидовых РНК Таблиц 1 или 2 и нуклеотиды SEQ ID

№: 300, необязательно при этом sgRNA содержит любую из схем модификаций, описанных в Таблице 4. В некоторых вариантах осуществления изобретения sgRNA содержит любую из гидовых РНК из Таблиц 1 или 2 и любой из консервативных участков sgRNA из Таблицы 4, необязательно с любой из схем модификации, описанных в Таблице 4.

Таблица 3А (Консервативная часть sgRNA spyCas9; SEQ ID №: 500)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	
G	U	U	U	U	A	G	A	G	C	U	A	G	A	A	A	U	A	G	C	A	A	G	U	U	A	A	A	A	U	
LS1-LS6						B1-B2		US1-US12												B2-B6				LS7-LS12						
31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	
A	A	G	G	C	U	A	G	U	C	C	G	U	U	A	U	C	A	A	C	U	U	G	A	A	A	A	A	G	U	
Некыс																		с H1-1 по H1-12												
61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76															
G	G	C	A	C	C	G	A	G	U	C	G	G	U	G	C															
N	с H2-1 по H2-15																													

Таблица 3В

	LS1-6			B1-2			US1-12			B3-6		
5'-конец (n)	нижний стебель		n	выпуклость		n	верхний стебель		n	выпуклость		n
LS7-12		N1-18			с Н1-1 по Н1-12			с Н2-1 по Н2-15				
нижний стебель	n	нексус		n	шпилька 1		n	шпилька 2		3'-конец		

[00434] В некоторых вариантах осуществления в изобретении представлена композиция, содержащая одну или более гидовых РНК (гРНК), содержащих гидовые последовательности, которые направляют управляемый РНК ДНК-связывающий агент, который может представлять собой нуклеазу (например, нуклеазу Cas, такую как Cas9), на целевую последовательность ДНК в *KLKB1*. гРНК может содержать crRNA, содержащую гидовую последовательность, показанную в Таблице 1. гРНК может содержать crRNA, содержащую 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов подряд гидовой последовательности, показанной в Таблице 1. В некоторых вариантах осуществления изобретения гРНК содержит crRNA, содержащую последовательность, которая на около 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 нуклеотидам подряд гидовой последовательности, показанной в Таблице 1. В некоторых вариантах осуществления изобретения гРНК содержит crRNA, содержащую последовательность, которая на около 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична гидовой последовательности, показанной в Таблице 1. гРНК может дополнительно содержать trRNA. В каждом варианте осуществления композиции и способа, описанных в данном документе, crRNA и trRNA могут быть связаны в единую РНК (sgRNA) или могут быть на отдельных РНК (dgRNA). В контексте sgRNA, компоненты crRNA и trRNA могут быть ковалентно связаны, например, посредством фосфодиэфирной связи или другой ковалентной связи.

[00435] В каждой из вариантов осуществления композиций, применений и способов, описанных в данном документе, гидовая РНК может содержать две молекулы РНК в виде «двойной гидовой РНК» или «dgRNA». dgRNA содержит первую молекулу РНК, содержащую crRNA, содержащую, например, гидовую последовательность, показанную в Таблице 1, и вторую молекулу РНК, содержащую trRNA. Первая и вторая молекулы РНК могут не быть ковалентно связаны, но могут образовывать РНК-дуплекс посредством спаривания оснований между участками crRNA и trRNA.

[00436] В каждой из вариантов осуществления композиций, применений и способов, описанных в данном документе, гидовая РНК может содержать единую молекулу РНК в виде «единой гидовой РНК» или «sgRNA». sgRNA может содержать crRNA (или ее часть), содержащую гидовую последовательность, показанную в Таблице 1, ковалентно связанную с trRNA. sgRNA может содержать 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов подряд гидовой последовательности, показанной в Таблице 1. В некоторых вариантах осуществления изобретения crRNA и trRNA ковалентно связаны посредством линкера. В некоторых вариантах осуществления изобретения sgRNA образует структуру шпильки посредством спаривания оснований между участками crRNA и trRNA. В некоторых вариантах осуществления изобретения crRNA и trRNA ковалентно связаны посредством одной или более связей, которые не являются фосфодиэфирной связью.

[00437] В некоторых вариантах осуществления изобретения trRNA может содержать всю или часть последовательности trRNA, полученной из встречающейся в природе системы CRISPR/Cas. В некоторых вариантах осуществления изобретения trRNA содержит

усеченную или модифицированную trRNA дикого типа. Длина trRNA зависит от используемой системы CRISPR/Cas. В некоторых вариантах осуществления изобретения trRNA содержит или состоит из 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 или более 100 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения trRNA может содержать некоторые вторичные структуры, такие как, например, одну или более структур шпильки или «петля и стебель» или одну или более структур выступов.

[00438] В некоторых вариантах осуществления изобретения представлена композиция, содержащая одну или более гидовых РНК, содержащих гидовую последовательность с любой из SEQ ID №: 1-149. В некоторых вариантах осуществления изобретения представлена композиция, содержащая одну или более гидовых РНК, содержащих гидовую последовательность с любой из SEQ ID №: 1-149 и любой консервативный участок sgRNA, показанный в Таблице 4, необязательно содержащий модификацию любой из sgRNA, показанной в Таблице 4, необязательно при этом sgRNA содержит модификацию на 5'- и 3'-конце (если уже не показана в конструкции Таблицы 4). В некоторых вариантах осуществления изобретения представлена композиция, содержащая одну или более гидовых РНК, содержащих гидовую последовательность с любой из SEQ ID №: 1-149, причем нуклеотиды SEQ ID №: 170, 171, 172 или 173 следуют за гидовой последовательностью на ее 3'-конце. В некоторых вариантах осуществления изобретения представлена одна или более гидовых РНК, содержащих гидовую последовательность с любой из SEQ ID №: 1-149, причем нуклеотиды SEQ ID №: 170, 171, 172 или 173 следуют за гидовой последовательностью на ее 3'-конце, модифицирована в соответствии со схемой модификации SEQ ID NO: 300.

[00439] В некоторых вариантах осуществления изобретения представлена композиция, содержащая одну или более гидовых РНК, содержащих гидовую последовательность с любой из SEQ ID №: 1-149. В одном аспекте изобретения представлена композиция, содержащая одну или более gRNA, содержащих гидовую последовательность, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична любой из нуклеиновых кислот с SEQ ID №: 1-149.

[00440] В другом варианте осуществления изобретения представлена композиция, которая содержит по меньшей мере одну, например, по меньшей мере две gRNA, содержащие гидовые последовательности, выбранные из любых двух или более гидовых последовательностей SEQ ID №: 1-149. В некоторых вариантах осуществления изобретения композиция содержит по меньшей мере две gRNA, каждая из которых содержит гидовую последовательность, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична любой из нуклеиновых кислот с SEQ ID №: 1-149.

[00441] Композиции на основе гидовой РНК по данному изобретению разработаны, чтобы распознавать (например, гибридизоваться с) целевую последовательность в гене *KLKB1*. Например, целевая последовательность *KLKB1* может быть распознана и расщеплена предлагаемой клевазой Cas, содержащей гидовую РНК. В некоторых вариантах

осуществления изобретения управляемый РНК ДНК-связывающий агент, такой как клеваза Cas, может быть направлена гидовой РНК на целевую последовательность гена *KLKB1*, где гидовая последовательность гидовой РНК гибридизуется с целевой последовательностью, а управляемый РНК ДНК-связывающий агент, такой как клеваза Cas, расщепляет целевую последовательность.

[00442] В некоторых вариантах осуществления изобретения выбор одной или более гидовых РНК определяется на основании целевых последовательностей в гене *KLKB1*. В некоторых вариантах осуществления изобретения композиции, содержащие одну или более гидовых последовательностей, содержат гидовую последовательность, которая комплементарна соответствующей геномной области, показанной в Таблице 1 ниже, в соответствии с координатами от эталонного генома hg38 человека. Гидовые последовательности по дополнительным вариантам осуществления могут быть комплементарны последовательностям в непосредственной близости от геномных координат, перечисленных в любой из Таблиц, представленных в данном документе. Например, гидовые последовательности по дополнительным вариантам осуществления могут быть комплементарны последовательностям, которые содержат 15 нуклеотидов подряд ± 10 нуклеотидов геномных координат, перечисленных в любой из Таблиц, раскрытых в данном документе.

[00443] Не связываясь какой-либо конкретной теорией, мутации (например, мутации рамки сдвига, возникающие в результате вставок-делеций, происходящих в результате опосредованного нуклеазой DSB) в некоторых областях гена могут быть менее переносимыми, чем мутации в других областях гена, таким образом расположение DSB является важным фактором в количестве или типе нокдауна белка, который может возникнуть в результате. В некоторых вариантах осуществления изобретения гРНК, комплементарная или имеющая комплементарность к целевой последовательности в *KLKB1*, используется для направления управляемого РНК ДНК-связывающего агента к определенной локации в гене *KLKB1*. В некоторых вариантах осуществления изобретения гРНК разработаны так, что содержат гидовые последовательности, которые комплементарны или имеют комплементарность к целевым последовательностям в экзоне 1, экзоне 3, экзоне 4, экзоне 5, экзоне 6, экзоне 8, экзоне 9, экзоне 10, экзоне 11, экзоне 12, экзоне 13, экзоне 14 или экзоне 15 *KLKB1*.

[00444] В некоторых вариантах осуществления изобретения гидовая последовательность по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична целевой последовательности, присутствующей в гене *KLKB1* человека. В некоторых вариантах осуществления изобретения целевая последовательность может быть комплементарна гидовой последовательности гидовой РНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения степень комплементарности или идентичности между гидовой последовательностью гидовой РНК и ее соответствующей целевой последовательностью может составлять по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%. В некоторых вариантах осуществления изобретения целевая последовательность и гидовая

последовательность гРНК может быть на 100% комплементарной или идентичной. В других вариантах осуществления изобретения целевая последовательность и гидовая последовательность гРНК могут содержать по меньшей мере одно несоответствие. Например, целевая последовательность и гидовая последовательность гРНК может содержать 1, 2, 3 или 4 несоответствия, при этом общая длина гидовой последовательности составляет 20. В некоторых вариантах осуществления изобретения целевая последовательность и гидовая последовательность гРНК может содержать 1-4 несоответствия, при этом гидовая последовательность составляет 20 нуклеотидов.

[00445] В некоторых вариантах осуществления изобретения композиция или состав, раскрытые в данном документе, содержат мРНК, содержащую открытую рамку считывания (ORF), кодирующую управляемый РНК ДНК-связывающий агент, такой как нуклеаза Cas, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления изобретения мРНК, содержащая ORF, кодирующую управляемый РНК ДНК-связывающий агент, такой как нуклеаза Cas, представлена, применяется или вводится.

Модифицированные гРНК и мРНК

[00446] В некоторых вариантах осуществления изобретения гРНК является химически модифицированной. гРНК, содержащая один или более модифицированных нуклеозидов или нуклеотидов, называют «модифицированной» гРНК или «химически модифицированной» гРНК для описания наличия одного или более не встречающихся в природе и/или встречающихся в природе компонентов или конфигураций, которые используются вместо или вдобавок к каноническим остаткам А, G, C и U. В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированную гРНК синтезируют с использованием неканонического нуклеозида или нуклеотида и называют в данном документе «модифицированной». Модифицированные нуклеозиды и нуклеотиды могут включать одно или более из: (i) изменения, например замены одного или обоих несвязывающих фосфатных кислородов и/или одного или более связывающих фосфатных кислородов в фосфодиэфирной связи остова (иллюстративная модификация остова); (ii) изменения, например замены составляющих рибозного сахара, например 2'-гидроксила на рибозном сахаре (иллюстративная модификация сахара); (iii) массовой замены фосфатного фрагмента «дефосфо»-линкерами (иллюстративная модификация остова); (iv) модификации или замены встречающегося в природе нуклеинового основания, в том числе неканонического нуклеинового основания (иллюстративная модификация основания); (v) замены или модификации рибоза-фосфатного остова (иллюстративная модификация остова); (vi) модификации 3'-конца или 5'-конца олигонуклеотида, например удаление, модификация или замена концевой фосфатной группы или конъюгации фрагмента, кэпа или линкера (такие 3'- или 5'-модификации кэпа могут включать модификацию сахара и/или остова); и (vii) модификации или замены сахара (иллюстративная модификация сахара).

[00447] Химические модификации, такие как те, которые перечислены выше, можно комбинировать, чтобы обеспечить модифицированные гРНК и/или мРНК, содержащие нуклеозиды и нуклеотиды (в общем «остатки»), которые могут иметь два, три, четыре или

более модификаций. Например, модифицированный остаток может иметь модифицированный сахар и модифицированное нуклеиновое основание. В некоторых вариантах осуществления изобретения каждое основание гРНК является модифицированным, например, все основания имеют модифицированную фосфатную группу, такую как фосфоротиаатная группа. В некоторых вариантах осуществления изобретения все или практически все фосфатные группы молекулы гРНК заменены фосфоротиаатными группами. В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированные гРНК содержат по меньшей мере один модифицированный остаток в или возле 5'-конца РНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированные гРНК содержат по меньшей мере один модифицированный остаток в или возле 3'-конца РНК.

[00448] В некоторых вариантах осуществления изобретения гРНК содержит один, два, три или более модифицированных остатков. В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере 5% (например, по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100%) положений в модифицированной гРНК представляют собой модифицированные нуклеозиды или нуклеотиды.

[00449] Немодифицированные нуклеиновые кислоты могут подвергаться деградации, например, внутриклеточными нуклеазами или теми, которые обнаруживаются в сыворотке. Например, нуклеазы могут гидролизовать фосфодиэфирные связи нуклеиновой кислоты. Следовательно, в одном аспекте гРНК, описанные в данном документе, могут содержать один или более модифицированных нуклеозидов или нуклеотидов, например, для введения стабильности по отношению к внутриклеточным или сывороточным нуклеазам. В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированные молекулы гРНК, описанные в данном документе, могут демонстрировать сниженный врожденный иммунный ответ при введении в популяцию клеток, как *in vivo*, так и *ex vivo*. Термин «врожденный иммунный ответ» включает клеточный ответ на экзогенные нуклеиновые кислоты, в том числе одноцепочечные нуклеиновые кислоты, который включает индукцию экспрессии и высвобождения цитокинов, особенно интерферонов, и клеточную смерть.

[00450] В некоторых вариантах осуществления изобретения модификация остова, фосфатная группа модифицированного остатка может быть модифицирована путем замены одного или более кислородов другим заместителем. Дополнительно, модифицированный остаток, например модифицированный остаток, присутствующий в модифицированной нуклеиновой кислоте, может включать повсеместную замену немодифицированного фосфатного фрагмента модифицированной фосфатной группой, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления изобретения модификация фосфатного

остова может включать изменения, которые приводят или к незаряженному линкеру, или к заряженному линкеру с несимметричным распределением заряда.

[00451] Примеры модифицированных фосфатных групп включают фосфоротиоат, фосфороселенаты, боранофосфаты, боранофосфатные эфиры, гидрогенфосфонаты, фосфорамилаты, алкил или арилфосфонаты и фосфотриэфиры. Фосфорный атом в немодифицированной фосфатной группе является ахиральным. Однако, замена одного из немостиковых кислородов на один из атомов или групп атомов выше может придавать хиральность атому фосфора. Стереогенный атом фосфора может обладать или «R»-конфигурацией (в данном документе Rp), или «S»-конфигурацией (в данном документе Sp). Остов также может быть модифицирован путем замены мостикового кислорода (т.е. кислорода, который связывает фосфат с нуклеозидом) на азот (мостиковые фосфороамидаты), серу (мостиковые фосфоротиоаты) и углерод (мостиковые метиленфосфонаты). Замена может осуществляться или по связывающему кислороду, или по обоим связывающим кислородам.

[00452] Фосфатная группа может быть заменена не содержащими фосфор соединителями в некоторых модификациях остова. В некоторых вариантах осуществления изобретения заряженную фосфатную группу можно заменить нейтральным фрагментом. Пример фрагментов, которые могут замещать фосфатную группу, могут включать, без ограничения, например, метилфосфонат, гидроксиламино, силоксан, карбонат, карбоксиметил, карбамат, амид, тиозфир, этиленоксидный линкер, сульфонат, сульфонамид, тиоформацеталь, формацеталь, оксим, метиленимино, метиленметилямино, метиленгидразо, метилендиметилгидразо и метиленоксиметилямино.

[00453] Молекулярные каркасы, которые могут имитировать нуклеиновые кислоты, также могут быть сконструированы, при этом фосфатный линкер и рибозный сахар заменены на устойчивую к нуклеазе имитацию нуклеозида или нуклеотида. Такие модификации могут содержать модификации остова и сахара. В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновые основания могут быть связаны имитацией остова. Примеры могут включать, без ограничения, нуклеозидные суррогаты морфолино, циклобутил, пирролидин и пептидную нуклеиновую кислоту (PNA).

[00454] Модифицированные нуклеозиды и модифицированные нуклеотиды могут включать одну или более модификаций группы сахара, т.е. модификацию сахара. Например, 2'-гидроксильная группа (ОН) может быть модифицирована, например, заменена рядом различных «окси» или «дезокси» заместителей. В некоторых вариантах осуществления изобретения модификации 2'-гидроксильной группы может усиливать стабильность нуклеиновой кислоты, поскольку гидроксильная группа больше не может депротонироваться с образованием 2'-алкоксидного иона.

[00455] Примеры модификаций 2'-гидроксильной группы может включать алкокси или арилокси (OR, где «R» может представлять собой, например, алкил, циклоалкил, арил, аралкил, гетероарил или сахар); полиэтиленгликоли (ПЭГ), $O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OR$, где R может представлять собой, например, H или необязательно замещенный алкил, и n может

представлять собой целое число от 0 до 20 (например, от 0 до 4, от 0 до 8, от 0 до 10, от 0 до 16, от 1 до 4, от 1 до 8, от 1 до 10, от 1 до 16, от 1 до 20, от 2 до 4, от 2 до 8, от 2 до 10, от 2 до 16, от 2 до 20, от 4 до 8, от 4 до 10, от 4 до 16 и от 4 до 20). В некоторых вариантах осуществления изобретения модификация 2'-гидроксильной группы может представлять собой 2'-О-Ме. В некоторых вариантах осуществления изобретения модификация 2'-гидроксильной группы может представлять собой 2'-фтор-модификацию, при которой 2'-гидроксильная группа заменена на фторид. В некоторых вариантах осуществления изобретения модификация 2'-гидроксильной группы может включать «замкнутые» нуклеиновые кислоты (LNA), в которых 2'-гидроксил может быть связан, например, посредством C_{1-6} алкиленового или C_{1-6} гетероалкиленового мостика с 4'-углеродом того же рибозного сахара, где иллюстративные мостики могут включать метиленовый, пропиленовый, простой эфирный или amino-мостики; О-amino (при этом amino может представлять собой, например, NH_2 ; алкиламино, диалкиламино, гетероциклил, ариламино, диариламино, гетероариламино или дигетероариламино, этилендиамин или полиамино) и aminoалкокси, $O(CH_2)_n$ -amino, (где amino может представлять собой, например, NH_2 ; алкиламино, диалкиламино, гетероциклил, ариламино, диариламино, гетероариламино или дигетероариламино, этилендиамин или полиамино). В некоторых вариантах осуществления изобретения модификация 2'-гидроксильной группы может включать «незамкнутые» нуклеиновые кислоты (UNA), в которых в рибозном кольце отсутствует связь C2'-C3'. В некоторых вариантах осуществления изобретения модификация 2'-гидроксильной группы может включать метоксиэтильную группу (МОЕ), $(OCH_2CH_2OCH_3)$, например, производное ПЭГ).

[00456] «Дезокси» 2'-модификации могут включать водород (т.е. дезоксирибозные сахара, например выступающие части частично dsRNA); галоген (например, бром, хлор, фтор или йод); amino (где amino amino может представлять собой, например, NH_2 ; алкиламино, диалкиламино, гетероциклил, ариламино, диариламино, гетероариламино, дигетероариламино или аминокислоту); $NH(CH_2CH_2NH)_nCH_2CH_2$ -amino (где amino может представлять собой, например, как описано в данном документе), $-NHC(O)R$ (где R может представлять собой, например, алкил, циклоалкил, арил, аралкил, гетероарил или сахар), циано; меркапто; алкил-тио-алкил; тиаалкокси; и алкил, циклоалкил, арил, алкенил и алкинил, которые могут быть необязательно замещены, например, amino, как описано в данном документе.

[00457] Модификация сахара может включать сахарную группу, которая также может содержать один или более углеродов, которые обладают противоположной стереохимической конфигурацией, чем конфигурация соответствующего углерода в рибозе. Таким образом, модифицированная нуклеиновая кислота может включать нуклеотиды, содержащие, например, арабинозу в качестве сахара. Модифицированные нуклеиновые кислоты могут также включать безосновные сахара. Эти безосновные сахара также могут быть дополнительно модифицированы по одному или более атомов, составляющих сахар. Модифицированные нуклеиновые кислоты также могут включать

один или более сахаров, которые находятся в L-форме, например L-нуклеозидов.

[00458] Модифицированные нуклеозиды и модифицированные нуклеотиды, описанные в данном документе, которые могут быть включены в модифицированную нуклеиновую кислоту, могут включать основание, также называемое нуклеиновым основанием. Примеры нуклеиновых оснований включают, но не ограничиваясь этим, аденин (A), гуанин (G), цитозин (C) и урацил (U). Эти нуклеиновые основания могут быть модифицированы или полностью заменены для обеспечения модифицированных остатков, которые могут быть включены в модифицированные нуклеиновые кислоты. Нуклеиновое основание нуклеотида может быть независимо выбрано из пурина, пиримидина, аналога пурина или аналога пиримидина. В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновое основание может включать, например, встречающиеся в природе и синтетические производные основания.

[00459] В некоторых вариантах осуществления изобретения, в которых используется двойная гидовая РНК, каждая из crRNA и tracr RNA может содержать модификации. Такие модификации могут быть на одном или на обоих концах crRNA и/или tracr RNA. В некоторых вариантах осуществления изобретения, включающих sgRNA, один или более остатков на одном или более концах sgRNA могут быть химически модифицированы, и/или внутренние нуклеозиды могут быть модифицированы, и/или целая sgRNA может быть химически модифицирована. Некоторые варианты осуществления изобретения включают модификацию на 5'-конце. Некоторые варианты осуществления изобретения включают модификацию на 3'-конце.

[00460] В некоторых вариантах осуществления изобретения гидовые РНК, раскрытые в данном изобретении, содержат одну из схем модификации, раскрытых в WO2018/107028 и/или WO2019/237069, содержание которых включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме. Например, гидовые РНК, раскрытые в данном документе, могут содержать короткие гидовые структуры, описанные в пунктах 1-15, и/или схемы модификации, описанные в пунктах 16-462 WO2019/237069. В некоторых вариантах осуществления изобретения гидовые РНК, раскрытые в данном изобретении, содержат одну из структур/схем модификации, раскрытых в WO 2015/200555, содержание которых включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме. В некоторых вариантах осуществления изобретения гидовые РНК, раскрытые в данном изобретении, содержат одну из структур/схем модификации, раскрытых в WO2017/136794, содержание которых включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

Модификации YA

[00461] Модификация в сайте YA (также называемая в данном документе «модификацией YA») может представлять собой модификацию интернуклеозидной связи, модификацию основания (пиримидин или аденин), например посредством химической модификации, замены или иным образом, и/или модификацию сахара (например, в 2'-положении, таком как 2'-О-алкил, 2'-F, 2'-мие, 2'-F-арабиноза, 2'-H (дезоксирибоза) и тому подобное). В некоторых вариантах осуществления изобретения «модификация YA»

представляет собой любую модификацию, которая изменяет структуру мотива динуклеотида для снижения эндонуклеазной активности РНК, например, посредством вмешательства в распознавание или расщепление сайта УА посредством РНКазы и/или стабилизации структуры РНК (например, вторичной структуры), которая снижает доступность сайта расщепления для РНКазы. См. Peacock et al., *J Org Chem.* 76: 7295-7300 (2011); Behlke, *Oligonucleotides* 18:305-320 (2008); Ku et al., *Adv. Drug Delivery Reviews* 104: 16-28 (2016); Ghidini et al., *Chem. Commun.*, 2013, 49, 9036. Peacock et al., Behlke, Ku, and Ghidini предложили иллюстративные модификации, пригодные в качестве модификаций УА. Охвачены модификации, известные специалистам в данной области техники как снижающие эндонуклеотическую деградацию. Иллюстративные модификации 2'-рибозы, которые влияют на 2'-гидроксильную группу, вовлеченную в расщепление РНКазы, представляют собой 2'-Н и 2'-О-алкил, в том числе 2'-О-Ме. Модификации, такие как аналоги бициклической рибозы, UNA и модифицированные интернуклеозидные связи остатков в сайте УА, могут представлять собой модификации УА. Иллюстративные модификации оснований, которые могут стабилизировать структуры РНК, представляют собой псевдоуридин и 5-метилцитозин. В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере один нуклеотид сайта УА является модифицированным. В некоторых вариантах осуществления изобретения пиримидин (также называемый положением пиримидина) сайта УА содержит модификацию (которая включает модификацию, изменяющую интернуклеозидную связь непосредственно 3'-положения сахара пиримидина, модификацию основания пиримидина и модификацию рибозы, например в ее 2'-положении). В некоторых вариантах осуществления изобретения аденин (также называемый положением аденина) сайта УА содержит модификацию (которая включает модификацию, изменяющую интернуклеозидную связь непосредственно 3'-положения сахара пиримидина, модификацию основания пиримидина и модификацию рибозы, например в ее 2'-положении). В некоторых вариантах осуществления изобретения пиримидин и аденин сайта УА содержат модификации. В некоторых вариантах осуществления изобретения модификация УА снижает эндонуклеазную активность РНК.

[00462] В некоторых вариантах осуществления изобретения sgRNA содержит модификацию в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 или более сайтах УА. В некоторых вариантах осуществления изобретения пиримидин сайта УА содержит модификацию (которая включает модификацию, изменяющую интернуклеозидную связь непосредственно 3'-положения сахара пиримидина). В некоторых вариантах осуществления изобретения аденин сайта УА содержит модификацию (которая включает модификацию, изменяющую интернуклеозидную связь непосредственно 3'-положения сахара аденина). В некоторых вариантах осуществления изобретения пиримидин и аденин сайта УА содержат модификации, такие как модификации сахара, основания или интернуклеозидной связи. Модификации УА могут представлять собой модификации любого из типов, представленных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления изобретения модификации УА содержат одну или более из фосфоротиоата,

2'-ОМе или 2'-фтор. В некоторых вариантах осуществления изобретения модификация УА содержат модификации пиримидина, включающие одну или более из фосфоротиоата, 2'-ОМе или 2'-фтор. В некоторых вариантах осуществления изобретения модификация УА содержит аналог бициклической рибозы (например, LNA, BNA или ENA) в области дуплекса РНК, которая содержит один или более сайтов УА. В некоторых вариантах осуществления изобретения модификация УА содержит аналог бициклической рибозы (например, LNA, BNA или ENA) в области дуплекса РНК, которая содержит сайт УА, при этом модификация УА удалена от сайта УА.

[00463] В некоторых вариантах осуществления изобретения sgRNA содержит модификацию сайта УА гидовой области. В некоторых вариантах осуществления изобретения гидовая область содержит 1, 2, 3, 4, 5 или более сайтов УА («сайты УА гидовой области»), которые могут содержать модификации УА. В некоторых вариантах осуществления изобретения один или более сайтов УА, расположенных на 5-конце, 6-конце, 7-конце, 8-конце, 9-конце или 10-конце от 5'-конца 5'-концевого фрагмента (где «5-конец» и т.д. относится к положению от 5 к 3'-концу гидовой области, т.е. крайний 3'-нуклеотид в гидовой области) содержит модификацию УА. В некоторых вариантах осуществления изобретения два или более сайтов УА, расположенных на 5-конце, 6-конце, 7-конце, 8-конце, 9-конце или 10-конце от 5'-конца 5'-концевого фрагмента, содержат модификации УА. В некоторых вариантах осуществления изобретения три или более сайтов УА, расположенных на 5-конце, 6-конце, 7-конце, 8-конце, 9-конце или 10-конце от 5'-конца 5'-концевого фрагмента, содержат модификации УА. В некоторых вариантах осуществления изобретения четыре или более сайтов УА, расположенных на 5-конце, 6-конце, 7-конце, 8-конце, 9-конце или 10-конце от 5'-конца 5'-концевого фрагмента, содержат модификации УА. В некоторых вариантах осуществления изобретения пять или более сайтов УА, расположенных на 5-конце, 6-конце, 7-конце, 8-конце, 9-конце или 10-конце от 5'-конца 5'-концевого фрагмента, содержат модификации УА. Модифицированный сайт УА гидовой области содержит модификацию УА.

[00464] В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный сайт УА гидовой области находится в пределах 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10 или 9 нуклеотидов от 3'-концевого нуклеотида гидовой области. Например, если модифицированный сайт УА гидовой области находится в пределах 10 нуклеотидов от 3'-концевого нуклеотида гидовой области, и гидовая область составляет 20 нуклеотидов в длину, то модифицированный нуклеотид сайта УА гидовой области расположен в любом из положений 11-20. В некоторых вариантах осуществления изобретения модификация УА расположена в сайте УА в пределах 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 нуклеотида от 3'-концевого нуклеотида гидовой области. В некоторых вариантах осуществления изобретения модификация УА расположена в пределах 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 нуклеотида от 3'-концевого нуклеотида гидовой области.

[00465] В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный сайт УА гидовой области находится в пределах или после нуклеотида 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или 11 от 5'-конца 5'-концевого фрагмента.

[00466] В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный сайт УА гидовой области отличается от модификации 5'-конца. Например, sgRNA может содержать модификацию на 5'-конце, как описано в данном документе, и дополнительно содержать модифицированный сайт УА гидовой области. Альтернативно, sgRNA может содержать немодифицированный 5'-конец и модифицированный сайт УА гидовой области. Альтернативно, sgRNA может содержать модифицированный 5'-конец и немодифицированный сайт УА гидовой области.

[00467] В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный сайт УА гидовой области содержит модификацию, которую по меньшей мере один нуклеотид, расположенный в 5'-положении сайта УА гидовой области, не содержит. Например, если нуклеотиды 1-3 содержат фосфоротиоаты, нуклеотид 4 содержит только 2'-ОМе модификацию, и нуклеотид 5 представляет собой пиримидин сайта УА и содержит фосфоротиоат, то модифицированный сайт УА гидовой области содержит модификацию (фосфоротиоат), которую по меньшей мере один нуклеотид, расположенный в 5'-положении сайта УА гидовой области (нуклеотид 4) не содержит. В другом примере, если нуклеотиды 1-3 содержат фосфоротиоаты, и нуклеотид 4 представляет собой пиримидин сайта УА и содержит 2'-ОМе, то модифицированный сайт УА гидовой области содержит модификацию (2'-ОМе), которую по меньшей мере один нуклеотид, расположенный в 5'-положении сайта УА гидовой области (любой из нуклеотидов 1-3) не содержит. Это условие всегда удовлетворяется, если немодифицированный нуклеотид расположен в 5'-положении от модифицированного сайта УА гидовой области.

[00468] В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированные сайты УА гидовой области содержат модификации, как описано для сайтов УА выше.

[00469] Дополнительные варианты осуществления модификаций сайта УА гидовой области представлены в обобщении выше. Любые варианты осуществления, представленные в любом месте в этом описании, можно объединять в возможной степени с любым из предшествующих вариантов осуществления.

[00470] В некоторых вариантах осуществления изобретения sgRNA содержит модификацию сайта УА консервативной области. Сайты УА 1-10 консервативной области проиллюстрированы на Фиг. 14. В некоторых вариантах осуществления изобретения 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 сайтов УА консервативной области содержат модификации.

[00471] В некоторых вариантах осуществления изобретения сайты УА 1, 8, или 1 и 8 консервативной области содержат модификации УА. В некоторых вариантах осуществления изобретения сайты УА 1, 2, 3, 4 и 10 консервативной области содержат модификации УА. В некоторых вариантах осуществления изобретения сайты УА 2, 3, 4, 8 и 10 содержат модификации УА. В некоторых вариантах осуществления изобретения сайты УА 1, 2, 3 и 10 консервативной области содержат модификации УА. В некоторых вариантах

осуществления изобретения сайты YA 2, 3, 8 и 10 содержат модификации YA. В некоторых вариантах осуществления изобретения сайты YA 1, 2, 3, 4, 8 и 10 содержат модификации YA. В некоторых вариантах осуществления изобретения 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 дополнительных сайтов YA консервативной области содержат модификации YA.

[00472] В некоторых вариантах осуществления изобретения 1, 2, 3 или 4 из сайтов YA 2, 3, 4 и 10 консервативной области содержат модификации YA. В некоторых вариантах осуществления изобретения 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 дополнительных сайтов YA консервативной области содержат модификации YA.

[00473] В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированные сайты YA консервативной области содержат модификации, как описано для сайтов YA выше.

[00474] Дополнительные варианты осуществления модификаций сайта YA консервативной области представлены в обобщении выше. Любые варианты осуществления, представленные в любом месте в этом описании, можно объединять в возможной степени с любым из предшествующих вариантов осуществления.

[00475] В некоторых вариантах осуществления изобретения sgRNA, содержащая гидовую последовательность с любой из SEQ ID №: 1-149 и любой консервативный участок sgRNA, показанный в Таблице 4, необязательно содержащий модификацию любой из sgRNA, показанной в Таблице 4, необязательно при этом sgRNA содержит модификацию на 5'- и 3'-конце (если уже не показана в конструкции Таблицы 4).

[00476] В некоторых вариантах осуществления изобретения sgRNA содержит любую из схем модификации, показанных ниже в Таблице 4, где N представляет собой природный или неприродный нуклеотид, и при этом совокупность N содержит гидовую последовательность *KLKB1*, как описано в данном документе в Таблице 1. Таблица 4 не отражает часть гидовой последовательности sgRNA. Модификации остаются, как показано в Таблице 4, несмотря на замену N на нуклеотиды гидовой последовательности. Следовательно, хотя нуклеотиды гидовой последовательности заменяют «N», нуклеотиды модифицированы, как показано в Таблице 4.

Таблица 4: Схемы модификации sgRNA и консервативные части sgRNA. Гидовая последовательность не показана и будет добавлена к указанной последовательности на ее 5'-конце.

SEQ ID №	Название	Последовательность
171	Иллюстративный консервативный участок	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAG UCGGUGCUUUU
172	Иллюстративный консервативный участок	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAG UCGGUGC

173	Иллюстративный консервативный участок	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGGUGC
170	Иллюстративный консервативный участок	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGGUGCU UUU
168	Иллюстративный - только мод.	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAG UCGGUGCmU*mU*mU*U
169	Иллюстративный - только мод.	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGGUGCm U*mU*mU*U
400	Иллюстративный - только мод.	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUmGmGmCmA mCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*m U
401	Иллюстративный - только мод.	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmA mGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUm GmCmU*mU*mU*mU
402	Иллюстративный - только мод.	GUUUUAGAGCUAmGmAmAmAUAGCAAGUUA AAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCAC CGAGUCGGUGCmU*mU*mU*U
403	Иллюстративный - только мод.	GUUUUAGAmGmCmUmAGAAAmUmAmGmCAAGUUA AAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUG GCACCGAGUCGGUGCmU*mU*mU*U
404	Иллюстративный - только мод.	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCA AGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAA AAGUGGCACCGAGUCGGUGCmU*mU*mU*U
405	Иллюстративный - только мод.	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCA AGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmA mGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU

406	Иллюстративный - только мод.	mGUUUUmAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGm CAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
407	Иллюстративный - только мод.	fGfUfUfUfUfAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGm CAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
408	Иллюстративный - только мод.	mGfUfUfUfUmAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAm GmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAm CmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmC mGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
409	Иллюстративный - только мод.	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCA AGUmUmAAAmAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAm CmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmC mGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
410	Иллюстративный - только мод.	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCA AGUmUmAfAfAmAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmA mCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCm CmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
411	Иллюстративный - только мод.	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCA AGUfUmAfAmAfAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAm CmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmC mGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
412	Иллюстративный - только мод.	mGUUUUmAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGm CAAGUmUmAAAmAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAm AmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmC mCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
413	Иллюстративный - только мод.	mGUUUUmAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGm CAAGUmUmAfAfAmAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAm CmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU

414	Иллюстративный - только мод.	mGUUUUmAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGm CAAGUfUmAfAmAfAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAm AmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmC mCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
415	Иллюстративный - только мод.	fGfUfUfUfUfAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGm CAAGUmUmAAAmAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAm AmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmC mCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
416	Иллюстративный - только мод.	fGfUfUfUfUfAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGm CAAGUmUmAfAfAmAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAm CmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
417	Иллюстративный - только мод.	fGfUfUfUfUfAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGm CAAGUfUmAfAmAfAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAm AmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmC mCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
418	Иллюстративный - только мод.	GUUUUAmGmAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGm CAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
419	Иллюстративный - только мод.	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCm AmAmGmUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAm CmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmC mGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
420	Иллюстративный - только мод.	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCA AGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUfAfUfCfAmAmCmU mUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGm AmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
421	Иллюстративный - только мод.	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCA AGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAmUmCmAmAmC mUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCm GmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU

422	Иллюстративный - только мод.	fGfUfUfUfUfAmGmAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAm GmCmAmAmGmUmUmAfAfAmAmUAAGGCUAGUCCG UUAmUmCmAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCm U*mU*mU*mU
423	Иллюстративный - только мод.	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCA AGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmA mGmUmCmGmGmUmGmCmUmUmUmU
424	Иллюстративный - только мод.	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCA AGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmA mGmUmCmGmGmUmGmCmUmU*mU*mU
425	Иллюстративный - только мод.	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCA AGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmA mGfUfCfGfGfUfGfCfU*fU*fU*mU
426	Иллюстративный - только мод.	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCA AGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAfAmCfUmUf GmAfAmAfAmAfGmUfGmGfCmAfCmCfGmAfGmUfCmG fGmUfGmCfU*mU*fU*mU
427	Иллюстративный - только мод.	mGUUUUmAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGm CAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
428	Иллюстративный - только мод.	fGfUfUfUfUfAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGm CAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
429	Иллюстративный - только мод.	mGfUfUfUfUmAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAm GmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAm CmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmC mGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU

430	Иллюстративный - только мод.	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCA AGUmUmAAAmAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAm CmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmC mGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
431	Иллюстративный - только мод.	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCA AGUmUmAfAfAmAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmA mCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCm CmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
432	Иллюстративный - только мод.	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCA AGUfUmAfAmAfAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAm CmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmC mGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
433	Иллюстративный - только мод.	mGUUUUmAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGm CAAGUmUmAAAmAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAm AmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmC mCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
434	Иллюстративный - только мод.	mGUUUUmAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGm CAAGUmUmAfAfAmAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAm CmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
435	Иллюстративный - только мод.	mGUUUUmAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGm CAAGUfUmAfAmAfAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAm AmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmC mCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
436	Иллюстративный - только мод.	fGfUfUfUfUfAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGm CAAGUmUmAAAmAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAm AmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmC mCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
437	Иллюстративный - только мод.	fGfUfUfUfUfAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGm CAAGUmUmAfAfAmAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAm CmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU

438	Иллюстративный - только мод.	fGfUfUfUfUfAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGm CAAGUfUmAfAmAfAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAm AmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmC mCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
439	Иллюстративный - только мод.	GUUUUAmGmAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGm CAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
440	Иллюстративный - только мод.	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCm AmAmGmUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAm CmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmC mGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
441	Иллюстративный - только мод.	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCA AGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUfAfUfCfAmAmCmU mUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGm AmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
442	Иллюстративный - только мод.	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCA AGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAmUmCmAmAmC mUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCm GmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
443	Иллюстративный - только мод.	fGfUfUfUfUfAmGmAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAm GmCmAmAmGmUmUmAfAfAmAmUAAGGCUAGUCCG UUA mUmCmAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCm U*mU*mU*mU
444	Иллюстративный - только мод.	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCA AGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmA mGmUmCmGmGmUmGmCmUmUmUmU
445	Иллюстративный - только мод.	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCA AGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmA mGmUmCmGmGmUmGmCmUmU*mU*mU

446	Иллюстративный - только мод.	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCA AGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmA mGfUfCfGfGfUfGfCfU*fU*fU*mU
447	Иллюстративный - только мод.	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCA AGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAfAmCfUmUf GmAfAmAfAmAfGmUfGmGfCmAfCmCfGmAfGmUfCmG fGmUfGmCfU*mU*fU*mU
448	Иллюстративный - гидовый участок, только мод.	mN*mN*mN*mNNN*N*fN*fN*fN*fNNfNfNNNfNfNNN
449	Иллюстративный - гидовый участок, только мод.	mN*mN*mN*mNNN*N*fN*fN*fN*fNNfNfNNN*fNfNNN
450	Иллюстративный - только мод.	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCA AGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCA CCGAGUCGG*mU*mG*mC
174	Иллюстративный - только мод.	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACUAAGCACCGAGUCGG*mU* mG*mC
175	Иллюстративный - только мод.	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACUCAGCACCGAGUCGG*mU* mG*mC
176	Иллюстративный - только мод.	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCCACUUGGCACCGAGUCGG*mU* mG*mC
177	Иллюстративный - только мод.	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUACGGC UAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*m G*mC
178	Иллюстративный - только мод.	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAAGAGCUGGCACCGAGUCGG*m U*mG*mC
179	Иллюстративный - только мод.	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAAGAAAUUGGCACCGAGUCGG*m U*mG*mC
180	Иллюстративный - только мод.	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCACGAAAGGGCACCGAGUCGG*m U*mG*mC
181	Иллюстративный - только мод.	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAAAAAUGGCACCGAGUCGG*mU *mG*mC

182	Иллюстративный только мод.	- GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAAAGUGGCACCGAGUCGG*mU *mG*mC
183	Иллюстративный только мод.	- GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACAGUGGCACCGAGUCGG*mU *mG*mC
184	Иллюстративный только мод.	- GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCACAAGGGCACCGAGUCGG*mU* mG*mC
185	Иллюстративный только мод.	- GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAAAGUGGCACCGAGUCGG*mU* mG*mC
186	Иллюстративный только мод.	- GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAAGGCACCGAGUCGG*mU*mG* mC
187	Иллюстративный только мод.	- GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAAGGGCACCGAGUCGG*mU*mG* mC
188	Иллюстративный только мод.	- GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
189	Иллюстративный только мод.	- GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*m G*mC
190	Иллюстративный только мод.	- GUUUUAGAGCGCAAAGCGCAAGUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG* mC
191	Иллюстративный только мод.	- GUUUUAGAGCGCGAAGCGCAAGUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG* mC
192	Иллюстративный только мод.	- GUUUUAGAGCGGAAACGCAAGUAAAAUAAGGCUA GUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGGU*mG*mC* mU
193	Иллюстративный только мод.	- GUUUUAGAGCGGAAACGCAAGUAAAAUAAGGCUA GUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*m C
194	Иллюстративный только мод.	- GUUUUAGAGCCGAAAGGCAAGUAAAAUAAGGCUA GUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*m C
195	Иллюстративный только мод.	- GUUUUAGAGCUGAAAAGCAAGUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG* mC
196	Иллюстративный только мод.	- GUUUUAGAGCGAAAGCAAGUAAAAUAAGGCUAG UCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
197	Иллюстративный только мод.	- GUUUUAGAGCGAAGCAAGUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
198	Иллюстративный только мод.	- GUUUUAGAGCAAAGCAAGUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
199	Иллюстративный только мод.	- GUUUUAGAGGAAACAAGUAAAAUAAGGCUAGUCC GUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
202	Иллюстративный только мод.	- GUUUUAGAGCAAGCAAGUAAAAUAAGGCUAGUCC GUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC

203	Иллюстративный только мод.	- GUUUUAGAGCGAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCC GUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
204	Иллюстративный только мод.	- GUUUUAGAGCGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
205	Иллюстративный только мод.	- GUUUUAGAGACAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
206	Иллюстративный только мод.	- GUUUUAGAGACAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUU AUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
207	Иллюстративный только мод.	- GUUUUAGAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUA UCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
208	Иллюстративный только мод.	- GUUUUAGAAAAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUU AUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
209	Иллюстративный только мод.	- GUUUUAGAAAAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUA UCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
210	Иллюстративный только мод.	- GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCG*mG*m U*mG
211	Иллюстративный только мод.	- GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUC*mG*mG* mU
212	Иллюстративный только мод.	- GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGU*mC*mG*m G
213	Иллюстративный только мод.	- GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAG*mU*mC*mG
214	Иллюстративный только мод.	- GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGA*mG*mU*mC
215	Иллюстративный только мод.	- GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCG*mA*mG*mU
216	Иллюстративный только мод.	- GUUUUAGAGCGAAAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAG UCCGUUAUCACUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
217	Иллюстративный только мод.	- GUUUUAGAGCGAAAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAG UCCGUUAUCAGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
218	Иллюстративный только мод.	- GUUUUAGAGAAAAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCG UUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
219	Иллюстративный только мод.	- GUUUUAGAGGAAACAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCC GUUAUCA AUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
220	Иллюстративный только мод.	- GUUUUAGAGAAAAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCG UUAUCA AUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
221	Иллюстративный только мод.	- GUUUUAGAGGAAACAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCC GUUAUCACUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
222	Иллюстративный только мод.	- GUUUUAGAGAAAAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCG UUAUCAGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
223	Иллюстративный только мод.	- GUUUUAGAGCGAAAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAG UCCGUUAUCAAGCUAUGGCACCGAGUCGG*mU*mG* mC
224	Иллюстративный только мод.	- GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGG CAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*m G*mC

225	Иллюстративный только мод.	- GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAUAAGG CUGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*m G*mC
226	Иллюстративный только мод.	- GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAUAAGG CGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG* mC
227	Иллюстративный только мод.	- GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAUAAGG UAUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG* mC
228	Иллюстративный только мод.	- GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAUAAGG UUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*m C
229	Иллюстративный только мод.	- GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAUAAGG AUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*m C
230	Иллюстративный только мод.	- GUUUUCGAGCUAGAAAUAGCAAGUGAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*m G*mC
231	Иллюстративный только мод.	- GUUUUUGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU* mG*mC
232	Иллюстративный только мод.	- GUUUUAGAGCGAGAAAUAGCAAGUAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*m G*mC
233	Иллюстративный только мод.	- GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCGAGUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU* mG*mC
234	Иллюстративный только мод.	- GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCCGGUAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*m G*mC
235	Иллюстративный только мод.	- GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAUGAGG CUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU* mG*mC
236	Иллюстративный только мод.	- GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAUAAGG CUGGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU* mG*mC
237	Иллюстративный только мод.	- GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAUAAGG CUCGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU* mG*mC
238	Иллюстративный только мод.	- GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAUAAGG CUUGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU* mG*mC
239	Иллюстративный только мод.	- GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUGUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU* mG*mC
240	Иллюстративный только мод.	- GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUCUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU* mG*mC
241	Иллюстративный только мод.	- GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUUUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU* mG*mC

242	Иллюстративный только мод.	-	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUGAACUUGGCACCGAGUCGG*mU* mG*mC
243	Иллюстративный только мод.	-	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACUUGGGACCGAGUCGG*mU* mC*mC
244	Иллюстративный только мод.	-	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACUUGGAACCGAGUCGG*mU* mU*mC
245	Иллюстративный только мод.	-	GUUUUCGAGCGAGAAAUUCGCGAGUGAAAAUGAGGC UGGUCCGUUGUGAACUUGGAACCGAGUCGG*mU*m U*mC
246	Иллюстративный только мод.	-	GUUUUUGAGCGAGAAAUUCGCAAGUAAAAUAAGGC UCGUCCGUUCUGAACUUGGAACCGAGUCGG*mU*m U*mC
247	Иллюстративный только мод.	-	GUUUCGGAGCCGGAACCGGCGAGUCGAAAUGAGGC UGGUCCGUUGUCGGCUCGGAACCGAGUCGG*mU*m U*mC
248	Иллюстративный только мод.	-	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU* mG*mC
249	Иллюстративный только мод.	-	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU* mG*mC
250	Иллюстративный только мод.	-	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU* mG*mC
251	Иллюстративный только мод.	-	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU* mG*mC
252	Иллюстративный только мод.	-	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU* mG*mC
253	Иллюстративный только мод.	-	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU* mG*mC
254	Иллюстративный только мод.	-	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU* mG*mC
255	Иллюстративный только мод.	-	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU* mG*mC
256	Иллюстративный только мод.	-	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCA AGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCACGAAAGGG CACCGAGUCGG*mU*mG*mC
257	Иллюстративный только мод.	-	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCA AGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAAAAAUGGC ACCGAGUCGG*mU*mG*mC
258	Иллюстративный только мод.	-	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCA AGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAAAAGGGCA CCGAGUCGG*mU*mG*mC

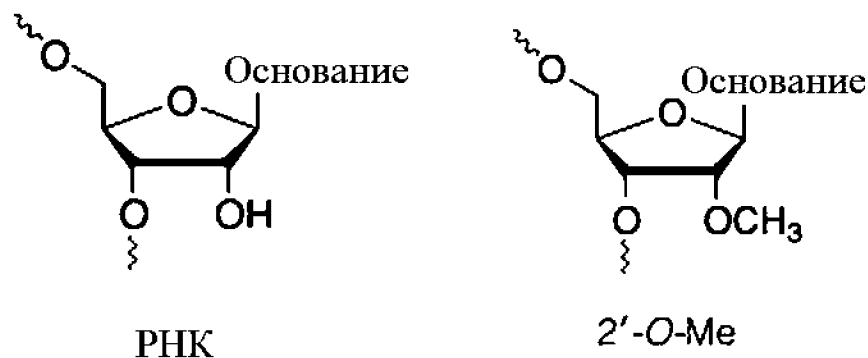
259	Иллюстративный - только мод.	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCA AGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAAAAUGGCA CCGAGUCGG*mU*mG*mC
260	Иллюстративный - только мод.	GUUUUAGAGCGCGAAGCGCAAGUUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAAAAUGGCACCGAGUCGG*mU*mG* mC
261	Иллюстративный - только мод.	GUUUUAGAGCUGAAAAGCAAGUUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAAAAUGGCACCGAGUCGG*mU*mG* mC
262	Иллюстративный - только мод.	GUUUUAGAGCGAAAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAG UCCGUUAUCAAAAUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
263	Иллюстративный - только мод.	GUUUUAGAGCAAAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAAAAUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC
264	Иллюстративный - только мод.	GUUUUAGAmGmCmGmAmAmAmGmCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG *mU*mG*mC
265	Иллюстративный - только мод.	GUUUUAGAmGmCmGmAmAmAmGmCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAAGAAAUGGCACCGAGUC GG*mU*mG*mC
266	Иллюстративный - только мод.	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCA AGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmCmGmAm AmAmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmG*mU *mG*mC
267	Иллюстративный - только мод.	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCA AGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmAmAm UmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmG*mU*mG* mC
268	Иллюстративный - только мод.	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCA AGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCACmGmAmA mAmGmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmG*mU* mG*mC
269	Иллюстративный - только мод.	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCA AGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAAmAmAmU mGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmG*mU*mG*m C

[00477] В некоторых вариантах осуществления изобретения sgRNA содержит следующую последовательность:
 mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUm
 AmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmA
 mGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (SEQ ID
 №: 300), где «N» может представлять собой любой природный или неприродный нуклеотид,
 и при этом совокупность N содержит гидовую последовательность *KLKBI*, как описано в
 Таблице 1. Например, в данном документе охвачена SEQ ID №: 300, где N заменены любой
 из гидовых последовательностей, раскрытых в данном документе в Таблице 1 (SEQ ID №:
 1-149). Также в данном документе охвачены гидовые РНК, объединяющие любую из
 гидовых последовательностей Таблицы 1 (SEQ ID №: 1-149), объединенных с
 консервативной частью sgRNA, например последовательностью Таблицы 4.

[00478] Любая из модификаций, описанных ниже, может присутствовать в гРНК и мРНК, описанных в данном документе.

[00479] Термины «mA», «mC», «mU» или «mG» можно использовать для обозначения нуклеотида, который был модифицирован 2'-O-Me.

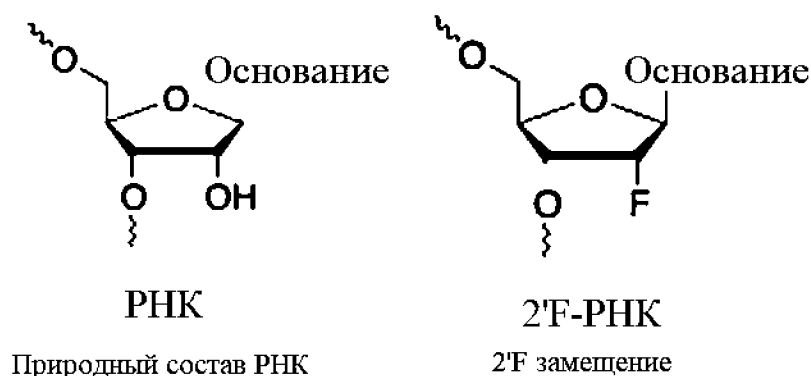
[00480] Модификация 2'-O-метил может быть обозначена следующим образом:



[00481] Другая химическая модификация, которая, как было показано, влияет на кольца сахаров нуклеотидов, представляет собой замещение галогеном. Например, 2'-фтор (2'-F) замещение на кольцах сахаров нуклеотидов может повышать аффинность связывания олигонуклеотида и нуклеазную стабильность.

[00482] В этой заявке термины «fA», «fC», «fU» или «fG» можно использовать для обозначения нуклеотида, который был замещен 2'-F.

[00483] Замещение 2'-F может быть обозначено следующим образом:

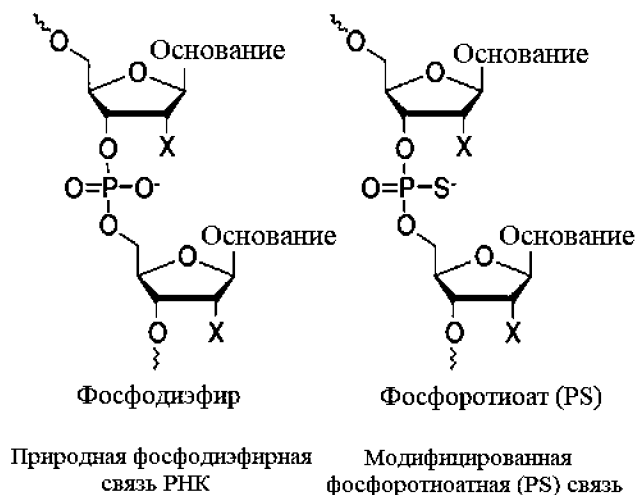


[00484] Фосфоротиоатное (PS) соединение или связь относится к связи, в которой на серу заменен один немостиновый фосфатный кислород в фосфодиэфирной связи, например в связях между нуклеотидными основаниями. Когда фосфоротиоаты используются для получения олигонуклеотидов, модифицированные олигонуклеотиды могут также называться S-олигонуклеотиды.

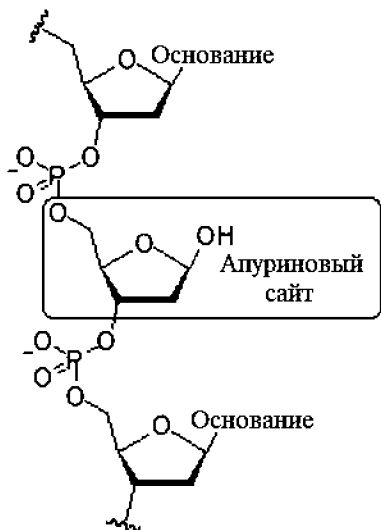
[00485] «*» может использоваться для обозначения модификации PS. В этой заявке термины A*, C*, U* или G* могут использоваться для обозначения нуклеотида, который связан со следующим (например, 3') нуклеотидом посредством PS связи.

[00486] В этой заявке термины «mA*», «mC*», «mU*» или «mG*» могут использоваться для обозначения нуклеотида, который был замещен 2'-O-Me и который связан со следующим (например, 3') нуклеотидом посредством PS связи.

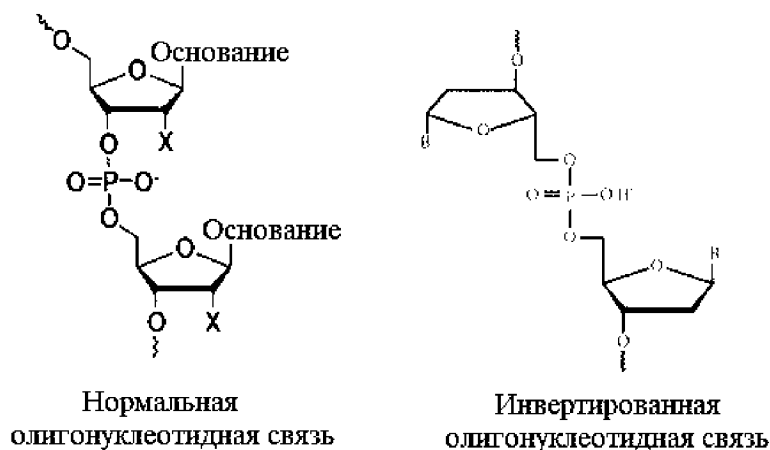
[00487] Диаграмма ниже иллюстрирует замещение S-на немостиковый фосфатный кислород, давая PS связь вместо фосфодиэфирной связи:



[00488] Безосновные нуклеотиды относятся к тем, в которых отсутствуют азотистые основания. На фигуре ниже представлен олигонуклеотид с безосновным (также известным как апуриновый) сайтом, в котором отсутствует основание:



[00489] Инвертированные основания относятся к связям, которые инвертированы относительно нормальной 5'-3' связи (т.е. или 5'-5' связь, или 3'-3' связь). Например:



[00490] Безосновный нуклеотид может быть присоединен с помощью инвертированной связи. Например, безосновный нуклеотид может быть присоединен к концевому 5'-нуклеотиду посредством 5'-5' связи, или безосновный нуклеотид может быть присоединен к концевому 3'-нуклеотиду посредством 3'-3' связи. Инвертированный безосновный нуклеотид в положении концевого или 5'-, или 3'-нуклеотида также может называться инвертированным безосновным концевым кэпом.

[00491] В некоторых вариантах осуществления изобретения один или более из первых трех, четырех или пяти нуклеотидов на 5'-конце, и один или более из последних трех, четырех или пяти нуклеотидов на 3'-конце модифицированы. В некоторых вариантах осуществления изобретения модификация представляет собой 2'-O-Me, 2'-F, инвертированный безосновный нуклеотид, PS связь или другую модификацию нуклеотида, хорошо известную в данной области для улучшения стабильности и/или характеристик.

[00492] В некоторых вариантах осуществления изобретения первые четыре нуклеотида на 5'-конце и последние четыре нуклеотида на 3'-конце связаны фосфоротиоатными (PS) связями.

[00493] В некоторых вариантах осуществления изобретения первые три нуклеотида на 5'-конце и последние три нуклеотида на 3'-конце содержат нуклеотид, модифицированный 2'-O-метил (2'-O-Me). В некоторых вариантах осуществления изобретения первые три нуклеотида на 5'-конце и последние три нуклеотида на 3'-конце содержат нуклеотид, модифицированный 2'-фтор (2'-F). В некоторых вариантах осуществления изобретения первые три нуклеотида на 5'-конце и последние три нуклеотида на 3'-конце содержат инвертированный безосновный нуклеотид.

[00494] В некоторых вариантах осуществления изобретения гидовая РНК содержит модифицированную sgRNA. В некоторых вариантах осуществления изобретения гидовая РНК содержит любой консервативный участок sgRNA, показанный в Таблице 4, необязательно содержащий модификацию любой из sgRNA, показанной в Таблице 4, необязательно при этом sgRNA содержит модификацию на 5'- и 3'-конце (если уже не показана в конструкции Таблицы 4). В некоторых вариантах осуществления изобретения sgRNA содержит схему модификации любой из sgRNA, показанной в Таблице 4, где N

представляет собой любой природный или неприродный нуклеотид, и где совокупность N содержит гидовую последовательность, которая направляет нуклеазу на целевую последовательность в *KLKB1*, например, как показано в Таблице 1.

[00495] В некоторых вариантах осуществления изобретения гидовая РНК содержит sgRNA, содержащую любую из гидовых последовательностей SEQ ID №: 1-149 и любой консервативный участок sgRNA, показанный в Таблице 4, необязательно содержащий модификацию любой из sgRNA, показанной в Таблице 4, необязательно при этом sgRNA содержит модификацию на 5'- и 3'-конце (если уже не показана в конструкции Таблицы 4). В некоторых вариантах осуществления изобретения гидовая РНК содержит sgRNA, содержащую любую из гидовых последовательностей SEQ ID №: 1-149, и нуклеотиды SEQ ID №: 170, 171, 172 или 173, при этом нуклеотиды SEQ ID №: 170, 171, 172 или 173 находятся на 3'-конце гидовой последовательности, и при этом sgRNA может быть модифицирована, как показано в Таблице 4 или SEQ ID №: 300.

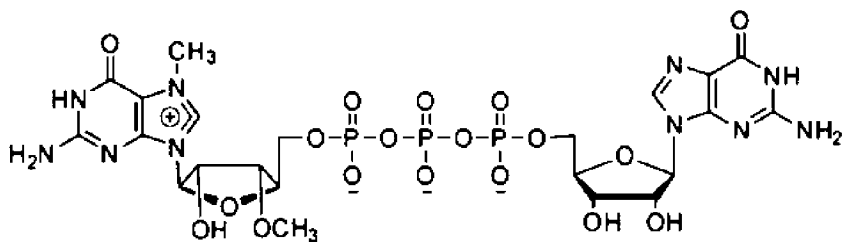
[00496] Как указано выше, в некоторых вариантах осуществления изобретения композиция или состав, раскрытые в данном документе, содержат мРНК, содержащую открытую рамку считывания (ORF), кодирующую управляемый РНК ДНК-связывающий агент, такой как нуклеаза Cas, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления изобретения мРНК, содержащая ORF, кодирующую управляемый РНК ДНК-связывающий агент, такой как нуклеаза Cas, представлена, применяется или вводится. В некоторых вариантах осуществления изобретения ORF, кодирующая управляемую РНК нуклеазу ДНК, представляет собой «ORF модифицированного, управляемого РНК ДНК-связывающего агента» или просто «модифицированную ORF», которая используется как сокращения для указания того, что ORF модифицирована.

[00497] В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированная ORF может содержать модифицированный уридин в по меньшей мере одном, множестве или во всех положениях уридина. В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный уридин представляет собой уридин, модифицированный в положении 5, например, галогеном, метилом или этилом. В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный уридин представляет собой псевдоуридин, модифицированный в положении 1, например, галогеном, метилом или этилом. Модифицированный уридин может представлять собой, например, псевдоуридин, N1-метилпсевдоуридин, 5-метоксиуридин, 5-йодуридин или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный уридин представляет собой 5-метоксиуридин. В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный уридин представляет собой 5-йодуридин. В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный уридин представляет собой псевдоуридин. В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный уридин представляет собой N1-метилпсевдоуридин. В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный уридин представляет собой комбинацию псевдоуридина и N1-метилпсевдоуридина. В некоторых вариантах осуществления изобретения

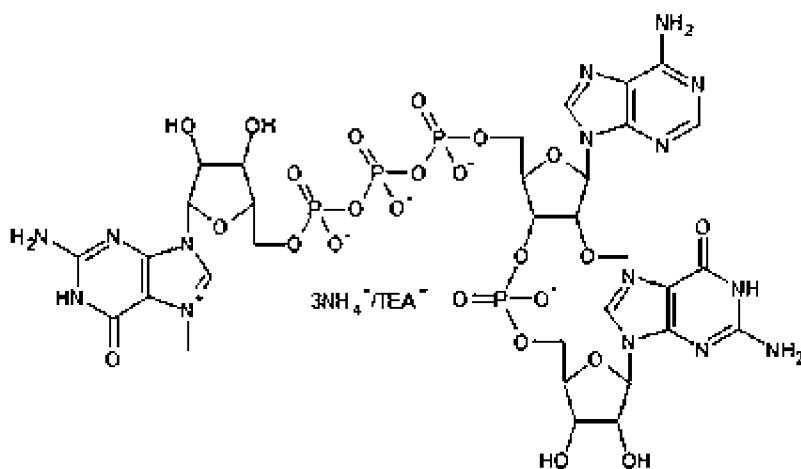
модифицированный уридин представляет собой комбинацию псевдоуридина и 5-метоксиуридина. В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный уридин представляет собой комбинацию N1-метилпсевдоуридина и 5-метоксиуридина. В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный уридин представляет собой комбинацию 5-йодуридина и N1-метилпсевдоуридина. В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный уридин представляет собой комбинацию псевдоуридина и 5-йодуридина. В некоторых вариантах осуществления изобретения модифицированный уридин представляет собой комбинацию 5-йодуридина и 5-метоксиуридина.

[00498] В некоторых вариантах осуществления изобретения мРНК, раскрытая в данном документе, содержит 5'-кэп, такой как кэп 0, кэп 1 или кэп 2. 5'-кэп в общем представляет собой 7-метилгуанинрибонуклеотид (который может быть дополнительно модифицирован, как обсуждалось ниже, например, по отношению к ARCA), связанный посредством 5'-трифосфата с 5'-положением первого нуклеотида 5'-к-3' цепи мРНК, т.е. первым ближайшим к кэпу нуклеотиду. В кэпе 0 обе рибозы первого и второго ближайших к кэпу нуклеотидов мРНК содержат 2'-гидроксил. В кэпе 1 рибозы первого и второго транскрибируемых нуклеотидов мРНК содержат 2'-метокси и 2'-гидроксил, соответственно. В кэпе 2 обе рибозы первого и второго ближайших к кэпу нуклеотидов мРНК содержат 2'-метокси. См., например, Katibah et al. (2014) *Proc Natl Acad Sci USA* 111(33):12025-30; Abbas et al. (2017) *Proc Natl Acad Sci USA* 114(11):E2106-E2115. Большинство эндогенных мРНК высших эукариотов, в том числе мРНК млекопитающих, таких как мРНК человека, содержат кэп 1 или кэп 2. Кэп 0 и другие структуры кэпов, отличающиеся от кэпа 1 и кэпа 2, могут быть иммуногенными у млекопитающих, таких как люди, вследствие распознавания как «не своими» компонентами врожденной иммунной системы, такими как IFIT-1 и IFIT-5, что может приводить к повышенным уровням цитокинов, включая интерферон I типа. Компоненты врожденной иммунной системы, такие как IFIT-1 и IFIT-5, могут также конкурировать с eIF4E за связывание мРНК с кэпом, отличным от кэпа 1 или кэпа 2, потенциально ингибирующим трансляцию мРНК.

[00499] Кэп может быть включен ко-транскрипционно. Например, ARCA (аналог антиреверсивного кэпа; Thermo Fisher Scientific, кат. № AM8045) представляет собой аналог кэпа, содержащий 7-метилгуанин-3'-метокси-5'-трифосфат, связанный с 5'-положением гуанинрибонуклеотида, который может быть включен *in vitro* в транскрипт при инициации. ARCA приводит к кэпу кэп 0, в котором 2'-положение первого проксимального к кэпу нуклеотида представляет собой гидроксил. См., например, Stepinski et al., (2001) "Synthesis and properties of mRNAs containing the novel 'anti-reverse' cap analogs 7-methyl(3'-O-methyl)GpppG and 7-methyl(3'-deoxy)GpppG," *RNA* 7: 1486-1495. Структура ARCA представлена ниже.



[00500] CleanCap™ AG (m7G(5')ppp(5')(2'OMeA)pG; TriLink Biotechnologies, кат. № N-7113) или CleanCap™ GG (m7G(5')ppp(5')(2'OMeG)pG; TriLink Biotechnologies, кат. № N-7133) можно применять для получения структуры кэпа 1 котранскрипционно. 3'-О-метилованные варианты CleanCap™ AG и CleanCap™ GG также доступны в TriLink Biotechnologies под кат. № N-7413 и N-7433, соответственно. Структура CleanCap™ AG показана ниже.



[00501] Альтернативно, кэп может быть добавлен к РНК посттранскрипционно. Например, фермент, кэпированный вирусом коровьей оспы, коммерчески доступен (New England Biolabs, кат. № M2080S) и обладает активностью трифосфатазы или гуанилилтрансферазы РНК, обеспечиваемой его субъединицей D1, и гуанинметилтрансферазы, обеспечиваемой ее субъединицей D12. Следовательно, он может добавлять 7-метилгуанин к РНК, что дает кэп 0, в присутствии S-аденозилметионина и ГТФ. См., например, Guo, P. and Moss, B. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 4023-4027; Mao, X. and Shuman, S. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 24472-24479.

[00502] В некоторых вариантах осуществления изобретения мРНК дополнительно содержит поли-аденилированный (поли-А) хвост. В некоторых вариантах осуществления изобретения поли-А хвост содержит по меньшей мере 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 аденинов, необязательно до 300 аденинов. В некоторых вариантах осуществления изобретения поли-А хвост содержит 95, 96, 97, 98, 99 или 100 адениновых нуклеотидов.

Рибонуклеопротеиновый комплекс

[00503] В некоторых вариантах осуществления изобретения в изобретении представлены композиции, содержащие одну или более гРНК, содержащих одну или более гидовых последовательностей из Таблицы 1 или 2 и управляемый РНК ДНК-связывающий агент, например нуклеазу, такую как нуклеаза Cas, такая как Cas9. В некоторых вариантах

осуществления изобретения управляемый РНК ДНК-связывающий агент обладает активностью кляззы, которую также можно называть активностью двухцепочечной эндонуклеазы. В некоторых вариантах осуществления изобретения управляемый РНК ДНК-связывающий агент содержит нуклеазу Cas. Примеры нуклеаз Cas9 включают нуклеазы систем CRISPR II типа *S. pyogenes*, *S. aureus* и других прокариотов (см., например, перечень в следующем абзаце) и их модифицированные варианты (например, сконструированные или мутантные). См., например, US2016/0312198 A1; US 2016/0312199 A1. Другие примеры нуклеаз Cas включают комплекс Csm или Cmr системы CRISPR III типа или их субъединицы Cas10, Csm1 и Cmr2; и каскадный комплекс системы CRISPR I типа или его субъединицу Cas3. В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеаза Cas может быть из системы типа IIA, типа IIB или типа IIC. Обсуждение различных систем CRISPR и нуклеаз Cas см., например, в Makarova et al., NAT. REV. MICROBIOL. 9:467-477 (2011); Makarova et al., NAT. REV. MICROBIOL, 13: 722-36 (2015); Shmakov et al., MOLECULAR CELL, 60:385-397 (2015).

[00504] Неограничивающие иллюстративные виды, из которых нуклеаза Cas может быть получена, включают *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus thermophilus*, род *Streptococcus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*, *Lactobacillus gasseri*, *Francisella novicida*, *Wolinella succinogenes*, *Sutterella wadsworthensis*, *Gammaproteobacterium*, *Neisseria meningitidis*, *Campylobacter jejuni*, *Pasteurella multocida*, *Fibrobacter succinogenes*, *Rhodospirillum rubrum*, *Nocardiopsis dassonvillei*, *Streptomyces pristinaespiralis*, *Streptomyces viridochromogenes*, *Streptomyces viridochromogenes*, *Streptosporangium roseum*, *Streptosporangium roseum*, *Alicyclobacillus acidocaldarius*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus selenitireducens*, *Exiguobacterium sibiricum*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus buchneri*, *Treponema denticola*, *Microscilla marina*, *Burkholderiales bacterium*, *Polaromonas naphthalenivorans*, род *Polaromonas*, *Crocospaera watsonii*, род *Cyanothece*, *Microcystis aeruginosa*, род *Synechococcus*, *Acetohalobium arabaticum*, *Ammonifex degensii*, *Caldicelulosiruptor beccarii*, *Candidatus Desulforudis*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile*, *Fingoldia magna*, *Natronaerobius thermophilus*, *Pelotomaculum thermopropionicum*, *Acidithiobacillus caldus*, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Allochrocatium vinosum*, род *Marinobacter*, *Nitrosococcus halophilus*, *Nitrosococcus watsoni*, *Pseudoalteromonas haloplanktis*, *Ktedonobacter racemifer*, *Methanohalobium evestigatum*, *Anabaena variabilis*, *Nodularia spumigena*, род *Nostoc*, *Arthrospira maxima*, *Arthrospira platensis*, род *Arthrospira*, род *Lyngbya*, *Microcoleus chthonoplastes*, род *Oscillatoria*, *Petrotoga mobilis*, *Thermosiphon africanus*, *Streptococcus pasteurianus*, *Neisseria cinerea*, *Campylobacter lari*, *Parvibaculum lavamentivorans*, *Corynebacterium diphtheria*, род *Acidaminococcus*, бактерию *Lachnospiraceae* ND2006 и *Acaryochloris marina*.

[00505] В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеаза Cas представляет собой нуклеазу Cas9 от *Streptococcus pyogenes*. В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеаза Cas представляет собой нуклеазу Cas9 от *Streptococcus thermophilus*. В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеаза

Cas представляет собой нуклеазу Cas9 от *Neisseria meningitidis*. В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеаза Cas представляет собой нуклеазу Cas9 от *Staphylococcus aureus*. В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеаза Cas представляет собой нуклеазу Cpf1 от *Francisella novicida*. В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеаза Cas представляет собой нуклеазу Cpf1 от рода *Acidaminococcus*. В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеаза Cas представляет собой нуклеазу Cpf1 от бактерии *Lachnospiraceae* ND2006. В дополнительных вариантах осуществления изобретения нуклеаза Cas представляет собой нуклеазу Cpf1 от *Francisella tularensis*, *Lachnospiraceae bacterium*, *Butyrivibrio proteoclasticus*, *Peregrinibacteria bacterium*, *Parcubacteria bacterium*, *Smithella*, *Acidaminococcus*, *Candidatus Methanoplasma termitum*, *Eubacterium eligens*, *Moraxella bovoculi*, *Leptospira inadai*, *Porphyromonas crevioricanis*, *Prevotella disiens* или *Porphyromonas macacae*. В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеаза Cas представляет собой нуклеазу Cpf1 от *Acidaminococcus* или *Lachnospiraceae*.

[00506] В некоторых вариантах осуществления изобретения гРНК вместе с управляемым РНК ДНК-связывающим агентом называют рибонуклеопротеиновым комплексом (RNP). В некоторых вариантах осуществления изобретения управляемый РНК ДНК-связывающий агент представляет собой нуклеазу Cas. В некоторых вариантах осуществления изобретения гРНК вместе с нуклеазой Cas называют RNP Cas. В некоторых вариантах осуществления изобретения RNP содержит компоненты I типа, II типа или III типа. В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеаза Cas представляет собой белок Cas9 из системы CRISPR/Cas II типа. В некоторых вариантах осуществления изобретения гРНК вместе с Cas9 называют RNP Cas9.

[00507] Cas9 дикого типа содержит два нуклеазных домена: RuvC и HNH. Домен RuvC расщепляет нецелевую нить ДНК, а домен HNH расщепляет целевую нить ДНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения белок Cas9 содержит более чем один домен RuvC и/или более чем один домен HNH. В некоторых вариантах осуществления изобретения белок Cas9 представляет собой Cas9 дикого типа. В каждом из вариантов осуществления композиции, применения и способа Cas индуцирует двухцепочечный разрыв в целевой ДНК.

[00508] В некоторых вариантах осуществления изобретения используют химерные нуклеазы Cas, когда один домен или область белка заменяют частью другого белка. В некоторых вариантах осуществления изобретения домен нуклеазы Cas может быть заменен доменом от другой нуклеазы, такой как FokI. В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеаза Cas может представлять собой модифицированную нуклеазу.

[00509] В других вариантах осуществления изобретения нуклеаза Cas может быть из системы CRISPR/Cas I типа. В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеаза Cas может представлять собой компонент каскадного комплекса системы CRISPR/Cas I типа. В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеаза Cas может представлять собой белок Cas3. В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеаза Cas может

быть из системы CRISPR/Cas III типа. В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеаза Cas может обладать активностью расщепления РНК.

[00510] В некоторых вариантах осуществления изобретения управляемый РНК ДНК-связывающий агент обладает активностью одноцепочечной нуклеазы, т.е. может разрезать одну цепь ДНК для получения одноцепочечного разрыва, также известного как «ник». В некоторых вариантах осуществления изобретения управляемый РНК ДНК-связывающий агент содержит нуклеазу Cas. Нуклеаза представляет собой фермент, который создает ник в дцДНК, т.е. разрезает одну нить, но не другую, двойной спирали ДНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеаза Cas представляет собой вариант нуклеазы Cas (например, нуклеазы Cas, обсуждаемой выше), в которой эндонуклеатический активный сайт деактивирован, например, посредством одного или более изменений (например, точечных мутаций) в каталитическом домене. См., например, в патенте США № 8889356 обсуждение нуклеазы Cas и иллюстративные изменения каталитических доменов. В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеазы Cas, такая как нуклеаза Cas9, имеет деактивированный домен RuvC или HNH.

[00511] В некоторых вариантах осуществления изобретения управляемый РНК ДНК-связывающий агент модифицирован так, что содержит только один функциональный нуклеазный домен. Например, белок агента может быть модифицирован так, что один из нуклеазных доменов мутирован или полностью или частично удален для снижения его активности расщепления нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления изобретения используется нуклеаза, содержащая домен RuvC со сниженной активностью. В некоторых вариантах осуществления изобретения используют нуклеазу, содержащую неактивный домен RuvC. В некоторых вариантах осуществления изобретения используется нуклеаза, содержащая домен HNH со сниженной активностью. В некоторых вариантах осуществления изобретения используют нуклеазу, содержащую неактивный домен HNH.

[00512] В некоторых вариантах осуществления изобретения консервативная аминокислота в домене нуклеазы белка Cas замещена, чтобы снизить или изменить активность нуклеазы. В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеаза Cas может содержать аминокислотную замену в RuvC или RuvC-подобном нуклеазном домене. Иллюстративные аминокислотные замены в RuvC или RuvC-подобном нуклеазном домене включают D10A (на основании белка Cas9 *S. pyogenes*). См., например, Zetsche et al. (2015) *Cell* Oct 22;163(3): 759-771. В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеаза Cas может содержать аминокислотную замену в HNH или HNH-подобном нуклеазном домене. Иллюстративные аминокислотные замены в HNH или HNH-подобном нуклеазном домене включают E762A, H840A, N863A, H983A и D986A (на основании белка Cas9 *S. pyogenes*). См., например, Zetsche et al. (2015). Дополнительные иллюстративные аминокислотные замены включают D917A, E1006A и D1255A (на основании последовательности U112 Cpf1 (FnCpf1) *Francisella novicida* (UniProtKB - A0Q7Q2 (CPF1_FRATN))).

[00513] В некоторых вариантах осуществления изобретения мРНК, кодирующая

никазу, представлена в комбинации с парой гидовых РНК, которые комплементарны смысловой и антисмысловой нитям целевой последовательности, соответственно. В этом варианте осуществления изобретения гидовая РНК направляет никазу на целевую последовательность и вводит DSB путем создания ника на противоположных нитях целевой последовательности (т.е. двойное никирование). В некоторых вариантах осуществления изобретения применение двойного никирования может улучшать специфичность и снижать нецелевые эффекты. В некоторых вариантах осуществления изобретения никазу используют вместе с двумя отдельными гидовыми РНК, нацеленными на противоположные нити ДНК, для получения двойного ника в целевой ДНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения никазу используют вместе с двумя отдельными гидовыми РНК, которые выбраны так, что находятся в близком расположении, для получения двойного ника в целевой ДНК.

[00514] В некоторых вариантах осуществления изобретения в управляемом РНК ДНК-связывающем агенте отсутствует активность клевазы и никазы. В некоторых вариантах осуществления изобретения управляемый РНК ДНК-связывающий агент содержит ДНК-связывающий полипептид dCas. Полипептид dCas обладает ДНК-связывающей активностью, при этом в нем по существу отсутствует каталитическая активность (клевазы/никазы). В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептид dCas представляет собой полипептид dCas9. В некоторых вариантах осуществления изобретения у управляемого РНК ДНК-связывающего агента отсутствует активность клевазы и никазы, или ДНК-связывающий полипептид dCas представляет собой вариант нуклеазы Cas (например, нуклеазы Cas, обсуждаемой выше), в которой эндонуклеотически активные сайты инактивированы, например, путем одного или более изменений (например, точечных мутаций) в ее каталитических доменах. См., например, US 2014/0186958 A1; US 2015/0166980 A1.

[00515] В некоторых вариантах осуществления изобретения управляемый РНК ДНК-связывающий агент содержит один или более гетерологичных функциональных доменов (например, представляет собой или содержит полипептид слияния).

[00516] В некоторых вариантах осуществления изобретения гетерологичный функциональный домен может облегчать транспорт управляемого РНК ДНК-связывающего агента в ядро клетки. Например, гетерологичный функциональный домен может представлять собой сигнал ядерной локализации (NLS). В некоторых вариантах осуществления изобретения управляемый РНК ДНК-связывающий агент может быть слит с 1-10 NLS. В некоторых вариантах осуществления изобретения управляемый РНК ДНК-связывающий агент может быть слит с 1-5 NLS. В некоторых вариантах осуществления изобретения управляемый РНК ДНК-связывающий агент может быть слит с одним NLS. Когда применяется один NLS, NLS может быть связан с N-концом или C-концом последовательности управляемого РНК ДНК-связывающего агента. Он также может быть вставлен в последовательность управляемого РНК ДНК-связывающего агента. В других вариантах осуществления изобретения управляемый РНК ДНК-связывающий агент может

быть слит с более чем одним NLS. В некоторых вариантах осуществления изобретения управляемый РНК ДНК-связывающий агент может быть слит с 2, 3, 4 или 5 NLS. В некоторых вариантах осуществления изобретения управляемый РНК ДНК-связывающий агент может быть слит с двумя NLS. В некоторых случаях два NLS могут быть такими же (например, два NLS SV40) или различными. В некоторых вариантах осуществления изобретения управляемый РНК ДНК-связывающий агент слит с двумя последовательностями NLS SV40, связанными на карбокси-конце. В некоторых вариантах осуществления изобретения управляемый РНК ДНК-связывающий агент может быть слит с двумя NLS, при этом один связан с N-концом, а другой связан с С-концом. В некоторых вариантах осуществления изобретения управляемый РНК ДНК-связывающий агент может быть слит с 3 NLS. В некоторых вариантах осуществления изобретения управляемый РНК ДНК-связывающий агент может быть не слит с NLS. В некоторых вариантах осуществления изобретения NLS может быть однокомпонентной последовательностью, такой как, например, NLS SV40, PKKKRKV (SEQ ID №: 600) или PKKKRRV (SEQ ID №: 601). В некоторых вариантах осуществления изобретения NLS может быть двухкомпонентной последовательностью, такой как NLS нуклеоплазмина, KRPAATKKAGQAKKKK (SEQ ID №: 602). В конкретном варианте осуществления изобретения единственная PKKKRKV (SEQ ID №: 600) NLS может быть связана с С-концом управляемого РНК ДНК-связывающего агента. Один или более линкеров необязательно включены в сайт слияния.

[00517] В некоторых вариантах осуществления изобретения гетерологичный функциональный домен может быть способен модифицировать внутриклеточный период полувыведения управляемого РНК ДНК-связывающего агента. В некоторых вариантах осуществления изобретения период полувыведения управляемого РНК ДНК-связывающего агента может быть увеличен. В некоторых вариантах осуществления изобретения период полувыведения управляемого РНК ДНК-связывающего агента может быть снижен. В некоторых вариантах осуществления изобретения гетерологичный функциональный домен может быть способен увеличивать стабильность управляемого РНК ДНК-связывающего агента. В некоторых вариантах осуществления изобретения гетерологичный функциональный домен может быть способен снижать стабильность управляемого РНК ДНК-связывающего агента. В некоторых вариантах осуществления изобретения гетерологичный функциональный домен может действовать как сигнальный пептид для деградации белка. В некоторых вариантах осуществления изобретения деградация белка может быть опосредована протеолитическими ферментами, такими как, например, протеасомы, лизосомальные протеазы и кальпаиновые протеазы. В некоторых вариантах осуществления изобретения гетерологичный функциональный домен может содержать последовательность PEST. В некоторых вариантах осуществления изобретения управляемый РНК ДНК-связывающий агент может быть модифицирован путем добавления убиквитиновой или полиубиквитиновой цепи. В некоторых вариантах осуществления изобретения убиквитин может представлять собой убиквитин-подобный белок (UBL). Неограничивающие примеры убиквитин-подобных белков включают малый убиквитин-

подобный модификатор (SUMO), убиквитиновый перекрестно-реактивный белок (UCRP, также известный как стимулированный интерфероном ген-15 (ISG15)), родственный убиквитину модификатор-1 (URM1), экспрессируемый нейрональными клетками-предшественниками, подавляемый в процессе развития белок-8 (NEDD8, также называемый Rub1 в *S. cerevisiae*), F-связанный лейкоцитарный антиген человека (FAT10), аутофагию-8 (ATG8) и -12 (ATG12), Fau убиквитин-подобный белок (FUB1), закрепленный на мембране UBL (MUB), убиквитин-подобный модификатор-1 (UFM1) и убиквитин-подобный белок-5 (UBL5).

[00518] В некоторых вариантах осуществления изобретения гетерологичный функциональный домен может представлять собой маркерный домен. Неограничивающие примеры маркерных доменов включают флуоресцентные белки, тэги очистки, тэги эпитопов и последовательности репортерных генов. В некоторых вариантах осуществления изобретения маркерный домен может представлять собой флуоресцентный белок. Неограничивающие примеры пригодных флуоресцентных белков включают зеленые флуоресцентные белки (например, GFP, GFP-2, tagGFP, turboGFP, sfGFP, EGFP, Emerald, Azami Green, мономерный Azami Green, CopGFP, AceGFP, ZsGreen1), желтые флуоресцентные белки (например, YFP, EYFP, Citrine, Venus, YPet, PhiYFP, ZsYellow1), синие флуоресцентные белки (например, EBFP, EBFP2, Azurite, mKalamal, GFPuv, Sapphire, T-sapphire), голубые флуоресцентные белки (например, ECFP, Cerulean, CyPet, AmCyan1, Midoriishi-Cyan), красные флуоресцентные белки (например, mKate, mKate2, mPlum, мономер DsRed, mCherry, mRFP1, DsRed-Express, DsRed2, DsRed-мономер, HcRed-тандем, HcRed1, AsRed2, eqFP611, mRaspberry, mStrawberry, Jred) и оранжевые флуоресцентные белки (mOrange, mKO, Kusabira-Orange, мономерный Kusabira-Orange, mTangerine, tdTomato) или любой другой пригодный флуоресцентный белок. В других вариантах осуществления изобретения маркерный домен может представлять собой тэг очистки и/или тэг эпитопа. Неограничивающие примеры тэгов включают глутатион-S-трансферазу (GST), хитин-связывающий белок (CBP), мальтоза-связывающий белок (MBP), тиоредоксин (TRX), поли(NANP), тэг тандемной очистки по аффинности (TAP), мус, AcV5, AU1, AU5, E, ECS, E2, FLAG, HA, nus, Softag 1, Softag 3, Strep, SBP, Glu-Glu, HSV, KT3, S, S1, T7, V5, VSV-G, 6xHis, 8xHis, белок-переносчик биотин-карбоксила (BCCP), поли-His и калмодулин. Неограничивающие иллюстративные репортерные гены включают глутатион-S-трансферазу (GST), пероксидазу хрена (HRP), хлорамфениколацетилтрансферазу (CAT), бета-галактозидазу, бета-глюкуронидазу, люциферазу или флуоресцентные белки.

[00519] В дополнительных вариантах осуществления изобретения гетерологичный функциональный домен может нацеливать управляемый РНК ДНК-связывающий агент на конкретную органеллу, тип клеток, ткань или орган. В некоторых вариантах осуществления изобретения гетерологичный функциональный домен может нацеливать управляемый РНК ДНК-связывающий агент на митохондрию.

[00520] В дополнительных вариантах осуществления изобретения гетерологичный функциональный домен может представлять собой эффекторный домен. Когда

управляемый РНК ДНК-связывающий агент нацелен на свою целевую последовательность, например, когда нуклеаза Cas нацелена на целевую последовательность посредством гРНК, эффекторный домен может модифицировать или влиять на целевую последовательность. В некоторых вариантах осуществления изобретения эффекторный домен может быть выбран из домена, связывающего нуклеиновую кислоту, нуклеазного домена (например, нуклеазного домена, отличного от домена Cas), домена эпигенетической модификации, домена транскрипционной активации или домена транскрипционного подавления. В некоторых вариантах осуществления изобретения гетерологичный функциональный домен представляет собой нуклеазу, такую как нуклеаза FokI. См., например, в патенте США № 9 023 649. В некоторых вариантах осуществления изобретения гетерологичный функциональный домен представляет собой транскрипционный активатор или репрессор. См., например, Qi et al., “Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression,” *Cell* 152:1173-83 (2013); Perez-Pinera et al., “RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors,” *Nat. Methods* 10:973-6 (2013); Mali et al., “CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering,” *Nat. Biotechnol.* 31:833-8 (2013); Gilbert et al., “CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes,” *Cell* 154:442-51 (2013). Таким образом, управляемый РНК ДНК-связывающий агент по существу становится транскрипционным фактором, который может быть направлен на связывание с желаемой целевой последовательностью с использованием гидовой РНК.

Определение эффективности гРНК

[00521] В некоторых вариантах осуществления изобретения эффективность гРНК определяют при доставке или экспрессии вместе с другими компонентами, образующими RNP. В некоторых вариантах осуществления изобретения гРНК экспрессируется вместе с управляемым РНК ДНК-связывающим агентом, таким как белок Cas, например Cas9. В некоторых вариантах осуществления изобретения гРНК доставляют или она экспрессируется в клеточной линии, которая уже стабильно экспрессирует управляемую РНК нуклеазу ДНК, такую как нуклеаза или никаза Cas, например нуклеаза или никаза Cas9. В некоторых вариантах осуществления изобретения гРНК доставляют в клетку как часть RNP. В некоторых вариантах осуществления изобретения гРНК доставляют в клетку вместе с мРНК, кодирующей управляемую РНК нуклеазу ДНК, такую как нуклеаза или никаза Cas, например нуклеаза или никаза Cas9.

[00522] Как описано в данном документе, применение управляемой РНК нуклеазы ДНК и гидовой РНК, раскрытой в данном документе, может приводить к двухцепочечным разрывам (DSB), одноцепочечному разрыву и/или сайт-специфическому связыванию, которое приводит к модификации нуклеиновой кислоты в ДНК, которая может продуцировать ошибки в форме мутаций вставок/делеций (вставки-делеции) при восстановлении клеточного механизма. Много мутаций вследствие вставок-делеций изменяют рамку считывания или вводят преждевременные стопкодоны, и следовательно, продуцируют нефункциональные белки.

[00523] В некоторых вариантах осуществления изобретения эффективность конкретных гРНК определяют на основании моделей *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления изобретения модель *in vitro* представляет собой клетки НЕК293, стабильно экспрессирующие Cas9 (НЕК293_Cas9). В некоторых вариантах осуществления изобретения модель *in vitro* представляет собой клетки гепатокарциномы человека HUH7. В некоторых вариантах осуществления изобретения модель *in vitro* представляет собой клетки HepG2. В некоторых вариантах осуществления изобретения модель *in vitro* представляет собой первичные гепатоциты человека. В некоторых вариантах осуществления изобретения модель *in vitro* представляет собой первичные гепатоциты яванского макака. По отношению к использованию первичных гепатоцитов человека доступные первичные гепатоциты можно использовать для обеспечения большей согласованности между экспериментами. В некоторых вариантах осуществления изобретения определяют количество нецелевых сайтов, в которых происходит вставка или делеция в модели *in vitro* (например, в первичных гепатоцитах человека), например, путем анализа геномной ДНК из первичных гепатоцитов человека, трансфицированных *in vitro* с использованием мРНК Cas9 и гидовой РНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения такое определение включает анализ геномной ДНК из первичных гепатоцитов человека, трансфицированных *in vitro* с помощью мРНК Cas9, гидовой РНК и донорного олигонуклеотида. Иллюстративные методики для таких определений представлены в рабочих примерах ниже.

[00524] В некоторых вариантах осуществления изобретения эффективность конкретной гРНК определяют по нескольким клеточным моделям *in vitro* для процесса отбора гРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения осуществляют сравнение данных в различных клеточных линиях с выбранными гРНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения осуществляют перекрестный скрининг в нескольких клеточных моделях. В некоторых вариантах осуществления изобретения эффективность конкретной гРНК определяют в РНН или РСН для процесса отбора гРНК.

[00525] В некоторых вариантах осуществления изобретения эффективность конкретных гРНК определяют на основании моделей *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления изобретения *in vivo* модель представляет собой модель на крысах. В некоторых вариантах осуществления изобретения модель на крысах представляет собой мышь, которая экспрессирует ген *KLKB1*. В некоторых вариантах осуществления изобретения модель на крысах представляет собой мышь, которая экспрессирует ген *KLKB1* человека. В некоторых вариантах осуществления изобретения модель *in vivo* представляет собой нечеловекообразную обезьяну, например яванского макака.

[00526] В некоторых вариантах осуществления изобретения эффективность гидовой РНК измеряют в процентах редактирования *KLKB1*. Процент вставок-делеций может быть рассчитан из секвенирования NGS. В некоторых вариантах осуществления изобретения процент редактирования *KLKB1* сравнивают с процентом редактирования, необходимым для достижения нокдауна белка прекалликреина и/или калликреина, например, из среды

клеточной культуры или клеточных лизатов в случае *in vitro* модели или плазмы, характеризующейся уровнями в кровотоке, в случае моделей *in vivo*.

[00527] В некоторых вариантах осуществления изобретения эффективность гидовой РНК измеряют по количеству и/или частоте вставок-делений в нецелевых последовательностях в геноме клеток-мишеней. В некоторых вариантах осуществления изобретения представлены эффективные гидовые РНК, которые продуцируют вставки-деления в нецелевых сайтах при очень низких частотах (например, <5%) в клеточной популяции и/или относительно частоты создания вставок-делений в целевом сайте. Таким образом, в изобретении предложены гидовые РНК, которые не демонстрируют образования вставок-делений в клетках-мишенях (например, гепатоцит, такой как РНН), или которые продуцируют частоту образования нецелевых вставок-делений <5% в клеточной популяции и/или относительно частоты создания вставок-делений в целевом сайте. В некоторых вариантах осуществления в изобретении предложены гидовые РНК, которые не демонстрируют какого-либо образования нецелевых вставок-делений в клетках-мишенях (например, гепатоците). В некоторых вариантах осуществления изобретения представлены гидовые РНК, которые продуцируют вставки-деления в менее чем 5 нецелевых сайтах, например, как оценено с помощью одного или более способов, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления изобретения представлены гидовые РНК, которые продуцируют вставки-деления в менее чем или 4, 3, 2 или 1 нецелевом сайте(-ах), например, как оценено с помощью одного или более способов, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления изобретения нецелевой сайт(-ы) не возникает в области, кодирующей белок, в геноме клетки-мишени (например, гепатоците).

[00528] В некоторых вариантах осуществления изобретения используют линейную амплификацию для обнаружения событий редактирования генома, таких как образование мутаций вставка/делеция («вставка-делеция»), транслокации и восстановление, направляемое гомологией, (HDR) в целевой ДНК. Например, можно применять линейную амплификацию с уникальным праймером, тэгированным последовательностью, и выделение тэгированных продуктов амплификации (в данном документе также называют способ «UnIT» или «уникального идентификатора тэгирования»).

[00529] В некоторых вариантах осуществления изобретения эффективность гидовой РНК определяют путем измерения уровней KLKB1, pKal, общего KLKB1 (прекалликреин+pKal), активности KLKB1, HMWK, активности HMWK и/или брадикинина в таком образце, как жидкости организма, например сыворотка, плазма или кровь.

[00530] В некоторых вариантах осуществления изобретения эффективность гидовой РНК определяют путем измерения уровней мРНК KLKB1. Снижение уровней мРНК KLKB1 является индикатором эффективной гидовой РНК.

[00531] В некоторых вариантах осуществления изобретения эффективность гидовой РНК определяют путем измерения уровней брадикинина в таком образце, как жидкости организма, например сыворотка, плазма или кровь.

[00532] В некоторых вариантах осуществления изобретения эффективность гидовой РНК определяют путем измерения уровней брадикинина и/или продуктов его деградации в образце. В некоторых вариантах осуществления изобретения эффективность гидовой РНК определяют путем измерения уровней брадикинина и/или продуктов его деградации в сыворотке или плазме. Снижение уровней брадикинина и/или продуктов его деградации в сыворотке или плазме является индикатором эффективной гидовой РНК.

[00533] Один способ определения брадикинина в кровотоке представлен в Ferreira, et al., Br. J. Pharmac. Chemother. (1967), 29, 367-377. Брадикинин также можно определять с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) с использованием среды клеточной культуры или сыворотки или плазмы. (См., например, Abcam Cat. No. ab136936; Markit-M Bradykinin (Gentaur)). В некоторых вариантах осуществления изобретения уровни брадикинина измеряют в тех же *in vitro* или *in vivo* системах или моделях, что и для измерения редактирования. В некоторых вариантах осуществления изобретения уровни брадикинина измеряют в клетках, например первичных гепатоцитах человека. В некоторых вариантах осуществления изобретения уровни брадикинина измеряют в такой жидкости, как сыворотка или плазма. В некоторых вариантах осуществления изобретения измеряют уровни брадикинина в кровотоке.

[00534] В некоторых вариантах осуществления изобретения эффективность гидовой РНК определяют путем измерения уровней общего калликреина (прекалликреина и калликреина плазмы (pKal)) в образце. В некоторых вариантах осуществления изобретения эффективность гидовой РНК определяют путем измерения уровней общего калликреина в таком образце, как жидкости организма, например сыворотка, плазма или кровь. В некоторых вариантах осуществления изобретения эффективность гидовой РНК определяют путем измерения уровней общего калликреина в сыворотке или плазме. Снижение уровней общего калликреина в сыворотке или плазме является индикатором эффективной гидовой РНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения общий калликреин в сыворотке и/или плазме снижен ниже 40% от исходного уровня. В некоторых вариантах осуществления изобретения уровни общего калликреина измеряют с использованием твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) со средой клеточной культуры, или сывороткой, или плазмой. В некоторых вариантах осуществления изобретения уровни общего калликреина измеряют в тех же *in vitro* или *in vivo* системах или моделях, что и для измерения редактирования. В некоторых вариантах осуществления изобретения уровни общего калликреина измеряют в клетках, например первичных гепатоцитах человека. В некоторых вариантах осуществления изобретения уровни общего калликреина измеряют в клетках РНН и РСН.

[00535] В некоторых вариантах осуществления изобретения эффективность гидовой РНК определяют путем измерения уровней прекалликреина и/или калликреина в таком образце, как жидкости организма, например сыворотка, плазма или кровь. В некоторых вариантах осуществления изобретения эффективность гидовой РНК определяют путем измерения уровней общего прекалликреина и/или калликреина в сыворотке или плазме.

Снижение уровней прекалликреина и/или калликреина в сыворотке или плазме является индикатором эффективной гидовой РНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения уровни прекалликреина и/или калликреина измеряют с использованием твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) со средой клеточной культуры, или сывороткой, или плазмой. В некоторых вариантах осуществления изобретения уровни прекалликреина и/или калликреина измеряют в *in vitro* или *in vivo* системах или моделях, что и для измерения редактирования. В некоторых вариантах осуществления изобретения уровни прекалликреина и/или калликреина измеряют в клетках, например первичных гепатоцитах человека, в плазме или в среде клеточной культуры. В некоторых вариантах осуществления изобретения уровни прекалликреина и/или калликреина измеряют из образцов плазмы. В некоторых вариантах осуществления изобретения уровни прекалликреина и/или калликреина измеряют из образцов сыворотки. Уровни прекалликреина и/или белка рK_{al} необязательно измеряют с помощью ELISA после стадии активации для превращения прекалликреина в его активную форму, рK_{al}.

[00536] В некоторых вариантах осуществления изобретения эффективность гидовой РНК определяют путем измерения уровней прекалликреина в образце. В некоторых вариантах осуществления изобретения эффективность гидовой РНК определяют путем измерения уровней прекалликреина в таком образце, как жидкости организма, например сыворотка, плазма или кровь. В некоторых вариантах осуществления изобретения эффективность гидовой РНК определяют путем измерения уровней прекалликреина в сыворотке или плазме. Снижение уровней прекалликреина в сыворотке или плазме является индикатором эффективной гидовой РНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения прекалликреин сыворотки и/или плазмы снижен по меньшей мере на 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% или более. В некоторых вариантах осуществления изобретения общий калликреин, прекалликреин и/или калликреин в сыворотке и/или плазме снижен на около 60-80%, 60-90%, 60-95%, 60-100%, 85-95% или 85-100%. В некоторых вариантах осуществления изобретения уровни прекалликреина измеряют с использованием твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) со средой клеточной культуры, или сывороткой, или плазмой. В некоторых вариантах осуществления изобретения уровни прекалликреина измеряют в *in vitro* или *in vivo* системах или моделях, что и для измерения редактирования. В некоторых вариантах осуществления изобретения уровни прекалликреина измеряют в клетках, например первичных гепатоцитах человека, в плазме или в среде клеточной культуры. В некоторых вариантах осуществления изобретения уровни прекалликреина измеряют из образцов плазмы. В некоторых вариантах осуществления изобретения уровни прекалликреина измеряют из образцов сыворотки.

[00537] В некоторых вариантах осуществления изобретения эффективность гидовой РНК определяют путем измерения уровней рK_{al} в образце. В некоторых вариантах осуществления изобретения эффективность гидовой РНК определяют путем измерения уровней рK_{al} в сыворотке или плазме. Снижение уровня рK_{al} в сыворотке или плазме является индикатором эффективной гидовой РНК. В некоторых вариантах осуществления

изобретения уровень pK_{al} снижен по меньшей мере на 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% или более. В некоторых вариантах осуществления изобретения pK_{al} в сыворотке и/или плазме снижен на около 60-80%, 60-90%, 60-95%, 60-100%, 85-95% или 85-100%. В некоторых вариантах осуществления изобретения уровни pK_{al} измеряют с использованием твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) со средой клеточной культуры, или сывороткой, или плазмой. В некоторых вариантах осуществления изобретения уровни pK_{al} измеряют в *in vitro* или *in vivo* системах или моделях, что и для измерения редактирования. В некоторых вариантах осуществления изобретения уровни pK_{al} измеряют в клетках, например первичных гепатоцитах человека, в плазме или в среде клеточной культуры. В некоторых вариантах осуществления изобретения уровни pK_{al} измеряют из образцов плазмы. В некоторых вариантах осуществления изобретения уровни pK_{al} измеряют из образцов сыворотки.

[00538] В некоторых вариантах осуществления изобретения эффективность гидовой РНК определяют путем измерения уровней расщепленного HMWK (сHMWK) в кровотоке и общего HMWK в цитратной сыворотке или цитратной плазме. В некоторых вариантах осуществления изобретения эффективность гидовой РНК определяют путем измерения уровней расщепленного HMWK (сHMWK) в кровотоке и общего HMWK в сыворотке или плазме. Снижение доли расщепленного HMWK по сравнению с общим HMWK является индикатором эффективной гидовой РНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения доля расщепленного HMWK по сравнению с общим HMWK может нацеливаться на соотношение сHMWK в плазме кровотока и общего HMWK, составляющее менее около 60%. В некоторых вариантах осуществления изобретения соотношение сHMWK к HMWK составляет менее около 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 50% или более. В некоторых вариантах осуществления изобретения уровни прекалликреина измеряют с использованием вестерн-блоттинга со средой клеточной культуры, или сывороткой, или плазмой. В некоторых вариантах осуществления изобретения уровни сHMWK и общего HMWK измеряют в *in vitro* или *in vivo* системах или моделях, что и для измерения редактирования. В некоторых вариантах осуществления изобретения уровни сHMWK и общего HMWK измеряют в клетках, например первичных гепатоцитах человека, в плазме или в среде клеточной культуры. В некоторых вариантах осуществления изобретения уровни сHMWK и общего HMWK измеряют из образца плазмы. В некоторых вариантах осуществления изобретения уровни сHMWK и общего HMWK измеряют из образца сыворотки.

[00539] В некоторых вариантах осуществления изобретения эффективность гидовой РНК определяют путем измерения активности pK_{al} в образце. Снижение активности KLKB1 является индикатором эффективной гидовой РНК. В некоторых вариантах осуществления изобретения эффективность гидовой РНК определяют путем измерения активности pK_{al} в сыворотке или плазме.

[00540] В некоторых вариантах осуществления изобретения активность pK_{al} измеряют как способность образца цитратной сыворотки или образца цитратной плазмы

превращать HMWK в сHMWK (см. Banerji et al., N Engl J Med 2017;376:717-28.). Снижение конечной доли сHMWK по отношению к общему HMWK указывает на снижение активности pK_{al}. Уровни сHMWK и HMWK полной длины можно измерить с помощью вестерн-блоттинга. В других вариантах осуществления изобретения активность pK_{al} измеряют как способность образца цитратной сыворотки или образца цитратной плазмы ферментативно расщеплять HMWK-подобный пептидный субстрат, в случае которого снижение расщепления субстрата указывает на снижение активности pK_{al}.

[00541] В некоторых вариантах осуществления изобретения активность pK_{al} снижена по меньшей мере на 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% или более. В некоторых вариантах осуществления изобретения активность pK_{al} снижена на около 60-80%, 60-90%, 60-95%, 60-100%, 85-95% или 85-100%. В некоторых вариантах осуществления изобретения активность pK_{al} снижена до менее чем около 40% от исходных уровней. В некоторых вариантах осуществления изобретения активность pK_{al} снижена до около 40-50% от исходных уровней. В некоторых вариантах осуществления изобретения активность pK_{al} снижена до 20-40 или 20-50% от исходных уровней. В некоторых вариантах осуществления изобретения уровни активности pK_{al} измеряют в *in vitro* или *in vivo* системах или моделях, что и для измерения редактирования. В некоторых вариантах осуществления изобретения уровни активности pK_{al} измеряют в клетках, например первичных гепатоцитах человека, в плазме или в среде клеточной культуры. В некоторых вариантах осуществления изобретения уровни активности pK_{al} измеряют из образцов плазмы. В некоторых вариантах осуществления изобретения уровни pK_{al} измеряют из образцов сыворотки.

Терапевтические способы

[00542] гРНК и связанные способы и композиции, раскрытые в данном документе, пригодны при лечении или профилактике НАЕ и при профилактике симптомов НАЕ. В некоторых вариантах осуществления изобретения гРНК и связанные способы и композиции пригодны для снижения частоты приступов НАЕ. В некоторых вариантах осуществления изобретения гРНК и связанные способы и композиции пригодны для профилактики приступов НАЕ. В некоторых вариантах осуществления изобретения гРНК, раскрытые в данном документе, пригодны при лечении и профилактике продуцирования и накопления брадикинина, отека, индуцированного брадикинином, обструкции дыхательных путей, вызванной ангионевротическим отеком, или асфиксии. В некоторых вариантах осуществления изобретения гРНК, раскрытые в данном документе, пригодны при лечении или профилактике ангионевротического отека и приступов, вызванных НАЕ. В некоторых вариантах осуществления изобретения гРНК, раскрытая в данном документе, пригодна для снижения частоты приступов ангионевротического отека, таких как приступы НАЕ. В некоторых вариантах осуществления изобретения гРНК, раскрытая в данном документе, пригодна для снижения тяжести приступов ангионевротического отека. В некоторых вариантах осуществления изобретения гРНК, раскрытая в данном документе, пригодна для снижения частоты и/или тяжести приступов, таких как приступы НАЕ. В некоторых

вариантах осуществления изобретения гРНК, раскрытая в данном документе, пригодна для достижения ремиссии приступов ангионевротического отека, таких как приступы НАЕ. В некоторых вариантах осуществления изобретения гРНК, раскрытые в данном документе, пригодны для достижения длительной ремиссии, например, поддерживаемой в течение по меньшей мере 1 месяца, 2 месяцев, 4 месяцев, 6 месяцев, 1 года, 2 лет, 5 лет, 10 лет или более.

[00543] гРНК и связанные способы и композиции, раскрытые в данном документе, пригодны для снижения продуцирования мРНК KLKB1. Следовательно, в одном аспекте эффективность лечения/профилактики можно оценить путем измерения уровней мРНК KLKB1, при этом снижение уровней мРНК KLKB1 указывает на эффективность.

[00544] гРНК и связанные способы и композиции, раскрытые в данном документе, пригодны для снижения уровней белка прекалликреина в плазме или сыворотке. Следовательно, в одном аспекте эффективность лечения/профилактики можно оценить путем измерения уровней белка прекалликреина или общих уровней белка калликреина, при этом снижение белка прекалликреина и/или калликреина указывает на эффективность. В некоторых вариантах осуществления изобретения эффективность лечения/профилактики можно оценить путем измерения белка прекалликреина в образце, таком как сыворотка или плазма, при этом снижение прекалликреина указывает на эффективность. Например, прекалликреин плазмы или сыворотки можно измерить с помощью ELISA, как описано в Ferrone JD, Bhattacharjee G, Revenko AS, et al. IONIS-PKK_{RX} a Novel Antisense Inhibitor of Prekallikrein and Bradykinin Production. *Nucleic Acid Ther.* 2019;29(2):82-91. Подобным образом, калликреин можно измерить с помощью ELISA, как описано в данном документе, а введение гРНК, раскрытого в данном документе, может снизить уровни белка калликреина в плазме или сыворотке.

[00545] гРНК и связанные способы и композиции, раскрытые в данном документе, пригодны для снижения уровней общего белка калликреина (прекалликреина и рKal) в плазме или сыворотке. Следовательно, в одном аспекте эффективность лечения/профилактики можно оценить путем измерения уровней общего белка калликреина (прекалликреина и рKal), при этом снижение общего белка калликреина указывает на эффективность. Общий калликреин, прекалликреин и/или калликреин можно измерять до или после активации для высвобождения калликреина плазмы. В некоторых вариантах осуществления изобретения эффективность лечения/профилактики можно оценить путем измерения белка прекалликреина и/или рKal в образце, таком как сыворотка или плазма, при этом снижение белка прекалликреина указывает на эффективность. В некоторых вариантах осуществления изобретения эффективность лечения/профилактики можно оценить путем измерения белка рKal в образце, таком как сыворотка или плазма, при этом снижение белка рKal указывает на эффективность. Например, уровни белка прекалликреина и рKal можно измерить с помощью ELISA, например с использованием набора ELISA для прекалликреина и калликреина человека (Abcam, Eugene, OR). Уровни

прекалликреина и/или белка рКал необязательно измеряют с помощью ELISA после стадии активации для превращения прекалликреина в его активную форму, рКал.

[00546] гРНК и связанные способы и композиции, раскрытые в данном документе, пригодны для снижения доли расщепленного HMWK (сHMWK) в кровотоке в сравнении с общим HMWK в цитратной сыворотке или цитратной плазме. Следовательно, в одном аспекте эффективность лечения/профилактики можно оценить путем измерения общих уровней белков HMWK и сHMWK, при этом снижение доли расщепленного HMWK указывает на эффективность. В некоторых вариантах осуществления изобретения эффективность лечения/профилактики можно оценить путем измерения общих уровней белков HMWK и сHMWK в образце, таком как сыворотка или плазма, при этом снижение доли сHMWK указывает на эффективность. Например, доля сHMWK по сравнению с HMWK в образцах цитратной сыворотки или цитратной плазмы можно измерить с помощью вестерн-блоттинга, как описано в Suffritti C, Zanichelli A, Maggioni L, Bonanni E, Cugno M, Cicardi M. High-molecular weight kininogen cleavage correlates with disease states in the bradykinin-mediated angioedema due to hereditary C1-inhibitor deficiency. Clin Exp Allergy 2014;44:1503-14 и в Banerji A, Busse P, Shennak M, et al. Inhibiting plasma kallikrein for hereditary angioedema prophylaxis. N Engl J Med 2017;376:717-28.

[00547] Уровни сHMWK в плазме ниже около 30% от общего HMWK были связаны с уменьшением приступов НАЕ у пациентов, которых лечили ланаделумабом (см. Banerji, et al, 2017). В этом исследовании здоровые контрольные субъекты обладали уровнями в плазме сHMWK около 8,3% от общего HMWK. В другом исследовании Suffritti и коллеги обнаружили уровни сHMWK в плазме в среднем около 34,8% у здоровых контрольных субъектов, около 41,4% у пациентов с НАЕ в ремиссии и около 58,1% у пациентов с НАЕ во время приступа (Suffritti, et al. Clin Exp Allergy 2014;44:1503-14). Следовательно, в некоторых вариантах осуществления изобретения гРНК и связанные способы и композиции, раскрытые в данном документе, пригодны для снижения уровней сHMWK в кровотоке, так что субъект демонстрирует снижение количества приступов НАЕ. В некоторых вариантах осуществления изобретения гРНК и связанные способы и композиции, раскрытые в данном документе, пригодны для снижения доли сHMWK в цитратной плазме субъекта до ниже 30%. В некоторых вариантах осуществления изобретения гРНК и связанные способы и композиции, раскрытые в данном документе, пригодны для снижения доли сHMWK в цитратной плазме субъекта до ниже 30%, 20% и/или 10%. В некоторых вариантах осуществления изобретения гРНК и связанные способы и композиции, раскрытые в данном документе, пригодны для снижения доли сHMWK в цитратной плазме субъекта до приблизительно тех, которые наблюдаются у здоровых контрольных субъектов.

[00548] гРНК и связанные способы и композиции, раскрытые в данном документе, могут быть пригодны для снижения самопроизвольной активности рКал в сыворотке или плазме. Следовательно, в одном аспекте эффективность лечения/профилактики можно оценить путем измерения самопроизвольной активности рКал, при этом снижение

самопроизвольной активности pKal указывает на эффективность. В некоторых вариантах осуществления изобретения эффективность лечения/профилактики можно оценить путем измерения самопроизвольной активности pKal в образце, таком как сыворотка или плазма, при этом снижение самопроизвольной активности pKal указывает на эффективность. В некоторых вариантах осуществления изобретения гРНК и связанные способы и композиции, раскрытые в данном документе, пригодны для снижения исходного уровня pKal в кровотоке и активности pKal в кровотоке.

[00549] гРНК и связанные способы и композиции, раскрытые в данном документе, могут быть пригодны для снижения индуцируемой активности pKal в сыворотке или плазме. Следовательно, в одном аспекте эффективность лечения/профилактики можно оценить путем измерения индуцируемой активности pKal, при этом снижение индуцируемой активности pKal указывает на эффективность. В некоторых вариантах осуществления изобретения эффективность лечения/профилактики можно оценить путем измерения индуцируемой активности pKal в образце, таком как сыворотка или плазма, при этом снижение индуцируемой активности pKal указывает на эффективность. В некоторых примерах активность pKal может быть индуцирована путем подвергания образца воздействию FXIIa (см. Banerji et al., *N Engl J Med* 2017;376:717-28.) В некоторых примерах активность pKal может быть индуцирована путем инкубации образца с декстрансульфатом (см. Ferrone, et al. *Nucleic Acid Ther.* 2019;29(2):82-91.) В некоторых примерах активность pKal может быть индуцирована путем добавления эллаговой кислоты к образцу (Aygören-Pürsün, et al. *J Allergy Clin Immunol* 2016; 138: 934-936.)

[00550] В некоторых примерах активность pKal измеряют как способность образца цитратной сыворотки или образца цитратной плазмы превращать HMWK в сHMWK (см. Banerji et al., *N Engl J Med* 2017;376:717-28.), при этом снижение конечной доли сHMWK к общему HMWK указывает на снижение активности pKal. Долю сHMWK и HMWK полной длины можно измерить путем вестерн-блоттинга, например, как описано Suffritti, et al. *Clin Exp Allergy* 2014;44:1503-14. В других примерах активность pKal измеряют как способность образца цитратной сыворотки или образца цитратной плазмы ферментативно расщеплять HWMK-подобный пептидный субстрат, в случае которого снижение расщепления субстрата указывает на снижение активности pKal. В одном примере пептидный субстрат может представлять собой хромогенный субстрат пептид H-D-Pro-Phe-Arg-p-нитроанилид (Bachem, кат. L-2120) и расщепление можно измерить как изменение A405 (см. Defendi et al, *PLoS One* 2013;8:e70140). В другом примере пептидный субстрат может представлять собой флуорогенный субстрат H-Pro-Phe-Arg-AMC (Sigma, кат. № P9273), и расщепление можно измерить как изменение флуоресценции при длинах волн возбуждения и эмиссии 360 и 480 нм, соответственно (см. Banerji, et al., *N Engl J Med* 2017;376:717-28).

[00551] В одном исследовании снижение индуцированной активности pKal на более чем 40% было связано со снижением приступов НАЕ (Banerji, et al., *N Engl J Med* 2017;376:717-28). Снижение индуцированной активности pKal на более чем 50% было связано со снижением приступов НАЕ при лечении BCX7353 (Aygören-Pürsün, et al., *N Engl*

J Med 2018; 379:352-362). Снижение индуцированной активности pK_{al} на более чем 60% было связано со снижением приступов при лечении ланаделумабом (Banerji, et al., *N Engl J Med* 2017;376:717-28). Соответственно, в некоторых вариантах осуществления изобретения введение гРНК и композиций, описанных в данном документе, пригодны для снижения активности калликрейна, например общего калликрейна, прекалликрейна и/или активности pK_{al}, так что субъект демонстрирует меньше приступов НАЕ.

[00552] В некоторых вариантах осуществления изобретения гРНК и композиции, раскрытые в данном документе, снижают активность pK_{al} субъекта до менее около 40% от исходных уровней. В некоторых вариантах осуществления изобретения гРНК и композиции, раскрытые в данном документе, снижают активность pK_{al} субъекта до около 40-50% от исходных уровней. В некоторых вариантах осуществления изобретения гРНК и композиции, раскрытые в данном документе, снижают активность pK_{al} субъекта до 20-40% или 20-50% от исходных уровней.

[00553] В некоторых вариантах осуществления изобретения любая одна или более из гРНК, композиций или фармацевтических составов, описанных в данном документе, предназначена для применения в получении лекарственного препарата для лечения или профилактики заболевания или расстройства у субъекта. В некоторых вариантах осуществления изобретения лечение и/или профилактика связана с однократной дозой, например однократным лечением, лекарственного препарата/композиции. В некоторых вариантах осуществления изобретения заболевание или расстройство представляет собой НАЕ.

[00554] В некоторых вариантах осуществления изобретения изобретение включает способ лечения или профилактики заболевания или расстройства у субъекта, включающий введение любого из одного или более из гРНК, композиций или фармацевтических составов, раскрытых в данном документе. В некоторых вариантах осуществления изобретения заболевание или расстройство представляет собой НАЕ. В некоторых вариантах осуществления изобретения гРНК, композиции или фармацевтические составы, описанные в данном документе, вводят в виде единой дозы, например, в одно время. В некоторых вариантах осуществления изобретения однократная доза обеспечивает длительное лечение и/или профилактику. В некоторых вариантах осуществления изобретения способ обеспечивает длительное лечение и/или профилактику. Длительное лечение и/или профилактика, как используется в данном документе, включает лечение и/или профилактику, которая превосходит по меньшей мере i) 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 недель; ii) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 18, 24, 30 или 36 месяцев; или iii) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 лет. В некоторых вариантах осуществления изобретения однократная доза гРНК, композиций или фармацевтических составов, описанных в данном документе, достаточна для лечения и/или профилактики любого из показаний, описанных в данном документе, в течение всей жизни субъекта.

[00555] В некоторых вариантах осуществления изобретения включает способ или применения модификации (например, создание двухцепочечного разрыва) целевой ДНК,

включающие введение или доставку любого одного или более из гРНК, композиций или фармацевтических составов, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления изобретения целевая ДНК представляет собой ген *KLKB1*. В некоторых вариантах осуществления изобретения целевая ДНК находится в экзоне гена *KLKB1*. В некоторых вариантах осуществления изобретения целевая ДНК находится в экзоне 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 гена *KLKB1*.

[00556] В некоторых вариантах осуществления изобретение включает способ или применение модуляции целевого гена, включающие введение или доставку любого одного или более из гРНК, композиций или фармацевтических составов, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления изобретения модуляция представляет собой редактирование целевого гена *KLKB1*. В некоторых вариантах осуществления изобретения модуляция представляет собой изменение экспрессии белка, кодируемого целевым геном *KLKB1*.

[00557] В некоторых вариантах осуществления изобретения способ или применение приводит к редактированию гена. В некоторых вариантах осуществления изобретения способ или применение приводит к двухцепочечному разрыву в целевом гене *KLKB1*. В некоторых вариантах осуществления изобретения способ или применение приводит к образованию мутаций вставок-делеций при соединении негомологичных концов DSB. В некоторых вариантах осуществления изобретения способ или применение приводит к вставке или делеции нуклеотидов в целевом гене *KLKB1*. В некоторых вариантах осуществления изобретения вставка или делеция нуклеотидов в целевом гене *KLKB1* приводит к мутации рамки сдвига или преждевременному стоп-кодону, который приводит к нефункциональному белку. В некоторых вариантах осуществления изобретения вставка или делеция нуклеотидов в целевом гене *KLKB1* приводит к нокдауну или устранению экспрессии целевого гена.

[00558] В некоторых вариантах осуществления изобретения способ или применение приводит к модуляции гена *KLKB1*. В некоторых вариантах осуществления изобретения модуляция гена *KLKB1* представляет собой снижение экспрессии гена. В некоторых вариантах осуществления изобретения способ или применение приводит к снижению экспрессии белка, кодируемого целевым геном в популяции клеток или *in vivo*.

[00559] В некоторых вариантах осуществления изобретения представлен способ индуцирования двухцепочечного разрыва (DSB) в гене *KLKB1*, включающий введение композиции, содержащей гидовую РНК, содержащую любую одну или более гидовых последовательностей SEQ ID №: 1-149. В некоторых вариантах осуществления изобретения гРНК, содержащую любую одну или более гидовых последовательностей SEQ ID №: 1-149, вводят для индуцирования DSB в гене *KLKB1*. Гидовые РНК можно вводить вместе с управляемой РНК нуклеазой ДНК, такой как нуклеаза Cas (например, Cas9) или мРНК или вектор, кодирующий управляемую РНК нуклеазу ДНК, такую как нуклеазу Cas (например, Cas9).

[00560] В некоторых вариантах осуществления изобретения представлен способ модификации гена *KLKB1*, включающий введение композиции, содержащей гидовую РНК, содержащую любую одну или более гидовых последовательностей SEQ ID №: 1-149. В некоторых вариантах осуществления изобретения гРНК, содержащую любую одну или более гидовых последовательностей SEQ ID №: 1-149, вводят для модификации гена *KLKB1*. Гидовые РНК можно вводить вместе с управляемой РНК нуклеазой ДНК, такой как нуклеаза Cas (например, Cas9) или мРНК или вектор, кодирующий управляемую РНК нуклеазу ДНК, такую как нуклеазу Cas (например, Cas9).

[00561] В некоторых вариантах осуществления изобретения представлен способ лечения или профилактики наследственного ангионевротического отека (НАЕ), включающий введение композиции, содержащей гидовую РНК, содержащую любую одну или более гидовых последовательностей SEQ ID №: 1-149. В некоторых вариантах осуществления изобретения гРНК, содержащую любую одну или более гидовых последовательностей SEQ ID №: 1-149, вводят для лечения или профилактики НАЕ. Гидовые РНК можно вводить вместе с управляемой РНК нуклеазой ДНК, такой как нуклеаза Cas (например, Cas9) или мРНК или вектор, кодирующий управляемую РНК нуклеазу ДНК, такую как нуклеазу Cas (например, Cas9).

[00562] В некоторых вариантах осуществления изобретения представлен способ снижения или устранения продуцирования и накопления брадикинина, включающий введение гидовой РНК, содержащей любую одну или более гидовых последовательностей SEQ ID №: 1-149. Гидовые РНК можно вводить вместе с управляемой РНК нуклеазой ДНК, такой как нуклеаза Cas (например, Cas9) или мРНК или вектор, кодирующий управляемую РНК нуклеазу ДНК, такую как нуклеазу Cas (например, Cas9).

[00563] В некоторых вариантах осуществления изобретения представлен способ лечения или профилактики отека, индуцированного брадикинином, включающий введение гидовой РНК, содержащей любую одну или более гидовых последовательностей SEQ ID №: 1-149. Гидовые РНК можно вводить вместе с управляемой РНК нуклеазой ДНК, такой как нуклеаза Cas (например, Cas9) или мРНК или вектор, кодирующий управляемую РНК нуклеазу ДНК, такую как нуклеазу Cas (например, Cas9).

[00564] В некоторых вариантах осуществления изобретения представлен способ лечения или профилактики ангионевротического отека, индуцированного брадикинином, включающий введение гидовой РНК, содержащей любую одну или более гидовых последовательностей SEQ ID №: 1-149. Гидовые РНК можно вводить вместе с управляемой РНК нуклеазой ДНК, такой как нуклеаза Cas (например, Cas9) или мРНК или вектор, кодирующий управляемую РНК нуклеазу ДНК, такую как нуклеазу Cas (например, Cas9).

[00565] В некоторых вариантах осуществления изобретения представлен способ лечения или профилактики обструкции дыхательных путей и/или асфиксии, включающий введение гидовой РНК, содержащей любую одну или более гидовых последовательностей SEQ ID №: 1-149. Гидовые РНК можно вводить вместе с управляемой РНК нуклеазой ДНК,

такой как нуклеаза Cas (например, Cas9) или мРНК или вектор, кодирующий управляемую РНК нуклеазу ДНК, такую как нуклеаза Cas (например, Cas9).

[00566] В некоторых вариантах осуществления изобретения гРНК, содержащую любую одну или более гидовых последовательностей SEQ ID №: 1-149, вводят для снижения уровней брадикинина в плазме, сыворотке или крови. гРНК можно вводить вместе с управляемой РНК нуклеазой ДНК, такой как нуклеаза Cas (например, Cas9) или мРНК или вектор, кодирующий управляемую РНК нуклеазу ДНК, такую как нуклеазу Cas (например, Cas9).

[00567] В некоторых вариантах осуществления изобретения гРНК, содержащую любую одну или более гидовых последовательностей SEQ ID №: 1-149, вводят для снижения брадикинина в сыворотке или плазме. гРНК можно вводить вместе с управляемой РНК нуклеазой ДНК, такой как нуклеаза Cas (например, Cas9) или мРНК или вектор, кодирующий управляемую РНК нуклеазу ДНК, такую как нуклеазу Cas (например, Cas9).

[00568] В некоторых вариантах осуществления изобретения гРНК, содержащие гидовые последовательности из Таблицы 1, вместе с управляемой РНК нуклеазой ДНК, такой как нуклеаза Cas, индуцирует DSB, и негомологичное соединение концов (NHEJ) при восстановлении приводит к мутации в гене *KLKB1*. В некоторых вариантах осуществления изобретения NHEJ приводит к делеции или вставке нуклеотида(-ов), которые индуцируют сдвиг рамки или нонсенс-мутацию в гене *KLKB1*.

[00569] В некоторых вариантах осуществления изобретения введение гидовых РНК по изобретению (например, в композиции, представленной в данном документе) снижает уровни (например, уровни в сыворотке или плазме) общего калликреина, прекалликреина и/или калликреина у субъекта, и следовательно предотвращает сверхпродуцирование и накопление брадикинина. В некоторых вариантах осуществления изобретения введение гидовых РНК по изобретению (например, в композиции, представленной в данном документе) снижает уровни активности калликреина (например, уровни в сыворотке или плазме) у субъекта, и следовательно предотвращает сверхпродуцирование и накопление брадикинина.

[00570] В некоторых вариантах осуществления изобретения способы, представленные в данном документе, приводят к меньшему количеству приступов, которые включают протекание жидкости через клетки крови в ткани. В некоторых вариантах осуществления изобретения способы, представленные в данном документе, снижают частоту приступов, которые увеличивают отек в тканях органов. В некоторых вариантах осуществления изобретения введение гидовых РНК по изобретению (например, в композиции, представленной в данном документе) снижает частоту или тяжесть приступов ангионевротического отека.

[00571] В некоторых вариантах осуществления изобретения субъект представляет собой млекопитающее. В некоторых вариантах осуществления изобретения субъект представляет собой примата, например человека.

[00572] В некоторых вариантах осуществления изобретения представлено применение гидовых РНК, содержащих любую одну или более из гидовых последовательностей в Таблице 1 или Таблице 2 (например, в композиции, представленной в данном документе) для приготовления лекарственного препарата для лечения субъекта-человека с НАЕ.

[00573] В некоторых вариантах осуществления изобретения гидовые РНК, композиции и составы вводят внутривенно. В некоторых вариантах осуществления изобретения гидовые РНК, композиции и составы вводят путем инфузии. В некоторых вариантах осуществления изобретения гидовые РНК, композиции и составы вводят в кровоток печени.

[00574] В некоторых вариантах осуществления изобретения однократное введение композиции, содержащей гидовую РНК, представленную в данном документе, является достаточным для нокаута экспрессии белка. В других вариантах осуществления изобретения более чем одно введение композиции, содержащей гидовую РНК, представленную в данном документе, может быть полезным для максимизации терапевтических эффектов.

[00575] В некоторых вариантах осуществления изобретения лечение замедляет или останавливает прогрессирование заболевания НАЕ.

[00576] В некоторых вариантах осуществления изобретения лечение замедляет или останавливает прогрессирование ангионевротического отека. В некоторых вариантах осуществления изобретения лечение приводит к улучшению, стабилизации или замедлению изменений симптомов НАЕ.

Доставка композиций гРНК

[00577] Липидные наночастицы (LNP) являются хорошо известным способом доставки нуклеотида и белка и могут использоваться для доставки гидовых РНК, композиций или фармацевтических составов, раскрытых в данном документе. В некоторых вариантах осуществления изобретения LNP доставляют нуклеиновую кислоту, белок или нуклеиновую кислоту вместе с белком.

[00578] В некоторых вариантах осуществления изобретение включает способ доставки любой из гРНК, раскрытых в данном документе, субъекту, при этом гРНК связана с LNP. В некоторых вариантах осуществления изобретения гРНК/LNP также связана с Cas9 или мРНК, кодирующей Cas9.

[00579] В некоторых вариантах осуществления изобретение включает композицию, содержащую любую из раскрытых гРНК и LNP. В некоторых вариантах осуществления изобретения композиция дополнительно содержит Cas9 или мРНК, кодирующую Cas9.

[00580] В некоторых вариантах осуществления изобретения LNP содержит катионные липиды. В некоторых вариантах осуществления изобретения LNP содержат (9Z,12Z)-3-((4,4-бис(октилокси)бутаноил)окси)-2-(((3-(диэтиламино)пропокси)карбонил)окси)метил)пропилоктадека-9,12-диеноат, также называемый 3-((4,4-бис(октилокси)бутаноил)окси)-2-(((3-

(диэтиламино)пропокси)карбонил)окси)метил)пропил-(9Z,12Z)-октадека-9,12-диеноат), или другой ионизируемый липид. См., например, липиды WO/2017/173054 и источники, описанные в указанном документе. В некоторых вариантах осуществления изобретения LNP содержит молярные соотношения катионного липидного амина к РНК-фосфату (N:P), составляющие около 4,5, 5,0, 5,5, 6,0 или 6,5. В некоторых вариантах осуществления изобретения термин катионный и ионизируемый в контексте липидов LNP является взаимозаменяемым, например, при этом ионизируемые липиды являются катионными в зависимости от pH.

[00581] В некоторых вариантах осуществления изобретения LNP, связанные с гРНК, раскрытыми в данном документе, предназначены для применения при получении лекарственного препарата для лечения заболевания или расстройства.

[00582] Электропорация является хорошо известным способом для доставки полезных компонентов, и любую методологию электропорации можно использовать для доставки любой из гРНК, раскрытых в данном документе. В некоторых вариантах осуществления изобретения электропорацию можно использовать для доставки любой из гРНК, раскрытых в данном документе, и Cas9 или мРНК, кодирующей Cas9.

[00583] В некоторых вариантах осуществления изобретение включает способ доставки любой из гРНК, раскрытых в данном документе, в клетку *ex vivo*, при этом гРНК связана с LNP или не связана с LNP. В некоторых вариантах осуществления изобретения гРНК/LNP или гРНК также связана с Cas9 или мРНК, кодирующей Cas9.

[00584] В некоторых вариантах осуществления изобретения композиции гидовых РНК, описанных в данном документе, отдельно или кодируемые одним или более векторами, введены в состав или вводятся посредством липидной наночастицы; см., например, WO/2017/173054 и WO 2019/067992, содержание которых включено в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

[00585] В некоторых вариантах осуществления изобретение содержит ДНК или РНК векторы, кодирующие любую из гидовых РНК, содержащих любую одну или более из гидовых последовательностей, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления изобретения в дополнение к последовательностям гидовых РНК векторы дополнительно содержат нуклеиновые кислоты, которые не кодируют гидовые РНК. Нуклеиновые кислоты, которые не кодируют гидовую РНК, включают, но не ограничиваясь этим, промоторы, энхансеры, регулирующие последовательности и нуклеиновые кислоты, кодирующие управляемую РНК нуклеазу ДНК, которая может представлять собой такую нуклеазу, как Cas9. В некоторых вариантах осуществления изобретения вектор содержит одну или более нуклеотидных последовательностей, кодирующих crRNA, trRNA или crRNA и trRNA. В некоторых вариантах осуществления изобретения вектор содержит одну или более нуклеотидных последовательностей, кодирующих sgRNA, и мРНК, кодирующую управляемую РНК нуклеазу ДНК, которая может представлять собой нуклеазу Cas, такую как Cas9 или Cpf1. В некоторых вариантах осуществления изобретения вектор содержит одну или более нуклеотидных последовательностей, кодирующих crRNA, trRNA, и мРНК,

кодирующую управляемую РНК нуклеазу ДНК, которая может представлять собой белок Cas, такой как Cas9. В одном варианте осуществления изобретения Cas9 происходит от *Streptococcus pyogenes* (т.е. Cas9 Spy). В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеотидная последовательность, кодирующая crRNA, trRNA или crRNA и trRNA (которая может представлять собой sgRNA), содержит или состоит из гидовой последовательности, фланкированной всеми или частью повторяющейся последовательности из встречающейся в природе системы CRISPR/Cas. Нуклеиновая кислота, содержащая или состоящая из crRNA, trRNA или crRNA и trRNA может дополнительно содержать векторную последовательность, при этом векторная последовательность содержит или состоит из нуклеиновых кислот, которые обычно не находятся вместе с crRNA, trRNA или crRNA и trRNA.

[00586] Это описание и иллюстративные варианты осуществления изобретения не должны рассматриваться ограничивающими. Для целей этого описания и прилагаемой формулы изобретения, если иное не указано, все числа, выражающие количества, проценты или доли и другие численные величины, используемые в описании и формуле изобретения, необходимо понимать как модифицированные во всех случаях термином «около» в той степени, в который они уже не являются модифицированными. Следовательно, если не указано противоположное, численные параметры, представленные в следующем описании и прилагаемой формуле изобретения, представляют собой приближенные значения, которые могут варьироваться в зависимости от свойств, которые предполагается получить. Как минимум и не с целью ограничить применение теории эквивалентов к объему формулы изобретения, каждый численный параметр по меньшей мере следует рассматривать ввиду количества представленных значащих цифр и путем применения обычных правил округления.

[00587] Следует отметить, что как используется в этой заявке и прилагаемой формуле изобретения, единственное число и любое использование любого слова в единственном числе включает эквиваленты во множественном числе, если явно и однозначно не ограничено одним объектом. При использовании в данном документе, предполагается, что термин «включать» и его грамматические варианты является неограничивающим, так что такое перечисление объектов в списке не предназначено для исключения других подобных элементов, которые могут быть замещены или добавлены к перечисленным элементам.

ПРИМЕРЫ

[00588] Следующие примеры представлены для иллюстрации некоторых раскрытых вариантов осуществления, и их не следует считать ограничивающими объем раскрытия каким-либо образом.

Пример 1: Вещества и методики

1.1 *In vitro* транскрипция («IVT») мРНК нуклеазы

[00589] Кэпированную и полиаденилированную мРНК Cas9 *Streptococcus pyogenes* («Spy»), содержащую N1-метил-псевдо-U, получали с помощью *in vitro* транскрипции с

использованием шаблона линейаризованной плазмидной ДНК и полимеразы РНК T7. Плазмидная ДНК, содержащая промотор T7 и последовательность транскрипции (для получения мРНК, включающей мРНК, описанную в данном документе (см., SEQ ID №: 501-516 в Таблице 5 ниже для ORF Cas9) линейаризовали путем инкубации при 37°C для завершения разложения с использованием XbaI в следующих условиях: 200 нг/мкл плазмиды, 2 Ед./мкл XbaI (NEB) и 1x реакционный буфер. XbaI инактивировали путем нагревания реакционной смеси при 65°C в течение 20 мин. Линейаризованную плазмиду очищали от фермента и солей буфера с использованием колонки с силикагелем Maxi spin (Epoch Life Sciences) и анализировали на агарозном геле для подтверждения линейаризации. Реакцию IVT для получения мРНК Cas9 инкубировали при 37°C в течение 4 часов в следующих условиях: 50 нг/мкл линейаризованной плазмиды; 2 mM каждого из GTP, АТР, СТР и N1-метил-псевдо-UTP (Trilink); 10 mM ARCA (Trilink); 5 Ед./мкл полимеразы РНК T7 (NEB); 1 Ед./мкл ингибитора РНКазы мыши (NEB); 0,004 Ед./мкл неорганической пирофосфатазы *E. coli* (NEB); и 1x реакционный буфер. Через 4 часа после инкубации добавляли ДНКазу TURBO (ThermoFisher) до конечной концентрации 0,01 Ед./мкл, и реакционную смесь инкубировали в течение дополнительных 30 минут для удаления шаблона ДНК. мРНК Cas9 очищали от фермента и нуклеотидов с использованием набора для очищения MegaClear Transcription в соответствии с протоколом производителя (ThermoFisher). Альтернативно, мРНК Cas9 очищали по методу осаждения с LiCl, за которым в некоторых случаях шло дополнительное очищение фильтрованием с тангенциальным потоком. Концентрацию транскрипта определяли путем измерения поглощения света при 260 нм (Nanodrop), и транскрипт анализировали с помощью капиллярного электрофореза с использованием Bioanalyzer (Agilent).

[00590] Таблица 5: Иллюстративные последовательности мПНК Cas9

SEQ ID №	
501	GGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCGTGTGTGTGTCGTTGCAGGCCTTATTCGGATCCGCCACCATG GACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAAACAGCGTCGGATGGGCAGTCATCACAGACGAATACAAGGT CCCGAGCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAAACACAGACAGACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGT TCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACTGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAAGAACA GAATCTGCTACCTGCAGGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAAGGTCGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAAA GCTTCCTGGTCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGATCTTCGGAAACATCGTCGACGAAGTCGCATACCAC GAAAAGTACCCGACAATCTACCACCTGAGAAAGAAGCTGGTCGACAGCACAGACAAGGCAGACCTGAGACTGATCTA CCTGGCACTGGCACACATGATCAAGTTCAGAGGACACTTCCTGATCGAAGGAGACCTGAACCCGGACAACAGCGACGT CGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTCCAGACATACAACCAGCTGTTCGAAGAAAACCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGA CGCAAAGGCAATCCTGAGCGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAGACTGGAAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGAA AAGAAGAACGGACTGTTTCGGAAACCTGATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTG GCAGAAGACGCAAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCACAGATCGGAGA CCAGTACGCAGACCTGTTCTGCGCAGCAAAGAACCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCAACAC AGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGATCAAGAGATACGACGAACACCACCAGGACCTGACACTGCTGA AGGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGAAAAGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGATACGCAGGA TACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAATTCTACAAGTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAACAGA AGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGACCTGCTGAGAAAGCAGAGAACATTCGACAACGGAAGCATCCCGCACC AGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAGACAGGAAGACTTCTACCCGTTCTGAAGGACAACAGAGAA AAGATCGAAAAGATCCTGACATTCAGAATCCCGTACTACGTCGGACCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTTCGCATG GATGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAATCACACCGTGGAACCTTCGAAGAAGTCGTCGACAAGGGAGCAAGCGCACAG AGCTTCATCGAAAGAATGACAAACTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAAAGGTCCTGCCGAAGCACAGCCTGCTGTA

CGAATACTTCACAGTCTACAACGAACTGACAAAGGTCAAGTACGTACAGAAAGGAATGAGAAAGCCGGCATTCTCTGA
 GCGGAGAACAGAAGAAGGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTACAGTCAAGCAGCTGAAGGAA
 GACTACTTCAAGAAGATCGAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGATTCAACGCAAGCCTGGG
 AACATACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAAGAAAACGAAGACATCCTGGAAG
 ACATCGTCCTGACACTGACACTGTTCTGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACGCACACCTGTTCTG
 ACGACAAGGTCATGAAGCAGCTGAAGAGAAGAAGATACACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGG
 AATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGACGGATTCGCAAACAGAACTTCATGC
 AGCTGATCCACGACGACAGCCTGACATTCAAGGAAGACATCCAGAAGGCACAGGTCAGCGGACAGGGAGACAGCCTG
 CACGAACACATCGCAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCAATCAAGAAGGGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCGTCGACGA
 ACTGGTCAAGGTCATGGGAAGACACAAGCCGGAAAACATCGTCATCGAAATGGCAAGAGAAAACAGACAACACAG
 AAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAATGAAGAGAATCGAAGAAGGAATCAAGGAACTGGGAAGCCAGATCCTGA
 AGGAACACCCGGTCGAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGAAGAGACATG
 TACGTCGACCAGGAACTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGACCACATCGTCCCGCAGAGCTTCCTGAAG
 GACGACAGCATCGACAACAAGGTCCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAACGTCCCGAGCGAAG
 AAGTCGTCAAGAAGATGAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAAGCTGATCACACAGAGAAAGTTCGACAAC
 CTGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACTGAGCGAACTGGACAAGGCAGGATTCATCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAA
 GACAGATCACAAAGCACGTCGCACAGATCCTGGACAGCAGAATGAACACAAAGTACGACGAAAACGACAAGCTGATC
 AGAGAAGTCAAGGTCATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTCAG
 AGAAATCAACAACTACCACCACGCACACGACGCATACCTGAACGCAGTCGTCGGAACAGCACTGATCAAGAAGTACC
 CGAAGCTGGAAAGCGAATTCGTCTACGGAGACTACAAGGTCTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAGAGCGAACAG
 GAAATCGGAAAGGCAACAGCAAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTCTTCAAGACAGAAATCACACTGGCA
 AACGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAGGGAAGAG
 ACTTCGCAACAGTCAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGCAGGTCAACATCGTCAAGAAGACAGAAGTCCAGACAGGAGGA

	TTCAGCAAGGAAAGCATCCTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCTGATCGCAAGAAAGAAGGACTGGGACCCGAAGA AGTACGGAGGATTTCGACAGCCCGACAGTCGCATACAGCGTCCTGGTCGTCGCAAAGGTCGAAAAGGGAAAGAGCAAG AAGCTGAAGAGCGTCAAGGAACTGCTGGGAATCACAATCATGGAAAGAAGCAGCTTCGAAAAGAACCCGATCGACTT CCTGGAAGCAAAGGGATACAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCTGTTTCAACTGG AAAACGGAAGAAAGAGAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGAAGGGAAACGAACCTGGCACTGCCGAGCAAGTA CGTCAACTTCCTGTACCTGGCAAGCCACTACGAAAAGCTGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCTGT TCGTCGAACAGCACAAGCACTACCTGGACGAAATCATCGAACAGATCAGCGAATTCAGCAAGAGAGTCATCCTGGCA GACGCAAACCTGGACAAGGTCTGAGCGCATACAACAAGCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGAAAACA TCATCCACCTGTTCACACTGACAAACCTGGGAGCACCGGCAGCATTCAAGTACTTCGACACAACAATCGACAGAAAGA GATACACAAGCACAAAGGAAGTCCTGGACGCAACACTGATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAACAAGAATC GACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGTCTAGCTAGCCATCACATTTA AAAGCATCTCAGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAGAAAATGAAGATCAATAGCTTATTCATCTCTTTTTCTTTTCGTT GGTGTAAGCCAACACCCTGTCTAAAAAACATAAATTTCTTTAATCATTTTGCCTCTTTTCTCTGTGCTTCAATTAATAA AAAATGGAAAGAACCTCGAG
502	CAUCGGACUGGACAUCGGAACAAACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUACAAGGUCCCGAGCAAGAAG CACAGACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGAGCACUGCUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACA AAGAAGAAGAUACACAAGAAGAAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUCUUCAGCAACGAAAUGGCAAAGGU ACAGACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGAUCUUCGGAAACAUCGUCGA AAAAGUACCCGACAAUCUACCACCUGAGAAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGACCUGAGACUGAUCUA UGAUCAAGUUCAGAGGACACUCCUGAUCGAAGGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUCAU ACAACCAGCUGUUCGAAGAAAACCCGAUCAACGCAAGCGGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCGCAAGACUGAG AAAACCUGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACUGUUCGGAAACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGACU GCAACUUCGACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACGACGACGACCUGGACAACCUGCU

AGUACGCAGACCUGUUCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUCCUGCUGAGCGACAUCCUGAGAGUCAACAC
 CGCUGAGCGCAAGCAUGAUGAUAAGAGAUACGACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACUGGUCAGACA
 ACAAGGAAAUCUUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGAUACGCAGGAUACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUU
 CGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAACAGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAGACCUGCUGAGAAAGCAGAG
 GCAUCCCGCACCAGAUAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAGACAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAA
 UCGAAAAGAUAUCCUGACAUAUUCAGAAUCCCGUACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAACAGCAGAUUCGCAUGGAU
 AAACAAUCACACCGUGGAACUUCGAAGAAGUCGUCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGAAUGAC
 UGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAGCACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACUGACAAAGGU
 GAAUGAGAAAGCCGGCAUUCCUGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUUAAGACAAACAGAAA
 UGAAGGAAGACUACUUAAGAAGAUCGAAUGCUUCGACAGCGUCGAAAUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUUCAACGC
 ACGACCUGCUGAAGAUAUCAAGGACAAGGACUUCCUGGACAACGAAGAAAACGAAGACAUCCUGGAAGACAUCGU
 UCGAAGACAGAGAAAUGAUCGAAGAAAGACUGAAGACAUACGCACACCUGUUCGACGACAAGGUCAUGAAGCAGCU
 CAGGAUGGGGAAGACUGAGCAGAAAGCUGAUAACGGAAUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUGGACU
 UUCGCAAACAGAAACUUCAUGCAGCUGAUCCACGACGACAGCCUGACAUAAGGAAGACAUCCAGAAGGCACAGG
 AGCCUGCACGAACACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCGGCAAUCAAGAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCG
 GUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAUCGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAGA
 AUGAAGAGAAUCGAAGAAGGAUUAAGGAACUGGGAAGCCAGAUCCUGAAGGAACACCCGGUCGAAAACACACAGC
 UACCUGUACUACCUGCAGAACGGAAGAGACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUAACAGACUGAGCGACUACG
 CCGCAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGACAACAAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCG
 GAAGUCGUCAAGAAGAUGAAGAACUACUGGAGACAGCUGCUGAACGCAAAGCUGAUCACACAGAGAAAGUUCGACA
 AGAGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUAUCAAGAGACAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCACAAAGC
 GACAGCAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUCAGAGAAGUCAAGGUCAUCACACUGAAGAGCA
 AGAAAGGACUUCCAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUACCACCACGCACACGACGCAUACCUGAACGCAG

	AUCAAGAAGUACCCGAAGCUGGAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUCAGAAAGAUGAUCG AUCGGAAAGGCAACAGCAAAGUACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUCUUAAGACAGAAAUCACACUGGCAA AGACCGCUGAUCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAAUCGUCUGGGACAAGGGAAGAGACUUCGCAACAGUCAGA GCAGGUCAACAUCGUAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAAGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAAC AAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGUACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUACAGCGUCCUGGUCGUC AAAGAGCAAGAAGCUGAAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUCAUGGAAAGAAGCAGCUUCGAAAAGAA AAGCAAAGGGAUACAAGGAAGUCAAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGAACUGGAAAA UGGCAAGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGGAAACGAACUGGCACUGCCGAGCAAGUACGUCAACUCCUGUACCUGGC UGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCUGUUCGUCGAACAGCACAAGCACUACCUGGACGAAAUCAU UCAGCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAGGUCCUGAGCGCAUACAACAAGCACAGAGACAAGCC AAAACAUCAUCCACCUGUUCACACUGACAAACCUGGGAGCACCGGCAGCAUUCAAGUACUUCGACACAACAAUCGA GCACAAAGGAAGUCCUGGACGCAACACUGAUCCACCAGAGCAUACAGGACUGUACGAAACAAGAAUCGACCUGAG AG
503	GACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGACAUCGGAACAAACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUACAAG GUCCCGAGCAAGAAGUUAAGGUCCUGGGAAACACAGACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGAGCACUG CUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACUGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGAUACACAAGAAGAAAG AACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUCUUCAGCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUCCACAGACUG GAAGAAAGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGAUCUUCGGAAACAUCGUCGACGAAGUC GCAUACCACGAAAAGUACCCGACAAUCUACCACCUGAGAAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGACCUGA GACUGAUCUACCUGGCACUGGCACACAUGAUCAAGUUCAGAGGACACUUCUGAUCGAAGGAGACCUGAACCCGGA CAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUAUCCAGCUGGUCCAGACAUACAACCAGCUGUUCGAAGAAAACCCGAUCAAC GCAAGCGGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUGGAAAACCUGAUCGCA CAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACUGUUCGGAAACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACACCGAACUUC

AAGAGCAACUUCGACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACGACGACGACCUGGACAACC
 UGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGUACGCAGACCUGUUCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUCCUGCUGAG
 CGACAUCCUGAGAGUCAACACAGAAAUCACAAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUAAGAGAUACGACGAACAC
 CACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACUGGUCAGACAGCAGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUCUUCUUCGACC
 AGAGCAAGAACGGAUACGCAGGAUACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAGUUCAUCAAGCCGA
 UCCUGGAAAAGAUGGACGGAACAGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAGACCUGCUGAGAAAGCAGAGAA
 CAUUCGACAACGGAAGCAUCCCGCACCAAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAGACAGGAAGACUU
 CUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAGAAAAGAUCGAAAAGAUCUGACAUAUCAGAAUCCCGUACUACGUCGGACCG
 CUGGCAAGAGGAAACAGCAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAAUCACACCCGUGGAACUUCGAA
 GAAGUCGUCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGAAUGACAAACUUCGACAAGAACCUGCCGAAC
 GAAAAGGUCCUGCCGAAGCACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACUGACAAAGGUCAAGUAC
 GUCACAGAAGGAAUGAGAAAGCCGGCAUUCCUGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCCAAUCGUCGACCUGCUGUUC AAG
 ACAAACAGAAAGGUCACAGUCAAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUCAAGAAGAUCGAAUGCUUCGACAGCGUCGAA
 AUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUACCACGACCUGCUGAAGAUCAUCAAGGACAAG
 GACUUCCUGGACAACGAAGAAAACGAAGACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUGACACUGUUCGAAGACAGA
 GAAAUGAUCGAAGAAAGACUGAAGACAUAACGCACACCUGUUCGACGACAAGGUCAUGAAGCAGCUGAAGAGAAGA
 AGAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAGCAGAAAGCUGAUAACGGAAUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAUC
 CUGGACUUCCUGAAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAUGCAGCUGAUCCACGACGACAGCCUGACAUUCA
 AGGAAGACAUCCAGAAGGCACAGGUCAGCGGACAGGGAGACAGCCUGCACGAACACAUCGCAAACCUGGCAGGAA
 GCCCCGGCAAUCAAGAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACUGGUCAAGGUCAUGGGGAAGACACA
 AGCCGGAAAACAUCGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAA
 GAAUGAAGAGAAUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAGCCAGAUCCUGAAGGAACACCCGGUCGAAAACACAC
 AGCUGCAGAACGAAAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGAAGAGACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACA

	UCAACAGACUGAGCGACUACGACGUCGACCACAUCGUCCCGCAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGACAACAA GGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAACGUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAGAAGAUGAA GAACUACUGGAGACAGCUGCUGAACGCAAAGCUGAUCACACAGAGAAAGUUCGACAACCUGACAAAGGCAGAGAG AGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAGAGACAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCAACAAAGCA CGUCGCACAGAUCCUGGACAGCAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUCAGAGAAGUCAAGGU CAUCACACUGAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAGGACUUCAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAA CUACCACCACGCACACGACGCAUACCUGAACGCAGUCGUCGGAACAGCACUGAUCAAGAAGUACCCGAAGCUGGAA AGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUCAGAAAGAUGAUCGCAAAGAGCGAACAGGAAAUUCGGA AAGGCAACAGCAAAGUACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUCUUAAGACAGAAAUCACACUGGCAAACGGA GAAAUCAGAAAGAGACCGCUGAUCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAAUCGUCUGGGACAAGGGAAGAGACUUC GCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCAUGCCGCAGGUCAACAUCGUCAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUC AGCAAGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUGAUCGCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAG UACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUACAGCGUCCUGGUCGUCGCAAAGGUUCGAAAAGGGAAAGAGCAAG AAGCUGAAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUCAUGGAAAGAAGCAGCUUCGAAAAGAACCCGAUCGAC UUCCUGGAAGCAAAGGGAUACAAGGAAGUCAAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGAA CUGGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGGAAACGAACUGGCACUGCCGAGC AAGUACGUCAACUCCUGUACCUGGCAAGCCACUACGAAAAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAG CAGCUGUUCGUCGAACAGCACAAAGCACUACCUGGACGAAAUCAUCGAACAGAUCAAGCGAAUUCAGCAAGAGAGUC AUCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAGGUCCUGAGCGCAUACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAUCAGAGAACAGG CAGAAAACAUCAUCCACCUGUUCACACUGACAAACCUGGGAGCACCGGCAGCAUUCAAGUACUUCGACACAACAAU CGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUGGACGCAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUAC GAAACAAGAAUCGACCUGAGCCAGCUGGGAGGAGAC
504	AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGACAUCGGAACAAACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUAC

AAGGUCCCGAGCAAGAAGUUCAAGGUCCUGGGAAACACAGACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGAGCA
 CUGCUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACUGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGAUACACAAGAAGA
 AAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUCUUCAGCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUUCCACAGA
 CUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGAUCUUCGGAAACAUCGUCGACGAA
 GUCGCAUACCACGAAAAGUACCCGACAAUCUACCACCUGAGAAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGACC
 UGAGACUGAUCUACCUGGCACUGGCACACAUGAUCAAGUUCAGAGGACACUUCCUGAUCGAAGGAGACCUGAACCC
 GGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUCAUCCAGCUGGUCCAGACAUACAACCAGCUGUUCGAAGAAAACCCGAUC
 AACGCAAGCGGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUGGAAAACCUGAUC
 GCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACUGUUCGGAAACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACACCGAAC
 UUCAAGAGCAACUUCGACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACGACGACGACCUGGACA
 ACCUGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGUACGCAGACCUGUUCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUCCUGCU
 GAGCGACAUCCUGAGAGUCAACACAGAAAUCACAAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUAAGAGAUACGACGA
 ACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACUGGUCAGACAGCAGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUCUUCUUC
 GACCAGAGCAAGAACGGAUACGCAGGAUACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAGUUCAUCAAG
 CCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAACAGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAGACCUGCUGAGAAAGCAG
 AGAACAUUCGACAACGGAAGCAUCCCGCACCAAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAGACAGGAAG
 ACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAGAAAAGAUCGAAAAGAUCUGACAUCAGAAUCCCGUACUACGUCG
 GACCGCUGGCAAGAGGAAACAGCAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAAUCACACCGUGGAACU
 UCGAAGAAGUCGUCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGAAUGACAAACUUCGACAAGAACCUGC
 CGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAGCACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACUGACAAAGGUCAA
 GUACGUCACAGAAGGAAUGAGAAAGCCGGCAUUCCUGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUU
 CAAGACAAACAGAAAGGUCACAGUCAAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUCAAGAAGAUUCGAAUGCUUCGACAGCGU
 CGAAAUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUACCACGACCUGCUGAAGAUAUCAAGGA

CAAGGACUUCCUGGACAACGAAGAAAACGAAGACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUGACACUGUUCGAAGA
 CAGAGAAAUGAUCGAAGAAAGACUGAAGACAUACGCACACCUGUUCGACGACAAGGUCAUGAAGCAGCUGAAGAG
 AAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAGCAGAAAGCUGAUAACGGAAUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGAC
 AAUCCUGGACUUCCUGAAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAUGCAGCUGAUCCACGACGACAGCCUGACA
 UUCAAGGAAGACAUCCAGAAGGCACAGGUCAGCGGACAGGGAGACAGCCUGCACGAACACAUCGCAAACCUGGCAG
 GAAGCCCGGCAAUCAAGAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUUCGUCGACGAACUGGUCAAGGUCAUGGGAAGAC
 ACAAGCCGGAAAACAUCGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAG
 AAAGAAUGAAGAGAAUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAGCCAGAUCUGAAGGAACACCCGGUCGAAAACA
 CACAGCUGCAGAACGAAAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGAAGAGACAUGUACGUCGACCAGGAACUGG
 ACAUCAACAGACUGAGCGACUACGACGUCGACCACAUCGUCCCGCAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGACAA
 CAAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAACGUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAGAAGAU
 GAAGAACUACUGGAGACAGCUGCUGAACGCAAAGCUGAUCACACAGAGAAAGUUCGACAACCUGACAAAGGCAGA
 GAGAGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAGAGACAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUACAAA
 GCACGUCGCACAGAUCCUGGACAGCAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUCAGAGAAGUCAA
 GGUCAUCACACUGAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAGGACUUCAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCA
 CAACUACCACCACGCACACGACGCAUACCUGAACGCAGUCGUCGGAACAGCACUGAUCAGAAGUACCCGAAGCUG
 GAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUCAGAAAGAUGAUCGCAAAGAGCGAACAGGAAAUC
 GGAAAGGCAACAGCAAAGUACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUCUUAAGACAGAAAUCACACUGGCAAAC
 GGAGAAAUCAGAAAGAGACCGCUGAUCGAAACAAACGGAGAAAACAGGAGAAAUCGUCUGGGACAAGGGAAGAGAC
 UUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCAUGCCGCAGGUCAACAUCGUCAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGA
 UUCAGCAAGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUGAUCGCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAG
 AAGUACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUACAGCGUCCUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGC
 AAGAAGCUGAAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUCAUGGAAAGAAGCAGCUUCGAAAAGAACCCGAUC

	GACUUCCUGGAAGCAAAGGGAUACAAGGAAGUCAAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUC GAACUGGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAACUGGCACUGCCG AGCAAGUACGUCAACUCCUGUACCUGGCAAGCCACUACGAAAAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAG AAGCAGCUGUUCGUCGAACAGCACAAAGCACUACCUGGACGAAAUCAUCGAACAGAUACGCGAAUUCAGCAAGAGA GUCAUCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAGGUCCUGAGCGCAUACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAUCAGAGAAC AGGCAGAAAACAUCAUCCACCUGUUCACACUGACAAACCUGGGAGCACCGGCAGCAUUCAAGUACUUCGACACAAC AAUCGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUGGACGCAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACU GUACGAAACAAGAAUCGACCUGAGCCAGCUGGGAGGAGACGGAAGCGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGUCGA CGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGUCGACAGCGGAUAG
505	GACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGACAUCGGAACAAACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUACAAG GUCCCGAGCAAGAAGUUAAGGUCCUGGGAAACACAGACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCCGGAGCACUG CUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACUGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGAUACACAAGAAGAAAG AACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUCUUCAGCAACGAAAUGGCAAAGGUUCGACGACAGCUUCUCCACAGACUG GAAGAAAGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGAUCUUCGGAAACAUCGUCGACGAAGUC GCAUACCACGAAAAGUACCCGACAAUCUACCACCUGAGAAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGACCUGA GACUGAUCUACCUGGCACUGGCACACAUGAUCAAGUUCAGAGGACACUUCUGAUUCGAAGGAGACCUGAACCCGGA CAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUAUCCAGCUGGUCCAGACAUACAACCAGCUGUUCGAAGAAAACCCGAUCAAC GCAAGCGGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUGGAAAACCUGAUCGCA CAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACUGUUCGGAAACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACACCGAACUUC AAGAGCAACUUCGACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUCGACGACGACCUGGACAACC UGCUGGCACAGAUCCGAGACCAGUACGCAGACCUGUUCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUCCUGCUGAG CGACAUCCUGAGAGUCAACACAGAAAUCACAAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAGAGAUACGACGAACAC CACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACUGGUCAGACAGCAGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUCUUCUUCGACC

AGAGCAAGAACGGAUACGCAGGAUACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAGUUCAUCAAGCCGA
 UCCUGGAAAAGAUGGACGGAACAGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAGACCUGGCUGAGAAAGCAGAGAA
 CAUUCGACAACGGAAGCAUCCCGCACCAAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAGACAGGAAGACUU
 CUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAGAAAAGAUCGAAAAGAUCUGACAUCAGAAUCCCGUACUACGUCGGACCG
 CUGGCAAGAGGAAACAGCAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAAUCACACCGUGGAACUUCGAA
 GAAGUCGUCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGAAUGACAAACUUCGACAAGAACCUGCCGAAC
 GAAAAGGUCCUGCCGAAGCACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACUGACAAAGGUCAAGUAC
 GUCACAGAAGGAAUGAGAAAGCCGGCAUUCCUGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCCAAUCGUCGACCUGCUGUUAAG
 ACAAACAGAAAGGUCACAGUCAAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUAAGAAGAUCGAAUGCUUCGACAGCGUCGAA
 AUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUACCACGACCUGCUGAAGAUCAUCAAGGACAAG
 GACUUCCUGGACAACGAAGAAAACGAAGACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUGACACUGUUCGAAGACAGA
 GAAAUGAUCGAAGAAAGACUGAAGACAUCGCACACCUGUUCGACGACAAGGUCAUGAAGCAGCUGAAGAGAAGA
 AGAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAGCAGAAAGCUGAUAACGGAAUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAUC
 CUGGACUUCCUGAAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUAUGCAGCUGAUCCACGACGACAGCCUGACAUUA
 AGGAAGACAUCCAGAAGGCACAGGUCAGCGGACAGGGAGACAGCCUGCACGAACACAUCGCAAACCUGGCAGGAA
 GCCCCGGCAAUCAAGAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACUGGUCAAGGUCAUGGGAAGACACA
 AGCCGGAAAACAUCGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAA
 GAAUGAAGAGAAUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAGCCAGAUAUCCUGAAGGAACACCCGGUCGAAAACACAC
 AGCUGCAGAACGAAAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGAAGAGACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACA
 UCAACAGACUGAGCGACUACGACGUCGACCACAUCGUCCCGCAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGACAACAA
 GGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAACGUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAGAAGAUGAA
 GAACUACUGGAGACAGCUGCUGAACGCAAAGCUGAUCACACAGAGAAAGUUCGACAACCUGACAAAGGCAGAGAG
 AGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAGAGACAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCACAAAGCA

	CGUCGCACAGAUCCUGGACAGCAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUCAGAGAAGUCAAGGU CAUCACACUGAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAGGACUCCAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAA CUACCACCACGCACACGACGCAUACCUGAACGCAGUCGUCGGAACAGCACUGAUCAAGAAGUACCCGAAGCUGGAA AGCGAAUUCGUCUACGGGAGACUACAAGGUCUACGACGUCAGAAAGAUGAUCGCAAAGAGCGAACAGGAAAUCGGA AAGGCAACAGCAAAGUACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUCUUAAGACAGAAAUCACACUGGCAAACGGA GAAAUCAGAAAGAGACCGCUGAUCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAAUCGUCUGGGACAAGGGAAGAGACUUC GCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCAUGCCGCAGGUCAACAUCGUCAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUC AGCAAGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAAACAGCGACAAGCUGAUCGCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAG UACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUACAGCGUCCUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAAG AAGCUGAAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUCAUGGAAAGAAGCAGCUUCGAAAAGAACCCGAUCGAC UUCUGGAAGCAAAGGGAUACAAGGAAGUCAAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCGAA CUGGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAACUGGCACUGCCGAGC AAGUACGUCAACUCCUGUACCUGGCAAGCCACUACGAAAAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAG CAGCUGUUCGUCGAACAGCACAAAGCACUACCUGGACGAAAUCAUCGAACAGAUUCAGCGAAUUCAGCAAGAGAGUC AUCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAGGUCCUGAGCGCAUACAACAAGCACAGAGACAAGCCGAUCAGAGAACAGG CAGAAAACAUCAUCCACCUGUUCACACUGACAAACCUGGGAGCACCGGCAGCAUUCAAGUACUUCGACACAACAAU CGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUGGACGCAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUAC GAAACAAGAAUCGACCUGAGCCAGCUGGGAGGAGACGGAAGCGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGUCGACGGA AGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGUCGACAGCGGA
506	GGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTTCGTGTGTGTGTCGTTGCAGGCCTTATTTCGGATCCATGGACAAG AAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAAACAGCGTCGGATGGGCAGTCATCACAGACGAATACAAGGTCCCGAG CAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAAACACAGACAGACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTCGACA GCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACTGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAAGAACAGAATCT

GCTACCTGCAGGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAAGGTTCGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAAAGCTTCC
 TGGTCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGATCTTCGGAAACATCGTCGACGAAGTCGCATACCACGAAAAG
 TACCCGACAATCTACCACCTGAGAAAGAAGCTGGTTCGACAGCACAGACAAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGC
 ACTGGCACACATGATCAAGTTCAGAGGACACTTCCTGATCGAAGGAGACCTGAACCCGGACAACAGCGACGTCGACA
 AGCTGTTCATCCAGCTGGTCCAGACATACAACCAGCTGTTCGAAGAAAACCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAA
 AGGCAATCCTGAGCGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAGACTGGAAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGAAAAGAA
 GAACGGACTGTTCGGAAACCTGATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCAGA
 AGACGCAAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCACAGATCGGAGACCAGT
 ACGCAGACCTGTTCTGGCAGCAAAGAACCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCAACACAGAA
 ATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGATCAAGAGATACGACGAACACCACCAGGACCTGACACTGCTGAAGGC
 ACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGAAAAGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGATACGCAGGATACA
 TCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAATTCTACAAGTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAACAGAAGAA
 CTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGACCTGCTGAGAAAGCAGAGAACATTCGACAACGGAAGCATCCCGCACCAGAT
 CCACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAGACAGGAAGACTTCTACCCGTTCTGAAGGACAACAGAGAAAAGA
 TCGAAAAGATCCTGACATTCAGAATCCCGTACTACGTTCGGACCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTTCGCATGGATGA
 CAAGAAAGAGCGAAGAAACAATCACACCGTGGAACCTTCGAAGAAGTCGTCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTC
 ATCGAAAGAATGACAACTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAAAGGTCCTGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATA
 CTTACAGTCTACAACGAACTGACAAAGGTCAAGTACGTACAGAAAGGAATGAGAAAGCCGGCATTCTGAGCGGAG
 AACAGAAGAAGGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTCACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTAC
 TTCAAGAAGATCGAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGATTCAACGCAAGCCTGGGAACATA
 CCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAAGAAAACGAAGACATCCTGGAAGACATCG
 TCCTGACACTGACACTGTTCGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACGCACACCTGTTCGACGAC
 AAGGTCATGAAGCAGCTGAAGAGAAGAAGATACACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGAATCA

GAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGACGGATTTCGCAAACAGAACTTCATGCAGCTG
 ATCCACGACGACAGCCTGACATTCAAGGAAGACATCCAGAAGGCACAGGTCAGCGGACAGGGAGACAGCCTGCACGA
 ACACATCGCAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCAATCAAGAAGGGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCGTCGACGAACTGG
 TCAAGGTCATGGGAAGACACAAGCCGGAAAACATCGTCATCGAAATGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAAGGG
 ACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAATGAAGAGAATCGAAGAAGGAATCAAGGAACTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAA
 CACCCGGTCGAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGAAGAGACATGTACGT
 CGACCAGGAACTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGACCACATCGTCCCGCAGAGCTTCCTGAAGGACG
 ACAGCATCGACAACAAGGTCCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAACGTCCCGAGCGAAGAAGT
 CGTCAAGAAGATGAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAAGCTGATCACACAGAGAAAGTTTCGACAACCTGA
 CAAAGGCAGAGAGAGGAGGACTGAGCGAACTGGACAAGGCAGGATTCATCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAGACA
 GATCACAAAGCACGTCGCACAGATCCTGGACAGCAGAATGAACACAAAGTACGACGAAAACGACAAGCTGATCAGAG
 AAGTCAAGGTCATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTCAGAGAA
 ATCAACAACCTACCACCACGCACACGACGCATACCTGAACGCAGTCGTCGGAACAGCACTGATCAAGAAGTACCCGAA
 GCTGGAAAGCGAATTCGTCTACGGAGACTACAAGGTCTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAGAGCGAACAGGAAA
 TCGGAAAGGCAACAGCAAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTCTTCAAGACAGAAATCACACTGGCAAACG
 GAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAGGGAAGAGACTT
 CGCAACAGTCAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGCAGGTCAACATCGTCAAGAAGACAGAAGTCCAGACAGGAGGATTCA
 GCAAGGAAAGCATCCTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCTGATCGCAAGAAAGAAGGACTGGGACCCGAAGAAGTA
 CGGAGGATTCGACAGCCCGACAGTCGCATACAGCGTCCTGGTCGTCGCAAAGGTCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGC
 TGAAGAGCGTCAAGGAACTGCTGGGAATCACAATCATGGAAAGAAGCAGCTTCGAAAAGAACCCGATCGACTTCCTG
 GAAGCAAAGGGATACAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCTGTTTGAAGTGGAAAA
 CGGAAGAAAGAGAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGAAGGGAAACGAACTGGCACTGCCGAGCAAGTACGTC
 AACTTCCTGTACCTGGCAAGCCACTACGAAAAGCTGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCTGTTCGT

	CGAACAGCACAAGCACTACCTGGACGAAATCATCGAACAGATCAGCGAATTCAGCAAGAGAGTCATCCTGGCAGACG CAAACCTGGACAAGGTCCTGAGCGCATACAACAAGCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGAAAACATCATC CACCTGTTACACTGACAAACCTGGGAGCACCGGCAGCATTCAAGTACTTCGACACAACAATCGACAGAAAGAGATAC ACAAGCACAAAGGAAGTCCTGGACGCAAACTGATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAACAAGAATCGACCT GAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGTCTAGCTAGCCATCACATTTAAAAGC ATCTCAGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAGAAAATGAAGATCAATAGCTTATTCATCTCTTTTTCTTTTTCGTTGGTGT AAAGCCAACACCCTGTCTAAAAAACATAAATTTCTTTAATCATTTTGCCTCTTTTCTCTGTGCTTCAATTAATAAAAAAT GGAAAGAACCTCGAG
507	ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAAACAGCGTCGGATGGGCAGTCATCACAGACGAATACAA GGTCCCGAGCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAAACACAGACAGACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGC TGTTTCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACTGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAAGAA CAGAATCTGCTACCTGCAGGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAAGGTTCGACGACAGCTTCTTCCACcggCTGGAAGAA AGCTTCCTGGTCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGATCTTCGGAAACATCGTCGACGAAGTCGCATACCA CGAAAAGTACCCGACAATCTACCACCTGAGAAAGAAGCTGGTCGACAGCACAGACAAGGCAGACCTGAGACTGATCT ACCTGGCACTGGCACACATGATCAAGTTCAGAGGACACTTCCTGATCGAAGGAGACCTGAACCCGGACAACAGCGAC GTCGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTCCAGACATACAACCAGCTGTTTCGAAGAAAACCCGATCAACGCAAGCGGAGTC GACGCAAAGGCAATCCTGAGCGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAGACTGGAAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAG AAAAGAAGAACGGACTGTTCGGAAACCTGATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTTCGAC CTGGCAGAAGACGCAAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCACAGATCGG AGACCAGTACGCAGACCTGTTCTGGCAGCAAAGAACCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCAA CACAGAAATCACAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGATCAAGAGATACGACGAACACCACCAGGACCTGACACTGC TGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGAAAAGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGATACGCA GGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAATTCTACAAGTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAAC

AGAAGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGACCTGCTGAGAAAGCAGAGAACATTTCGACAACGGAAGCATCCCGC
 ACCAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAGACAGGAAGACTTCTACCCGTTCTGAAGGACAACAGA
 GAAAAGATCGAAAAGATCCTGACATTCAGAATCCCGTACTACGTCGGACCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTTCGC
 ATGGATGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAATCACACCGTGGAACCTTCGAAGAAGTCGTCGACAAGGGAGCAAGCGCA
 CAGAGCTTCATCGAAAGAATGACAACTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAAAGGTCCTGCCGAAGCACAGCCTGCT
 GTACGAATACTTCACAGTCTACAACGAACTGACAAAGGTCAAGTACGTCACAGAAGGAATGAGAAAGCCGGCATTCC
 TGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTCACAGTCAAGCAGCTGAAG
 GAAGACTACTTCAAGAAGATCGAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGATTCAACGCAAGCCT
 GGGAACATACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAAGAAAACGAAGACATCCTGG
 AAGACATCGTCCTGACACTGACACTGTTCGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACGCACACCTG
 TTCGACGACAAGGTCATGAAGCAGCTGAAGAGAAGAAGATACACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCA
 ACGGAATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGACGGATTTCGCAAACAGAACTTC
 ATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACATTCAAGGAAGACATCCAGAAGGCACAGGTCAGCGGACAGGGAGACAG
 CCTGCACGAACACATCGCAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCAATCAAGAAGGGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCGTCG
 ACGAACTGGTCAAGGTCATGGGAAGACACAAGCCGGAAAACATCGTCATCGAAATGGCAAGAGAAAACCAGACAAC
 ACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAGAAAGAATGAAGAGAATCGAAGAAGGAATCAAGGAACTGGGAAGCCAGAT
 CCTGAAGGAACACCCGGTCGAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAaAACGGAAGAG
 ACATGTACGTCGACCAGGAACTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGACCACATCGTCCCGCAGAGCTTCC
 TGAAGGACGACAGCATCGACAACAAGGTCCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAACGTCCCGAG
 CGAAGAAGTCGTCAAGAAGATGAAGAATACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAAGCTGATCACACAGAGAAAGTTTCG
 ACAACCTGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACTGAGCGAACTGGACAAGGCAGGATTCATCAAGAGACAGCTGGTTCGA
 AACAAGACAGATCACAAAGCACGTCGCACAGATCCTGGACAGCAGAATGAACACAAAGTACGACGAAAACGACAAG
 CTGATCAGAGAAGTCAAGGTCATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAG

	GTCAGAGAAATCAACAACCTACCACCACGCACACGACGCATACCTGAACGCAGTCGTCGGAACAGCACTGATCAAGAA GTACCCGAAGCTGGAAAGCGAATTCGTCTACGGAGACTACAAGGTCTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAGAGCG AACAGGAAATCGGAAAGGCAACAGCAAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTCTTCAAGACAGAAATCACAC TGGCAAACGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAGGG AAGAGACTTCGCAACAGTCAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGCAGGTCAACATCGTCAAGAAGACAGAAGTCCAGACAG GAGGATTCAGCAAGGAAAGCATCCTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCTGATCGCAAGAAAGAAGGACTGGGACCC GAAGAAGTACGGAGGATTCGACAGCCCGACAGTCGCATACAGCGTCCTGGTCGTCGCAAAGGTCTGAAAAGGGAAAGA GCAAGAAGCTGAAGAGCGTCAAGGAACTGCTGGGAATCACAATCATGGAAAGAAGCAGCTTCGAAAAGAACCCGATC GACTTCCTGGAAGCAAAGGGATACAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCTGTTCGA ACTGGAAAACGGAAGAAAGAGAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGAAGGGAAACGAACTGGCACTGCCGAGC AAGTACGTCAACTTCCTGTACCTGGCAAGCCACTACGAAAAGCTGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCA GCTGTTTCGTCGAACAGCACAAAGCACTACCTGGACGAAATCATCGAACAGATCAGCGAATTCAGCAAGAGAGTCATCCT GGCAGACGCAAACCTGGACAAGGTCCTGAGCGCATACAACAAGCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGAA AACATCATCCACCTGTTCACACTGACAAACCTGGGAGCACCGGCAGCATTCAAGTACTTCGACACAACAATCGACAGA AAGAGATACACAAGCACAAAGGAAGTCCTGGACGCAAACTGATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAACAAG AATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGTCTAG
508	ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACAGCGTGGGCTGGGCCGTGATCACCGACGAGTACAA GGTGCCCAGCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACAGACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGCGCCCTGC TGTTTCGACAGCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCAGACTGAAGAGAACCGCCAGAAGAAGATACACCAGAAGAAAGAA CAGAATCTGCTACCTGCAGGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAGGA GAGCTTCCTGGTGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGAGACACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACC ACGAGAAGTACCCACCATCTACCACCTGAGAAAGAAGCTGGTGGACAGCACCGACAAGGCCGACCTGAGACTGATC TACCTGGCCCTGGCCACATGATCAAGTTCAGAGGCCACTTCCTGATCGAGGGCGACCTGAACCCCGACAACAGCGAC

GTGGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTGCAGACCTACAACCAGCTGTTTCGAGGAGAACCCCATCAACGCCAGCGGCGTG
 GACGCCAAGGCCATCCTGAGCGCCAGACTGAGCAAGAGCAGAAGACTGGAGAACCTGATCGCCCAGCTGCCCCGGCGA
 GAAGAAGAACGGCCTGTTTCGGCAACCTGATCGCCCTGAGCCTGGGCCTGACCCCCAACTTCAAGAGCAACTTCGACCT
 GGCCGAGGACGCCAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCCCAGATCGGCG
 ACCAGTACGCCGACCTGTTTCCTGGCCGCCAAGAACCTGAGCGACGCCATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTGAACA
 CCGAGATCACCAAGGCCCCCCTGAGCGCCAGCATGATCAAGAGATACGACGAGCACCACCAGGACCTGACCCTGCTG
 AAGGCCCTGGTGAGACAGCAGCTGCCCCGAGAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGCTACGCCGG
 CTACATCGACGGCGGCCAGCCAGGAGGAGTTCTACAAGTTCATCAAGCCCATCCTGGAGAAGATGGACGGCACCG
 AGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACAGAGAGGACCTGCTGAGAAAGCAGAGAACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCAC
 CAGATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGAGAAGACAGGAGGACTTCTACCCCTTCCTGAAGGACAACAGAGA
 GAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCAGAATCCCCTACTACGTGGGCCCCCTGGCCAGAGGCAACAGCAGATTTCGCCTG
 GATGACCAGAAAGAGCGAGGAGACCATCACCCCCTGGAACCTTCGAGGAGGTGGTGGACAAGGGCGCCAGCGCCCAGA
 GCTTCATCGAGAGAATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCCAACGAGAAGGTGCTGCCCAAGCACAGCCTGCTGTACG
 AGTACTTCACCGTGTACAACGAGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCATGAGAAAGCCCGCCTTCCTGAGCG
 GCGAGCAGAAGAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACAGAAAGGTGACCGTGAAGCAGCTGAAGGAGGAC
 TACTTCAAGAAGATCGAGTGCTTCGACAGCGTGGAGATCAGCGGCGTGGAGGACAGATTCAACGCCAGCCTGGGCAC
 CTACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAGGACA
 TCGTGCTGACCCTGACCCTGTTTCGAGGACAGAGAGATGATCGAGGAGAGACTGAAGACCTACGCCACCTGTTTCGACG
 ACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGAGAAGAAGATACACCGGCTGGGGCAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGCAT
 CAGAGACAAGCAGAGCGGCAAGACCATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGACGGCTTCGCCAACAGAACTTCATGCAGC
 TGATCCACGACGACAGCCTGACCTTCAAGGAGGACATCCAGAAGGCCAGGTGAGCGGCCAGGGCGACAGCCTGCAC
 GAGCACATCGCCAACCTGGCCGGCAGCCCCGCCATCAAGAAGGGCATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACGAGCT
 GGTGAAGGTGATGGGCAGACACAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAGATGGCCAGAGAGAACCAGACCACCCAGAAG

GGCCAGAAGAACAGCAGAGAGAGAATGAAGAGAATCGAGGAGGGCATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAGG
 AGCACCCCGTGGAGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGCAGAGACATGTAC
 GTGGACCAGGAGCTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTGGACCACATCGTGCCCCAGAGCTTCCTGAAGGA
 CGACAGCATCGACAACAAGGTGCTGACCAGAAGCGACAAGAACAGAGGCAAGAGCGACAACGTGCCCAGCGAGGAG
 GTGGTGAAGAAGATGAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCCAGAGAAAGTTCGACAACCT
 GACCAAGGCCGAGAGAGGGCGGCCTGAGCGAGCTGGACAAGGCCGGCTTCATCAAGAGACAGCTGGTGGAGACCAGAC
 AGATCACCAAGCACGTGGCCCAGATCCTGGACAGCAGAATGAACACCAAGTACGACGAGAACGACAAGCTGATCAGA
 GAGGTGAAGGTGATCACCTGAAGAGCAAGCTGGTGAGCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTGAGAGA
 GATCAACAACCTACCACCACGCCCACGACGCCTACCTGAACGCCGTGGTGGGCACCGCCCTGATCAAGAAGTACCCCAA
 GCTGGAGAGCGAGTTCGTGTACGGCGACTACAAGGTGTACGACGTGAGAAAGATGATCGCCAAGAGCGAGCAGGAGA
 TCGGCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTCTTCAAGACCGAGATCACCTGGCCAACG
 GCGAGATCAGAAAGAGACCCCTGATCGAGACCAACGGCGAGACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAGGGGCAGAGACTTC
 GCCACCGTGAGAAAGGTGCTGAGCATGCCCCAGGTGAACATCGTGAAGAAGACCGAGGTGCAGACCGGCGGCTTCAG
 CAAGGAGAGCATCCTGCCCAAGAGAAACAGCGACAAGCTGATCGCCAGAAAGAAGGACTGGGACCCCAAGAAGTAC
 GGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCTACAGCGTGCTGGTGGTGGCCAAGGTGGAGAAGGGCAAGAGCAAGAAGCT
 GAAGAGCGTGAAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGAGAAGCAGCTTCGAGAAGAACCCCATCGACTTCCTGG
 AGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTGAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCCAAGTACAGCCTGTTCGAGCTGGAGAAC
 GGCAGAAAGAGAATGCTGGCCAGCGCCGGCGAGCTGCAGAAGGGCAACGAGCTGGCCCTGCCAGCAAGTACGTGAA
 CTTCTGTACCTGGCCAGCCACTACGAGAAGCTGAAGGGCAGCCCCGAGGACAACGAGCAGAAGCAGCTGTTCGTGG
 AGCAGCACAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCAGCGAGTTCAGCAAGAGAGTGATCCTGGCCGACGCC
 AACCTGGACAAGGTGCTGAGCGCCTACAACAAGCACAGAGACAAGCCCATCAGAGAGCAGGCCGAGAACATCATCCA
 CCTGTTACCCCTGACCAACCTGGGCGCCCCCGCCGCCTTCAAGTACTTCGACACCACCATCGACAGAAAGAGATACAC
 CAGCACCAAGGAGGTGCTGGACGCCACCCTGATCCACCAGAGCATCACCGGCCTGTACGAGACCAGAATCGACCTGA

	GCCAGCTGGGCGGCGACGGCGGGCGGCAGCCCCAAGAAGAAGAGAAAGGTGTGA
509	GGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTTCGTGTGTGTGTCGTTGCAGGCCTTATTCGGATCCGCCACCATG GACAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACAGCGTGGGCTGGGCCGTGATCACCGACGAGTACAAGGT GCCCAGCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACAGACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGCGCCCTGCTGT TCGACAGCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCAGACTGAAGAGAACCGCCAGAAGAAGATACACCAGAAGAAAGAAGACAG AATCTGCTACCTGCAGGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAGGAGAG CTTCCTGGTGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGAGACACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACG AGAAGTACCCCAACCATCTACCACCTGAGAAAGAAGCTGGTGGACAGCACCGACAAGGCCGACCTGAGACTGATCTAC CTGGCCCTGGCCACATGATCAAGTTCAGAGGCCACTTCCTGATCGAGGGCGACCTGAACCCCGACAACAGCGACGTG GACAAGCTGTTCATCCAGCTGGTGCAGACCTACAACCAGCTGTTCGAGGAGAACCCCATCAACGCCAGCGGCGTGGAC GCCAAGGCCATCCTGAGCGCCAGACTGAGCAAGAGCAGAAGACTGGAGAACCTGATCGCCCAGCTGCCCGGCGAGAA GAAGAACGGCCTGTTCGGCAACCTGATCGCCCTGAGCCTGGGCCTGACCCCAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGC CGAGGACGCCAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCCCAGATCGGCGACC AGTACGCCGACCTGTTCTGCGCCGCCAAGAACCTGAGCGACGCCATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTGAACACCG AGATCACCAAGGCCCCCCTGAGCGCCAGCATGATCAAGAGATACGACGAGCACCACCAGGACCTGACCCTGCTGAAG GCCCTGGTGAGACAGCAGCTGCCCCGAGAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGCTACGCCGGCTA CATCGACGGCGGCGCCAGCCAGGAGGAGTTCTACAAGTTCATCAAGCCCATCCTGGAGAAGATGGACGGCACCGAGG AGCTGCTGGTGAAGCTGAACAGAGAGGACCTGCTGAGAAAGCAGAGAACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCACCG ATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGAGAAGACAGGAGGACTTCTACCCCTTCCTGAAGGACAACAGAGAGAA GATCGAGAAGATCCTGACCTTCAGAATCCCCTACTACGTGGGCCCCCTGGCCAGAGGCAACAGCAGATTTCGCTGGAT GACCAGAAAGAGCGAGGAGACCATCACCCCTGGAACCTTCGAGGAGGTGGTGGACAAGGGCGCCAGCGCCCAGAGCT TCATCGAGAGAATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCAACGAGAAGGTGCTGCCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGT ACTTACCGTGTACAACGAGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCATGAGAAAGCCCGCCTTCCTGAGCGGC

GAGCAGAAGAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACAGAAAGGTGACCGTGAAGCAGCTGAAGGAGGACTA
 CTTCAAGAAGATCGAGTGCTTCGACAGCGTGGAGATCAGCGGCGTGGAGGACAGATTCAACGCCAGCCTGGGCACCT
 ACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAGGACATC
 GTGCTGACCCTGACCCTGTTCGAGGACAGAGAGATGATCGAGGAGAGACTGAAGACCTACGCCCACCTGTTCGACGAC
 AAGGTGATGAAGCAGCTGAAGAGAAGAAGATACACCGGCTGGGGCAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGCATCA
 GAGACAAGCAGAGCGGCAAGACCATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGACGGCTTCGCCAACAGAACTTCATGCAGCTG
 ATCCACGACGACAGCCTGACCTTCAAGGAGGACATCCAGAAGGCCCAGGTGAGCGGCCAGGGCGACAGCCTGCACGA
 GCACATCGCCAACCTGGCCGGCAGCCCCGCCATCAAGAAGGGCATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGG
 TGAAGGTGATGGGCAGACACAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAGATGGCCAGAGAGAACCAGACCACCCAGAAGGG
 CCAGAAGAACAGCAGAGAGAGAATGAAGAGAATCGAGGAGGGCATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAGGAG
 CACCCCGTGGAGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGCAGAGACATGTACGT
 GGACCAGGAGCTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTGGACCACATCGTGCCCCAGAGCTTCCTGAAGGACG
 ACAGCATCGACAACAAGGTGCTGACCAGAAGCGACAAGAACAGAGGCAAGAGCGACAACGTGCCCAGCGAGGAGGT
 GGTGAAGAAGATGAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCCAGAGAAAGTTCGACAACCTGA
 CCAAGGCCGAGAGAGGCGGCCTGAGCGAGCTGGACAAGGCCGGCTTCATCAAGAGACAGCTGGTGGAGACCAGACAG
 ATCACCAAGCACGTGGCCCAGATCCTGGACAGCAGAATGAACACCAAGTACGACGAGAACGACAAGCTGATCAGAGA
 GGTGAAGGTGATCACCTGAAGAGCAAGCTGGTGAGCGACTTCAGAAAGGACTTCAGTTCTACAAGGTGAGAGAGA
 TCAACAACCTACCACCACGCCACGACGCCTACCTGAACGCCGTGGTGGGCACCGCCCTGATCAAGAAGTACCCCAAGC
 TGGAGAGCGAGTTCGTGTACGGCGACTACAAGGTGTACGACGTGAGAAAGATGATCGCCAAGAGCGAGCAGGAGATC
 GGCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTCTTCAAGACCGAGATCACCTGGCCAACGGC
 GAGATCAGAAAGAGACCCCTGATCGAGACCAACGGCGAGACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAGGGCAGAGACTTCGC
 CACCGTGAGAAAGGTGCTGAGCATGCCCCAGGTGAACATCGTGAAGAAGACCGAGGTGCAGACCGGCGGCTTCAGCA
 AGGAGAGCATCCTGCCCAAGAGAAACAGCGACAAGCTGATCGCCAGAAAGAAGGACTGGGACCCCAAGAAGTACGG

	CGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCTACAGCGTGCTGGTGGTGGCCAAGGTGGAGAAGGGCAAGAGCAAGAAGCTGA AGAGCGTGAAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGAGAAGCAGCTTCGAGAAGAACCCCATCGACTTCCTGGAG GCCAAGGGCTACAAGGAGGTGAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCAAGTACAGCCTGTTCGAGCTGGAGAACGG CAGAAAGAGAATGCTGGCCAGCGCCGGCGAGCTGCAGAAGGGCAACGAGCTGGCCCTGCCAGCAAGTACGTGAACT TCCTGTACCTGGCCAGCCACTACGAGAAGCTGAAGGGCAGCCCCGAGGACAACGAGCAGAAGCAGCTGTTCGTGGAG CAGCACAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCAGCGAGTTCAGCAAGAGAGTGATCCTGGCCGACGCCAA CCTGGACAAGGTGCTGAGCGCCTACAACAAGCACAGAGACAAGCCCATCAGAGAGCAGGCCGAGAACATCATCCACC TGTTACCCCTGACCAACCTGGGCGCCCCCGCCGCTTCAAGTACTTCGACACCACCATCGACAGAAAGAGATACACCA GCACCAAGGAGGTGCTGGACGCCACCCTGATCCACCAGAGCATCACCGGCCTGTACGAGACCAGAATCGACCTGAGC CAGCTGGGCGGCGACGGCGGGCAGCCCCAAGAAGAAGAGAAAGGTGTGACTAGCCATCACATTTAAAAGCATCTC AGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAGAAAATGAAGATCAATAGCTTATTCATCTCTTTTTCTTTTTCTTTTGGTGTAAAGC CAACACCCTGTCTAAAAAACATAAATTTCTTTAATCATTTTGCCTCTTTTCTCTGTGCTTCAATTAATAAAAAATGGAAA GAACCTCGAG
510	ATGGACAAGAAGTACTCTATCGGTTTGGACATCGGTACCAACTCTGTTCGGTTGGGCCGTCATCACCGACGAATACAAG GTCCCATCTAAGAAGTTCAAGGTCTTGGGTAACACCGACAGACACTCTATCAAGAAGAAGTTGATCGGTGCCTTGTGT TCGACTCTGGTGAAACCGCCGAAGCCACCAGATTGAAGAGAACCGCCAGAAGAAGATACACCAGAAGAAAGAACAG AATCTGCTACTTGCAAGAAATCTTCTCTAACGAAATGGCCAAGGTCGACGACTCTTTCTTCCACAGATTGGAAGAATCT TTCTTGGTCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCAATCTTCGGTAACATCGTCGACGAAGTCGCCTACCACGAA AAGTACCCAACCATCTACCACTTGAGAAAGAAGTTGGTCGACTCTACCGACAAGGCCGACTTGAGATTGATCTACTTG GCCTTGGCCCACATGATCAAGTTCAGAGGTCACCTTCTTGATCGAAGGTGACTTGAACCCAGACAACCTCTGACGTCGAC AAGTTGTTTCATCCAATTGGTCCAAACCTACAACCAATTGTTTCGAAGAAAACCCAATCAACGCCTCTGGTGTGACGCC AAGGCCATCTTGTCTGCCAGATTGTCTAAGAGCAGAAGATTGGAAAAGTTGATCGCCCAATTGCCAGGTGAAAAGAAG AACGGTTTGTTCGGTAAGTTGATCGCCTTGTCTTTGGGTTTGACCCCAAAGTTCAAGTCTAACTTCGACTTGGCCGAAG

ACGCCAAGTTGCAATTGTCTAAGGACACCTACGACGACGACTTGGACAACCTTGTGGCCCAAATCGGTGACCAATACG
CCGACTTGTCTTGGCCGCCAAGAACTTGTCTGACGCCATCTTGTGTCTGACATCTTGAGAGTCAACACCGAAATCAC
CAAGGCCCCATTGTCTGCCTCTATGATCAAGAGATACGACGAACACCACCAAGACTTGACCTTGTGTAAGGCCTTGGT
CAGACAACAATTGCCAGAAAAGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAATCTAAGAACGGTTACGCCGGTTACATCGACGG
TGGTGCCTCTCAAGAAGAATTCTACAAGTTCATCAAGCCAATCTTGGAAAAGATGGACGGTACCGAAGAATTGTTGGT
CAAGTTGAACAGAGAAGACTTGTGAGAAAGCAAAGAACCTTCGACAACGGTTCTATCCCACACCAAATCCACTTGGG
TGAATTGCACGCCATCTTGAGAAGACAAGAAGACTTCTACCCATTCTTGAAGGACAACAGAGAAAAGATCGAAAAGA
TCTTGACCTTCAGAATCCCATACTACGTCGGTCCATTGGCCAGAGGTAACAGCAGATTTCGCCTGGATGACCAGAAAGT
CTGAAGAAACCATCACCCCATGGAACCTCGAAGAAGTCGTCGACAAGGGTGCCTCTGCCCAATCTTTCATCGAAAGAA
TGACCAACTTCGACAAGAACTTGCCAAACGAAAAGGTCTTGCCAAAGCACTCTTTGTTGTACGAATACTTCACCGTCTA
CAACGAATTGACCAAGGTCAAGTACGTCACCGAAGGTATGAGAAAGCCAGCCTTCTTGTCTGGTGAACAAAAGAAGG
CCATCGTCGACTTGTGTTCAAGACCAACAGAAAGGTCACCGTCAAGCAATTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATCG
AATGCTTCGACTCTGTCGAAATCTCTGGTGTGCAAGACAGATTCAACGCCTCTTTGGGTACCTACCACGACTTGTGAA
GATCATCAAGGACAAGGACTTCTTGGACAACGAAGAAAACGAAGACATCTTGAAGACATCGTCTTGACCTTGACCTT
GTTCTGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGATTGAAGACCTACGCCCCTTGTTCGACGACAAGGTCATGAAGCAAT
TGAAGAGAAGAAGATACACCGGTTGGGGTAGATTGAGCAGAAAGTTGATCAACGGTATCAGAGACAAGCAATCTGGT
AAGACCATCTTGGACTTCTTGAAGTCTGACGGTTTCGCCAACAGAACTTCATGCAATTGATCCACGACGACTCTTTGA
CCTTCAAGGAAGACATCCAAAAGGCCCAAGTCTCTGGTCAAGGTGACTCTTTGCACGAACACATCGCCAACTTGGCCG
GTTCTCCAGCCATCAAGAAGGGTATCTTGCAAACCGTCAAGGTCGTCGACGAATTGGTCAAGGTCATGGGTAGACACA
AGCCAGAAAACATCGTCATCGAAATGGCCAGAGAAAACCAAACCAACCCAAAAGGGTCAAAAGAACAGCAGAGAAAG
AATGAAGAGAATCGAAGAAGGTATCAAGGAATTGGGTCTCAAATCTTGAAGGAACACCCAGTCGAAAACACCCAAT
TGCAAAACGAAAAGTTGTACTTGTACTACTTGCAAAACGGTAGAGACATGTACGTCGACCAAGAATTGGACATCAACA
GATTGTCTGACTACGACGTCGACCACATCGTCCCACAATCTTCTTGAAGGACGACTCTATCGACAACAAGGTCTTGAC

	CAGATCTGACAAGAACAGAGGTAAGTCTGACAACGTCCCATCTGAAGAAGTCGTCAAGAAGATGAAGAAGTACTGGA GACAATTGTTGAACGCCAAGTTGATCACCCAAAGAAAGTTCGACAACCTTGACCAAGGCCGAAAGAGGTGGTTTGTCTG AATTGGACAAGGCCGGTTTCATCAAGAGACAATTGGTCGAAACCAGACAAATCACCAAGCACGTGCCCCAAATCTTGG ACAGCAGAATGAACACCAAGTACGACGAAAACGACAAGTTGATCAGAGAAGTCAAGGTCATCACCTTGAAGTCTAAG TTGGTCTCTGACTTCAGAAAGGACTTCCAATTCTACAAGGTCAGAGAAATCAACAACCTACCACCACGCCACGACGCC TACTTGAACGCCGTCGTCGGTACCGCCTTGATCAAGAAGTACCCAAAGTTGGAATCTGAATTCGTCTACGGTGACTACA AGGTCTACGACGTCAGAAAGATGATCGCCAAGTCTGAACAAGAAATCGGTAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTACT CTAACATCATGAACTTCTTCAAGACCGAAATCACCTTGGCCAACGGTGAAATCAGAAAGAGACCATTGATCGAAACCA ACGGTGAAACCGGTGAAATCGTCTGGGACAAGGGTAGAGACTTCGCCACCGTCAGAAAGGTCTTGTCTATGCCACAAG TCAACATCGTCAAGAAGACCGAAGTCCAAACCGGTGGTTTCTCTAAGGAATCTATCTTGCCAAAGAGAAACTCTGACA AGTTGATCGCCAGAAAGAAGGACTGGGACCCAAAGAAGTACGGTGGTTTCGACTCTCCAACCGTCGCCTACTCTGTCT TGGTCGTCGCCAAGGTCGAAAAGGGTAAGTCTAAGAAGTTGAAGTCTGTCAAGGAATTGTTGGGTATCACCATCATGG AAAGATCTTCTTTTCGAAAAGAACCCAATCGACTTCTTGGAAGCCAAGGGTTACAAGGAAGTCAAGAAGGACTTGATCA TCAAGTTGCCAAAGTACTCTTTGTTTGAATTGGAAAACGGTAGAAAGAGAATGTTGGCCTCTGCCGGTGAATTGCAAA AGGGTAACGAATTGGCCTTGCCATCTAAGTACGTCAACTTCTTGTACTTGGCCTCTCACTACGAAAAGTTGAAGGGTTC TCCAGAAGACAACGAACAAAAGCAATTGTTTCGTCGAACAACACAAGCACTACTTGGACGAAATCATCGAACAAATCT CTGAATTCTCTAAGAGAGTCATCTTGGCCGACGCCAACTTGGACAAGGTCTTGTCTGCCTACAACAAGCACAGAGACA AGCCAATCAGAGAACAAGCCGAAAACATCATCCACTTGTTACCTTGACCAACTTGGGTGCCCCAGCCGCCTTCAAGT ACTTCGACACCACCATCGACAGAAAGAGATACACCTCTACCAAGGAAGTCTTGGACGCCACCTTGATCCACCAATCTA TCACCGGTTTGTACGAAACCAGAATCGACTTGTCTCAATTGGGTGGTGACGGTGGTGGTTCTCCAAGAAGAAGAGAA AGGTCTAA
511	ATGGACAAGAAGTACTCCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACTCCGTGGGCTGGGCCGTGATCACCGACGAGTACAAG GTGCCCTCCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCGGCACTCCATCAAGAAGAACCTGATCGGCGCCCTGCTG

TTCGACTCCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCCGGCTGAAGCGGACCGCCCGGCGGCGGTACACCCGGCGGAAGAACCG
 GATCTGCTACCTGCAGGAGATCTTCTCCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACTCCTTCTTCCACCGGCTGGAGGAGTC
 CTTCTGGTGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGGCACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACG
 AGAAGTACCCACCATCTACCACCTGCGGAAGAAGCTGGTGGACTCCACCGACAAGGCCGACCTGCGGGCTGATCTACC
 TGGCCCTGGCCACATGATCAAGTTCCGGGGCCACTTCCTGATCGAGGGCGACCTGAACCCCGACAACCTCCGACGTGG
 ACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTGCAGACCTACAACCAGCTGTTTCGAGGAGAACCCCATCAACGCCTCCGGCGTGGACG
 CCAAGGCCATCCTGTCCGCCCCGGCTGTCCAAGTCCCGGCGGCTGGAGAACCTGATCGCCAGCTGCCCGGCGAGAAGA
 AGAACGGCCTGTTTCGGCAACCTGATCGCCCTGTCCCTGGGCCTGACCCCCAACTTCAAGTCCAACCTTCGACCTGGCCGA
 GGACGCCAAGCTGCAGCTGTCCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCCCAGATCGGCGACCACT
 ACGCCGACCTGTTCTTGGCCGCCAAGAACCTGTCCGACGCCATCCTGCTGTCCGACATCCTGCGGGTGAACACCGAGA
 TCACCAAGGCCCCCTGTCCGCCTCCATGATCAAGCGGTACGACGAGCACCAACAGGACCTGACCCTGCTGAAGGCCC
 TGGTGCGGCAGCAGCTGCCCCGAGAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGTCCAAGAACGGCTACGCCGGCTACATCG
 ACGGCGGCGCCTCCCAGGAGGAGTTCTACAAGTTCATCAAGCCCATCCTGGAGAAGATGGACGGCACCGAGGAGCTG
 CTGGTGAAGCTGAACCGGGAGGACCTGCTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCTCCATCCCCCACCAGATCCAC
 CTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGCGGCAGGAGGACTTCTACCCCTTCCTGAAGGACAACCGGGAGAAGATCGA
 GAAGATCCTGACCTTCCGGATCCCCTACTACGTGGGCCCCCTGGCCCCGGGGCAACTCCCGGTTTCGCCTGGATGACCCG
 GAAGTCCGAGGAGACCATCACCCCTGGAACCTTCGAGGAGGTGGTGGACAAGGGCGCCTCCGCCCAGTCCTTCATCGA
 GCGGATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCAACGAGAAGGTGCTGCCCAAGCACTCCCTGCTGTACGAGTACTTCAC
 CGTGTACAACGAGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCATGCGGAAGCCCGCCTTCCTGTCCGGCGAGCAGA
 AGAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAGGTGACCGTGAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAG
 AAGATCGAGTGCTTCGACTCCGTGGAGATCTCCGGCGTGGAGGACCGGTTCAACGCCTCCCTGGGCACCTACCACGAC
 CTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAGGACATCGTGCTGAC
 CCTGACCCTGTTTCGAGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAGACCTACGCCACCTGTTTCGACGACAAGGTGAT

GAAGCAGCTGAAGCGGCGGCGGTACACCGGCTGGGGCCGGCTGTCCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGGACAAGC
 AGTCCGGCAAGACCATCCTGGACTTCCTGAAGTCCGACGGCTTCGCCAACCGGAACTTCATGCAGCTGATCCACGACG
 ACTCCCTGACCTTCAAGGAGGACATCCAGAAGGCCAGGTGTCCGGCCAGGGCGACTCCCTGCACGAGCACATCGCCA
 ACCTGGCCGGCTCCCCCGCCATCAAGAAGGGCATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTGATG
 GGCCGGCACAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAGATGGCCCGGGAGAACCAGACCACCCAGAAGGGCCAGAAGAACTC
 CCGGGAGCGGATGAAGCGGATCGAGGAGGGCATCAAGGAGCTGGGCTCCCAGATCCTGAAGGAGCACCCCGTGGAGA
 ACACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGCCGGGACATGTACGTGGACCAGGAGCTG
 GACATCAACCGGCTGTCCGACTACGACGTGGACCACATCGTGCCCCAGTCCTTCCTGAAGGACGACTCCATCGACAAC
 AAGGTGCTGACCCGGTCCGACAAGAACCGGGGCAAGTCCGACAACGTGCCCTCCGAGGAGGTGGTGAAGAAGATGAA
 GAACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCCAGCGGAAGTTCGACAACCTGACCAAGGCCGAGCGGG
 GCGGCCTGTCCGAGCTGGACAAGGCCGGCTTCATCAAGCGGCAGCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCACGTG
 GCCCAGATCCTGGACTCCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAACGACAAGCTGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCAC
 CCTGAAGTCCAAGCTGGTGTCCGACTTCCGGAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTGCGGGAGATCAACAACCTACCACCA
 CGCCACGACGCCTACCTGAACGCCGTGGTGGGCACCGCCCTGATCAAGAAGTACCCCAAGCTGGAGTCCGAGTTCGT
 GTACGGCGACTACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGTCCGAGCAGGAGATCGGCAAGGCCACCGCCA
 AGTACTTCTTCTACTCCAACATCATGAACCTTCTTCAAGACCGAGATCACCTGGCCAACGGCGAGATCCGGAAGCGGC
 CCCTGATCGAGACCAACGGCGAGACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAGGGCCGGGACTTCGCCACCGTGCGGAAGGTG
 CTGTCCATGCCCCAGGTGAACATCGTGAAGAAGACCGAGGTGCAGACCGGCGGCTTCTCCAAGGAGTCCATCCTGCCC
 AAGCGGAACTCCGACAAGCTGATCGCCCGGAAGAAGGACTGGGACCCCAAGAAGTACGGCGGCTTCGACTCCCCAC
 CGTGGCCTACTCCGTGCTGGTGGTGGCCAAGGTGGAGAAGGGCAAGTCCAAGAAGCTGAAGTCCGTGAAGGAGCTGC
 TGGGCATCACCATCATGGAGCGGTCTCCTTCGAGAAGAACCCCATCGACTTCCTGGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGG
 TGAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCCAAGTACTCCCTGTTCGAGCTGGAGAACGGCCGGAAGCGGATGCTGGCCT
 CCGCCGGCGAGCTGCAGAAGGGCAACGAGCTGGCCCTGCCCTCCAAGTACGTGAACCTTCCTGTACCTGGCCTCCCACT

	ACGAGAAGCTGAAGGGCTCCCCGAGGACAACGAGCAGAAGCAGCTGTTCTGTGGAGCAGCACAAGCACTACCTGGAC GAGATCATCGAGCAGATCTCCGAGTTCTCCAAGCGGGTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGGTGCTGTCCGCC TACAACAAGCACCGGGACAAGCCCATCCGGGAGCAGGCCGAGAACATCATCCACCTGTTACCCTGACCAACCTGGGC GCCCCGCCGCCTTCAAGTACTTCGACACCACCATCGACCGGAAGCGGTACACCTCCACCAAGGAGGTGCTGGACGCC ACCCTGATCCACCAGTCCATCACCGGCCTGTACGAGACCCGGATCGACCTGTCCCAGCTGGGCGGCGACGGCGGCGGC TCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGTGA
512	ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACAGCGTGGGCTGGGCCGTGATCACCGACGAGTACAA GGTGCCCAGCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCGGCACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGCGCCCTGC TGTTTCGACAGCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCCGGCTGAAGCGGACCGCCCGGCGGGCGGTACACCCGGCGGAAGAAC CGGATCTGCTACCTGCAGGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAGCTTCTTCCACCGGCTGGAGGAG AGCTTCTTGGTGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGGCACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCA CGAGAAGTACCCACCATCTACCACCTGCGGAAGAAGCTGGTGGACAGCACCGACAAGGCCGACCTGCGGCTGATCT ACCTGGCCCTGGCCACATGATCAAGTTCCGGGGCCACTTCTGATCGAGGGCGACCTGAACCCCGACAACAGCGACG TGGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTGCAGACCTACAACCAGCTGTTTCGAGGAGAACCCCATCAACGCCAGCGGCGTGG ACGCCAAGGCCATCCTGAGCGCCCGGCTGAGCAAGAGCCGGCGGCTGGAGAACCTGATCGCCCAGCTGCCCCGGCGAG AAGAAGAACGGCCTGTTTCGGCAACCTGATCGCCCTGAGCCTGGGCCTGACCCCCAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTG GCCGAGGACGCCAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCCCAGATCGGCGA CCAGTACGCCGACCTGTTCTTGGCCGCCAAGAACCTGAGCGACGCCATCCTGCTGAGCGACATCCTGCGGGTGAACAC CGAGATCACCAAGGCCCCCCCTGAGCGCCAGCATGATCAAGCGGTACGACGAGCACCACCAGGACCTGACCCTGCTGA AGGCCCTGGTGCGGCAGCAGCTGCCCCGAGAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGCTACGCCGGC TACATCGACGGCGGCGCCAGCCAGGAGGAGTTCTACAAGTTCATCAAGCCCATCCTGGAGAAGATGGACGGCACCGA GGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACCGGGAGGACCTGCTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCACC AGATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGCGGCAGGAGGACTTCTACCCCTTCTGAAGGACAACCGGGAGA

AGATCGAGAAGATCCTGACCTTCCGGATCCCCTACTACGTGGGCCCCCTGGCCCCGGGGCAACAGCCGGTTCGCCTGGA
 TGACCCGGAAGAGCGAGGAGACCATCACCCCTGGA ACTTCGAGGAGGTGGTGGACAAGGGCGCCAGCGCCCAGAGC
 TTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCCAACGAGAAGGTGCTGCCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAG
 TACTTCACCGTGTACAACGAGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCATGCGGAAGCCCGCCTTCCTGAGCGGC
 GAGCAGAAGAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAGGTGACCGTGAAGCAGCTGAAGGAGGACTA
 CTTCAAGAAGATCGAGTGCTTCGACAGCGTGGAGATCAGCGGCGTGGAGGACCGGTTCAACGCCAGCCTGGGACACCTA
 CCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAGGACATCG
 TGCTGACCCTGACCCTGTTTCGAGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAGACCTACGCCCACCTGTTTCGACGACA
 AGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGCGGGCGGTACACCGGCTGGGGCCGGCTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGG
 GACAAGCAGAGCGGCAAGACCATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGACGGCTTCGCCAACCGGAACTTCATGCAGCTGATC
 CACGACGACAGCCTGACCTTCAAGGAGGACATCCAGAAGGCCCAGGTGAGCGGCCAGGGCGACAGCCTGCACGAGCA
 CATCGCCAACCTGGCCGGCAGCCCCGCCATCAAGAAGGGCATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGA
 AGGTGATGGGCCGGCACAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAGATGGCCCGGGAGAACCAGACCACCCAGAAGGGCCAG
 AAGAACAGCCGGGAGCGGATGAAGCGGATCGAGGAGGGCATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAGGAGCACC
 CCGTGGAGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGCCGGGACATGTACGTGGAC
 CAGGAGCTGGACATCAACCGGCTGAGCGACTACGACGTGGACCACATCGTGCCCCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAG
 CATCGACAACAAGGTGCTGACCCGGAGCGACAAGAACCGGGGCAAGAGCGACAACGTGCCAGCGAGGAGGTGGTG
 AAGAAGATGAAGAACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCCAGCGGAAGTTCGACAACCTGACCAA
 GGCCGAGCGGGGCGGCCTGAGCGAGCTGGACAAGGCCGGCTTCATCAAGCGGCAGCTGGTGGAGACCCGGCAGATCA
 CCAAGCACGTGGCCAGATCCTGGACAGCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAACGACAAGCTGATCCGGGAGGTG
 AAGGTGATCACCTGAAGAGCAAGCTGGTGAAGCGACTTCCGGAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTGCGGGAGATCAA
 CAACTACCACCACGCCCACGACGCCTACCTGAACGCCGTGGTGGGCACCGCCCTGATCAAGAAGTACCCCAAGCTGGA
 GAGCGAGTTCGTGTACGGCGACTACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGAGCGAGCAGGAGATCGGCA

	AGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTCTTCAAGACCGAGATCACCTGGCCAACGGCGAGA TCCGGAAGCGGCCCTGATCGAGACCAACGGCGAGACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAGGGCCGGGACTTCGCCACC GTGCGGAAGGTGCTGAGCATGCCCCAGGTGAACATCGTGAAGAAGACCGAGGTGCAGACCGGCGGCTTCAGCAAGGA GAGCATCCTGCCCCAAGCGGAACAGCGACAAGCTGATCGCCCGGAAGAAGGACTGGGACCCCAAGAAGTACGGCGGCT TCGACAGCCCCACCGTGGCCTACAGCGTGCTGGTGGTGGCCAAGGTGGAGAAGGGCAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGC GTGAAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGCGGAGCAGCTTCGAGAAGAACCCCATCGACTTCCTGGAGGCCAA GGGCTACAAGGAGGTGAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCCAAGTACAGCCTGTTCGAGCTGGAGAACGGCCGGA AGCGGATGCTGGCCAGCGCCGGCGAGCTGCAGAAGGGCAACGAGCTGGCCCTGCCAGCAAGTACGTGAACCTCCTG TACCTGGCCAGCCACTACGAGAAGCTGAAGGGCAGCCCCGAGGACAACGAGCAGAAGCAGCTGTTCGTGGAGCAGCA CAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCAGCGAGTTCAGCAAGCGGGTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGG ACAAGGTGCTGAGCGCCTACAACAAGCACCGGGACAAGCCCATCCGGGAGCAGGCCGAGAACATCATCCACCTGTTC ACCCTGACCAACCTGGGCGCCCCCGCCGCCTTCAAGTACTTCGACACCACCATCGACCGGAAGCGGTACACCAGCACC AAGGAGGTGCTGGACGCCACCCTGATCCACCAGAGCATCACCGGCCTGTACGAGACCCGGATCGACCTGAGCCAGCTG GGCGGCGACGGCGGCGGCAGCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGTGA
513	ATGGACAAGAAGTACTCCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACTCCGTGGGCTGGGCCGTGATCACCGACGAGTACAAG GTGCCCTCCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCGGCACTCCATCAAGAAGAACCTGATCGGCGCCCTGCTG TTCGACTCCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCCGGCTGAAGCGGACCGCCCGGCGGCGGTACACCCGGCGGAAGAACCG GATCTGCTACCTGCAGGAGATCTTCTCCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACTCCTTCTTCCACCGGCTGGAGGAGTC CTTCTTGGTGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGGCACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACG AGAAGTACCCACCATCTACCACCTGCGGAAGAAGCTGGTGGACTCCACCGACAAGGCCGACCTGCGGCTGATCTACC TGGCCCTGGCCACATGATCAAGTTCCGGGGCCACTTCTGATCGAGGGCGACCTGAACCCCGACAACCTCCGACGTGG ACAAGCTGTTCATCCAGCTGGTGCAGACCTACAACCAGCTGTTCGAGGAGAACCCCATCAACGCCTCCGGCGTGGACG CCAAGGCCATCCTGTCCGCCCCGGCTGTCCAAGTCCCGGCGGCTGGAGAACCTGATCGCCAGCTGCCCGGCGAGAAGA

AGAACGGCCTGTTTCGGCAACCTGATCGCCCTGTCCCTGGGCCTGACCCCCAACTTCAAGTCCAACCTTCGACCTGGCCGA
 GGACGCCAAGCTGCAGCTGTCCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCCCAGATCGGCGACCAGT
 ACGCCGACCTGTTCTTGGCCGCCAAGAACCTGTCCGACGCCATCCTGCTGTCCGACATCCTGCGGGTGAACACCGAGA
 TCACCAAGGCCCCCCTGTCCGCCTCCATGATCAAGCGGTACGACGAGCACCACCAGGACCTGACCCTGCTGAAGGCCC
 TGGTGCGGCAGCAGCTGCCCCGAGAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGTCCAAGAACGGCTACGCCGGCTACATCG
 ACGGCGGCGCCTCCCAGGAGGAGTTCTACAAGTTCATCAAGCCCATCCTGGAGAAGATGGACGGCACCGAGGAGCTG
 CTGGTGAAGCTGAACCGGGAGGACCTGCTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCTCCATCCCCACCAGATCCAC
 CTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGCGGCAGGAGGACTTCTACCCCTTCCTGAAGGACAACCGGGAGAAGATCGA
 GAAGATCCTGACCTTCCGGATCCCCTACTACGTGGGCCCCCTGGCCCCGGGGCAACTCCCGGTTTCGCCTGGATGACCCG
 GAAGTCCGAGGAGACCATCACCCCCTGGAACCTTCGAGGAGGTGGTGGACAAGGGCGCCTCCGCCCAGTCCTTCATCGA
 GCGGATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCCAACGAGAAGGTGCTGCCCAAGCACTCCCTGCTGTACGAGTACTTCAC
 CGTGTACAACGAGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCATGCGGAAGCCCGCCTTCCTGTCCGGCGAGCAGA
 AGAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAGGTGACCGTGAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAG
 AAGATCGAGTGCTTCGACTCCGTGGAGATCTCCGGCGTGGAGGACCGGTTCAACGCCTCCCTGGGCACCTACCACGAC
 CTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAGGACATCGTGCTGAC
 CCTGACCCTGTTTCGAGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAGACCTACGCCACCTGTTTCGACGACAAGGTGAT
 GAAGCAGCTGAAGCGGCGGCGGTACACCGGCTGGGGCCGGCTGTCCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGGACAAGC
 AGTCCGGCAAGACCATCCTGGACTTCCTGAAGTCCGACGGCTTCGCCAACCGGAACCTTCATGCAGCTGATCCACGACG
 ACTCCCTGACCTTCAAGGAGGACATCCAGAAGGCCAGGTGTCCGGCCAGGGCGACTCCCTGCACGAGCACATCGCCA
 ACCTGGCCGGCTCCCCCGCCATCAAGAAGGGCATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTGATG
 GGCCGGCACAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAGATGGCCCGGGAGAACCAGACCACCCAGAAGGGCCAGAAGAAGTCC
 CCGGGAGCGGATGAAGCGGATCGAGGAGGGCATCAAGGAGCTGGGCTCCAGATCCTGAAGGAGCACCCCGTGGAGA
 ACACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGCCGGGACATGTACGTGGACCAGGAGCTG

	GACATCAACCGGCTGTCCGACTACGACGTGGACCACATCGTGCCCCAGTCCTTCCTGAAGGACGACTCCATCGACAAC AAGGTGCTGACCCGGTCCGACAAGAACCGGGGCAAGTCCGACAACGTGCCCTCCGAGGAGGTGGTGAAGAAGATGAA GAACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCAGCGGAAGTTCGACAACCTGACCAAGGCCGAGCGGG GCGGCCTGTCCGAGCTGGACAAGGCCGGCTTCATCAAGCGGCAGCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCACGTG GCCCAGATCCTGGACTCCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAACGACAAGCTGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCAC CCTGAAGTCCAAGCTGGTGTCCGACTTCCGGAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTGCGGGAGATCAACAACCTACCACCA CGCCCACGACGCCTACCTGAACGCCGTGGTGGGCACCGCCCTGATCAAGAAGTACCCCAAGCTGGAGTCCGAGTTCGT GTACGGCGACTACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGTCCGAGCAGGAGATCGGCAAGGCCACCGCCA AGTACTTCTTCTACTCCAACATCATGAACTTCTTCAAGACCGAGATCACCTGGCCAACGGCGAGATCCGGAAGCGGC CCCTGATCGAGACCAACGGCGAGACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAGGGCCGGGACTTCGCCACCGTGCGGAAGGTG CTGTCCATGCCCCAGGTGAACATCGTGAAGAAGACCGAGGTGCAGACCGGCGGCTTCTCCAAGGAGTCCATCCTGCCC AAGCGGAAGTCCGACAAGCTGATCGCCCGGAAGAAGGACTGGGACCCCAAGAAGTACGGCGGCTTCGACTCCCCAC CGTGGCCTACTCCGTGCTGGTGGTGGCCAAGGTGGAGAAGGGCAAGTCCAAGAAGCTGAAGTCCGTGAAGGAGCTGC TGGGCATCACCATCATGGAGCGGTCCTCCTTCGAGAAGAACCCCATCGACTTCCTGGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGG TGAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCCAAGTACTCCCTGTTCGAGCTGGAGAACGGCCGGAAGCGGATGCTGGCCT CCGCCGGCGAGCTGCAGAAGGGCAACGAGCTGGCCCTGCCCTCCAAGTACGTGAACTTCCTGTACCTGGCCTCCCACT ACGAGAAGCTGAAGGGCTCCCCCGAGGACAACGAGCAGAAGCAGCTGTTCGTGGAGCAGCACAAGCACTACCTGGAC GAGATCATCGAGCAGATCTCCGAGTTCTCCAAGCGGGTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGGTGCTGTCCGCC TACAACAAGCACCGGGACAAGCCCATCCGGGAGCAGGCCGAGAACATCATCCACCTGTTACCCCTGACCAACCTGGGC GCCCCCGCCGCCTTCAAGTACTTCGACACCACCATCGACCGGAAGCGGTACACCTCCACCAAGGAGGTGCTGGACGCC ACCCTGATCCACCAGTCCATCACCGGCCTGTACGAGACCCGGATCGACCTGTCCCAGCTGGGCGGCGACGGCTCCGGC TCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGACGGCTCCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGACTCCGGCTGA
514	ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACAGCGTGGGCTGGGCCGTGATCACCGACGAGTACAA

GGTGCCCAGCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCGGCACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGCGCCCTGC
 TGTTCGACAGCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCCGGCTGAAGCGGACCGCCCGGCGGGCGGTACACCCGGCGGAAGAAC
 CGGATCTGCTACCTGCAGGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAGCTTCTTCCACCGGCTGGAGGAG
 AGCTTCCTGGTGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGGCACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCA
 CGAGAAGTACCCACCATCTACCACCTGCGGAAGAAGCTGGTGGACAGCACCGACAAGGCCGACCTGCGGCTGATCT
 ACCTGGCCCTGGCCACATGATCAAGTTCCGGGGCCACTTCCTGATCGAGGGCGACCTGAACCCCGACAACAGCGACG
 TGGACAAGCTGTTCATCCAGCTGGTGCAGACCTACAACCAGCTGTTCGAGGAGAACCCCATCAACGCCAGCGGGCTGG
 ACGCCAAGGCCATCCTGAGCGCCCGGCTGAGCAAGAGCCGGCGGCTGGAGAACCTGATCGCCAGCTGCCCCGGCGAG
 AAGAAGAACGGCCTGTTCGGCAACCTGATCGCCCTGAGCCTGGGCCTGACCCCCAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTG
 GCCGAGGACGCCAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCCCAGATCGGCGA
 CCAGTACGCCGACCTGTTCTGGCCGCCAAGAACCTGAGCGACGCCATCCTGCTGAGCGACATCCTGCGGGTGAACAC
 CGAGATCACCAAGGCCCCCCCTGAGCGCCAGCATGATCAAGCGGTACGACGAGCACCACCAGGACCTGACCTGCTGA
 AGGCCCTGGTGCGGCAGCAGCTGCCCCGAGAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGCTACGCCGGC
 TACATCGACGGCGGCGCCAGCCAGGAGGAGTTCTACAAGTTCATCAAGCCCATCCTGGAGAAGATGGACGGCACCGA
 GGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACCGGGAGGACCTGCTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCACC
 AGATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGCGGCAGGAGGACTTCTACCCCTTCCTGAAGGACAACCGGGAGA
 AGATCGAGAAGATCCTGACCTTCCGGATCCCCTACTACGTGGGCCCCCTGGCCCCGGGGCAACAGCCGGTTCGCCTGGA
 TGACCCGGAAGAGCGAGGAGACCATCACCCCTGGAACCTTCGAGGAGGTGGTGGACAAGGGCGCCAGCGCCCAGAGC
 TTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCCAACGAGAAGGTGCTGCCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAG
 TACTTCACCGTGTACAACGAGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCATGCGGAAGCCCGCCTTCCTGAGCGGC
 GAGCAGAAGAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAGGTGACCGTGAAGCAGCTGAAGGAGGACTA
 CTTCAAGAAGATCGAGTGCTTCGACAGCGTGGAGATCAGCGGCGTGGAGGACCGTTCAACGCCAGCCTGGGCACCTA
 CCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAGGACATCG

TGCTGACCCTGACCCTGTTCGAGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAGACCTACGCCCACCTGTTCGACGACA
 AGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGCGGCGGTACACCGGCTGGGGCCGGCTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGG
 GACAAGCAGAGCGGCAAGACCATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGACGGCTTCGCCAACCGGAACTTCATGCAGCTGATC
 CACGACGACAGCCTGACCTTCAAGGAGGACATCCAGAAGGCCAGGTGAGCGGCCAGGGCGACAGCCTGCACGAGCA
 CATCGCCAACCTGGCCGGCAGCCCCGCCATCAAGAAGGGCATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGA
 AGGTGATGGGCCGGCACAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAGATGGCCCGGGAGAACCAGACCACCCAGAAGGGCCAG
 AAGAACAGCCGGGAGCGGATGAAGCGGATCGAGGAGGGCATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAGGAGCACC
 CCGTGAGAAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGCCGGGACATGTACGTGGAC
 CAGGAGCTGGACATCAACCGGCTGAGCGACTACGACGTGGACCACATCGTGCCCCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAG
 CATCGACAACAAGGTGCTGACCCGGAGCGACAAGAACCGGGGCAAGAGCGACAACGTGCCCAGCGAGGAGGTGGTG
 AAGAAGATGAAGAACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCCAGCGGAAGTTCGACAACCTGACCAA
 GGCCGAGCGGGGCGGCCTGAGCGAGCTGGACAAGGCCGGCTTCATCAAGCGGCAGCTGGTGGAGACCCGGCAGATCA
 CCAAGCACGTGGCCCAGATCCTGGACAGCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAACGACAAGCTGATCCGGGAGGTG
 AAGGTGATCACCTGAAGAGCAAGCTGGTGAGCGACTTCCGGAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTGCGGGAGATCAA
 CAACTACCACCACGCCCACGACGCCTACCTGAACGCCGTGGTGGGCACCGCCCTGATCAAGAAGTACCCCAAGCTGGA
 GAGCGAGTTCGTGTACGGCGACTACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGAGCGAGCAGGAGATCGGCA
 AGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTCTTCAAGACCGAGATCACCTGGCCAACGGCGAGA
 TCCGGAAGCGGCCCTGATCGAGACCAACGGCGAGACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAGGGCCGGGACTTCGCCACC
 GTGCGGAAGGTGCTGAGCATGCCCCAGGTGAACATCGTGAAGAAGACCGAGGTGCAGACCGGCGGGCTTCAGCAAGGA
 GAGCATCCTGCCCCAAGCGGAACAGCGACAAGCTGATCGCCCGGAAGAAGGACTGGGACCCCAAGAAGTACGGCGGCT
 TCGACAGCCCCACCGTGGCCTACAGCGTGCTGGTGGTGGCCAAGGTGGAGAAGGGCAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGC
 GTGAAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGCGGAGCAGCTTCGAGAAGAACCCCATCGACTTCCTGGAGGCCAA
 GGGCTACAAGGAGGTGAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCCAAGTACAGCCTGTTCGAGCTGGAGAACGGCCGGA

	AGCGGATGCTGGCCAGCGCCGGCGAGCTGCAGAAGGGCAACGAGCTGGCCCTGCCCAGCAAGTACGTGAACTTCCTG TACCTGGCCAGCCACTACGAGAAGCTGAAGGGCAGCCCCGAGGACAACGAGCAGAAGCAGCTGTTCGTGGAGCAGCA CAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCAGCGAGTTCAGCAAGCGGGTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGG ACAAGGTGCTGAGCGCCTACAACAAGCACCGGGACAAGCCCATCCGGGAGCAGGCCGAGAACATCATCCACCTGTTC ACCCTGACCAACCTGGGCGCCCCCGCCGCCTTCAAGTACTTCGACACCACCATCGACCGGAAGCGGTACACCAGCACC AAGGAGGTGCTGGACGCCACCCTGATCCACCAGAGCATCACCGGCCTGTACGAGACCCGGATCGACCTGAGCCAGCTG GGCGGCGACGGCAGCGGCAGCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGACGGCAGCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGACA GCGGCTGA
515	ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACAGCGTGGGCTGGGCCGTGATCACCGACGAGTACAA GGTGCCCAGCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCGGCACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGCGCCCTGC TGTTTCGACAGCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCCGGCTGAAGCGGACCGCCCGGCGGCGGTACACCCGGCGGAAGAAC CGGATCTGCTACCTGCAGGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAGCTTCTTCCACCGGCTGGAGGAG AGCTTCCTGGTGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGGCACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCA CGAGAAGTACCCACCATCTACCACCTGCGGAAGAAGCTGGTGGACAGCACCGACAAGGCCGACCTGCGGCTGATCT ACCTGGCCCTGGCCCACATGATCAAGTTCCGGGGCCACTTCCTGATCGAGGGCGACCTGAACCCCGACAACAGCGACG TGGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTGCAGACCTACAACCAGCTGTTCGAGGAGAACCCCATCAACGCCAGCGGCGTG ACGCCAAGGCCATCCTGAGCGCCCGGCTGAGCAAGAGCCGGCGGCTGGAGAACCTGATCGCCCAGCTGCCCAGCGAG AAGAAGAACGGCCTGTTCGGCAACCTGATCGCCCTGAGCCTGGGCCTGACCCCCAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTG GCCGAGGACGCCAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCCCAGATCGGCGA CCAGTACGCCGACCTGTTCTGCGCGCCAAGAACCTGAGCGACGCCATCCTGCTGAGCGACATCCTGCGGGTGAACAC CGAGATCACCAAGGCCCCCTGAGCGCCAGCATGATCAAGCGGTACGACGAGCACCACCAGGACCTGACCCTGCTGA AGGCCCTGGTGCAGCAGCTGCCCAGAGAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGCTACGCCGGC TACATCGACGGCGGCGCCAGCCAGGAGGAGTTCTACAAGTTCATCAAGCCCATCCTGGAGAAGATGGACGGCACCGA

GGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACCGGGAGGACCTGCTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCACC
 AGATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGCGGCAGGAGGACTTCTACCCCTTCCTGAAGGACAACCGGGAGA
 AGATCGAGAAGATCCTGACCTTCCGGATCCCCTACTACGTGGGCCCCCTGGCCCGGGGCAACAGCCGGTTCGCCTGGA
 TGACCCGGAAGAGCGAGGAGACCATCACCCCTGGAACCTTCGAGGAGGTGGTGGACAAGGGCGCCAGCGCCCAGAGC
 TTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCCAACGAGAAGGTGCTGCCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAG
 TACTTCACCGTGTACAACGAGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCATGCGGAAGCCCGCCTTCCTGAGCGGC
 GAGCAGAAGAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAGGTGACCGTGAAGCAGCTGAAGGAGGACTA
 CTTCAAGAAGATCGAGTGCTTCGACAGCGTGGAGATCAGCGGCGTGGAGGACCGGTTCAACGCCAGCCTGGGCACCTA
 CCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAGGACATCG
 TGCTGACCCTGACCCTGTTCGAGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAGACCTACGCCCACCTGTTCGACGACA
 AGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGCGGCGGTACACCGGCTGGGGCCGGCTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGG
 GACAAGCAGAGCGGCAAGACCATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGACGGCTTCGCCAACCAGGAACCTTCATGCAGCTGATC
 CACGACGACAGCCTGACCTTCAAGGAGGACATCCAGAAGGCCAGGTGAGCGGCCAGGGCGACAGCCTGCACGAGCA
 CATCGCCAACCTGGCCGGCAGCCCCGCCATCAAGAAGGGCATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGA
 AGGTGATGGGCCGGCACAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAGATGGCCCGGGAGAACCAGACCACCCAGAAGGGCCAG
 AAGAACAGCCGGGAGCGGATGAAGCGGATCGAGGAGGGCATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAGGAGCACC
 CCGTGGAGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGCCGGGACATGTACGTGGAC
 CAGGAGCTGGACATCAACCGGCTGAGCGACTACGACGTGGACCACATCGTGCCCCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAG
 CATCGACAACAAGGTGCTGACCCGGAGCGACAAGAACCAGGGGCAAGAGCGACAACGTGCCAGCGAGGAGGTGGTG
 AAGAAGATGAAGAACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCCAGCGGAAGTTCGACAACCTGACCAA
 GGCCGAGCGGGGCGGCCTGAGCGAGCTGGACAAGGCCGGCTTCATCAAGCGGCAGCTGGTGGAGACCCGGCAGATCA
 CCAAGCACGTGGCCAGATCCTGGACAGCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAACGACAAGCTGATCCGGGAGGTG
 AAGGTGATCACCTGAAGAGCAAGCTGGTGGAGCGACTTCGGAAGGACTTCAGTTCTACAAGGTGCGGGAGATCAA

	CAACTACCACCACGCCCACGACGCCTACCTGAACGCCGTGGTGGGCACCGCCCTGATCAAGAAGTACCCCAAGCTGGA GAGCGAGTTCGTGTACGGCGACTACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGAGCGAGCAGGAGATCGGCA AGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTCTTCAAGACCGAGATCACCTGGCCAACGGCGAGA TCCGGAAGCGGCCCTGATCGAGACCAACGGCGAGACCGGGCGAGATCGTGTGGGACAAGGGCCGGGACTTCGCCACC GTGCGGAAGGTGCTGAGCATGCCCCAGGTGAACATCGTGAAGAAGACCGAGGTGCAGACCGGCGGCTTCAGCAAGGA GAGCATCCTGCCCCAAGCGGAACAGCGACAAGCTGATCGCCCGGAAGAAGGACTGGGACCCCAAGAAGTACGGCGGCT TCGACAGCCCCACCGTGGCCTACAGCGTGCTGGTGGTGGCCAAGGTGGAGAAGGGCAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGC GTGAAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGCGGAGCAGCTTCGAGAAGAACCCCATCGACTTCCTGGAGGCCAA GGGCTACAAGGAGGTGAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCCAAGTACAGCCTGTTCGAGCTGGAGAACGGCCGGA AGCGGATGCTGGCCAGCGCCGGCGAGCTGCAGAAGGGCAACGAGCTGGCCCTGCCAGCAAGTACGTGAACTTCCTG TACCTGGCCAGCCACTACGAGAAGCTGAAGGGCAGCCCCGAGGACAACGAGCAGAAGCAGCTGTTCGTGGAGCAGCA CAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCAGCGAGTTCAGCAAGCGGGTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGG ACAAGGTGCTGAGCGCCTACAACAAGCACCGGGACAAGCCCATCCGGGAGCAGGCCGAGAACATCATCCACCTGTTC ACCCTGACCAACCTGGGCGCCCCCGCCGCCTTCAAGTACTTCGACACCACCATCGACCGGAAGCGGTACACCAGCACC AAGGAGGTGCTGGACGCCACCCTGATCCACCAGAGCATCACCGGCCTGTACGAGACCCGGATCGACCTGAGCCAGCTG GGCGGCGACTGA
516	GGGAAGCUCAGAAUAAACGCUCAACUUUGGCCGGAUCUGCCACCAUGGACAAGAAGUACUCCAUCGGCCUGGACAU CGGCACCAACUCCGUGGGCUGGGCCGUGAUCACCGACGAGUACAAGGUGCCCUCCAAGAAGUUAAGGUGCUGGGC AACACCGACCGGCACUCCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGCGCCCUGCUGUUCGACUCCGGCGAGACCGCCGAGGCCA CCCGGCUGAAGCGGACCGCCCGGCGGCGGUACACCCGGCGGAAGAACCUGAUCUGCUACCUGCAGGAGAUCUUCUC CAACGAGAUGGCCAAGGUGGACGACUCCUUCUUCACCGGCUGGAGGAGUCCUUCUGGUGGAGGAGGACAAGAA GCACGAGCGGCACCCCAUCUUCGGCAACAUCGUGGACGAGGUGGCCUACCACGAGAAGUACCCACCAUCUACCAC CUGCGGAAGAAGCUGGUGGACUCCACCGACAAGGCCGACCUGCGGCUGAUCUACCUGGCCCUUGGCCACAUGAUC

AGUUCCGGGGCCACUUCCUGAUCGAGGGCGACCUGAACCCCGACAACUCCGACGUGGACAAGCUGUUCAUCCAGCU
 GGUGCAGACCUACAACCAGCUGUUCGAGGAGAACCCCAUCAACGCCUCCGGCGUGGACGCCAAGGCCAUCCUGUCC
 GCCCGGCUGUCCAAGUCCCGGCGGCUGGAGAACCUGAUCGCCCAGCUGCCCGGCAGAGAAGAAGAACGGCCUGUUCG
 GCAACCUGAUCGCCUGUCCUGGGGCCUGACCCCAACUUCAAGUCCAACUUCGACCUGGGCCGAGGACGCCAAGCU
 GCAGCUGUCCAAGGACACCUACGACGACGACCUGGACAACCUGCUGGGCCAGAUCGGCGACCAGUACGCCGACCUG
 UUCCUGGGCCGCCAAGAACCUGUCCGACGCCAUCCUGCUGUCCGACAUCCUGCGGGUGAACACCGAGAUACCAAGG
 CCCCCUGUCCGCCUCCAUGAUCAAGCGGUACGACGAGCACCACCAGGACCUGACCCUGCUGAAGGCCUGGUGCG
 GCAGCAGCUGCCCGAGAAGUACAAGGAGAUUCUUCUUCGACCAGUCCAAGAACGGCUACGCCGGCUACAUCGACGGC
 GGCGCCUCCCAGGAGGAGUUCUACAAGUUCAUCAAGCCCAUCCUGGAGAAGAUGGACGGCACCGAGGAGCUGCUGG
 UGAAGCUGAACC GGGAGGACCUGCUGCGGAAGCAGCGGACCUUCGACAACGGCUCCAUCCCCACCAGAUCCACCU
 GGGCGAGCUGCACGCCAUCCUGCGGGCGGCAGGAGGACUUCUACCCCUUCCUGAAGGACAACCGGGAGAAGAUCGAG
 AAGAUCCUGACCUUCCGGAUCCCCUACUACGUGGGCCCCCUGGGCCCGGGGCAACUCCCGGUUCGCCUGGAUGACCC
 GGAAGUCCGAGGAGACCAUCACCCCCUGGAACUUCGAGGAGGUGGUGGACAAGGGCGCCUCCGCCAGUCCUUCAU
 CGAGCGGAUGACCAACUUCGACAAGAACCUGCCCAACGAGAAGGUGCUGCCCAAGCACUCCUGCUGUACGAGUAC
 UUCACCGUGUACAACGAGCUGACCAAGGUGAAGUACGUGACCGAGGGCAUGCGGAAGCCCGCCUUCUGUCCGGCG
 AGCAGAAGAAGGCCAUCGUGGACCUGCUGUUCAAGACCAACCGGAAGGUGACCGUGAAGCAGCUGAAGGAGGACU
 ACUUCAAGAAGAUCGAGUGCUUCGACUCCGUGGAGAUCUCCGGCGUGGAGGACCGGUUCAACGCCUCCCUGGGCAC
 CUACCACGACCUGCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCUGGACAACGAGGAGAACGAGGACAUCCUGGAGGA
 CAUCGUGCUGACCCUGACCCUGUUCGAGGACCGGGAGAUGAUCGAGGAGCGGCUGAAGACCUACGCCACCUGUUC
 GACGACAAGGUGAUGAAGCAGCUGAAGCGGCGGCGGUACACCGGCUGGGGCGGCUGUCCCGGAAGCUGAUAAC
 GGCAUCCGGGACAAGCAGUCCGGCAAGACCAUCCUGGACUUCUGAAGUCCGACGGCUUCGCCAACCGGAACUUCA
 UGCAGCUGAUCCACGACGACUCCUGACCUUCAAGGAGGACAUCCAGAAGGCCAGGUGUCCGGCCAGGGCGACUC
 CCUGCACGAGCACAUCGCCAACCUGGCCGGCUCCCCCGCCAUCAAGAAGGGCAUCCUGCAGACCGUGAAGGUGGUG

GACGAGCUGGUGAAGGUGAUGGGCCGGCACAAGCCCAGAGAACAUCGUGAUCGAGAUGGCCCGGGAGAACCAGACC
 ACCCAGAAGGGCCAGAAGAACUCCCGGGAGCGGAUGAAGCGGAUCGAGGAGGGCAUCAAGGAGCUGGGCUCCCAG
 AUCCUGAAGGAGCACCCCGUGGAGAACACCCAGCUGCAGAACGAGAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGCC
 GGGACAUGUACGUGGACCAGGAGCUGGACAUCAACCGGCUGUCCGACUACGACGUGGACCACAUCGUGCCCCAGUC
 CUUCCUGAAGGACGACUCCAUCGACAACAAGGUGCUGACCCGGUCCGACAAGAACCGGGGCAAGUCCGACAACGUG
 CCCUCCGAGGAGGUGGUGAAGAAGAUGAAGAACUACUGGCGGCAGCUGCUGAACGCCAAGCUGAUCACCCAGCGG
 AAGUUCGACAACCUGACCAAGGCCGAGCGGGGCGGCCUGUCCGAGCUGGACAAGGCCGGCUUCAUCAAGCGGCAGC
 UGGUGGAGACCCGGCAGAUACCAAGCACGUGGCCCCAGAUCUGGACUCCCGGAUGAACCAAGUACGACGAGAA
 CGACAAGCUGAUCCGGGAGGUGAAGGUGAUCACCCUGAAGUCCAAGCUGGUGUCCGACUUCCGGAAGGACUUCCA
 GUUCUACAAGGUGCGGGAGAUCAACAACUACCACCACGCCCACGACGCCUACCUGAACGCCGUGGUGGGCACCGCC
 CUGAUCAAGAAGUACCCCAAGCUGGAGUCCGAGUUCGUGUACGGCGACUACAAGGUGUACGACGUGCGGAAGAUG
 AUCGCCAAGUCCGAGCAGGAGAUCCGCAAGGCCACCGCCAAGUACUUCUUCUACUCCAACAUCAUGAACUUCUUA
 AGACCGAGAUACCCUGGCCAACGGCGAGAUCCGGAAGCGGCCCCUGAUCGAGACCAACGGCGAGACCGGGCGAGAU
 CGUGUGGGACAAGGGCCGGGACUUCGCCACCGUGCGGAAGGUGCUGUCCAUGCCCCAGGUGAACAUUCGUGAAGAA
 GACCGAGGUGCAGACCGGGCGGCUUCUCCAAGGAGUCCAUCCUGCCCAAGCGGAACUCCGACAAGCUGAUCGCCCCG
 AAGAAGGACUGGGACCCCAAGAAGUACGGCGGCUUCGACUCCCCACCGUGGCCUACUCCGUGCUGGUGGUGGCCA
 AGGUGGAGAAGGGCAAGUCCAAGAAGCUGAAGUCCGUGAAGGAGCUGCUGGGCAUCACCAUCAUGGAGCGGUCCU
 CCUUCGAGAAGAACCCCAUCGACUUCUGGAGGCCAAGGGCUACAAGGAGGUGAAGAAGGACCUGAUCAUCAAGC
 UGCCCCAAGUACUCCUGUUCGAGCUGGAGAACGGCCGGAAGCGGAUGCUGGCCUCCGCCGGCGAGCUGCAGAAGGG
 CAACGAGCUGGCCCUGCCUCCAAGUACGUGAACUUCUGUACCUGGCCUCCACUACGAGAAGCUGAAGGGCUCC
 CCCGAGGACAACGAGCAGAAGCAGCUGUUCGUGGAGCAGCACAAGCACUACCUGGACGAGAUCAUCGAGCAGAUUC
 CCGAGUUCUCCAAGCGGGUGAUCUGGCCGACGCCAACCUGGACAAGGUGCUGUCCGCCUACAACAAGCACCGGGA
 CAAGCCCAUCCGGGAGCAGGCCGAGAACAUCAUCCACCUGUUCACCCUGACCAACCUGGGCGCCCCCGCCGCCUUA

	AGUACUUCGACACCACCAUCGACCGGAAGCGGUACACCUCCACCAAGGAGGUGCUGGACGCCACCCUGAUCCACCA GUCCAUCACCGGCCUGUACGAGACCCGGAUCGACCUGUCCCAGCUGGGCGGGCGACGGCGGGCGGCUCUUUUCAAGAAG AAGCGGAAGGUGUGACUAGCACCAGCCUCAAGAACACCCGAAUGGAGUCUCUAAGCUACAUAUACCAACUUACAC UUUACAAAAUGUUGUCCCCCAAAUGUAGCCAUUCGUAUCUGCUCCUAAUAAAAAGAAAGUUUCUUCACAUUCUC UCGAG
--	---

1.2 Дизайн гидовой последовательности *KLKB1* человека и *KLKB1* человека с дизайном гомологичной гидовой последовательности яванского макака

[00591] Гидовые РНК были разработаны по отношению к *KLKB1* человека (ENSG00000164344), нацеливаясь на области кодирования белка в экзонах 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 и 15. Гидовые РНК были также разработаны по отношению к *KLKB1* яванского макака (ENSMFAT00000002355), нацеливаясь на области кодирования белка в экзонах 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 и 15. Гидовые РНК и соответствующие целевые геномные координаты представлены выше (Таблица 1).

1.2. Доставка Cas9 (мРНК/белок) и гидовой РНК *in vitro*

1.2.1. Подготовка клеток, доставка *in vitro*

[00592] Первичные гепатоциты человека (PHH) (Gibco, партии Hu8296, Hu8300, и Hu8284, Hu8296, HU8290, и HU8317) и первичные гепатоциты яванского макака (PCH) (Gibco, партии Cy367, Cy400 и 10281011) оттаивали и ресуспендировали в среде для оттаивания гепатоцитов с добавками (Gibco, кат. № CM7500) с последующим центрифугированием. Супернатант отбрасывали и клеточный осадок ресуспендировали в среде для высеваания гепатоцитов (среда Вильямса E (Invitrogen, кат. № A1217601) с дексаметазоном+смесь добавок, содержащая ФБС и добавки для высеваания (Gibco, кат. № CM3000)). Клетки подсчитывали и высевали на 96-луночные планшеты, покрытые коллагеном I Bio-coat (ThermoFisher, кат. № 877272), с плотностью 30000-35000 клеток/лунка для PHH и 40000-45000 клеток/лунка для PCH. Высеянными клеткам давали заселиться и прилипнуть в течение 4-6 часов в инкубаторе для тканевой культуры при 37°C и в 5% атмосфере CO₂. После инкубации клетки проверяли относительно образования монослоя и промывали однократно средой для поддержания гепатоцитов (среда Вильямса E с поддерживающими добавками (Gibco, кат. № CM4000)) или средой Cellartis Power Primary HEP (Takada, кат. № Y20020).

[00593] Гидовые РНК, нацеленные на *KLKB1*, доставляли в клетки с использованием липосомальной системы, например, с белком Cas9, или с использованием состава LNP, содержащего мРНК Cas9 и гидовую РНК, как дополнительно описано ниже.

1.2.2. Трансфекция RNP

[00594] Трансфекцию RNP использовали с липосомальной системой (Lipofectamine RNAiMAX (ThermoFisher, кат. № 13778150) и реагентами CRISPR (гидовая РНК, белок Cas9) для передвижения рибонуклеопротеинового (RNP) комплекса вдоль клеточной мембраны.

[00595] Для исследований, в которых используются двойная гидовая последовательность (dgRNA), отдельные crRNA и trRNA предварительно отжигали путем смешивания эквивалентных количеств реагентов, и инкубирования при 95°C в течение 2 мин, и охлаждения до комнатной температуры. гРНК, состоящую из предварительно отоженных crRNA и trRNA, добавляли к белку Cas9 Sply в реакционном буфере (OptiMem) для образования комплекса RNP, и полученный комплекс RNP инкубировали при комнатной температуре в течение 10 минут. Комплекс RNP разбавляли OptiMem для

получения исходного раствора комплекса RNP с концентрацией 1 мкМ. Смесь для трансфекции, содержащую липофектамин RNAiMAX и OptiMem, готовили и инкубировали в течение по меньшей мере 5 минут. Смесь для трансфекции добавляли к комплексу RNP и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 минут, и к клеткам добавляли агент для трансфекции (смесь для трансфекции и комплекс RNP). Клетки трансфицировали комплексом RNP, содержащим белок Cas9 Spy (10 нМ), отдельную гидовую последовательность/трейсерную РНК (10 нМ), и липофектамин RNAiMAX (1,0 мкл/лунка) и OptiMem.

1.2.3. Электропорация RNP

[00596] Электропорацию RNP использовали с системой электропорации клеток (набор Lonza 4D Nucleofector™, 816B0346) и реагентами CRISPR, гРНК и белком Cas9, для передвижения рибонуклеопротеинового (RNP) комплекса вдоль клеточной мембраны.

[00597] Для исследований, в которых используется dgRNA, отдельные crRNA и trRNA предварительно отжигали смешиванием эквивалентных количеств реагентов, и инкубирования при 95°C в течение 2 мин, и охлаждения до комнатной температуры.

[00598] Для исследований, в которых используется sgRNA, готовили исходный раствор sgRNA с концентрацией 50 мкМ путем инкубирования равных количеств 100 мкМ sgRNA с водой при 95°C в течение 2 мин. с последующим охлаждением на льду в течение 5 минут. К белку Cas9 Spy в реакционном буфере (20 mM Hepes, 100 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 10% глицерина, 1 mM DTT pH 7,5) добавляли sgRNA с образованием комплекса RNP и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 минут. Клетки электропорировали (Амаха™ 96-луночный Shuttle™, кат. ААМ-1001S) комплексом RNP, содержащим белок Cas9 Spy (2 мкМ) и гРНК (4 мкМ) и буфер Lonza P3 (каталожный №: V4SP-3960). После электропорации в планшет с клетками добавляли среду для высевания гепатоцитов (Вильяма Е, кат. А12176-01), среду с клетками переносили на планшеты, покрытые коллагеном (Corning 354407). Через 4-6 часов среду меняли на поддерживающую среду (Вильяма Е (Gibco, кат. А12176-01, партия 2039733) и поддерживающую добавку (Gibco, Cat. А12176-01, партия 2039733) для инкубации в течение ночи при 37°C.

1.2.4. Получение состава LNP, содержащего sgRNA и мРНК Cas9

[00599] В общем компоненты липидных наночастиц растворяли в 100%-ом этаноле в различных молярных соотношениях. РНК-карго (например, мРНК и sgRNA Cas9) растворяли в 25 mM цитрата, 100 mM NaCl, pH 5,0, что дает концентрацию РНК-карго приблизительно 0,45 мг/мл. LNP, используемые в Примерах 2-10, содержали ионизируемый липид

((9Z,12Z)-3-((4,4-бис(октилокси)бутаноил)окси)-2-(((3-(диэтиламино)пропокси)карбонил)окси)метил)пропилоктадека-9,12-диеноат, также называемый

3-((4,4-бис(октилокси)бутаноил)окси)-2-(((3-(диэтиламино)пропокси)карбонил)окси)метил)пропил-(9Z,12Z)-октадека-9,12-диеноат,

холестерин, DSPC и PEG2k-DMG в молярном соотношении 50:38:9:3, соответственно. LNP получали с молярным соотношением липидамина к РНК-фосфату (N:P), составляющим около 6, и соотношением гРНК к мРНК, составляющим 1:2 по массе. LNP, используемые в

Примерах 2-10, содержат мРНК и sgRNA Cas9.

[00600] LNP получали с использованием техники перекрестного потока со смешением при столкновении потоков липида в этаноле с двумя объемами раствора РНК и одним объемом воды. Липид в этаноле смешивали посредством перекрестного смешивания с двумя объемами раствора РНК. Четвертый поток воды смешивали с внешним потоком, возникающим при перекрестном смешивании, через встроенный тройник (см. WO2016010840, Фиг. 2). LNP выдерживали в течение 1 часа при комнатной температуре и дополнительно разбавляли водой (приблизительно 1:1 об./об.). Разбавленные LNP концентрировали с использованием фильтрования с тангенциальным потоком на плоском картридже (Sartorius, 100 кДа MWCO), а затем заменяли буфер с использованием обессаливающих колонок PD-10 (GE) в 50 mM Tris, 45 mM NaCl, 5% (масса/объем) сахарозы, pH 7,5 (TSS). Полученную смесь затем фильтровали с использованием стерильного фильтра с размером пор 0,2 мкм. Готовые LNP характеризовали для определения эффективности инкапсуляции, индекса полидисперсности и среднего размера частиц. Готовые LNP хранили при 4°C или -80°C до дальнейшего использования.

1.2.5. Липофекция sgRNA и мРНК Cas9

[00601] Липофекцию мРНК Cas9 и гРНК проводили с использованием предварительно смешанных составов липидов. Реагент для липофекции содержал ионизируемый липид ((9Z,12Z)-3-((4,4-бис(октилокси)бутаноил)окси)-2-(((3-(диэтиламино)пропокси)карбонил)окси)метил)пропил-октадека-9,12-диеноат, также называемый 3-((4,4-бис(октилокси)бутаноил)окси)-2-(((3-(диэтиламино)пропокси)карбонил)окси)метил)пропил-(9Z,12Z)-октадека-9,12-диеноат, холестерин, DSPC и PEG2k-DMG в молярном соотношении 50:38:9:3, соответственно. Смесь восстанавливали в 100% этаноле, затем смешивали с РНК (например, мРНК и гРНК Cas9) при молярном соотношении липидного амина к фосфату РНК (N:P), составляющем около 6,0. Гидовые РНК были химически синтезированы коммерческими поставщиками или с использованием стандартных методик синтеза *in vitro* с модифицированными нуклеотидами. ORF Cas9 из Таблицы 5 получали с помощью IVT, как описано в WO2019/067910, см., например, абзац [00354], с использованием 2-часовой реакции IVT и очищения мРНК осаждением LiCl с последующим фильтрованием с тангенциальным потоком. Липофекцию осуществляли с использованием 3% сыворотки яванского макака и отношения гРНК к мРНК, составляющего 1:1 по массе.

1.2.6. Трансфекция LNP

[00602] Модифицированные sgRNA, нацеленные на KLKB1 человека, были введены в состав LNP, как описано в Примере 1. Первичные гепатоциты человека высевали, как описано в Примере 1. Клетки инкубировали при 37°C, с 5% CO₂ в течение 48 часов до обработки LNP. LNP инкубировали в среде, содержащей 3% фетальной бычьей сыворотки (ФБС) при 37°C в течение 10 минут. После инкубации среду аспирировали из клеток и смесь среды с 3% ФБС и LNP добавляли к гепатоцитам. Через от 72 до 96 часов после трансфекции часть клеток собирали и обрабатывали для секвенирования NGS, как описано

в Примере 1.

1.3. Выделение геномной ДНК

[00603] Трансфицированные РНН и РСН собирали через 48 или 72 часа после трансфекции. гДНК экстрагировали из каждой лунки 96-луночного планшета с использованием 50 мкл/лунка раствора для экстракции ДНК BuccalAmp (Epicentre, кат. QE09050) или набора для экстракции РНК/ДНК Zymo's Quick (кат. R2130) в соответствии с протоколом производителя. Все образцы ДНК подвергали ПЦР и последующему анализу NGS, как описано в данном документе.

1.4. Секвенирование последующего поколения («NGS») и анализ для определения целевой эффективности расщепления

[00604] Для количественного определения эффективности редактирования в целевой локации в геноме секвенирование следующего поколения использовали для идентификации наличия вставок и делеций, введенных при редактировании гена. Праймеры ПЦР были сконструированы вокруг целевого сайта в гене, представляющем интерес (например, *KLKB1*), и представляющая интерес область генома была амплифицирована. Конструирование последовательности праймера было выполнено по стандартной методике в данной области техники.

[00605] Дополнительную ПЦР осуществляли в соответствии с протоколами производителя (Illumina) для добавления химических реагентов для секвенирования. Ампликоны секвенировали на оборудовании Illumina MiSeq. Считывания выравнивали относительно эталонного генома человека (например, hg38) после удаления тех, которые обладают оценками низкого качества. Готовые файлы, содержащие считывания, картировали на эталонный геном (файлы BAM), при этом были выбраны считывания, которые перекрывались с целевой областью, представляющей интерес, и рассчитывали количество считываний дикого типа по отношению к количеству считываний, которые содержали вставку или делецию («вставка-делеция»).

[00606] Процент редактирования (например, «эффективность редактирования» или «процент редактирования») определяют как общее количество считываний последовательности с вставками или делециями («вставка-делеция») относительно общего количества считываний последовательности, в том числе дикого типа.

[00607] Биохимический анализ (см., например, Cameron et al., *Nature Methods*. 6, 600-606; 2017) использовали для определения потенциальных нецелевых сайтов в геноме, расщепленных Cas9, нацеленным на *KLKB1*. Очищенную геномную ДНК (гДНК) из клеток разлагали *in vitro* объединенным рибонуклеопротеином (RNP) Cas9 и sgRNA для индуцирования расщепления ДНК в целевом сайте и возможных нецелевых сайтах с гомологией к спейсерной последовательности sgRNA. После расщепления гРНК свободные концы фрагментов гДНК лигировали адаптирующими фрагментами для облегчения обогащения отредактированного фрагмента и построения библиотеки NGS. Библиотеки NGS секвенировали и подвергали биоинформационному анализу, считывания анализировали для определения геномных координат свободных концов ДНК.

Расположение в геноме человека с накоплением считываний затем аннотировали как возможные нецелевые сайты.

[00608] В известных анализах обнаружения нецелевых сайтов, таких как биохимические анализы, используемые выше, как правило, посредством конструирования извлекают большое количество возможных нецелевых сайтов, чтобы «закинуть широкую сеть» для возможных сайтов, которые могут быть валидированы в других контекстах, например, в первичной, представляющей интерес клетке. Например, биохимический анализ, как правило, преувеличивает количество возможных нецелевых сайтов, поскольку в анализе используется среда для клеток, очищенная от высокомолекулярных геномных ДНК, и зависит от используемой дозы RNP Cas9. Соответственно, возможные нецелевые сайты, идентифицированные в этих анализах, валидировали с использованием нацеленных последовательностей идентифицированных возможных нецелевых сайтов.

[00609] В одном подходе к нацеленной последовательности представляющие интерес Cas9 и sgRNA (например, sgRNA, обладающая возможными нецелевыми сайтами для оценки) вводили в клетки РНН или РСН. Затем клетки лизировали, а праймеры, фланкирующие возможный нецелевой сайт(-ы), использовали для получения ампликона для анализа NGS. Идентификацию вставок-делеций на определенном уровне можно использовать для валидации возможного нецелевого сайта, тогда как отсутствие вставок-делеций, обнаруженное в возможном нецелевом сайте, может указывать на ложноположительный результат в анализе нецелевых сайтов, который был использован.

[00610] Гидовые последовательности, демонстрирующие активность целевых вставок-делеций, тестировали относительно возможных нецелевых геномных сайтов расщепления с использованием этого анализа. Структуры восстановления вручную проверяли в локусах со статистически значимыми частотами вставок-делеций в нецелевых сайтах расщепления для проверки структур восстановления.

1.5 Анализ транскриптов с помощью количественной ПЦР

[00611] Количественную ПЦР выполняли для оценки уровней транскриптов *KLKB1*. Для выделения мРНК использовали мини-набор Qiagen RNeasy (Qiagen, кат. № 74106). Процедуру в соответствии с мини-набором RNeasy выполняли в соответствии с протоколом производителя.

[00612] РНК количественно определяли с использованием Nanodrop 8000 (ThermoFisher Scientific, кат. № ND-8000-GL). Процедуру количественного определения РНК выполняли в соответствии с протоколом производителя. Образцы РНК хранили при -20°C перед использованием.

[00613] Для создания реакций ПЦР использовали набор Taqman RNA-to-Ct 1-Step (Thermo Fisher Scientific, кат. № 4392938). Постановку реакции выполняли в соответствии с протоколом производителя. Альтернативно, для получения образцов для ПЦР использовали набор Cells-to-CT 1-Step TaqMan (Thermo Fisher Scientific, кат. № A25603). В реакциях ПЦР использовали количественные зонды ПЦР, нацеленные на *KLKB1* человека или яванского макака (Thermo Fisher Scientific, кат. № 4351372, транскрипт UniGene ID

Hs01111828_m1; Thermo Fisher Scientific, кат. № 4331182, транскрипт UniGene ID Hs00168478_m1), внутренний контроль *PPIB* (Thermo Fisher Scientific, кат. № 4351372, транскрипт UniGene ID Hs00168719_m1; Thermo Fisher Scientific, кат. № 4331182, транскрипт UniGene ID Mf02802985_m1), внутренний контроль *GAPDH* (Thermo Fisher Scientific, кат. № 4351372, транскрипт UniGene ID Hs02786624_g1) и внутренний контроль *18S* (Thermo Fisher Scientific, кат. № 4319413E). Систему ПЦР в реальном времени StepOnePlus (Thermo Fisher Scientific, кат. № 4376600) использовали для выполнения реакции ПЦР в реальном времени и количественного определения транскрипта в соответствии с протоколом производителя.

[00614] Анализ двойного дельта Ct мРНК *KLKB1* осуществляли с использованием величин Ct, определенных из системы для ПЦР в режиме реального времени StepOnePlus. Величину двойного дельта Ct рассчитывали для величин Ct для внутренних контролей в каждом образце по сравнению с величинами для *KLKB1*. Кратность изменения экспрессии определяли на основании величины двойного дельта Ct для каждой последовательности.

1.6. Белковый анализ в среде тканевой культуры посредством ELISA

[00615] РНН или РСН трансфицировали, как описано ранее. Начиная с трех дней после трансфекции и высевания (96-луночный планшет), среду меняли на клетки каждые два дня. Через от семи до десяти дней после трансфекции среду удаляли из клеток, а затем заменяли 100 мкл культуральной среды Вильямса Е или среды Cellartis Power Primary NEP (Takada, кат. № Y20020). Через от двадцати четырех до сорока восьми часов среду собирали и хранили при -20°C. Общие уровни секретируемого белка *KLKB1* определяли с использованием набора ELISA для прекалликреина Abcam, кат. № ab202405), который детектирует прекалликреин и калликреин (также называемый общим калликреином). Реагенты и стандарты набора готовили с использованием протоколов производителя. До проведения ELISA замороженную среду оттаивали при комнатной температуре и центрифугировали при 1000 об/мин в течение 1 минуты до получения клеточного остатка, а затем помещали на лед. Для ELISA от 10 до 40 мкл среды разбавляли разбавителем для образца в анализе NS до общего объема 50 мкл. Процедуру ELISA выполняли в соответствии с протоколом производителя. Планшет считывали на планшет-ридере SpectraMax M5. Общие уровни калликреина рассчитывали с помощью программного обеспечения SoftMax Pro, версия 6.4.2 с использованием четырехпараметрической логистической аппроксимации стандартной кривой. Снижение общего секретируемого белка прекалликреина для клеток, обработанных реагентами для *KLKB1*, определяли при сравнении с лунками, обработанными контрольными реагентами, или необработанными образцами.

1.6.1 Анализ белка сыворотки с помощью ELISA

[00616] Уровни прекалликреина сыворотки измеряли у гуманизированных мышей с использованием следующей методики. Через шесть-семь дней после введения дозы животных умерщвляли путем обескровливания через сердечную пункцию при анестезии изофлураном. Кровь собирали в пробирки для отделения сыворотки и давали агрегировать

при комнатной температуре в течение 2 часов до центрифугирования при 9000g в течение 10 мин. для отделения сыворотки. Образцы хранили при -20°C до анализа.

[00617] Уровни белка прекалликреина определяли с использованием набора ELISA для прекалликреина человека (Abcam, кат. ab202405), который детектирует прекалликреин и калликреин (называемые также общим калликреином). Вкратце, сыворотку последовательно разбавляли разбавителем для образца из набора до конечного разбавления, составляющего 1:500 или 1:1000, до добавления в планшет для ELISA. Анализ осуществляли в соответствии с протоколом производителя. Планшеты считывали на планшет-ридере Clariostar (BMG Labtech). Уровни прекалликреина рассчитывали с помощью программного обеспечения Mars с использованием четырехпараметрической логистической аппроксимации стандартной кривой. Снижение общего секретируемого белка прекалликреина для клеток, обработанных реагентами для KLKB1, определяли при сравнении с лунками, обработанными контрольными реагентами, или необработанными образцами.

1.6.2. Анализ белка с помощью вестерн-блоттинга

[00618] РНН обрабатывали с помощью LNP, в которые введены выбранные гидовые РНК из Таблицы 1, как дополнительно описано ниже. LNP инкубировали в среде Cellartis Power Primary NEP (Takada, кат. Y20020), содержащей 3% ФБС, или сыворотке яванского макака при 37°C в течение 10 минут. После инкубации LNP добавляли к гепатоцитам человека. Начиная с трех дней после трансфекции и высевания, среду меняли на клетки каждые два дня. Через от десяти до четырнадцати дней после трансфекции для клеток, высеянных в 96-луночный планшет, среду удаляли, и клетки лизировали с использованием 50 мкл/лунка буфера RIPA (Boston Bio Products, кат. BP-115) плюс только что добавленная смесь ингибиторов протеазы, состоящая из полной смеси ингибиторов протеазы (Sigma, кат. 11697498001), 1 mM DTT и 250 Ед./мл бензоазы (EMD Millipore, кат. 71206-3) на от 30000 до 45000 клеток. Клетки держали на льду в течение 30 минут, в этот момент добавляли NaCl (конечная концентрация 1 М). Клеточные лизаты тщательно смешивали и удерживали на льду в течение 30 минут. Цельные клеточные экстракты («WCE») переносили в планшет для ПЦР и центрифугировали до клеточного осадка. Анализ Бредфорда (Bio-Rad, кат. 500-0001) использовали для оценки содержания белка в лизатах. Процедуру анализа Бредфорда выполняли в соответствии с протоколом производителя. Экстракты хранили при -20°C перед использованием.

[00619] Вестерн-блоттинг выполняли для оценки уровней белка KLKB1. Лизаты смешивали с буфером Лаэммли (Boston BioProducts, кат. BP-111R) и денатурировали при 95°C в течение 10 минут. Вестерн-блоттинг осуществляли с использованием системы NuPage на 4-12% гелях бис-трис (Thermo Fisher Scientific, кат. NP0323BOX) в соответствии с протоколом производителя с последующим мокрым переносом на нитроцеллюлозную мембрану с размером пор 0,45 мкм (Bio-Rad, кат. 1620115). После переноса мембраны тщательно промывали водой и окрашивали раствором Ponceau S (Boston Bio Products, кат. ST-180) для подтверждения полного и равномерного переноса. Блоты блокировали с

использованием 5% сухого молока в TBS в течение 30 минут на лабораторном рокер-шейкере при комнатной температуре. Блоты промывали TBST и испытывали моноклональным кроличьим антителом к α -калликреину (Abcam, кат. ab124938) при 1:1000 в TBST. Для блотов с *in vitro* клеточным лизатом использовали GAPDH в качестве контроля загрузки (Novus, кат. NB600502) при 1:2500 в TBST и инкубировали одновременно с первичным антителом к KLKB1. После инкубации блоты промывали 3 раза по 5 минут каждый в TBST. Блоты визуализировали и анализировали с помощью денситометрии с использованием системы Licor Odyssey.

1.6.3. Обнаружение уровней калликреина в плазме, основанное на электрохемилюминесценции

[00620] Уровни калликреина в плазме в образцах измеряли с помощью иммуноанализа с использованием платформы для электрохемилюминесцентного обнаружения посредством MesoScale Discovery (MSD). 96-луночный стандартный планшет MSD (кат. №: L15XA) покрывали 25 или 40 мкл мышинового моноклонального антитела для захвата калликреина (LS-Bio, LS-C38308) при концентрации 1 мкг/мл в ФСБ в течение ночи при 4°C. На следующий день лунки промывали и затем блокировали с помощью 150 мкл 3% Blocker-A (MSD, кат. №: R93AA) и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре на шейкере, установленном на 700 об/мин. После промывания образца для определения концентрации калликреин вместе со стандартом калликреина человека с известной концентрацией, собственного изготовления, добавляли в лунки и инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре на шейкере, выставленном на 700 об/мин. Оба образца и стандарты разбавляли в 1% Blocker-A, необязательно с 0,05% твина 20.

[00621] После промывания добавляли 25 мкл раствора для обнаружения антитела (LSBio № C185168 при 1 мкг/мл и MSD № R32AG при 500 мкг/мл в 1% Blocker-A с 0,05% твина 20) и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Планшет промывали и в каждую лунку добавляли 150 мкл буфера MSD gold Read (MesoScale Discovery, кат. №: R92TG). Планшет считывали с использованием QuickPlex SQ 120 (MesoScale Discovery). Планшет промывали 3× с использованием ФСБ с 0,05% твина 20 между различными стадиями.

1.7. Флуорометрический анализ активности калликреина в плазме

[00622] Уровни активности общего калликреина в плазме в образцах, таких как образцы от нечеловекообразных обезьян (NHP), измеряли с использованием набора для анализа для определения активности калликреина в плазме Fluorometric SensoLyte Rh110 (Anaspec, кат. №: AS-72255). Предварительную обработку хлороформом выполняли для ингибирования активности ингибитора C1 путем смешивания равных объемов холодного хлороформа с плазмой NHP с K2EDTA NHP в 96-луночном планшете. Планшет затем центрифугировали в течение 5 мин. при 4°C при 16000X g, и 10 мкл обработанной плазмы осторожно отбирали из верхнего слоя. В 96-луночном черном микропланшете 10 мкл предварительно обработанной плазмы смешивали с 30 мкл буфера для анализа, 10 мкл активатора прекалликреина плазмы и 50 мкл субстрата, все из которых предоставлены в

наборе и приготовлены в соответствии с протоколом набора. Измерения флуоресценции сразу же начинали при $E_x/E_m=490$ нм/520 нм со считыванием каждые 5 минут в течение 1 часа на планшет-ридере SpectraMax M5. Наклон линейной части кинетических флуорометрических данных для данного образца плазмы после обработки сравнивают с наклоном образца плазмы до обработки от того же животного для расчета % от исходного.

1.7.1 Детектирование уровней калликреина в плазме, основанное на электрохемилюминесценции, у нечеловекообразных приматов

[00623] Уровни калликреина в плазме у нечеловекообразных приматов (NHP) измеряли с помощью иммуноанализа с использованием платформы для электрохемилюминесцентного обнаружения посредством MesoScale Discovery (MSD). 96-луночный стандартный планшет MSD (кат. №: L15XA) покрывали 40 мкл мышинового моноклонального антитела для захвата калликреина (LS-Bio, LS-C38308) при концентрации 1 мкг/мл в ФСБ в течение ночи при 4°C. На следующий день лунки промывали и затем блокировали с помощью 150 мкл 3% Blocker-A (MSD, кат. №: R93AA) и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре на шейкере, установленном на 700 об/мин. После промывания образца от NHP для определения концентрации калликреина вместе со стандартом калликреина NHP с известной концентрацией, собственного изготовления, добавляли в лунки и инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре на шейкере, выставленном на 700 об/мин. Оба образца и стандарты разбавляли в 1% Blocker-A с 0,05% твина 20.

[00624] После промывания добавляли 25 мкл раствора антитела для обнаружения и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре. Планшет промывали и в каждую лунку добавляли 150 мкл буфера MSD gold Read (MesoScale Discovery, кат. №: R92TG). Планшет считывали с использованием QuickPlex SQ 120 (MesoScale Discovery). Планшет промывали 3× с использованием ФСБ с 0,05% твина 20 между различными стадиями.

1.8 Анализ проницаемости сосудов

[00625] Анализ проницаемости сосудов с помощью Эванса синего является установленной моделью отека и протекания сосудов, которые можно использовать в качестве модели в исследовании НАЕ (см., например, Bhattacharjee et al., 2013). Анализ основан на инъекции Эванса синего, красителя, связывающего альбумин, исследуемому животному, как правило, мыши. В физиологических условиях эндотелий непроницаем для альбумина, так что связанный с альбумином Эванс синий остается внутри кровеносных сосудов. В патологических условиях, которые стимулируют повышение проницаемости сосудов, излияние Эванса синего можно легко определить качественно, например, по наличию синего цвета в ушах, ступнях и носу мышей после внутривенной инъекции или количественно путем измерения красителя, включенного в ткань, например кишечник.

[00626] С использованием мышей huKLKB1 была разработана модель проницаемости сосудов для оценки потенциала редактирования KLKB1 в ослаблении

эффектов избытка продуцирования брадикинина (Bhattacharjee et al., 2013). Модифицированную sgRNA, нацеленную на KLKB1, и мРНК Cas9 вводили дозозависимым образом при общих дозах РНК 0,03 мг/кг, 0,1 мг/кг и 0,3 мг/кг. Дополнительные группы подвергали воздействию 0,3 мг/кг контрольного ненацеленного LNP и контрольного носителя TSS. Через тринадцать дней после введения дозы проницаемость сосудов индуцировали с использованием 2,5 мг/кг интраперитонеальной инъекции ингибитора ангиотензин-превращающего фермента (ACE), каптоприла. Через 15 минут смесь красителя Эванса синего (30 мг/кг) и декстрансульфата (0,3 мг/кг) вводили с помощью внутривенной инъекции в хвостовую вену. Животных умерщвляли через 15 минут после этой инъекции и оценивали относительно утечки красителя в толстый кишечник по оптической плотности (OD) при поглощении 600 нм с помощью планшет-ридера Clariostar (BMG LabTech). Печень и сыворотку собирали для количественного определения редактирования гена huKLKB1 и белка калликреина, соответственно.

Пример 2: Скрининг и *in vitro* характеристика гидовой последовательности

2.1. Скрининг двойных гидовых РНК (dgRNA), которые нацелены на *KLKB1* человека

[00627] Гидовые последовательности, нацеленные на *KLKB1*, получали в виде двойных гидовых РНК и оценивали по трансфекции в первичные гепатоциты человека (PHH) и первичные гепатоциты яванского макака (PCH), как описано в Примере 1. Клетки лизировали через 48 часов после лечения для анализа NGS, как описано в Примере 1. Тестировали гидовые последовательности, показанные в Таблице 6.

Таблица 6. Двойные гидовые последовательности и единые гидовые последовательности у человека и яванского макака

dgRNA человека	гидовая последовательность человека	SEQ ID №	sgRNA человека	sgRNA яванского макака
CR005916	ACAGGAAACUGUAGCAAACA	1	G012253	н. д.
CR005917	AUAGAUAUUCACUACCAC	2	G012254	н. д.
CR005918	UACAUCCCCACCUCUGAAGA	3	G012255	н. д.
CR005919	AACUGAAUAGCAAACACCUU	89	н. д.	н. д.
CR005920	ACAAUUACCAAUUUCUGAAA	90	н. д.	н. д.
CR005921	UACAAUUACCAAUUUCUGAA	91	н. д.	н. д.
CR005922	UCUUGAGGAGUAGAGGAACU	4	G012256	н. д.
CR005923	GGUGUUUUCUUGAGGAGUAG	92	н. д.	н. д.
CR005924	ACCAGGUAAGUUCUUUUGC	5	G012257	н. д.
CR005925	GGGUAAAUUUAGAAUGGCA	6	G012258	н. д.
CR005926	CGGGUAAAUUUAGAAUGGC	93	н. д.	G013884

CR005927	CUCCCGGGUAAAUUUUAGAA	94	н. д.	G013925
CR005928	AUUUACCCGGGAGUUGACUU	7	G012259	н. д.
CR005929	UACCCGGGAGUUGACUUUGG	8	G012260	н. д.
CR005930	UAUGGGACACAAGGGAGCUC	95	н. д.	н. д.
CR005931	UCUUUGAGAUUGUGUAACAC	9	G012261	н. д.
CR005932	CUUUGAGAUUGUGUAACACU	10	G012262	н. д.
CR005933	UUUGAGAUUGUGUAACACUG	11	G012263	н. д.
CR005934	UUGGAGGAACAAACUCUUCU	96	н. д.	G013912
CR005935	UGGAGGAACAAACUCUUCUU	97	н. д.	н. д.
CR005936	CAAACUCUUCUUGGGGAGAG	98	н. д.	н. д.
CR005937	CUAUGAGUGACCCUCCACAC	99	н. д.	G013886
CR005938	CUGUGUGGAGGGUCACUCAU	100	н. д.	G013938
CR005939	GGUCACUCAUAGGACACCAG	101	н. д.	G013946
CR005940	GUCACUCAUAGGACACCAGU	102	н. д.	G013896
CR005941	ACUGCUGCCCACUGCUUUGA	103	н. д.	н. д.
CR005942	ACACUUACCCAUCAAAGCAG	104	н. д.	G013902
CR005943	UACAUACCAGUGUAAUUCAA	12	G012264	н. д.
CR005944	AGGAACACCUACCGCUAUA	105	н. д.	G013871
CR005945	CUCCGGGACUGUACUUUAAU	106	н. д.	G013889
CR005946	GUCCCAUACGCAAUCCUAGU	107	н. д.	G013890
CR005947	CUCAGCACCUUUUAUAGCGGU	108	н. д.	G013892
CR005948	UAUAGCGGUAGGUGUUCUC	109	н. д.	G013874
CR005949	CUCCAACUAGGAUUGCGUAU	13	G012265	G013933
CR005950	CUAUUAAAGUACAGUCCCGG	110	н. д.	G013875
CR005951	AGGAUUGCGUAUGGGACACA	14	G012266	G013904
CR005952	GGAUUGCGUAUGGGACACAA	15	G012267	G013901
CR005953	GUGCUGAGUAACGUGGAAUC	111	н. д.	G013883
CR005954	UAUAAAGGUGCUGAGUAACG	112	н. д.	G013878
CR005955	UCUCCAACUAGGAUUGCGUA	113	н. д.	G013908
CR005956	GUUACUCAGCACCUUUUAUAG	16	G012268	G013945
CR005957	AUAGCGGUAGGUGUUCUCC	114	н. д.	G013873
CR005958	CUGCCAAAAGUACAUCGAAC	115	н. д.	G013877
CR005959	UGCCUAUUAAGUACAGUCC	17	G012269	н. д.
CR005960	CUAUGGAUGGUUCUCCAACU	18	G012270	G013922

CR005961	ACCAAUUUCUGAAAGGGGCAC	116	н. д.	н. д.
CR005962	GUGUUUCUUAAGAUUAUCUA	117	н. д.	н. д.
CR005963	GAUGUUUGGCGCAUCUAUAG	19	G012271	G013921
CR005964	CCAAUUUCUGAAAGGGGCACA	118	н. д.	н. д.
CR005965	UUCUUAAGAUUAUCUAUGGA	119	н. д.	G013940
CR005966	CUGUUCGAUGUACUUUUGGC	120	н. д.	н. д.
CR005967	UGUUCGAUGUACUUUUGGCA	121	н. д.	G013880
CR005968	GGUGGAAUGUGCACCUCAUC	122	н. д.	G013939
CR005969	GUCCGACACACAAAAGCAUC	123	н. д.	G013894
CR005970	AUGCGCCAAACAUCCUGCAG	20	G012272	G013885
CR005971	AAACUGGCAGCGAAUGUUAC	124	н. д.	G013930
CR005972	UGCCACGCAAACAUUUCACA	125	н. д.	н. д.
CR005973	GCACCUGUUCGAUGUACUUU	126	н. д.	G013870
CR005974	AGAUGCGCCAAACAUCCUGC	127	н. д.	н. д.
CR005975	GCACCUCAUCUGGCAGUAUU	128	н. д.	н. д.
CR005976	CAUCUGAGAACGCAAGAUGC	129	н. д.	G013934
CR005977	AUGCCCAAUACUGCCAGAUG	130	н. д.	н. д.
CR005978	UGCACCUCAUCUGGCAGUAU	131	н. д.	G013944
CR005979	CUCCUUUAUAAAUGUCUCGA	21	G012273	G013905
CR005980	AUGUCAUUGAUUGAACUUGC	132	н. д.	G013936
CR005981	ACAAGCACACGCAUUGUUGG	133	н. д.	G013893
CR005982	UGUUACUGGUGCACCUUUUU	22	G012274	н. д.
CR005983	GAUGCGCCAAACAUCCUGCA	23	G012275	G013876
CR005984	UAUCGCCUUGAUAAAACUCC	134	н. д.	G013926
CR005985	CCUCAAGAAAACACCAUAUC	135	н. д.	G013906
CR005986	AAACGCCUUCUUCAGAGGUG	136	н. д.	н. д.
CR005987	AAAACAAGCACACGCAUUGU	137	н. д.	G013891
CR005988	CAUCGAACAGGUGCAGUUUC	138	н. д.	G013879
CR005989	GGCUUCCCCUGCAGGAUGUU	139	н. д.	G013881
CR005990	UUGAUGACCACAUUGCUUCA	140	н. д.	G013937
CR005991	AGGAGCCUGGAGUUUUUAUCA	141	н. д.	н. д.
CR005992	AUCUGGCAGUAUUGGGCAUU	24	G012276	G013915
CR005993	UGCCAUCGAGACAUUUUAA	142	н. д.	G013899
CR005994	GCGUGGCAUAUGAAAAAAC	25	G012277	н. д.

CR005995	UAUAAAGGAGUUGAUUAUGAG	26	G012278	G013913
CR005996	AGCAAGUCAAUCAAUGACA	143	н. д.	G013897
CR005997	GGACAUUCCUUGAAGCAAUG	144	н. д.	н. д.
CR005998	ACACCUUGAAUUGUACUCAC	27	G012279	н. д.
CR005999	GUUGGGGUGAUAGGUGCAGA	145	н. д.	н. д.
CR006000	GAAAACGCCUUCUUCAGAGG	146	н. д.	н. д.
CR006001	UAUGAAAACGCCUUCUUCAG	147	н. д.	н. д.
CR006002	CUCAGAUGUGGAUGUUGCCA	148	н. д.	н. д.
CR006003	CUCUCCUAGGCUUCCCCUGC	149	н. д.	н. д.

[00628] Редактирование определяли для dgRNA в двух отдельных наборах популяций РНН и РСН. Скрининговые данные для гидовых последовательностей перечислены в Таблице 6 выше. Таблица 7А и Фиг. 1А-1В иллюстрируют процент редактирования для гидовых последовательностей, нацеленных на *KLKB1*, которые трансфицированы совместно с белком Cas9 Sру в первичных гепатоцитах человека (РНН) (N=2), а Таблица 7В и Фиг. 1С-1D для первичных гепатоцитов яванского макака (РСН) (N=2).

[00629] Наиболее хорошо работающие гидовые РНК и соответствующие данные по редактированию из Набора 2 обозначены звездочкой (*) в Таблице 7А и 7В. При сравнении было определено, что наборы хорошо коррелируют (R Спирмена = 0,985).

Таблица 7А: Данные редактирования *KLKB1* для двойных гидовых последовательностей, доставляемых в первичные гепатоциты человека: Наборы праймеров 1 и 2

	НАБОР 1			НАБОР 2	
ИД ГИДОВОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ	Средний % редактирования	Ст. откл. % редактирования	ИД ГИДОВОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ	Средний % редактирования	Ст. откл. % редактирования
CR005916*	44,8	4,67	CR005916*	46,8	1,7
CR005917*	45,75	1,77	CR005917*	49,9	4,38
CR005918	НО	НО	CR005918	НО	НО
CR005919	24,6	0,28	CR005919	28,9	4,81
CR005920	9,35	0,35	CR005920	10,7	0,99
CR005921	6,15	1,06	CR005921	5,55	0,64
CR005922	НО	НО	CR005922	19,25	1,91
CR005923	19,25	4,74	CR005923	20,35	2,76
CR005924	6,1	0,71	CR005924	5,55	0,78

	НАБОР 1			НАБОР 2	
CR005925*	35,55	1,06	CR005925*	36,3	1,41
CR005926	11,95	4,45	CR005926	11,2	2,83
CR005927	29,2	4,24	CR005927	30,4	2,97
CR005928	HO	HO	CR005928	33,45	4,03
CR005929	HO	HO	CR005929	51,35	0,07
CR005930*	32,45	0,21	CR005930*	32,6	8,06
CR005931*	37,85	5,02	CR005931*	33,15	1,63
CR005932*	62,25	3,04	CR005932*	63,25	4,6
CR005933*	70,05	1,91	CR005933*	62,45	2,47
CR005934	17	2,12	CR005934	16,5	0,71
CR005935	26,25	0,35	CR005935	26,45	3,75
CR005936	4,55	0,64	CR005936	5	0,71
CR005937*	32,6	0,99	CR005937*	32,45	1,63
CR005938*	39,25	8,7	CR005938*	36,85	5,87
CR005939	27	0,57	CR005939	24,85	3,46
CR005940	16,7	2,12	CR005940	17,15	1,91
CR005941	8,9	0,85	CR005941	8,95	1,48
CR005942	19,8	0,71	CR005942	20,05	0,49
CR005943*	38,3	6,08	CR005943*	38,05	3,32
CR005944	23,55	1,91	CR005944	22,05	4,17
CR005945	21,95	1,63	CR005945	23,05	1,63
CR005946	29,35	2,47	CR005946	27,4	2,55
CR005947	12,4	2,97	CR005947	12,55	1,63
CR005948	15,2	1,56	CR005948	14,5	0,85
CR005949	19,15	2,33	CR005949	19,5	0,99
CR005950	21,6	2,12	CR005950	19,2	1,7
CR005951*	44,9	1,41	CR005951*	43,45	3,75
CR005952*	63,4	3,11	CR005952*	64,4	2,26
CR005953	5,7	0	CR005953	6,35	1,06
CR005954	12,5	1,7	CR005954	12,8	0,57
CR005955	24,65	3,04	CR005955	24,95	0,64
CR005956*	31,35	0,92	CR005956*	30,55	4,88
CR005957	22,95	2,05	CR005957	24,8	1,41

	НАБОР 1			НАБОР 2	
CR005958	16,45	1,2	CR005958	12,05	2,33
CR005959*	42,4	3,11	CR005959*	42,95	4,17
CR005960*	38,7	0,57	CR005960*	41,1	4,38
CR005961	15,2	0,71	CR005961	13,8	3,25
CR005962*	31,4	0	CR005962*	29,65	0,92
CR005963	HO	HO	CR005963	45,25	9,97
CR005964	17,45	1,91	CR005964	15,65	3,89
CR005965	25,25	2,33	CR005965	22,25	0,21
CR005966	8,35	2,9	CR005966	6,15	0,49
CR005967	19,5	2,55	CR005967	16,7	3,11
CR005968	11,55	2,33	CR005968	11,65	1,91
CR005969	13,5	2,26	CR005969	12,35	3,75
CR005970	HO	HO	CR005970	22,25	4,17
CR005971	1,1	0,42	CR005971	1,15	0,64
CR005972	13,65	1,63	CR005972	12,1	2,97
CR005973	6,45	0,21	CR005973	5,25	1,06
CR005974	HO	HO	CR005974	16,7	1,27
CR005975	7,95	1,34	CR005975	6,75	0,92
CR005976	HO	HO	CR005976	14,6	0,99
CR005977	12,2	2,69	CR005977	13,65	3,32
CR005978	9,95	1,06	CR005978	9,25	0,92
CR005979	22,35	1,63	CR005979	22,15	0,21
CR005980	18,2	2,26	CR005980	21,25	0,78
CR005981	18,2	1,27	CR005981	17,8	0,42
CR005982	6,25	1,77	CR005982	3,95	2,76
CR005983*	53	н. д.	CR005983*	43,3	9,9
CR005984	17,7	7,07	CR005984	18,45	5,73
CR005985	15,1	8,91	CR005985	16,3	0,71
CR005986	HO	HO	CR005986	HO	HO
CR005987	10,6	2,12	CR005987	9,8	0,85
CR005988	8,55	2,05	CR005988	6,4	1,13
CR005989	HO	HO	CR005989	4,9	0,42
CR005990	HO	HO	CR005990	20,2	6,36

	НАБОР 1			НАБОР 2	
CR005991	28,15	2,9	CR005991	26,9	4,81
CR005992	1,65	0,21	CR005992	4,85	0,92
CR005993*	38	1,27	CR005993*	31,35	1,2
CR005994*	33,4	1,98	CR005994*	36,4	1,98
CR005995	22,55	2,47	CR005995	30,65	7,14
CR005996	16,55	0,64	CR005996	13,75	3,46
CR005997	22,05	1,2	CR005997	16,45	3,61
CR005998*	56,65	2,33	CR005998*	59,05	14,07
CR005999	25	3,68	CR005999	22,45	2,19
CR006000	НО	НО	CR006000	НО	НО
CR006001	НО	НО	CR006001	НО	НО
CR006002	23,25	3,75	CR006002	20,85	2,05
CR006003	НО	НО	CR006003	7	1,13

* «отобранные dgRNA», подгруппа протестированных гидовых РНК

Таблица 7В: Данные редактирования *KLKB1* для crRNA, доставляемых в первичные гепатоциты яванского макака: Наборы 1 и 2

	НАБОР 1			НАБОР 2	
ИД ГИДОВОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ	Средний % редактирования	Ст. откл. % редактирования	ИД ГИДОВОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ	Средний % редактирования	Ст. откл. % редактирования
CR005916*	26,6	2,4	CR005916*	26,1	1,8
CR005917*	31,5	3,3	CR005917*	33,2	2,8
CR005918*	0,6	0,2	CR005918	НО	НО
CR005919*	2,5	НО	CR005919*	3,2	0,3
CR005920*	0,4	0,1	CR005920	0,1	0,1
CR005921	0,1	0,0	CR005921	0,1	0,1
CR005010	72,8	0,2	CR005010	65,7	0,9
CR005922*	0,5	0,1	CR005922*	0,6	0,3
CR005923	0,4	0,1	CR005923	0,3	0,1
CR005924	0,2	0,0	CR005924	0,2	0,2
CR005925*	0,7	0,4	CR005925*	1,5	0,3
CR005926	0,0	0,0	CR005926	0,0	0,0

CR005927*	3,1	0,8	CR005927*	3,2	0,2
CR005928*	3,3	1,6	CR005928*	2,2	0,4
CR005929*	13,0	2,7	CR005929*	12,5	0,0
CR005930*	5,0	0,9	CR005930*	3,6	1,3
CR005931*	1,3	0,0	CR005931*	2,3	0,0
CR005932*	15,5	3,5	CR005932*	12,2	5,7
CR005933*	21,5	2,6	CR005933*	16,6	НО
CR005934	НО	НО	CR005934	0,3	0,2
CR005935	НО	НО	CR005935*	2,0	0,1
CR005936	0,1	0,0	CR005936	НО	НО
CR005937*	2,8	0,1	CR005937*	2,9	0,1
CR005938*	5,8	0,4	CR005938*	6,2	0,0
CR005939*	2,3	0,1	CR005939*	1,9	0,4
CR005940*	1,2	0,3	CR005940*	1,2	0,3
CR005025	31,3	10,8	CR005025	36,5	НО
CR005941	0,4	0,1	CR005941*	0,3	0,0
CR005942*	1,2	0,6	CR005942*	1,0	0,8
CR005943*	4,0	0,4	CR005943*	3,1	0,0
CR005020	29,5	1,5	CR005020	30,7	0,6
CR003187	14,5	0,6	CR003187	15,2	2,2
CR005964	0,3	0,4	CR005964	0,1	0,1
CR005032	5,3	1,6	CR005032	4,5	0,9

* «отобранные dgRNA», подгруппа протестированных гидовых РНК

2.1.1 Перекрестный скрининг sgRNA в РНН и РСН, редактирование

[00630] Выбранные гидовые последовательности, нацеленные на *KLKB1*, получали в виде sgRNA и дополнительно оценивали в РНН и РСН. РНН и РСН (Gibco, партия Nu8298) получали и трансфицировали с помощью RNP, как описано в Примере 1. Клетки лизировали через 48 и 72 часов после лечения для анализа NGS, как описано в Примере 1. Таблица 8А и Фиг. 2А-2В иллюстрируют процент редактирования в РНН, а Таблица 8В и Фиг. 2С-2Д в РСН.

[00631] **Таблица 8А: Данные редактирования *KLKB1* для sgRNA, доставляемых в первичные гепатоциты человека: Наборы 1 и 2**

	НАБОР 1			НАБОР 2	
ИД ГИДОВОЙ ПОСЛЕДОВА	Средний % редактиров	Ст. откл. %	ИД ГИДОВОЙ ПОСЛЕДОВАТ	Средний %	Ст. откл. %

ТЕЛЬНОСТИ	ания	редактиро вания	ЕЛЬНОСТИ	редактир ования	редактир ования
G012321*	64,7	5,8	G012321*	62	5,5
G012102	64	5,7	G012102	63,6	4,7
G012293*	63,5	4,4	G012293*	61,6	3,9
G009246	63,3	3,1	G009246	62,3	4,6
G012308*	59,0	1,6	G012308*	59	1,5
G012253*	58,6	3,5	G012253*	59,1	1,7
G012319*	55,3	0,9	G012319*	55,1	3,6
G012298*	53,1	4,2	G012298*	54	4,9
G012320*	52,5	5,5	G012320*	51,9	7,7
G012290*	52,0	1,4	G012290*	51,7	0,9
G012304*	48,7	2,7	G012304	н. д.	н. д.
G012323*	47,4	1,4	G012323*	49,1	1,1
G012280*	46,2	4,0	G012280*	45,4	5,4
G012305*	46,1	5,2	G012305	н. д.	н. д.
G012303*	45,4	7,4	G012303	н. д.	н. д.
G012285*	45,1	7,6	G012285*	45,2	8,6
G012335*	45,1	2,4	G012335*	44,7	3,2
G012286*	44,7	5,3	G012286*	43,9	3,5
G000644	42,4	9,9	G000644	42,7	9,5
G012294*	42,0	1,3	G012294*	43	2,4
G009267	41,6	0,6	G009267	45,8	1,3
G009285	37,7	1,7	G009285	35,6	1,3
G012334*	36,4	2,5	G012334*	36	5,3
G012325*	36,2	1,8	G012325*	36,4	3,6

G012296*	35,9	6,2	G012296*	35,4	7,8
G012331	35,5	3,0	G012331*	35,7	1,2
G012306	34,9	1,8	G012306	н. д.	н. д.
G012313	34,9	1,3	G012313*	36,3	3,3
G012297	34,4	4,7	G012297	32,7	4,7
G012322	32,9	0,4	G012322	33,2	0,4
G012299	32,4	0,7	G012299	н. д.	н. д.
G012333	31,3	0,4	G012333	32,3	3,3
G012328	31,2	2,3	G012328*	34,9	0,1
G012309	30,4	0,1	G012309	29,9	2,3
G009321	29,9	2	G009321	31,8	4,5
G012338	29,0	2,2	G012338	29,7	2,3
G012283	26,2	4,2	G012283	24,9	4,1
G012291	25,3	2,3	G012291	24,7	3,7
G012302	23,2	н. д.	G012302	24,6	3,1
G012337	23,0	2,3	G012337	23,6	0,5
G012311	22,8	0,8	G012311	23,9	0,2
G012144	22,6	1,5	G012144	22,9	0,9
G012327	22,4	3,5	G012327	21,7	3,4
G012316	22,3	0,1	G012316	21,1	0,5
G000645	22	0,7	G000645	22,5	1,6
G012281	20,9	0,1	G012281	21,5	0,1
G012300	19,2	2,6	G012300	н. д.	н. д.
G012310	19,2	2,5	G012310	18,2	0,1
G012329	19,2	1,6	G012329	21,7	0,8
G012318	18,8	0,7	G012318	17,5	0,6
G012314	18,6	0,7	G012314	19,6	2,7
G012326	18,4	3,2	G012326	18,5	3,2
G012295	17,7	3,6	G012295	17,6	5,7
G012287	17,2	0,4	G012287	17	2,4
G012288	16,7	0,1	G012288	15,4	0,3

G012339	16,5	2,6	G012339	17,6	1,3
G012284	15,3	0,3	G012284	15,4	1,5
G012324	15,3	2,2	G012324	19,1	3,5
G012289	14,3	1,8	G012289	13,6	0,8
G012312	14,0	0,8	G012312	14,4	н. д.
G012292	13,4	3,6	G012292	12,9	3
G012330	13,3	1,9	G012330	12,9	0,6
G012315	13,0	0,1	G012315	12,8	1,9
G012332	12,6	1,0	G012332	11,5	0,6
G012340	10,5	2,3	G012340	13,9	1,8
G012301	9,2	0,1	G012301	н. д.	н. д.
G012336	7,5	1,6	G012336	6,3	1,8
G012282	7,3	1,2	G012282	8,6	2,3
G012307	5,3	0,2	G012307	н. д.	н. д.
G012317	3,5	0,6	G012317	3,5	0,7
G012260	1,9	0,6	G012260	1,8	0,1
G012254	1,6	0,2	G012254	0,7	0,3
G012266	1,0	0,1	G012266	1,9	0,6
G012256	0,8	0,4	G012256	0,2	0
G012274	0,8	0,1	G012274	0,7	0,1
G012259	0,6	0,1	G012259	0,6	0,1
G012262	0,5	0,1	G012262	0,6	0,2
G012276	0,5	0,0	G012276	0,8	н. д.
G012257	0,4	0,1	G012257	0,1	0
G012277	0,4	0,1	G012277	0,4	0,1
G012261	0,2	0,1	G012261	0,2	0,1
G012270	0,2	0,1	G012270	0,1	0
G012255	0,1	0,1	G012255	0,1	0,1
G012258	0,1	0,0	G012258	0,1	0,1
G012263	0,1	0,0	G012263	0,1	0
G012264	0,1	0,0	G012264	0,2	0,1
G012265	0,1	0,0	G012265	0,1	0
G012267	0,1	0,0	G012267	0,2	0,1

G012268	0,1	0,0	G012268	0,1	0,1
G012269	0,1	0,0	G012269	0,1	0,1
G012272	0,1	0,1	G012272	0,1	0
G012273	0,1	0,1	G012273	0,1	0,1
G012275	0,1	0,0	G012275	0,2	0,1
G012278	0,1	0,0	G012278	0,1	0,1
G012279	0,0	0,0	G012279	0,1	0,1
G012271	н. д.	н. д.	G012271	0,1	0

* «отобранные dgRNA», подгруппа протестированных гидовых РНК

Таблица 8В: Данные редактирования *KLKB1* для sgRNA, доставляемых в первичные гепатоциты яванского макака: Наборы 1 и 2

ID ГИДОВОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ	НАБОР 1		ID ГИДОВОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ	НАБОР 2	
	Средний % редактирования	Ст. откл. % редактирования		Средний % редактирования	Ст. откл. % редактирования
G000644	35,9	3,5	G000644	37,4	2,3
G000645	64,1	0,2	G000645	65	0,1
G009246	92,7	1,2	G009246	93	0,9
G009267	84	1,6	G009267	83,3	1,9
G009285	82,5	0,3	G009285	80,7	0,7
G009321	46,8	17	G009321	46,3	12,8
G012102	91,4	0,5	G012102	92,4	0,1
G012144	45,3	0,6	G012144	45,4	4,2
G012253*	92	0,3	G012253*	90,4	1,3
G012254	2,3	0,1	G012254*	2,8	0,1
G012255	0	0	G012255	0,1	0
G012256	0,1	0	G012256	0,1	0
G012257	0,1	0	G012257	0,2	0
G012258	н. д.	н. д.	G012258	0,1	0,1
G012259	0,3	0,1	G012259	0,3	0,1
G012260	0,6	0	G012260*	0,8	0,1
G012261	0,2	0,1	G012261	0,2	0,1
G012262	0,3	0,2	G012262	0,4	0,1

G012263	0,2	0,1	G012263	0,2	0,1
G012264	0,1	0	G012264	0,1	0
G012265	н. д.	н. д.	G012265	0,1	0
G012266	0,3	0,1	G012266	0,3	0,1
G012267	0,2	0,1	G012267	0,1	0
G012268	0,1	0,1	G012268	0,1	0
G012269	0,1	0	G012269	0,1	0
G012270	н. д.	н. д.	G012270*	4,8	0,7
G012271	0,2	0,1	G012271	0	0
G012274	н. д.	н. д.	G012274	0,6	0,2
G012277	0,6	0,1	G012277	0,6	0
G012278	0	0	G012278	0,2	0,1
G012279	0,2	0,1	G012279	0,1	0
G012280*	42,2	1,6	G012280*	39,1	5,6
G012282*	8,8	0,3	G012282*	10,3	н. д.
G012283*	50,5	н. д.	G012283*	53,7	3,2
G012284	0,3	0,2	G012284	0,2	0
G012285*	30,2	4,9	G012285*	30,5	0,8
G012287	0,1	0	G012287	0,1	0
G012291	5,5	0,8	G012291*	4,8	1,3
G012292	6,4	0,3	G012292*	6,3	0,7
G012293*	86,6	0,1	G012293*	83,3	6,8
G012294*	53,6	1,5	G012294*	52,1	0,3
G012295*	6,7	0,1	G012295*	7	0,8
G012296*	51,4	2,1	G012296*	49	3,4
G012297	н. д.	н. д.	G012297*	41,9	0,4
G012299*	38,2	0,9	G012299	н. д.	н. д.
G012300*	28,5	4,6	G012300	н. д.	н. д.
G012301*	7,6	2	G012301	н. д.	н. д.
G012302*	39,9	2,8	G012302	н. д.	н. д.
G012303*	13,8	1,1	G012303	н. д.	н. д.
G012304*	69,7	2,8	G012304	н. д.	н. д.
G012305*	16	0,1	G012305	н. д.	н. д.
G012307	0,3	0,2	G012307	н. д.	н. д.

G012308*	57,7	3,9	G012308*	58,1	0,7
G012309*	55,9	7,3	G012309*	55,1	3,7
G012310*	27	2,3	G012310*	27	1,9
G012311	4	0,1	G012311*	3,6	1,8
G012312*	14,4	0,5	G012312*	14,7	0,3

* «отобранные sgRNA», подгруппа протестированных гидовых РНК

2.2. Скрининг sgRNA в первичных гепатоцитах человека (РНН), редактирование и нокдаун белка

[00632] Три партии РНН (Hu8296, Hu8300 и Hu8284) отдельно высевали, как описано в Примере 1, и инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение 24 часов до липофекции. Смесь 6,88 мкл из 10 мкМ гидовой последовательности sgRNA и 4,5 мкл 500 нг/мкл мРНК Cas9 получали в общем объеме 11,4 мкл воды. Реагент липофекции, как описано в Примере 1, оттаивали до комнатной температуры. Смесь гидовая последовательность/мРНК Cas9 последовательно добавляли с 4,8 мкл 50 мМ цитрата натрия/200 мМ NaCl (pH 5), 4,8 мкл реагента для липофекции и 54 мкл воды для молекулярной биологии, для получения общего объема 75 мкл на образец. Образец для липофекции предварительно инкубировали со средой Вильямса Е или средой Cellartis Power Primary HEP (Takada, кат. № Y20020), содержащей 3% ФБС или сыворотки яванского макака в течение 10 мин. при 37°C до добавления клеток. Клетки трансфицировали 10 мкл приготовленного образца для липофекции, содержащего 300 нг мРНК Cas9 и 302 нг гидовой sgRNA.

[00633] Клетки лизировали через 72 часа после трансфекции для анализа NGS, который проводили, как описано в Примере 1.

[00634] Для клеток, которые собирались использовать для анализа секретируемых белков с помощью ELISA или анализа внутриклеточных белков с помощью вестерн-блоттинга, через 72 часа после трансфекции среду аспирировали и заменяли средой Cellartis Power Primary HEP (Takada, кат. № Y20020). Среду аспирировали и заменяли каждые два дня. Для образцов, используемых для определения снижения секретируемого белка, среду аспирировали из лунок и заменяли свежей средой, которую инкубировали в течение 24-48 часов до сбора. Среду собирали и переносили в 96-луночные планшеты для ПЦР и хранили при -20°C до применения в анализах.

[00635] Таблица 8А и Фиг. 3А-3В иллюстрируют процент редактирования и уровни секретируемого белка KLKB1 на основании трансфекции трех партий РНН. Двадцать гидовых последовательностей сравнивали по парам партий РНН и, как было определено, они хорошо коррелировали (R Спирмена > 0,8), как показано на Фиг. 3С-3Е.

Таблица 8С. Частота вставок-делеций KLKB1 и уровни секретируемого белка KLKB1 в РНН

	Партия 1 РНН - HU8296	Партия 2 РНН - HU8284	Партия 3 РНН - HU8300
--	------------------------------	------------------------------	------------------------------

ID ГИДОВОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ	Частота вставок-делений	СО	Секретируемый KCLKB1	СО	Частота вставок-делений	СО	Секретируемый KCLKB1	СО	Частота вставок-делений	СО	Секретируемый KCLKB1	СО
G012253	0,32	0,01	1,54	0,03	0,6 3	0,06	0,2 4	0,00	0,4 9	0,0 1	0,43	0,11
G012254	0,12	0,01	7,22	0,33	0,4 0	0,09	0,5 7	0,05	0,1 5	0,0 0	1,61	0,06
G012255	0,02	0,00	15,7 2	0,70	0,2 2	0,02	5,0 5	0,26	0,0 3	0,0 1	5,33	0,08
G012256	0,10	0,03	9,26	0,13	0,4 3	0,05	1,5 7	0,31	0,1 1	0,0 0	2,69	0,07
G012257	0,00	0,00	22,9 9	0,45	0,0 8	0,04	8,7 5	0,28	0,0 0	0,0 0	3,71	0,21
G012258	0,13	0,01	4,24	0,02	0,2 6	0,02	3,8 9	0,03	0,0 9	0,0 2	2,76	0,00
G012259	0,27	0,01	2,18	0,01	0,5 5	0,07	1,0 2	0,01	0,3 5	0,0 1	0,91	0,13
G012260	0,69	0,03	0,07	0,02	0,7 3	0,03	0,0 5	0,01	0,8 2	0,0 3	- 0,50	0,01
G012261	0,06	0,00	14,2 6	0,77	0,3 8	0,03	3,3 9	0,11	0,0 7	0,0 2	3,84	0,28
G012262	0,48	0,03	1,65	0,05	0,7 4	0,04	0,6 8	0,09	0,5 3	0,0 3	1,40	0,10
G012263	0,42	0,02	2,48	0,06	0,6 7	0,03	0,7 8	0,02	0,5 3	0,0 3	0,55	0,16
G012264	0,32	0,02	1,97	0,02	0,6 5	0,07	0,5 4	0,03	0,2 6	0,0 1	2,02	0,09
G012265	0,11	0,00	6,24	0,02	0,2 9	0,09	1,3 6	0,10	0,1 1	0,0 1	1,10	0,03

G012266	0,42	0,01	1,30	0,02	0,6 1	0,05	0,8 7	0,03	0,4 5	0,0 2	0,15	0,02
G012267	0,72	0,00	0,23	0,02	0,7 9	0,02	0,1 4	0,00	0,8 2	0,0 0	- 0,52	0,01
G012268	0,20	0,01	4,78	0,14	0,4 4	0,01	1,6 5	0,06	0,3 0	0,0 1	1,05	0,03
G012269	0,18	0,03	4,10	0,06	0,6 8	0,01	0,5 2	0,07	0,2 5	0,0 0	2,79	0,04
G012270	0,48	0,01	0,46	0,02	0,7 7	0,02	0,2 1	0,00	0,6 7	0,0 6	- 0,13	0,04
G012271	0,10	0,02	3,16	0,02	0,5 8	0,06	0,7 9	0,04	HO	0,0 0	0,87	0,05
G012272	0,12	0,02	6,42	0,09	0,5 3	0,06	1,1 6	0,03	0,2 1	0,0 1	0,09	0,02
G012273	0,07	0,01	9,39	0,03	0,1 6	HO	0,8 2	0,04	0,0 7	0,0 0	2,14	0,06
G012274	0,04	0,00	15,1 4	0,43	0,3 8	0,11	2,7 3	0,03	HO	0,0 0	4,13	0,04
G012275	0,54	0,00	2,35	0,02	0,7 5	0,03	0,8 9	0,00	0,6 2	0,0 2	0,33	0,00
G012276	0,01	0,00	20,5 4	0,24	0,0 9	0,00	4,5 6	0,18	0,0 3	0,0 0	3,92	0,03
G012277	0,28	0,05	3,39	0,08	0,5 7	0,00	1,6 1	0,01	0,2 2	0,0 3	2,22	0,01
G012278	0,22	0,01	1,61	0,03	0,6 4	0,04	0,5 0	0,00	0,4 2	0,0 2	- 0,08	0,01
G012279	0,40	0,05	2,56	0,08	0,5 9	0,03	1,5 1	0,02	0,5 3	0,0 3	- 0,12	0,01
G012280	0,39	0,02	1,34	0,06	0,5 5	0,04	0,5 2	0,01	0,4 4	0,0 2	0,08	0,00
G012285	0,24	0,00	2,53	0,01	0,5 6	HO	1,2 3	0,06	0,2 6	0,0 0	1,60	0,06
G012286	0,26	0,01	2,56	0,05	0,4 8	0,12	1,0 6	0,01	0,3 3	0,0 1	0,55	0,02

G012290	0,13	0,00	14,4 4	0,06	0,6 0	0,01	5,4 5	0,06	0,2 9	0,0 0	2,41	0,04
G012293	0,00	0,00	21,7 8	0,26	0,0 0	0,00	6,3 9	0,02	0,5 4	0,0 4	0,21	0,02
G012294	0,23	0,01	2,12	0,16	0,6 2	0,02	0,3 9	0,06	0,3 4	0,0 2	0,29	0,08
G012296	0,22	0,00	2,89	0,11	0,5 8	0,05	0,9 0	0,04	0,3 5	0,0 1	0,55	0,04
G012298	0,37	0,01	2,19	0,01	0,6 8	0,05	0,7 2	0,03	0,6 3	0,0 1	- 0,04	0,00
G012303	0,40	0,03	0,52	0,02	0,7 0	0,05	0,3 8	0,00	0,3 8	0,0 3	0,04	0,00
G012304	0,30	0,02	0,89	0,09	0,2 6	HO	0,2 0	0,01	0,2 7	0,0 3	1,31	0,06
G012305	0,38	0,03	0,79	0,07	0,7 3	0,03	0,3 2	0,01	0,5 1	0,0 2	0,04	0,00
G012308	0,18	0,02	1,79	0,13	0,7 2	0,03	0,5 3	0,04	0,3 3	0,0 1	- 0,03	0,01
G012319	0,26	0,00	1,45	0,03	0,2 5	0,02	3,6 2	0,76	0,3 2	0,0 3	0,80	0,00
G012320	0,21	0,00	2,24	0,11	0,6 3	0,03	0,8 8	0,01	0,3 2	0,0 1	1,17	0,02
G012321	0,45	0,00	0,49	0,07	0,7 2	0,01	0,4 9	0,09	0,6 0	0,0 7	- 0,09	0,02
G012323	0,28	0,00	1,32	0,01	0,4 8	0,12	0,7 5	0,17	0,3 3	0,0 0	0,01	0,02
G012325	0,40	0,02	2,51	0,01	0,6 2	0,00	1,3 7	0,68	0,5 0	0,0 5	0,27	0,02
G012334	0,10	0,00	7,52	0,18	0,1 9	HO	2,8 6	0,14	0,0 6	0,0 2	3,07	0,19
G012335	0,27	0,02	3,78	0,26	0,4 7	0,10	1,4 2	0,09	0,4 2	0,0 1	0,11	0,02
G009321 (HOX9)	0,10	0,03	19,5 9	1,30	0,3 0	0,32	6,5 7	0,00	0,3 7	0,0 3	3,80	0,11

Необраб отанный		24,0 3	0,03		7,5 8	0,10		3,47	0,03
--------------------	--	-----------	------	--	----------	------	--	------	------

2.3. Скрининг sgRNA в PNH

[00636] Первичные гепатоциты человека (PNH) трансфицировали мРНК и sgRNA Cas9, как описано в Примере 1. Клетки лизировали через 72 часа после трансфекции, и анализ NGS проводили, как описано в Примере 1.

[00637] Процент редактирования определяли для sgRNA, содержащей гидовые последовательности из Таблицы 1 для двух наборов праймеров. Средний процент редактирования для каждой гидовой последовательности в двух наборах данных показан в Таблице 9А и на Фиг. 4А-4В.

Таблица 9А. Данные редактирования KLKB1 в первичных гепатоцитах человека

ID гидовой последовате льности	Набор 1			ID гидовой последовате льности	Набор 2		
	% редактиро вания	CO	N		% редактиров ания	CO	N
G013946*	49,9	2,2	2	G013946	50,8	9,1	2
G000644	49,3	5,7	2	G000644	44,7	3,7	2
G013945*	48,6	1,9	2	G013945*	50,3	1,6	2
G012102	48,1	4,4	2	G012102	45,8	0,3	2
G012320*	45	14	2	G012320*	41,9	15	2
G013938*	44,5	9,5	2	G013938	НО	н. д.	2
G009285	42,1	0,7	2	G009285	41,4	4,9	2
G009246	40,5	0,6	2	G009246	39,1	3,1	2
G000502	36,5	15	2	G000502	34,9	18	2
G000502	36,5	15	2	G000502	34,9	18,4	2
G012304*	36,2	3,3	2	G012304	НО	н. д.	2
G013886*	30,5	4	2	G013886*	37,2	0,8	2
G012325*	28,7	3,3	2	G012325*	33,9	0,9	2
G013896*	28,4	3,7	2	G013896*	28,7	1,2	2
G009321	27,7	10	2	G009321	26,9	11	2
G012323*	27,4	7,2	2	G012323*	30,6	6,5	2
G013925*	25,9	11	2	G013925*	28,7	12	2

G013922*	21	7	2	G013922*	19,3	3,3	2
G012327	20,5	2,3	2	G012327*	19,5	4,6	2
G012322	18,6	3,8	2	G012322	13,9	4,5	2
G009267	18,3	1,9	2	G009267	20,4	4,8	2
G013924*	17,4	9,3	2	G013924	HO	н. д.	2
G013943*	14,2	9,5	2	G013943*	12,1	6,1	2
G000645	13,5	3,2	2	G000645	9,1	4	2
G013895*	13,4	3,1	2	G013895	14	6,6	2
G013941*	13	4,8	2	G013941	14,3	2,6	2
G013882*	10,4	8,1	2	G013882	HO	н. д.	2
G012329*	9,8	0,7	2	G012329*	8,9	0,9	2
G012300*	9,7	1,8	2	G012300	HO	н. д.	2
G013899	9,3	0,2	2	G013899*	7,1	4,4	2
G013874	9	2,3	2	G013874*	9,5	3,6	2
G013931	8,9	1,6	2	G013931	HO	н. д.	2
G012315	8,8	5,4	2	G012315	HO	н. д.	2
G013902	6,2	3,9	2	G013902*	4,9	5,2	2
G013917	6,1	4,6	2	G013917*	7,1	6,5	2
G013916	5,6	0,6	2	G013916	4	0,8	2
G012324	5,2	2,9	2	G012324	4,8	3,9	2
G013912	5,1	2,9	2	G013912	4,6	1,1	2
G013913	4,8	0,4	2	G013913*	5	0,2	2
G013932	4,8	4,9	2	G013932	HO	н. д.	2
G013900	4,6	2,1	2	G013900	4,6	0,7	2
G012340	3,3	1,1	2	G012340	2,2	1,7	2
G013873	2,8	0,8	2	G013873	3,6	1,1	2
G013884	2,3	1,1	2	G013884	3	0,3	2
G013903	1,4	0,4	2	G013903	1,3	0,5	2
G013901	1,2	1,3	2	G013901	1,4	1,3	2
G013889	0,9	0,2	2	G013889	1,1	1,2	2

G013930	0,9	1,1	2	G013930	1,3	0,1	2
G013893	0,8	0,3	2	G013893	1,8	0,4	2
G013919	0,8	0,2	2	G013919	0,6	0,4	2
G013891	0,7	0,1	2	G013891	0,3	0	2
G013934	0,6	0,2	2	G013934	0,9	1,1	2
G013894	0,3	0,4	2	G013894	0,6	0,8	2
G013906	0,3	0	2	G013906	0,7	0,3	2
G013914	0,3	0,1	2	G013914	НО	н. д.	2
G013928	0,3	0,2	2	G013928	0,5	н. д.	2
G013875	0,2	0,1	2	G013875	0,3	0,1	2
G013878	0,2	0,1	2	G013878	0,3	0,1	2
G013880	0,2	0,1	2	G013880	0,1	0	2
G013939	0,2	0,2	2	G013939	0,2	0,1	2
G013942	0,2	0,1	2	G013942	0,2	0,1	2
G013870	0,1	0	2	G013870	0,1	0	2
G013871	0,1	0	2	G013871	0,1	0	2
G013883	0,1	0	2	G013883	0,6	0,4	2
G013897	0,1	0	2	G013897	0,1	0	2
G013927	0,1	0	2	G013927	0	0	2
G013929	0,1	0	2	G013929	НО	н. д.	2
G013935	0,1	0,1	2	G013935	0,1	0	2
G013936	0,1	0	2	G013936	0,1	0	2
G013940	0,1	0	2	G013940	0,1	0,1	2
G013921	НО	НО	2	G013921	0,3	0,2	2
G013926	НО	НО	2	G013926	0,2	0,1	2

* «отобранные sgRNA», подгруппа протестированных гидовых РНК

2.3.1 Скрининг sgRNA в PCH

[00638] Первичные гепатоциты яванского макака (PCH) трансфицировали мРНК и sgRNA Cas9, как описано в Примере 1, с использованием возрастающих количеств приготовленного образца липофекции для анализа эффекта зависимости от дозы. Клетки лизировали через 72 после трансфекции, и анализ NGS проводили, как описано в Примере 1. Процент редактирования определяли для sgRNA, содержащей гидовые последовательности из Таблицы 1 с использованием двух наборов праймеров для амплификации и детектирования вставок-делеций. Средний процент редактирования для каждой гидовой последовательности в двух наборах данных показан в Таблице 9В и на Фиг.

4C-4D.

[00639] Отобранные гидовые РНК и соответствующие данные по редактированию из Наборов 1 и 2 обозначены звездочкой (*) в Таблице 9В. При сравнении было определено, что наборы данных хорошо коррелируют (R Спирмена = 0,987).

Таблица 9В. Данные редактирования KLKB1 в первичных гепатоцитах человека

ID гидовой последовательности	Набор 1			Набор 2		
	% редактирования	CO	N	% редактирования	CO	N
G013923	4,3	0	2	5	0,6	2
G013877	1,5	0	2	1,3	0,2	2
G013884	0,4	0	2	0,2	0,1	2
G013929	0,3	0	2	0,5	0,1	2
G013940	0,2	0	2	0,3	0,1	2
G013915	0,1	0	2	0,2	НО	2
G013939	9,3	0,1	2	10,1	0,3	2
G013870	4,8	0,1	2	4	1	2
G013879	3,4	0,1	2	3,1	0,6	2
G012327	1,4	0,1	2	1,5	0,1	2
G013942	0,7	0,1	2	0,2	НО	2
G013883	0,3	0,1	2	0,2	0,1	2
G013926	0,1	0,1	2	0	0	2
G013887	0,9	0,2	2	0,7	0,7	2
G013930	3,1	0,3	2	3,2	1,3	2
G013902	0,9	0,3	2	0,7	0,4	2
G013903	0,7	0,3	2	0,9	0,1	2
G013875	6,8	0,4	2	5,6	0,2	2
G013881	5,8	0,4	2	5,7	0	2
G013914	1,4	0,4	2	НО	НО	2
G013936	8,2	0,6	2	8,1	1,3	2
G013916	7,1	0,6	2	6,4	1,9	2
G013874	6,9	0,6	2	6	0,4	2
G012340	3,6	0,6	2	3,7	0,9	2
G013880	1,9	0,6	2	1,9	0,1	2
G013919	0,9	0,6	2	0,7	0,4	2

G013878*	14,3	0,7	2	11,8	3	2
G013931	4	0,8	2	HO	HO	2
G013872	11,1	0,9	2	11,7	1	2
G013909	4,8	0,9	2	5,3	0,5	2
G013899	3	0,9	2	3	1,6	2
G013886*	15,4	1,1	2	15,2	0,4	2
G013944	2,1	1,1	2	2,3	0,5	2
G013876*	23,4	1,3	2	21,4	3,3	2
G013921	4,1	1,3	2	3,1	3,3	2
G013913*	12,1	1,5	2	11,8	HO	2
G013871*	25,9	1,6	2	23,9	4	2
G013904	9	1,6	2	10,4	2,3	2
G013906	3,2	1,6	2	3,3	1,9	2
G013928	4,6	1,7	2	4,1	1,6	2
G012324	3,9	1,8	2	4,4	2,4	2
G013910	3,9	1,8	2	4,8	1,8	2
G013892	2,7	1,8	2	2,8	1,8	2
G013943	3,1	2	2	3,7	2,3	2
G013920	2	2	2	2,9	1,4	2
G013889*	29,4	2,1	2	31,4	0,5	2
G013938*	24,9	2,1	2	24,2	0,6	2
G012329*	12,4	2,1	2	11,4	0,5	2
G012315	4,1	2,1	2	HO	HO	2
G013927	4	2,1	2	5,2	0,3	2
G013918	2,3	2,1	2	2	1,6	2
G013935	4,1	2,2	2	4,3	1,1	2
G013941	7	2,3	2	8,7	1,3	2
G012322	10,8	2,4	2	10,4	3,4	2
G013890	4,9	2,5	2	5,5	2,1	2
G013925	5,8	2,6	2	6,9	2,3	2
G012325*	11,8	2,8	2	11,6	3,4	2
G013888	6,7	2,8	2	7,1	1,6	2
G013897	11	3	2	11,9	1,6	2
G013900	6,6	3	2	7,7	4,2	2

G013917*	16,4	3,2	2	18,3	3,8	2
G013937*	30,4	3,8	2	26,5	6	2
G013932	5,6	4,4	2	HO	HO	2
G012304*	11,7	4,7	2	HO	HO	2
G013895	6,8	4,7	2	6	3,2	2
G013896*	11,5	5	2	10,3	3,8	2
G013907*	36,1	5,5	2	36,2	5,7	2
G012320	8,9	5,7	2	9,2	4,6	2
G013945*	19	6,6	2	20	6,1	2
G013924*	13,9	6,7	2	HO	HO	2
G013882*	24,7	9	2	HO	HO	2
G013946*	27,2	HO	2	22,4	4,2	2
G013873*	23,6	HO	2	20,1	2,9	2
G012323*	12,3	HO	2	11,8	1,5	2
G013934	8,3	HO	2	7,1	1,6	2
G013905	6	HO	2	4	3,3	2
G013898	5,7	HO	2	6	2,1	2
G013908	1,8	HO	2	3,6	1,3	2
G013911	1,8	HO	2	3,4	1,6	2
G013894	0,3	HO	2	0,2	0,1	2
G013885	HO	HO	2	5,9	0,2	2
G013891	HO	HO	2	3,3	0,7	2
G013893	HO	HO	2	1,2	0,9	2
G013901	HO	HO	2	42,2	4,2	2
G013912	HO	HO	2	0,4	HO	2
G013922	HO	HO	2	11,2	1,1	2
G013933	HO	HO	2	12,2	4	2

* «отобранные sgRNA», подгруппа протестированных гидовых РНК

Пример 3: Анализы зависимости от дозы

3.1 Перекрестный скрининг sgRNA в РСН и РНН в 4-точечных анализах зависимости от дозы

[00640] Модифицированные sgRNA, нацеленные на KLKB1 человека, и соответствующие последовательности sgRNA яванского макака тестировали в РНН и РСН в анализе зависимости от дозы, используя 16 гидовых последовательностей из скрининга гидовых последовательностей в РНН, описанного в Примере 2.2. Образцы после

липофекции, включая мРНК и sgRNA, получали, как описано в Примере 2.2. Первичные гепатоциты человека и яванского макака высевали, как описано в Примере 1. Обе клеточные линии инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение 48 часов до обработки образцами после липофекции. Образцы после липофекции инкубировали в среде Cellartis Power Primary HEP (Takada, кат. Y20020), содержащей 3% ФБС при 37°C в течение 10 минут.

[00641] После инкубации образцы для липофекции добавляли к гепатоцитам человека или яванского макака в 4-точечном анализе зависимости от дозы. РНН лизировали через 120 часов после трансфекции, а РСН лизировали через 168 часов после трансфекции, и гДНК подвергали количественной ПЦР для анализа NGS, как описано в Примере 1.

[00642] Частота вставок-делений sgRNA при концентрациях 0,4 нМ, 3,3 нМ, 30 нМ и 90 нМ в клетках РНН показана в Таблице 10 и на Фиг. 5A-5B. Уровни секретируемого белка KLKB1 sgRNA, определенные с помощью ELISA, показаны в Таблице 10 и на Фиг. 5C-5D.

Таблица 10: Данные по редактированию KLKB1 и уровни секретируемого белка KLKB1 в РНН

ID ГИДОВОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ	Концентрация гидовой последовательности (нМ)	Средняя частота вставок-делений	CO	Средний уровень секретируемого KLKB1	CO
G012253	90	0,54	0,04	5,84	0,29
	30	0,64	0,05	4,06	0,09
	3,3	0,31	0,01	17,29	0,35
	0,4	0,02	0,00	26,56	0,00
G012259	90	0,30	0,02	8,70	0,10
	30	0,52	0,06	4,90	0,00
	3,3	0,20	0,03	18,90	0,20
	0,4	0,02	0,00	26,60	0,00
G012260	90	0,73	0,04	2,20	0,00
	30	0,84	0,00	0,30	0,30
	3,3	0,71	0,02	4,00	0,20
	0,4	0,20	0,01	25,10	0,30
G012267	90	0,80	0,03	2,10	0,10
	30	0,89	0,01	0,30	0,00
	3,3	0,76	0,05	4,00	0,20
	0,4	0,29	0,03	20,70	0,20

G012278	90	0,47	0,10	4,80	0,10
	30	0,57	0,02	1,80	0,10
	3,3	0,24	0,02	10,80	0,10
	0,4	0,02	0,01	26,50	0,10
G012279	90	0,00	0,00	18,70	0,40
	30	0,00	0,00	21,10	0,30
	3,3	0,00	0,00	26,60	0,00
	0,4	0,00	0,00	26,60	0,00
G012280	90	0,42	0,08	6,90	0,10
	30	0,69	0,01	4,70	0,10
	3,3	0,21	0,00	23,30	0,10
	0,4	0,01	0,00	26,60	0,00
G012293	90	0,48	0,05	5,10	0,10
	30	0,70	0,00	4,20	0,00
	3,3	0,32	0,02	15,20	0,60
	0,4	0,03	0,00	26,60	0,00
G012294	90	0,39	0,08	7,37	0,08
	30	0,48	0,04	6,44	0,06
	3,3	0,13	0,01	22,57	0,25
	0,4	0,01	0,00	23,49	0,73
G012298	90	0,48	0,14	9,30	0,60
	30	0,52	0,00	6,20	0,10
	3,3	0,20	0,07	21,50	0,50
	0,4	0,01	0,00	25,50	0,50
G012303	90	0,68	0,05	6,00	0,00
	30	0,75	0,04	3,80	0,30
	3,3	0,43	0,03	15,80	0,20
	0,4	0,02	0,00	23,20	2,70
G012304	90	0,54	0,02	6,00	0,10
	30	0,52	0,02	7,20	0,20
	3,3	0,21	0,04	21,30	0,30
	0,4	0,01	0,00	25,60	0,00
G012305	90	0,61	0,03	7,90	0,00
	30	0,66	0,01	4,40	0,10

	3,3	0,33	0,01	18,00	0,00
	0,4	0,01	0,00	26,10	0,20
G012308	90	0,41	0,01	10,70	0,20
	30	0,42	0,10	9,10	0,10
	3,3	0,08	0,01	24,30	0,10
	0,4	0,01	0,00	26,60	0,00
G012321	90	0,43	0,00	9,70	0,10
	30	0,61	0,13	5,20	0,00
	3,3	0,17	0,01	21,70	0,20
	0,4	0,02	0,02	26,50	0,10
G012323	90	0,28	0,03	9,90	0,30
	30	0,28	0,10	7,60	0,10
	3,3	0,14	0,03	22,40	0,30
	0,4	0,01	0,00	26,60	0,00
необработанный	н. д.			22,61	0,21

[00643] Частота вставок-делеций sgRNA при концентрациях 0,4 нМ, 10 нМ, 30 нМ и 90 нМ в клетках РСН показана в Таблице 11 и на Фиг. 5Е-5F. Уровни секретируемого белка KLKB1 sgRNA, определенные с помощью ELISA, показаны в Таблице 11 и на Фиг. 5G-5H.

Таблица 11: Данные по редактированию KLKB1 и уровни секретируемого белка KLKB1 в РСН

Гидовая последовательность	Концентрация гидовой последовательности (нМ)	Средняя частота вставок-делеций	СО	Средний уровень секретируемого KLKB1	СО
G012253	90	0,25	0,01	0,82	0,01
	30	0,38	0,05	0,77	0,00
	10	2,76	0,09	0,44	0,07
	0,4	13,26	0,32	0,01	0,00
G012259	90	1,13	0,02	0,70	0,01
	30	0,81	0,12	0,69	0,01
	10	3,95	0,41	0,37	0,04
	0,4	12,88	0,96	0,00	0,00
G012260	90	0,36	0,02	0,82	0,02
	30	0,23	0,00	0,81	0,01
	10	1,56	0,13	0,56	0,06

	0,4	11,51	1,03	0,01	0,00
G012267	90	1,28	0,10	0,67	0,02
	30	0,98	0,07	0,67	0,00
	10	3,18	0,37	0,42	0,04
	0,4	11,88	0,28	0,01	0,00
G012278	90	1,01	0,06	0,61	0,03
	30	0,82	0,01	0,63	0,02
	10	3,16	0,19	0,30	0,05
	0,4	12,08	1,14	0,00	0,00
G012279	90	9,88	1,25	0,00	0,00
	30	9,44	1,07	0,00	0,00
	10	12,49	0,14	0,00	0,00
	0,4	12,12	0,25	0,00	0,00
G012280	90	4,32	0,20	0,44	0,02
	30	3,08	0,18	0,46	0,00
	10	7,70	0,21	0,13	0,02
	0,4	11,69	1,13	0,00	0,00
G012293	90	0,80	0,22	0,80	0,03
	30	0,54	0,09	0,80	0,02
	10	2,56	0,16	0,59	0,00
	0,4	11,79	0,23	0,01	0,00
G012294	90	6,96	0,48	0,39	0,09
	30	6,21	0,29	0,41	0,03
	10	15,19	1,13	0,12	0,00
	0,4	24,96	3,85	0,00	0,00
G012298	90	18,40	0,36	HO	HO
	30	25,03	2,87	HO	HO
	10	24,81	2,89	HO	HO
	0,4	23,59	3,91	HO	HO
G012303	90	18,34	4,33	0,16	0,06
	30	16,05	4,43	0,17	0,00
	10	26,04	3,42	0,03	0,00
	0,4	27,82	2,74	0,00	0,00
G012304	90	5,75	1,35	0,52	0,04

	30	6,14	0,68	0,54	0,01
	10	17,23	1,75	0,21	0,04
	0,4	24,90	0,95	0,00	0,00
G012305	90	19,27	4,43	0,07	0,02
	30	18,57	3,56	0,11	0,01
	10	22,11	2,31	0,02	0,00
	0,4	27,30	1,17	0,00	0,00
G012308	90	6,97	2,00	0,44	0,04
	30	7,52	0,00	0,49	0,03
	10	14,43	0,07	0,18	0,05
	0,4	22,80	2,56	0,00	0,00
G012321	90	4,95	1,25	НО	НО
	30	5,96	0,07	НО	НО
	10	10,71	0,16	НО	НО
	0,4	23,83	1,78	НО	НО
G012323	90	9,93	2,24	НО	НО
	30	8,97	3,13	НО	НО
	10	15,75	0,20	НО	НО
	0,4	22,16	0,27	НО	НО

[00644] Было показано, что частота вставок-делеций и уровни секретируемого белка KLKB1 обратно коррелировали как в РНН, так и в РСН, как показано на Фиг. 5I-5J.

3.2 Перекрестный скрининг sgRNA в РНН и РСН в 7-точечных анализах зависимости от дозы

[00645] Составы липидных наночастиц (LNP) на основе sgRNA, нацеленной на последовательности sgRNA KLKB1 человека, тестировали в РНН и РСН в анализе зависимости от дозы.

[00646] LNP вводили в состав, как описано в Примере 1. Готовые LNP характеризовали для определения эффективности инкапсуляции, индекса полидисперсности и среднего размера частиц в соответствии с аналитическими методами, представленными выше.

[00647] Первичные гепатоциты человека и яванского макака высевали, как описано в Примере 1. Обе клеточные линии инкубировали при 37°C, с 5% CO₂ в течение 24 часов до обработки LNP. LNP инкубировали в среде, содержащей 3% ФБС при 37°C в течение 10 минут. После инкубации LNP добавляли к гепатоцитам человека или яванского макака в 7-точечном 3-кратном анализе зависимости от дозы. Клетки лизировали через 72 часа после трансфекции, и гДНК подвергали количественной ПЦР для анализа NGS, как описано в Примере 1.

[00648] Частота вставок-делений sgRNA при концентрациях 0,04 нМ, 0,13 нМ, 0,40 нМ, 1,19 нМ, 3,58 нМ, 10,75 нМ и 32,25 нМ показана в Таблице 12, а соответствующие кривые зависимости от дозы на Фиг. 6А-В для РНН и Фиг. 6С-Д для РСН.

Таблица 12: Частота вставок-делений и секретируемый белок KLKB для LNP, нацеленных на *KLKB1 in vitro*

ID ГИДОВОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ	Конц. гидовой последовательности (нМ)	РНН				РСН			
		Средняя частота вставок-делений	СО	Средний уровень секретируемого KLKB1	СО	Средняя частота вставок-делений	СО	Средний уровень секретируемого KLKB1	СО
G012253	32,25	0,91	0,00	-1,38	0,22	0,90	0,01	-1,58	0,10
	10,75	0,89	0,00	-1,30	0,08	0,89	0,01	-1,57	0,07
	3,58	0,89	0,02	-1,23	0,19	0,84	0,00	-1,39	0,07
	1,19	0,83	0,01	-0,48	0,11	0,55	0,03	5,01	0,24
	0,40	0,64	0,04	2,49	0,07	0,18	0,02	22,35	0,29
	0,13	0,34	0,03	9,34	0,01	0,05	0,01	27,18	0,07
	0,04	0,12	0,01	15,04	0,17	0,01	0,00	27,18	0,07
G012259	32,25	0,84	0,01	-1,12	0,21	0,95	0,01	-1,57	0,07
	10,75	0,86	0,01	-1,17	0,11	0,93	0,01	-1,57	0,02
	3,58	0,85	0,02	-1,00	0,06	0,80	0,00	-0,71	0,70
	1,19	0,79	0,01	-0,28	0,04	0,44	0,04	8,93	0,23
	0,40	0,63	0,02	2,37	0,19	0,12	0,03	25,94	0,05
	0,13	0,36	0,03	8,32	0,31	0,01	0,00	27,18	0,07
	0,04	0,13	0,01	12,97	0,41	0,00	0,00	27,18	0,07
G012260	32,25	0,93	0,00	-1,36	0,21	0,96	0,00	-1,32	0,18
	10,75	0,92	0,01	-1,35	0,15	0,95	0,01	-1,41	0,37
	3,58	0,92	0,01	-1,43	0,19	0,87	0,02	-0,94	0,03
	1,19	0,92	0,01	-1,37	0,27	0,50	0,00	7,33	0,02
	0,40	0,90	0,00	-1,03	0,17	0,13	0,01	24,00	1,03
	0,13	0,84	0,02	0,30	0,03	0,03	0,00	27,18	0,07
	0,04	0,63	0,03	4,51	0,20	0,00	0,00	26,95	0,39

G012267	32,25	0,94	0,03	-1,58	0,13	0,95	0,02	-1,88	0,02
	10,75	0,94	0,01	-1,50	0,08	0,94	0,02	-1,94	0,02
	3,58	0,93	0,01	-1,57	0,13	0,84	0,00	-1,48	0,10
	1,19	0,91	0,05	-1,62	0,25	0,52	0,01	7,68	0,29
	0,40	0,91	0,01	-1,48	0,22	0,15	0,01	24,74	1,33
	0,13	0,87	0,01	-0,77	0,07	0,04	0,01	27,00	0,05
	0,04	0,78	0,02	1,28	0,07	0,01	0,00	27,00	0,05
G012278	32,25	0,95	0,00	-1,63	0,18	0,95	0,01	-1,87	0,04
	10,75	0,94	0,01	-1,64	0,10	0,94	0,01	-1,91	0,14
	3,58	0,94	0,00	-1,59	0,05	0,82	0,02	-1,41	0,16
	1,19	0,88	0,01	-1,38	0,20	0,44	0,01	8,23	0,17
	0,40	0,65	0,03	0,29	0,14	0,08	0,03	26,13	1,19
	0,13	0,34	0,02	5,68	0,20	0,02	0,00	27,00	0,05
	0,04	0,12	0,01	12,54	0,43	0,01	0,00	27,00	0,05
G012279	32,25	0,00	0,00	-0,99	0,39	0,00	0,00	0,02	0,11
	10,75	0,00	0,00	-0,56	0,05	0,00	0,00	8,49	0,34
	3,58	0,00	0,00	3,54	0,08	0,00	0,00	26,50	0,03
	1,19	0,00	0,00	12,69	0,56	0,00	0,00	27,00	0,05
	0,40	0,00	0,00	15,91	0,26	0,00	0,00	26,85	0,17
	0,13	0,00	0,00	17,60	0,18	0,00	0,00	27,00	0,05
	0,04	0,00	0,00	17,32	0,00	0,00	0,00	27,00	0,05
G012280	32,25	0,93	0,01	-1,68	0,27	0,87	0,01	-1,91	0,01
	10,75	0,90	0,03	-1,56	0,20	0,83	0,01	-1,62	0,30
	3,58	0,91	0,03	-1,55	0,11	0,56	0,02	2,88	0,53
	1,19	0,85	0,01	-0,61	0,27	0,15	0,00	21,86	0,24
	0,40	0,61	0,02	4,05	0,45	0,02	0,00	26,36	0,86
	0,13	0,26	0,01	11,55	0,19	0,01	0,00	27,00	0,05
	0,04	0,08	0,00	15,47	0,38	0,00	0,00	27,00	0,05
G012293	32,25	0,91	0,00	-1,79	0,18	0,98	0,00	-1,82	0,06
	10,75	0,91	0,01	-1,63	0,19	0,96	0,02	-1,84	0,02
	3,58	0,92	0,02	-1,65	0,27	0,90	0,00	-1,21	0,55
	1,19	0,89	0,00	-1,27	0,55	0,54	0,02	3,40	0,13
	0,40	0,82	0,02	-0,36	0,32	0,19	0,02	22,12	0,61
	0,13	0,60	0,00	3,31	0,19	0,04	0,02	26,91	0,09

	0,04	0,32	0,01	10,09	0,50	0,01	0,00	27,00	0,04
G012294	32,25	0,93	0,01	-1,58	0,28	0,90	0,02	-1,84	0,12
	10,75	0,91	0,01	-1,41	0,14	0,89	0,00	-1,86	0,04
	3,58	0,91	0,01	-1,46	0,23	0,60	0,00	-0,15	0,19
	1,19	0,82	0,02	-0,96	0,32	0,23	0,03	13,68	0,43
	0,40	0,60	0,03	1,61	0,43	0,07	0,03	25,94	1,04
	0,13	0,30	0,01	7,91	0,02	0,01	0,00	26,73	0,16
	0,04	0,12	0,00	12,18	1,01	0,01	0,00	27,00	0,05
G012298	32,25	0,95	0,00	-0,50	0,11	н. д.	н. д.	15,77	0,15
	10,75	0,95	0,00	-0,47	0,23	н. д.	н. д.	27,00	0,05
	3,58	0,91	0,00	-0,15	0,21	н. д.	н. д.	27,00	0,05
	1,19	0,83	0,01	0,88	0,40	н. д.	н. д.	27,00	0,05
	0,40	0,59	0,01	6,54	0,52	н. д.	н. д.	26,39	0,82
	0,13	0,24	0,02	12,35	0,21	н. д.	н. д.	27,00	0,05
	0,04	0,08	0,00	16,29	1,12	н. д.	н. д.	27,00	0,05
G012303	32,25	0,96	0,01	-1,27	0,14	0,88	0,01	-1,55	0,10
	10,75	0,94	0,00	-1,39	0,18	0,83	0,02	-1,36	0,12
	3,58	0,93	0,01	-1,28	0,15	0,40	0,02	8,20	0,71
	1,19	0,90	0,01	-0,60	0,18	0,08	0,01	26,23	0,95
	0,40	0,74	0,02	2,18	0,05	0,02	0,00	27,18	0,07
	0,13	0,36	0,01	9,45	0,14	0,00	0,00	27,18	0,07
	0,04	0,13	0,01	15,14	0,26	0,00	0,00	27,18	0,07
G012304	32,25	0,94	0,01	-1,37	0,32	0,96	0,00	-1,70	0,19
	10,75	0,95	0,01	-1,39	0,10	0,94	0,01	-1,72	0,08
	3,58	0,91	0,00	-1,41	0,21	0,87	0,00	-1,52	0,01
	1,19	0,84	0,02	-0,38	0,15	0,52	0,02	6,62	0,71
	0,40	0,61	0,02	3,74	0,19	0,13	0,02	25,35	1,70
	0,13	0,22	0,01	11,39	0,18	0,02	0,00	27,18	0,07
	0,04	0,06	0,00	15,41	0,72	0,00	0,00	27,18	0,07
G012305	32,25	0,95	0,01	-1,26	0,16	0,86	0,01	-1,53	0,11
	10,75	0,94	0,00	-1,37	0,13	0,75	0,02	-0,43	0,12
	3,58	0,92	0,02	-1,30	0,15	0,33	0,01	15,42	0,72
	1,19	0,86	0,01	-0,26	0,07	0,06	0,00	27,18	0,07
	0,40	0,65	0,03	3,85	0,04	0,01	0,00	27,18	0,07

	0,13	0,27	0,04	10,94	0,24	0,00	0,00	27,18	0,07
	0,04	0,08	0,01	15,12	0,54	0,00	0,00	27,18	0,07
G012308	32,25	0,95	0,01	-1,07	0,19	0,93	0,02	-1,66	0,12
	10,75	0,95	0,01	-0,92	0,07	0,92	0,01	-1,44	0,02
	3,58	0,88	0,02	-0,77	0,27	0,60	0,07	-0,18	0,32
	1,19	0,75	0,01	1,00	0,10	0,34	0,03	14,44	0,04
	0,40	0,31	0,05	7,89	0,27	0,08	0,02	26,77	0,64
	0,13	0,07	0,00	12,76	0,59	0,03	0,02	27,18	0,07
	0,04	0,02	0,01	14,75	0,43	0,00	0,00	27,17	0,05
G012321	32,25	0,93	0,00	-1,17	0,24	0,96	0,01	-1,68	0,19
	10,75	0,93	0,01	-1,26	0,14	0,92	0,02	-1,60	0,12
	3,58	0,88	0,02	-1,07	0,21	0,80	0,02	-0,84	0,10
	1,19	0,85	0,00	-0,17	0,17	0,40	0,02	14,33	0,57
	0,40	0,63	0,02	3,56	0,06	0,09	0,01	23,98	1,24
	0,13	0,25	0,03	10,27	0,82	0,03	0,02	27,17	0,05
	0,04	0,09	0,01	13,27	0,79	0,01	0,00	27,18	0,07
G012323	32,25	0,89	0,01	-1,17	0,28	0,93	0,00	-1,74	0,12
	10,75	0,90	0,00	-1,35	0,14	0,93	0,00	-1,72	0,03
	3,58	0,84	0,01	-1,14	0,17	0,76	0,54	-0,36	0,32
	1,19	0,73	0,01	0,20	0,14	0,35	0,01	15,43	0,17
	0,40	0,49	0,01	4,28	0,04	0,07	0,01	25,63	1,00
	0,13	0,23	0,02	10,12	1,03	0,01	0,00	27,18	0,07
	0,04	0,08	0,01	14,08	0,80	0,00	0,00	27,18	0,07
G013901	32,25	0,29	0,01	7,11	0,34	0,97	0,00	-1,58	0,48
	10,75	0,29	0,00	8,89	0,40	0,98	0,00	-1,76	0,26
	3,58	0,22	0,02	10,94	0,34	0,95	0,01	-1,81	0,19
	1,19	0,15	0,02	14,44	0,70	0,79	0,01	-0,82	0,32
	0,40	0,08	0,01	13,76	0,22	0,46	0,00	8,67	0,27
	0,13	0,05	0,00	14,80	0,40	0,19	0,01	21,35	0,16
	0,04	0,02	0,00	14,97	0,59	0,05	0,00	26,84	0,19
необраб отанный	н. д.	0,00	0,00	13,62	0,95	0,00	0,00	25,77	2,09

3.3 Перекрестный скрининг лидерной sgRNA в РСН и РНН в 7-точечных анализах зависимости от дозы

[00649] Составы липидных наночастиц (LNP) на основе модифицированных sgRNA тестировали в РНН и РСН в анализе зависимости от дозы.

[00650] В этом исследовании использовали LNP, описанные в Примере 3.2.

[00651] После инкубации LNP добавляли к гепатоцитам человека или яванского макака в 7-точечном 3-кратном анализе зависимости от дозы. Клетки лизировали через 72 часа после трансфекции, и гДНК подвергали количественной ПЦР для анализа NGS, как описано в Примере 1. Для анализа белка KLKB1 клетки лизировали через 8 дней после трансфекции, и цельные клеточные экстракты подвергали вестерн-блоттингу, как описано в Примере 1.

[00652] Частота вставок-делений sgRNA при концентрациях 0,04 нМ, 0,13 нМ, 0,40 нМ, 1,19 нМ, 3,58 нМ, 10,75 нМ и 32,25 нМ для РНН и РСН показана в Таблице 13, а данные кривой зависимости от дозы проиллюстрированы на Фиг. 7А и 7В. Уровни секретируемого белка KLKB1 sgRNA, определенные с помощью ELISA, показаны в Таблице 13 и на Фиг. 7С для РНН и Фиг. 7D для РСН.

Таблица 13. Частота вставок-делений и секретируемый белок KLKB для LNP, нацеленных на *KLKB1 in vitro*

ID ГИДОВОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ	РНН					РСН				
	Конц. гидовой последовательности (нМ)	Средняя частота вставок-делений	СО	Средний уровень секретируемого KLKB1	СО	Конц. гидовой последовательности (нМ)	Средняя частота вставок-делений	СО	Средний уровень секретируемого KLKB1	СО
G012260	32,25	0,88	0,03	-0,07	0,04	32,25	0,97	0,01	-1,42	0,04
	10,75	0,86	0,03	0,05	0,09	10,75	0,98	0,01	-1,32	0,03
	3,58	0,82	0,08	0,03	0,04	3,58	0,95	0,00	-1,41	0,04
	1,19	0,81	0,07	0,06	0,00	1,19	0,68	0,07	-0,08	0,03
	0,40	0,84	0,00	0,14	0,00	0,40	0,26	0,04	14,46	1,24
	0,13	0,79	0,04	0,55	0,01	0,13	0,06	0,01	24,37	0,74
	0,04	0,73	0,02	1,80	0,01	0,04	0,01	0,00	25,32	0,79
G012267	32,25	0,88	0,05	0,11	0,02	32,25	0,98	0,00	-1,46	0,01
	10,75	0,89	0,04	0,17	0,01	10,75	0,97	0,02	-1,28	0,14
	3,58	0,87	0,05	0,16	0,05	3,58	0,94	0,00	-1,36	0,08

	1,19	0,89	0,04	0,12	0,02	1,19	0,61	0,01	1,06	0,00
	0,40	0,86	0,02	0,23	0,02	0,40	0,20	0,03	15,86	0,74
	0,13	0,87	0,02	0,54	0,00	0,13	0,05	0,00	25,73	1,85
	0,04	0,80	0,03	1,54	0,06	0,04	0,02	0,00	26,39	0,16
G012293	32,25	0,85	0,00	-0,09	0,07	32,25	0,98	0,01	-1,43	0,02
	10,75	0,76	0,15	-0,04	0,01	10,75	0,98	0,01	-1,32	0,06
	3,58	0,78	0,02	0,06	0,08	3,58	0,98	0,00	-1,37	0,07
	1,19	0,85	0,06	0,39	0,30	1,19	0,81	0,01	-0,89	0,04
	0,40	0,74	0,08	0,71	0,01	0,40	0,35	0,03	9,93	0,49
	0,13	0,71	0,02	2,52	0,12	0,13	0,09	0,00	23,26	0,06
	0,04	0,45	0,03	7,55	0,09	0,04	0,02	0,00	25,17	0,05
G013901	32,25	0,31	0,07	9,02	0,05	32,25	0,98	0,00	-1,47	0,02
	10,75	0,31	0,02	8,64	0,30	10,75	0,98	0,00	-1,35	0,04
	3,58	0,26	0,03	11,28	0,62	3,58	0,98	0,00	-1,45	0,03
	1,19	0,19	0,01	12,75	0,42	1,19	0,89	0,02	-1,32	0,09
	0,40	0,13	0,02	15,06	0,73	0,40	0,58	0,05	2,65	0,28
	0,13	0,06	0,01	15,61	1,11	0,13	0,23	0,05	15,10	0,22
	0,04	0,04	0,00	16,27	0,46	0,04	0,08	0,00	23,21	0,82
необраб отанный	н. д.	0,00	0,00	18,29	1,14	н. д.	0,00	0,00	25,96	1,35

[00653] Для анализа белка KLKB1 РНН трансфицировали гидовой последовательностью KLKB1 человека, G012267, и лизировали через 8 дней после трансфекции, и цельные клеточные экстракты подвергали вестерн-блоттингу, как описано в Примере 1. Уровни белка KLKB1 человека на протяжении 7-точечной кривой доза-ответ сравнивали с необработанными контролями и нормализовали к GAPDH, показано на Фиг. 7Е.

Пример 4 - Нецелевой анализ гидовых последовательностей KLKB1

[00654] Для определения потенциальных нецелевых сайтов в геноме, расщепленных Cas9, нацеленным на KLKB1, использовали биохимический способ, описанный в Примере 1. Гидовые последовательности, отобранные на основании результатов из экспериментов, описанных выше, тестировали на возможные нецелевые сайты расщепления генома. Шестнадцать гидовых последовательностей, нацеленных на KLKB1, оценивали относительно нецелевого расщепления генома по отношению к геномной ДНК из клеток НЕК293 в концентрации 16 нМ (ATCC, кат. № CRL-1573). Гидовую последовательность KLKB1, G012267 и контрольные гидовые последовательности с известными нецелевыми профилями были включены в эксперименты (G000644, нацеленный на EMX1, для которого

было обнаружено 281 нецелевых сайта, G00045, нацеленный на VEGFA, для которого было обнаружено 6602 нецелевых сайта); Frock et al., 2015, Tsai et al., 2015) оценивали относительно нецелевого расщепления генома по отношению к геномной ДНК из объединенных МКПК человека при концентрации 64 нМ. Количество потенциальных нецелевых сайтов, обнаруженных в биохимическом анализе с использованием геномной ДНК из клеток НЕК 293, показано в Таблице 14А. Количество потенциальных нецелевых сайтов, обнаруженных в биохимическом анализе с использованием геномной ДНК из МКПК, показано в Таблице 14В. Указан процент нецелевых сайтов, обнаруженных с помощью анализа, выполненного в данном исследовании, по сравнению с количеством нецелевых сайтов, обозначенных в литературе для гидовой последовательности EMX1 и гидовой последовательности VEGFA.

Таблица 14А. Биохимический нецелевой анализ геномной ДНК из клеток НЕК293

ID гидовой последовательности	Мишень	Концентрация гидовой последовательности (нМ)	Нецелевые сайты
G012253	KLKB1	16	122
G012259	KLKB1	16	77
G012260	KLKB1	16	153
G012267	KLKB1	16	136
G012278	KLKB1	16	153
G012279	KLKB1	16	0
G012280	KLKB1	16	292
G012293	KLKB1	16	126
G012294	KLKB1	16	132
G012298	KLKB1	16	155
G012303	KLKB1	16	45
G012304	KLKB1	16	42
G012305	KLKB1	16	48
G012308	KLKB1	16	116
G012321	KLKB1	16	107
G012323	KLKB1	16	14

Таблица 14В. Биохимический нецелевой анализ геномной ДНК из МКПК человека

Гидовая последовательность	Мишень	Нецелевые сайты (проценты*)
G012267	KLKB1	61
G000644	EMX1	242/281 (86%)
G000645	VEGFA	4431/6602 (67%)

*Проценты относительно известного количества нецелевых сайтов для каждого из целевых сайтов гидовой последовательности.

Пример 5. Нацеленное секвенирование для проверки потенциала нецелевых сайтов

[00655] Гидовые последовательности KLKB1 были выбраны на основании экспериментов выше для дополнительной оценки. Нацеленный нецелевой подход, описанный в Примере 1, был применен для оценки активности целевых вставок-делеций для возможных нецелевых сайтов, связанных с этими гидовыми последовательностями. Нецелевые сайты, протестированные в эксперименте, были идентифицированы посредством биохимических экспериментов, описанных в Примере 4, или предсказания *in silico*, как описано в Примере 1.

[00656] В этом эксперименте оценивали 3 sgRNA, нацеленные на KLKB1 человека. РНН культивировали и трансфицировали с помощью LNP, содержащих мРНК Cas9 и представляющую интерес sgRNA (например, sgRNA, имеющую возможные нецелевые сайты для оценки), как описано в Примере 1. Геномную ДНК выделяли из РНН и подвергали NGS и нацеленному анализу нецелевых сайтов, как описано в Примере 1.

[00657] Количество возможных нецелевых сайтов, оцененных в представленном анализе, и тех нецелевых сайтов, которые были успешно охарактеризованы в анализе, которые расположены за сайтами, которые были проверены вручную, показано в Таблице 15A.

Таблица 15. Нацеленный анализ нецелевых сайтов

ID гидовой последовательности	Оцененные нецелевые сайты	Охарактеризованные нецелевые сайты	Проверенные нецелевые сайты
G012260	223	206	5
G012267	181	171	1
G012293	360	347	4

Пример 6. In vivo редактирование гуманизированного локуса KLKB1 в мышинной модели KLKB1 человека

[00658] В этом исследовании использовали гуманизированных мышей, которые экспрессируют белок KLKB1 человека (мышинная модель KLKB1 человека). Мышиная модель KLKB1 человека включает гуманизированный локус *KLKB1*, в котором область от старт-кодона до стоп-кодона мышинного KLKB1 была заменена соответствующей геномной последовательностью человека. Животных взвешивали, и им вводили дозы в объемах,

соответствующих индивидуальным массам тела. В общем было 5 групп (N=4 с 2 самцами и 2 самками).

[00659] LNP, содержащие модифицированные sgRNA (G12260, G12267, G12293, G12303 и G12321) и мРНК Cas9 вводили посредством боковой хвостовой вены при 0,3 мг/кг на основании общего содержания РНК в объеме 10 мл на килограмм массы тела. Готовые LNP характеризовали для определения эффективности инкапсуляции, индекса полидисперсности и среднего размера частиц в соответствии с аналитическими методами, описанными в Примере 1. В день 11 после введения LNP мышей умерщвляли, и собирали ткань печени для извлечения ДНК. Ткани лизировали с использованием Zymo Research Bashing Bead Lysis Rack, и ДНК выделяли с использованием набора для выделения ДНК Zymo Research в соответствии с протоколом производителя. Выделенную ДНК подвергали ПЦР для секвенирования.

[00660] Кровь собирали в пробирки для отделения сыворотки и давали сворачиваться в течение 2 часов при комнатной температуре после центрифугирования. ELISA выполняли на сыворотке, разделенной на аликвоты и разбавленной в 96-луночном планшете.

[00661] Редактирование, наблюдаемое у обработанных мышей, показано на Фиг. 8А и в Таблице 16А.

Таблица 16А. Данные *in vivo* редактирования в мышинной модели KLKB1 человека

Гидовая последовательность	% редактирования	SD редактирования	N
G12260	32,9	10,96	4
G12267	72,83	1,17	4
G12293	43,05	5,59	4
G12303	14,38	5,60	4
G12321	35,53	11,11	4

[00662] Уровни белка KLKB1 человека в сыворотке до и после введения дозы измеряли с использованием анализа ELISA, как описано в Примере 1. Результаты показаны в Таблице 16В и на Фиг. 8В.

Таблица 16В. Уровни секретируемого белка KLKB1 в мышинной модели KLKB1 человека

Гидовая последовательность	Доза (мг/кг)	До введения дозы	СО	После введения дозы	СО	N
G12260	0,3	19,04	6,20	13,10	7,96	4
G12267	0,3	22,48	9,32	1,42	0,41	4
G12293	0,3	18,54	5,41	7,59	2,10	4
G12303	0,3	21,21	9,98	23,11	8,58	4

G12321	0,3	18,07	5,21	11,22	4,51	4
--------	-----	-------	------	-------	------	---

[00663] Уровни белка KLKB1 человека в сыворотке из образцов были измерены с использованием матрицы на основании электрохемилюминесценции (MSD), как описано в Примере 1, и их сравнивали с исходными уровнями. Результаты показаны в Таблице 17 и на Фиг. 8С.

Таблица 17. Уровни белка KLKB1 *in vivo*

Гидовая последовательность	Доза (мг/кг)	До введения дозы	СО	После введения дозы	СО	% KD в сыворотке	N
G12260	0,3	10,44	0,43	6,84	0,09	38	4
G12267	0,3	10,59	0,37	BLOD*	-	97**	2
G12293	0,3	10,74	0,24	3,92	0,04	64	4
G12303	0,3	13,86	0,34	7,78	0,35	35**	4
G12321	0,3	8,38	0,1	3,92	0,16	55	4

* ниже предела обнаружения; ** приблизительно

[00664] Уровни мРНК KLKB1 для каждой последовательности измеряли с помощью количественной ПЦР, как описано в Примере 1, и они представлены в Таблице 18 и на Фиг. 8D. Снижение белка подтверждали вестерн-блоттингом, как описано в Примере 1.

Таблица 18. Результаты количественной ПЦР

Гидовая последовательность	Кратность изменения	СО	N
G12260	1,20	0,35	4
G12267	0,51	0,41	4
G12293	0,73	0,22	4
G12303	1,10	0,23	4
G12321	1,18	0,41	4
TSS	1,01	0,17	2

Пример 7. *In vivo* редактирование активности гидовых последовательностей KLKB1 человека в мышинной модели KLKB1 человека

[00665] В этом исследовании использовали гуманизированных мышей KLKB1, описанных в Примере 6, которые были подготовлены с использованием того же протокола. В общем было 5 групп (N=5 с 2 самцами и 3 самками или наоборот). LNP, содержащие модифицированные sgRNAs и мРНК, кодирующие белок Cas9, вводили через боковую хвостовую вену в дозе 0,3 мг/кг и характеризовали, как описано в Примере 6.

[00666] В день 13 после введения LNP мышей умерщвляли. Ткань печени и кровь обрабатывали, как описано в Примере 6, для секвенирования и анализа ELISA.

[00667] Таблица 19 и Фиг. 9A-9D иллюстрируют уровни редактирования KLKB1, белка прекалликреина в сыворотке (обнаружено с использованием ELISA, который

детектирует как прекалликреин, так и калликреин) (мкг/мл), белка прекалликреина как процент уровня белка KLKB1 в контрольном TSS у обработанных мышей, и корреляцию процента редактирования в печени к проценту белка прекалликреина, соответственно. Были протестированы гидовые последовательности G012323 и G012253; однако редактирование не было обнаружено вследствие несоответствия метода NGS.

Таблица 19. Процент редактирования и прекалликреин сыворотки некоторых гидовых последовательностей в мышинной модели Nu-KLKB1

Доза (мг/кг)	Гидовая последовательность	Образец	% редактиро вания	Прекалликреин н сыворотки (мкг/мл)	Прекалликреин сыворотки (% от среднего TSS)
0	TSS	Среднее	0,1	19,49	100
		Животное 1	0,1	14,77	76
		Животное 2	0,1	18,29	94
		Животное 3	0,1	14,82	76
		Животное 4	0,1	26,82	138
		Животное 5	0,1	22,76	117
0,3	G012304	Среднее	21,9	12,4	64
		Животное 1	24,7	9,53	49
		Животное 2	21,0	9,88	51
		Животное 3	29,3	7,94	41
		Животное 4	18,8	20,32	104
		Животное 5	15,9	14,34	74
	G012305	Среднее	26,0	10,58	54
		Животное 1	20,6	9,09	47
		Животное 2	32,5	8,85	45
		Животное 3	27,9	8,13	42
		Животное 4	22,7	14,08	72
		Животное 5	26,5	12,75	65
	G012259	Среднее	24,2	10,88	56
		Животное 1	41,0	5,83	30
		Животное 2	20,3	9,96	51
		Животное 3	27,6	7,42	38
		Животное 4	9,4	17,83	91
		Животное 5	22,8	13,36	69
	G012278	Среднее	24,0	10,91	56

		Животное 1	29,8	7,15	37
		Животное 2	35,2	6,99	36
		Животное 3	28,6	6,16	32
		Животное 4	18,2	17,21	88
		Животное 5	8,0	17,07	88
	G012280	Среднее	13,8	14,71	75
		Животное 1	21,4	10,70	55
		Животное 2	24,0	8,92	46
		Животное 3	4,8	20,46	105
		Животное 4	8,9	17,34	89
		Животное 5	9,7	16,11	83
	G012294	Среднее	15,9	15,4	79
		Животное 1	21,1	10,38	53
		Животное 2	15,9	9,69	50
		Животное 3	15,2	15,37	79
		Животное 4	14,9	19,13	98
		Животное 5	12,4	22,44	115
	G012298	Среднее	36,9	9,05	46
		Животное 1	40,8	4,99	26
		Животное 2	46,6	5,26	27
		Животное 3	44,9	5,38	28
		Животное 4	25,3	15,01	77
		Животное 5	26,9	14,61	75

Пример 8. *In vivo* ответ редактирования гена KLKB1 на дозу в мышинной модели KLKB1 человека

[00668] В этом исследовании использовали гуманизированных мышей, описанных в Примере 6, которые были подготовлены с использованием того же протокола. В общем было 5 групп (N=5 с 2 самцами и 3 самками или наоборот). LNP, содержащие G12267 и мРНК, кодирующую белок Cas9, вводили в дозе 0,3, 0,1, 0,03 и 0,01 мг на кг массы тела и характеризовали, как описано в Примере 6.

[00669] В день 13 после введения LNP мышей умерщвляли. Ткань печени обрабатывали, как описано в Примере 6, для секвенирования ДНК. Кровь обрабатывали, как описано в Примере 6, и секретированный прекалликреин человека измеряли посредством ELISA, который детектирует прекалликреин и калликреин (также называемый общим калликреином), как описано в Примере 1.

[00670] Для анализа РНК ткань печени лизировали с использованием Zymo Research

Bashing Bead Lysis Rack, и РНК выделяли с использованием мини-набора Qiagen RNeasy (Qiagen, кат. 74106) в соответствии с протоколом производителя. РНК количественно определяли с использованием Nanodrop 8000 (ThermoFisher Scientific, кат. № ND-8000-GL). Образцы РНК хранили при -20°C перед использованием.

[00671] Набор SuperScript III Platinum One-Step qRT-PCR (Invitrogen, кат. 11732-088) использовали для создания реакций ПЦР. В этих реакциях использовали зонды для количественной ПЦР, нацеленные на *Hu KLKB1*, и внутренний контроль *Ms PPIB*. Количественный анализ ПЦР проводили в соответствии с указаниями производителя, масштабировали до соответствующего объема реакции, а также с использованием зондов *Hu KLKB1* и *Ms PPIB*, указанных выше. Систему ПЦР в реальном времени StepOnePlus (Thermo Fisher Scientific, кат. № 4376600) использовали для выполнения реакции ПЦР в реальном времени и количественного определения транскрипта в соответствии с протоколом производителя.

[00672] мРНК *Hu KLKB1* количественно определяли с использованием стандартной кривой, начиная с 20 нг/мкл объединенной мРНК из контрольной группы с носителем, с пятью дополнительными 3-кратными разведениями, заканчивая при 0,06 нг/мкл. Величины *St* определяли из системы ПЦР в реальном времени StepOnePlus. Снижение общего секретируемого белка прекалликреина человека для клеток, обработанных реагентами для *KLKB1*, определяли с помощью ELISA, как описано в Примере 1.

[00673] Таблица 20 и Фиг. 10 иллюстрирует процент редактирования, уровни прекалликреина в сыворотке как процент от мышей, обработанных контрольным носителем TSS, и уровни транскрипта мРНК как процент от животных, обработанных контрольным носителем TSS.

Таблица 20 Процент редактирования, мРНК *KLKB1* (% от исходного уровня) и уровни белка прекалликреина в сыворотке (% от исходного уровня) в мышинной модели *Hu KLKB1*

Гидовая последовательность	Доза (мг/кг)		% редактирования	% белка TSS	% мРНК TSS	CO
TSS	0	Среднее	0,1	100	100,5	9,7
		Животное 1	0,1	75,8		
		Животное 2	0,1	93,8		
		Животное 3	0,1	76,0		
		Животное 4	0,1	137,6		
		Животное 5	0,1	116,8		
G12267	0,01	Среднее	3,9	91,9	100,1	9,5
		Животное 1	4,4	55,3		
		Животное 2	3,8	57,3		

		Животное 3	4,5	126,2		
		Животное 4	4,2	122,2		
		Животное 5	2,6	98,6		
	0,03	Среднее	19,0	64,2	69,3	13,8
		Животное 1	22,1	38,6		
		Животное 2	0,3	51,0		
		Животное 3	26,9	78,9		
		Животное 4	21,3	80,5		
		Животное 5	24,3	72,2		
	0,1	Среднее	55,4	23,3	48	11,4
		Животное 1	52,1	17,6		
		Животное 2	52,7	19,6		
		Животное 3	56,5	25,3		
		Животное 4	57,5	25,6		
		Животное 5	58,0	28,3		
	0,3	Среднее	72,9	3,1	23	13
		Животное 1	73,9	2,7		
		Животное 2	70,4	2,9		
		Животное 3	72,7	3,1		
		Животное 4	73,1	3,4		
		Животное 5	74,3	3,4		

Пример 9. Исследование протекания сосудов

[00674] Исследование выполняли для оценки редактирования гена *KLKB1*, общей экспрессии белка калликреина и протекания сосудов у гуманизированных мышей. В этом исследовании использовали гуманизированных мышей, описанных в Примере 1. Было 6 групп (N=5 с 2 самцами, 3 самками на группу). Животных взвешивали, и им вводили дозы в объемах, соответствующих индивидуальным массам тела.

[00675] LNP, содержащие модифицированные sgRNA, нацеленные на *KLKB1*, (G12267) и мРНК Cas9 вводили через боковую хвостовую вену при 0,03 мг/кг, 0,1 мг/кг или 0,3 мг/кг на основании общего количества РНК в объеме 10 мл на килограмм массы тела или контрольный носитель (TSS).

[00676] За один день до исследования протекания сосудов кровь собирали и обрабатывали, как описано в Примере 6, и секретированный прекалликреин человека измеряли посредством ELISA, который детектирует прекалликреин и калликреин (также называемый общим калликреином), как описано в Примере 1.

[00677] Анализ протекания сосудов осуществляли, как описано в Примере 1. При

вскрытии собирали ткань печени и экстрагировали ДНК, как описано в Примере 6, для измерения редактирования KLKB1. Для количественного определения модели протекания сосудов собирали ткань толстой кишки и обрабатывали, как описано в Примере 1.

[00678] Результаты для процента редактирования, уровни белка KLKB1 человека в сыворотке и протекание сосудов показано в Таблице 21 и на Фиг. 11A-11B.

Таблица 21. Процент редактирования, уровни белка KLKB1 и протекание сосудов у мышей huKLKB1

	Доза (мг/кг)	% редактирования	Прекалликреин сыворотки (мкг/мл)	Толстая кишка (OD)
TSS-1	0	0,02	100,00	0,07
TSS-2	0	0,06	94,92	0,22
Контрольный образец	0,3	0,1	92,99	0,30
G012267	0,03	16,48	82,97	0,26
G012267	0,1	40,46	48,97	0,20
G012267	0,3	68,66	13,88	0,09

[00679] Проводили отдельное исследование с использованием подобных способов для оценки процента редактирования, уровней прекалликреина в сыворотке и протекания сосудов в течение 9-месячного периода. Мышам вводили модифицированную sgRNA, нацеленную на KLKB1, (G12267) и мРНК Cas9 или ненацеленную sgRNA через боковую хвостовую вену при 0,1 мг/кг или 0,3 мг/кг на основании общего количества РНК в объеме 10 мл на килограмм массы тела. Наблюдали длительный ответ от дозы, при этом во время всего исследования поддерживались повышенное редактирование, сниженные уровни белка и сниженные уровни протекания сосудов.

Пример 10. *In vivo* тестирование редактирования гена KLKB1 у нечеловекообразных обезьян (NHP)

[00680] В этом примере исследование выполняли для оценки редактирования гена *KLKB1* и экспрессии общего белка калликреина, и общих уровней активности калликреина у яванских макаков после введения липидных наночастиц (LNP) CRISPR/Cas9 с мРНК для белка Cas9 и различных гидовых последовательностей к гену *KLKB1*. Яванских макаков обрабатывали в группах n=3. Это исследование проводили с составами LNP в соответствии с Примером 1. Каждый состав LNP содержал полиаденилированную мРНК Cas9 (содержащую SEQ ID №: 516) и гРНК (G013901, специфичная для яванского макака гидовая РНК KLKB1) с соотношением мРНК:гРНК, составляющим 2:1. Животным вводили дозы 1,5, 3 или 6 мг на кг на основании общего количества РНК. Образование вставок-делеций (процент редактирования) измеряли с помощью NGS. Общая активность калликреина и уровни белка калликреина в сыворотке измеряли, как описано в Примере 1.

[00681] Исследование показало, что нокаут KLKB1, который является частью биологического пути, который приводит к высвобождению брадикинина, при этом G013901 давал до 90% снижения активности калликреина в группах NHP или более, робастный ответ, который превосходит целевую активность, необходимую для достижения терапевтически значимого влияния на частоту приступов НАЕ (снижение активности калликреина на 60%; Banerji, 2017). Это исследование показало дозозависимую корреляцию между повышенными частотами редактирования, сниженными уровнями калликреина в плазме и сниженной активностью калликреина. Ответ был длительным в течение одного года у NHP. Белок калликреин в кровотоке и уровни активности представлены в Таблицах 22 и 23; и на Фиг. 12А-12В.

Таблица 22. Активность калликреина (% от исходной активности)

День	TSS (n=3)		1,5 мг/кг (n=3)		3 мг/кг (n=3)		6 мг/кг (n=3)	
	Среднее	СО	Среднее	СО	Среднее	СО	Среднее	СО
0	100	0	100	0	100	0	100	0
7	108,4	9	67,8	7	42,8	12,4	18,2	10,6
14	101,8	18,3	31,1	3,2	15,9	11	5,3	1,6
28	124,4	7,9	26,8	6,5	10,6	5,4	3,9	1,4
42	117,8	5,8	19,8	11,9	8,6	4,4	3,6	0,4
56	130,3	32,5	8,8	5	3,4	0,6	4,2	2,2
70	109,2	15	6	1,7	3	0,4	3,9	1,6
84	121,3	25,7	10,6	3,8	4,2	2,1	4,7	2,5
105	130,8	15,5	23,3	4,9	6	3,6	4,7	2,5
119	88,2	9,1	12,2	10,2	3,4	0,5	3	0,5
147	101,1	3,3	11,9	6,6	4,5	1,4	3	0,5
161	113,2	13,4	21	1,8	6	2,8	5,6	1,8
180	122,3	8,7	19,2	9,5	4,7	1	5	1,9
238	125,5	27,3	16,6	6,5	4,7	1,4	3,2	0,7
252	122,7	27	19,1	7,3	8,2	4,4	3,1	0,7
266	115	23,3	13,9	3,3	8,9	5,2	2,7	0,6
280	112,2	22,7	17,5	2,3	6,8	3,6	3	1
294	126,3	34,1	17	5,8	7,9	4,1	2,9	0,6
308	122,9	28,9	18,2	2,3	7,4	3,3	3	0,8
326	111,6	23	13,3	5,2	5,5	2,9	3,5	0,4
333	127,3	22,4	15,9	1,8	6,8	2,8	3,3	0,4
347	108,4	11,7	16,9	1	4,1	1,8	2,9	0,3

	TSS (n=3)		1,5 мг/кг (n=3)		3 мг/кг (n=3)		6 мг/кг (n=3)	
365	118	2,2	24,1	10,2	10	5,7	3,4	0,7

Таблица 23. Уровни белка калликреина в плазме (% от исходного уровня)

	TSS (n=3)		1,5 мг/кг (n=3)		3 мг/кг (n=3)		6 мг/кг (n=3)	
День	Среднее	СО	Среднее	СО	Среднее	СО	Среднее	СО
0	100	0	100	0	100	0	100	0
14	101,3	14,9	28,8	7,4	27,1	8,2	13,7	3,3
28	117,7	7	32,7	8,5	16,9	6,8	6,6	2,3
42	112,6	23,5	31,5	9,1	16	7	6,3	2,8
56	111	16	30,1	8,8	15,4	6	5,8	2,5
70	112,5	14,1	29,8	8	15,4	5,8	5,8	2,8
84	133,6	9	38,7	11,1	17,1	6,7	6,7	2,5
105	118,2	20,1	47	12,7	22,3	10,3	7,6	3,8
119	96	9,8	31,6	8,7	18,1	7,2	6,4	2,2
147	110,7	12	32,1	8,3	18,3	8,1	6,7	2,2
161	119,3	6,1	35,8	10,5	7,5	6,8	7,4	3,5
180	131	10,1	33,8	11,4	18	10,1	2,9	1
238	106,2	3,7	27,4	10,8	16,4	9,8	3,7	0,9
252	114,3	21,4	27,9	9,1	15,6	7,1	3,9	0,8
266	117,6	8,7	28,7	9,7	21,8	10,4	3,7	0,5
280	93,4	22,1	33,7	7,1	24,6	9,8	6,3	2,9
294	122,1	23,7	30,4	13,8	24,6	14	7,4	4
308	93,2	12,8	20,6	13,8	27,6	14,2	6,2	3,1
326	нет данных		29,7	7,3	23,8	12,5	8	2,8
333	130,2	25,5	30,9	6,4	25,3	12,4	7,8	2,3
347	106,9	15	26	8,2	22,1	11,2	7,3	3,2
365	108,5	41,3	22,7	8	11,4	5,3	4,3	1,6

[00682] Тестирование выбранных образцов сыворотки NHP не выявило наблюдаемого влияния на биомаркеры путей коагуляции с нокаутом *KLKB1* у NHP в недели 10 или 15 (на основании измерения протромбина, АРТТ и фибриногена (все в неделю 10), и фактора XII (в неделю 15)), при сравнении контрольных групп с буфером TSS с группами, получавшими лечение.

[00683] Исследование NHP повторяли для оценки экспрессии общего белка калликреина *KLKB1*, и уровней общей активности калликреина у яванских макаков с использованием гидовой последовательности G012267, которая включает гидовую

последовательность, полностью комплементарную *KLKB1* человека. Гидовая последовательность G012267 отличается на один нуклеотид по сравнению с G013901, которая обладает гидовой последовательностью, полностью комплементарной *KLKB1* яванского макака. Протокол эксперимента и составы LNP в этом исследовании были по существу такими же, как описано в эксперименте выше, за исключением того, что животным (n=3) вводили только 3 мг/кг на основании общей массы РНК. Общая активность калликреина и уровни белка калликреина в сыворотке измеряли с использованием способов, как описано в Примере 1.

[00684] Исследование показало, что нокдаун *KLKB1* с G012267 давал снижение на до 65% активности калликреина в группах NHP. Ответ был длительным в течение 9 месяцев у NHP. Белок калликреин в кровотоке и уровни активности представлены в Таблицах 24 и 25 и на Фиг. 13A-13B.

Таблица 24. Активность калликреина (% от исходной активности)

День	TSS (n=3)		3 мг/кг (n=3)	
	Среднее	Ст. откл.	Среднее	Ст. откл.
0	100	нет данных	100	нет данных
7	90,9	13,7	68,7	11,3
15	87,7	6,6	51,3	18,7
28	90,5	2,5	39,3	24
42	96,5	4,8	31,9	19,5
56	94,5	1,6	34,1	16,7
70	96,2	7,2	42,3	25,7
91	100,2	11,7	45,3	27,6
106	100,2	6,3	45,7	14,3
120	99,8	7,4	46,5	11,1
134	115,2	8,5	47,5	32,4
148	91,5	2	52,9	34,7
162	86,1	21,1	50,1	43,2
180	97,9	1,8	47,3	22,1
192	87,9	1,9	43	24,6
208	94,4	5,8	48	23
222	97	2,9	34,6	21,1
236	97,2	2,2	43,5	19,1
250	91,8	12	46,5	18,3
264	99,9	10,6	51,3	25,2

	TSS (n=3)		3 мг/кг (n=3)	
278	105,3	13,4	60,8	32,3

Таблица 25. Уровни белка калликреина в плазме (% от исходного уровня)

	TSS (n=3)		3 мг/кг (n=3)	
День	Среднее	Ст. откл.	Среднее	Ст. откл.
0	100	нет данных	100	нет данных
7	99,6	5,1	72,3	13,3
15	89,7	13,1	50,6	9
28	93,9	5,2	52,8	22,3
42	90,3	8,6	52,7	25,5
56	104,2	17,3	49,9	19,1
70	93,9	5,2	52,8	22,3
91	90,3	8,6	52,7	25,5
106	99,3	21,9	43,1	17,3
120	121,7	12,6	41,1	6,2
134	104,2	12	49,7	5,5
148	93	15,8	47,5	11,8
162	100,3	15,7	56,2	26,7
180	106,8	10,9	44,1	33,2
192	96,5	20,5	52	26,6
208	105,6	25	52,9	28,5
250	103,7	21,5	63,3	17,4
264	101,4	7	67,3	15,4
278	94,3	14,4	62,6	16,7

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Гидовая РНК, содержащая:
 - a. гидовую последовательность, которая по меньшей мере на 95%, 90% или 85% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID №: 15, 8 и 41;
 - b. гидовую последовательность, содержащую по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов подряд из последовательности, выбранной из SEQ ID №: 15, 8 и 41; или
 - c. гидовую последовательность, выбранную из SEQ ID №: 15, 8 и 41.
2. Гидовая РНК по п. 1, дополнительно содержащая нуклеотидную последовательность SEQ ID №: 202.
3. Гидовая РНК по п. 1, отличающаяся тем, что гидовая РНК дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, выбранную из SEQ ID №: 170, 171, 172 и 173, при этом последовательность SEQ ID №: 170, 171, 172 или 173 представляет собой 3' гидовой последовательности.
4. Гидовая РНК по любому из пп. 1-3, отличающаяся тем, что гидовая РНК дополнительно содержит 3'-хвост.
5. Гидовая РНК по любому из пп. 1-4, отличающаяся тем, что гидовая РНК содержит по меньшей мере одну модификацию.
6. Гидовая РНК по п. 5, отличающаяся тем, что модификация включает модификацию на 5'-конце.
7. Гидовая РНК по п. 5 или 6, отличающаяся тем, что модификация включает модификацию на 3'-конце.
8. Гидовая РНК по любому из пп. 1-7, отличающаяся тем, что гидовая РНК содержит модификацию в области шпильки.
9. Гидовая РНК по любому из пп. 1-8, отличающаяся тем, что модификация включает 2'-О-метил- (2'-О-Me) модифицированный нуклеотид.
10. Гидовая РНК по любому из пп. 1-9, отличающаяся тем, что модификация включает фосфоротиоатную (PS) связь между нуклеотидами.
11. Гидовая РНК по любому из пп. 1-10, отличающаяся тем, что модификация включает 2'-фтор- (2'F) модифицированный нуклеотид.
12. Гидовая РНК по любому из пп. 1 или 3-11, дополнительно содержащая нуклеотидную последовательность SEQ ID №: 171.
13. Гидовая РНК по п. 12, модифицированная в соответствии со схемой нуклеотидной последовательности SEQ ID №: 405.
14. Гидовая РНК по любому из пп. 1 или 3-11, дополнительно содержащая нуклеотидную последовательность SEQ ID №: 173.
15. Гидовая РНК по п. 14, модифицированная в соответствии со схемой SEQ ID №: 248-255 или 450.
16. Гидовая РНК по любому из пп. 12-15, отличающаяся тем, что гидовая последовательность представляет собой SEQ ID №: 15.

17. Гидовая РНК по любому из пп. 12-15, отличающаяся тем, что гидовая последовательность представляет собой SEQ ID №: 8.

18. Гидовая РНК по любому из пп. 12-15, отличающаяся тем, что гидовая последовательность представляет собой SEQ ID №: 41.

19. Гидовая РНК по любому из пп. 1 или 4-11, отличающаяся тем, что гидовая РНК модифицирована в соответствии со схемой SEQ ID №: 300, где N вместе представляют собой гидовую последовательность по п. 1.

20. Гидовая РНК по п. 16, отличающаяся тем, что каждый N в SEQ ID №: 300 представляет собой любой природный или неприродный нуклеотид.

21. Гидовая РНК по п. 19, отличающаяся тем, что гидовая последовательность представляет собой SEQ ID №: 15, и гидовая РНК модифицирована в соответствии с mG*mG*mA* UUGCGUAUGGGACACAA GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCC GUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUm CmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU, где «mA», «mC», «mU» или «mG» обозначают нуклеотид, который был модифицирован 2'-O-Me, * обозначает фосфоротиоатную связь, и N представляет собой природный нуклеотид.

22. Гидовая РНК по п. 19, отличающаяся тем, что гидовая последовательность представляет собой SEQ ID №: 8, и гидовая РНК модифицирована в соответствии с mU*mA*mC*CCGGGAGUUGACUUUGG GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCC GUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUm CmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU, где «mA», «mC», «mU» или «mG» обозначают нуклеотид, который был модифицирован 2'-O-Me, * обозначает фосфоротиоатную связь, и N представляет собой природный нуклеотид.

23. Гидовая РНК по п. 19, отличающаяся тем, что гидовая последовательность представляет собой SEQ ID №: 41, и гидовая РНК модифицирована в соответствии с mU*mA*mU*UAUCAAAUCACAUUACC GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCC GUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUm CmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU, где «mA», «mC», «mU» или «mG» обозначают нуклеотид, который был модифицирован 2'-O-Me, * обозначает фосфоротиоатную связь, и N представляет собой природный нуклеотид.

24. Композиция, содержащая гидовую РНК по любому из пп. 1-23.

25. Композиция по п. 24, дополнительно содержащая управляемый РНК ДНК-связывающий агент или нуклеиновую кислоту, кодирующую управляемый РНК ДНК-связывающий агент.

26. Композиция по п. 25, отличающаяся тем, что нуклеиновая кислота, кодирующая управляемый РНК ДНК-связывающий агент, содержит мРНК, содержащую открытую рамку считывания (ORF), кодирующую управляемый РНК ДНК-связывающий агент.

27. Композиция по п. 25 или 26, отличающаяся тем, что управляемый РНК ДНК-связывающий агент представляет собой Cas9.

28. Композиция по п. 27, отличающаяся тем, что Cas9 представляет собой Cas9 *S. pyogenes*.

29. Композиция по любому из пп. 26-28, отличающаяся тем, что ORF представляет собой модифицированную ORF.

30. Композиция по любому из пп. 24-29, дополнительно содержащая фармацевтическое вспомогательное вещество.

31. Композиция по любому из пп. 24-30, отличающаяся тем, что гидовая РНК связана с липидной наночастицей (LNP).

32. Композиция по п. 31, отличающаяся тем, что LNP содержит катионный липид.

33. Композиция по п. 32, отличающаяся тем, что катионный липид представляет собой
 (9Z,12Z)-3-((4,4-бис(октилокси)бутаноил)окси)-2-(((3-(диэтиламино)пропокси)карбонил)окси)метил)пропил-октадека-9,12-диеноат, также называемый
 3-((4,4-бис(октилокси)бутаноил)окси)-2-(((3-(диэтиламино)пропокси)карбонил)окси)метил)пропил-(9Z,12Z)-октадека-9,12-диеноат.

34. Композиция по любому из пп. 31-33, отличающаяся тем, что LNP содержит (9Z,12Z)-3-((4,4-бис(октилокси)бутаноил)окси)-2-(((3-(диэтиламино)пропокси)карбонил)окси)метил)пропил-октадека-9,12-диеноат, также называемый
 3-((4,4-бис(октилокси)бутаноил)окси)-2-(((3-(диэтиламино)пропокси)карбонил)окси)метил)пропил-(9Z,12Z)-октадека-9,12-диеноат, DSPC, холестерин и PEG2k-DMG.

35. Фармацевтическая композиция, содержащая гидовую РНК по любому из пп. 1-23 или композицию по любому из пп. 24-34.

36. Фармацевтическая композиция, содержащая гидовую РНК по любому из пп. 1-23 или композицию по любому из пп. 24-34, или их применение для индуцирования двухпочечного разрыва или однопочечного разрыва в гене *KLKB1* в клетке или снижения экспрессии *KLKB1* в клетке.

37. Фармацевтическая композиция или применение по п. 36 для снижения экспрессии гена *KLKB1* в клетке или у субъекта.

38. Фармацевтическая композиция, содержащая гидовую РНК по любому из пп. 1-23 или композицию по любому из пп. 24-34, или их применение для лечения субъекта с наследственным ангионевротическим отеком (НАЕ).

39. Фармацевтическая композиция или применение по п. 38, включающие снижение частоты и/или тяжести приступов НАЕ.

40. Фармацевтическая композиция, содержащая гидовую РНК по любому из пп. 1-23 или композицию по любому из пп. 24-34, или их применение для лечения или профилактики ангионевротического отека, связанного с НАЕ, продуцирования и накопления брадикинина, отека, вызванного брадикинином, обструкции дыхательных путей, вызванной ангионевротическим отеком, или асфиксии.

41. Фармацевтическая композиция или применение гидовой РНК по любому из пп. 1-23 или композиции по любому из пп. 24-34 для снижения общей активности калликреина в плазме или снижения уровней прекалликреина и/или калликреина у субъекта.

42. Фармацевтическая композиция или применение по п. 41, отличающиеся тем, что общая активность калликреина в плазме уменьшена на более чем 60%.

43. Способ индуцирования двухпочечного разрыва или однопочечного разрыва в гене *KLKB1* в клетке или снижения экспрессии *KLKB1* в клетке, включающий приведение клетки в контакт с гидовой РНК по любому из пп. 1-23 или композицией по любому из пп. 24-34.

44. Способ по п. 43, отличающийся тем, что клетка принадлежит субъекту.

45. Способ лечения субъекта с наследственным ангионевротическим отеком (НАЕ), включающий введение гидовой РНК по любому из пп. 1-23 или композиции по любому из пп. 24-34, осуществляя таким образом лечение субъекта.

46. Способ по п. 45, отличающийся тем, что лечение субъекта включает снижение частоты и/или тяжести приступов НАЕ.

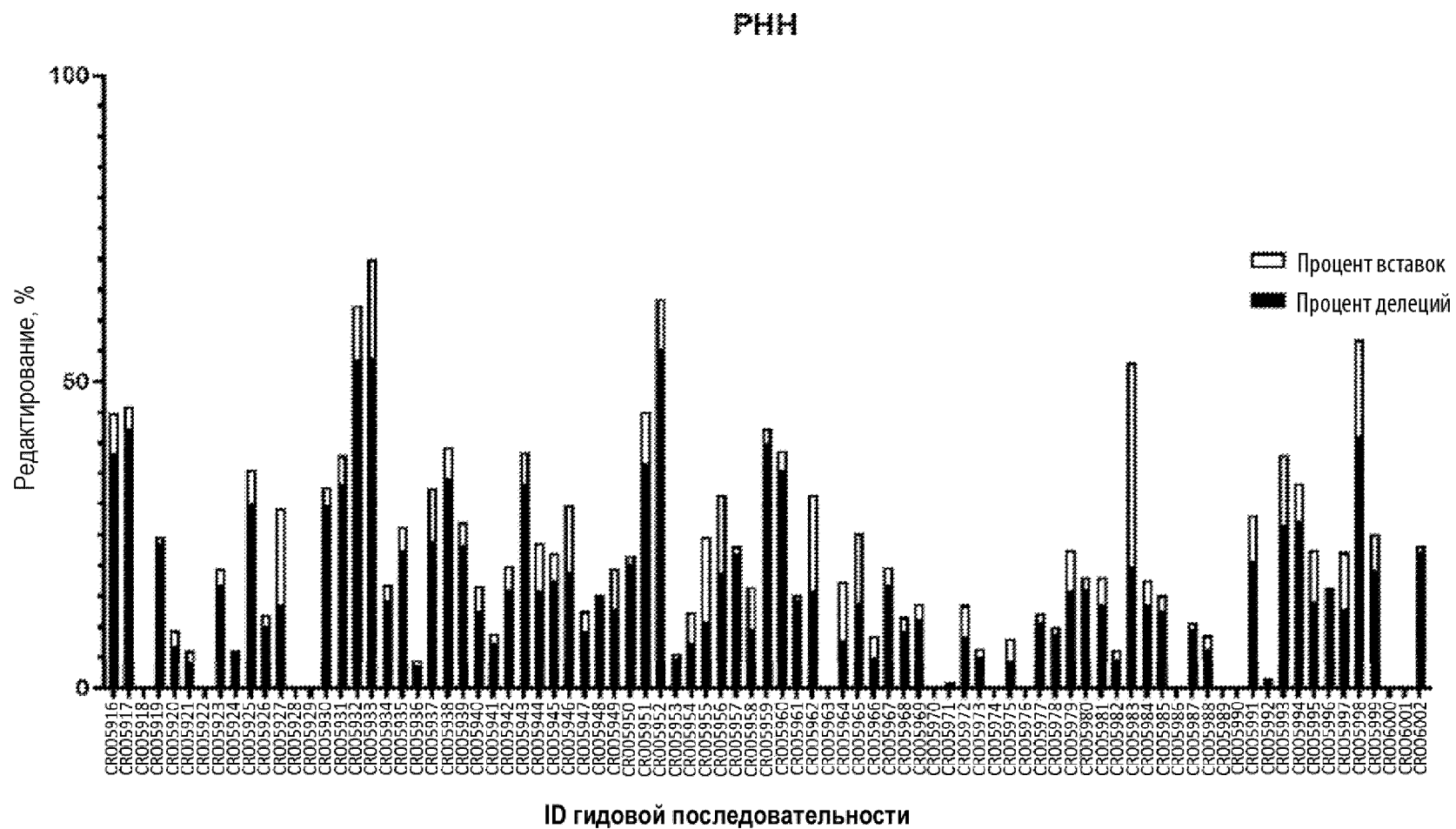
47. Способ лечения или профилактики ангионевротического отека, связанного с НАЕ, продуцирования и накопления брадикинина, отека, вызванного брадикинином, обструкции дыхательных путей, вызванной ангионевротическим отеком, или асфиксии, включающий введение субъекту гидовой РНК по любому из пп. 1-23 или композиции по любому из пп. 24-34, осуществляя таким образом лечение или профилактику ангионевротического отека, связанного с НАЕ, продуцирования и накопления брадикинина, отека, вызванного брадикинином, обструкции дыхательных путей, вызванной ангионевротическим отеком, или асфиксии у субъекта.

48. Способ снижения общей активности калликреина в плазме у субъекта, включающий введение гидовой РНК по любому из пп. 1-23 или композиции по любому из пп. 24-34, таким образом снижая общую активность калликреина в плазме у субъекта.

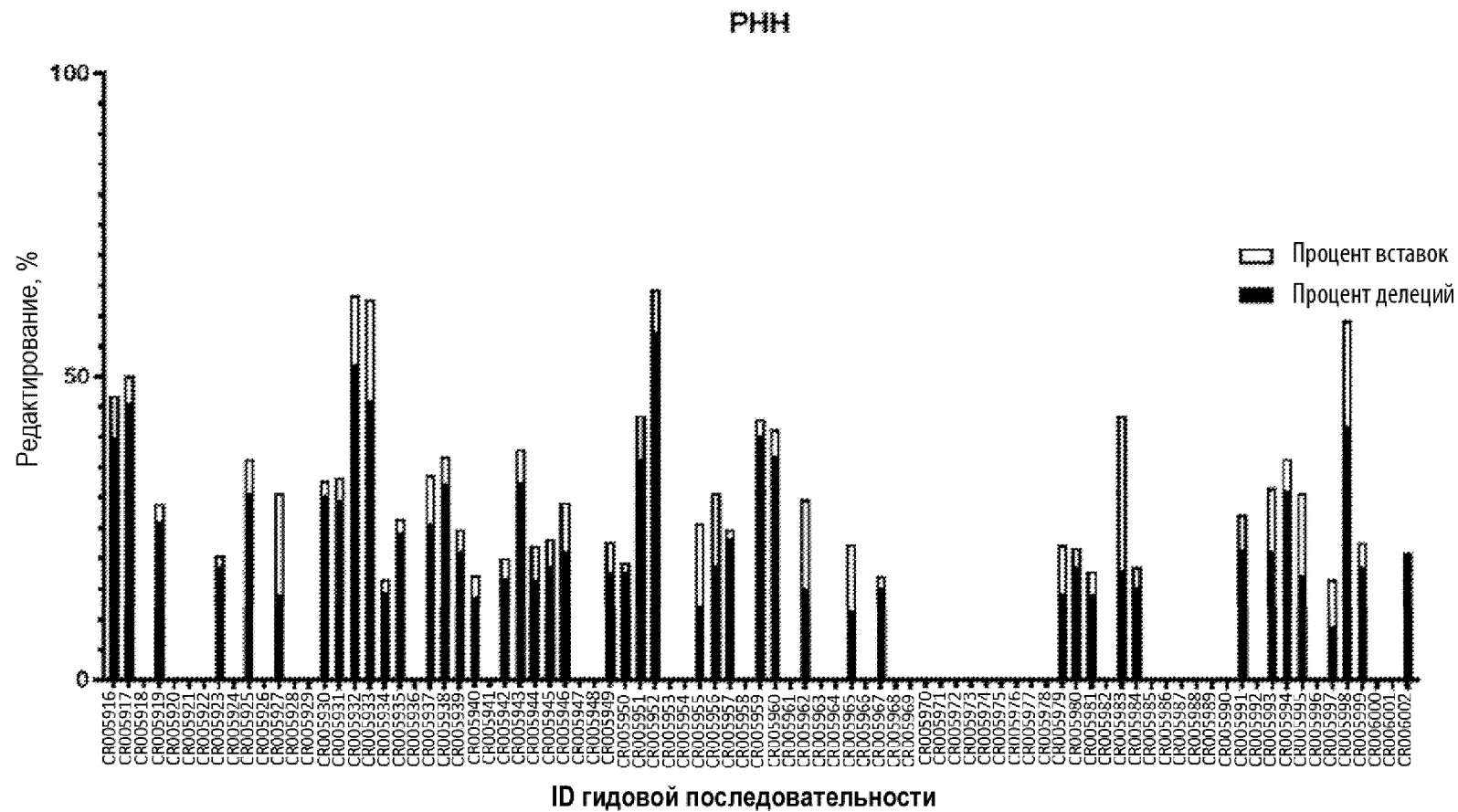
49. Способ по п. 48, отличающийся тем, что общая активность калликреина в плазме снижена у субъекта более чем на 60%.

50. Применение гидовой РНК по любому из пп. 1-23 или композиции по любому из пп. 24-34 для получения лекарственного препарата для практического осуществления любого из способов по пп. 43-49.

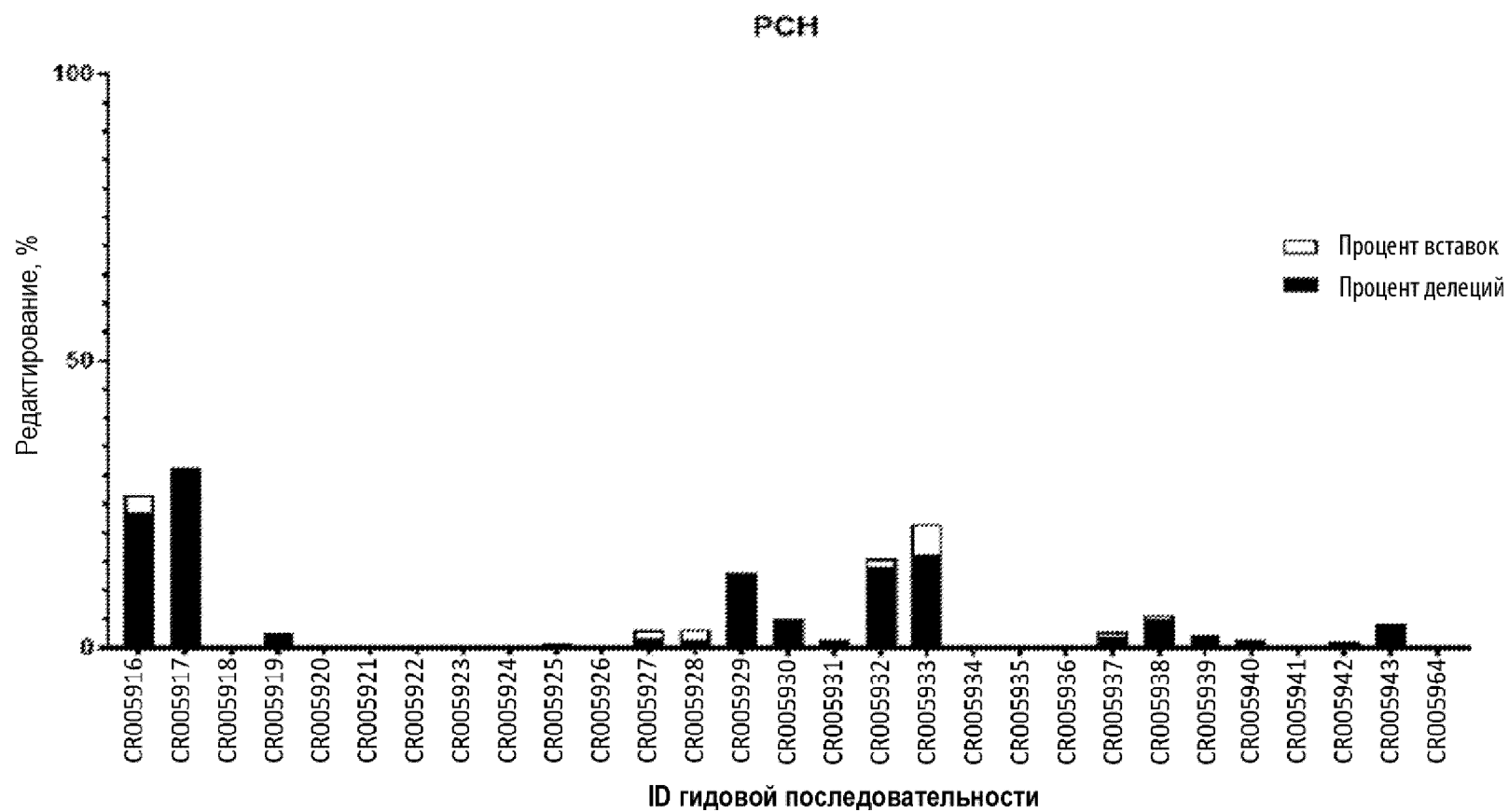
По доверенности



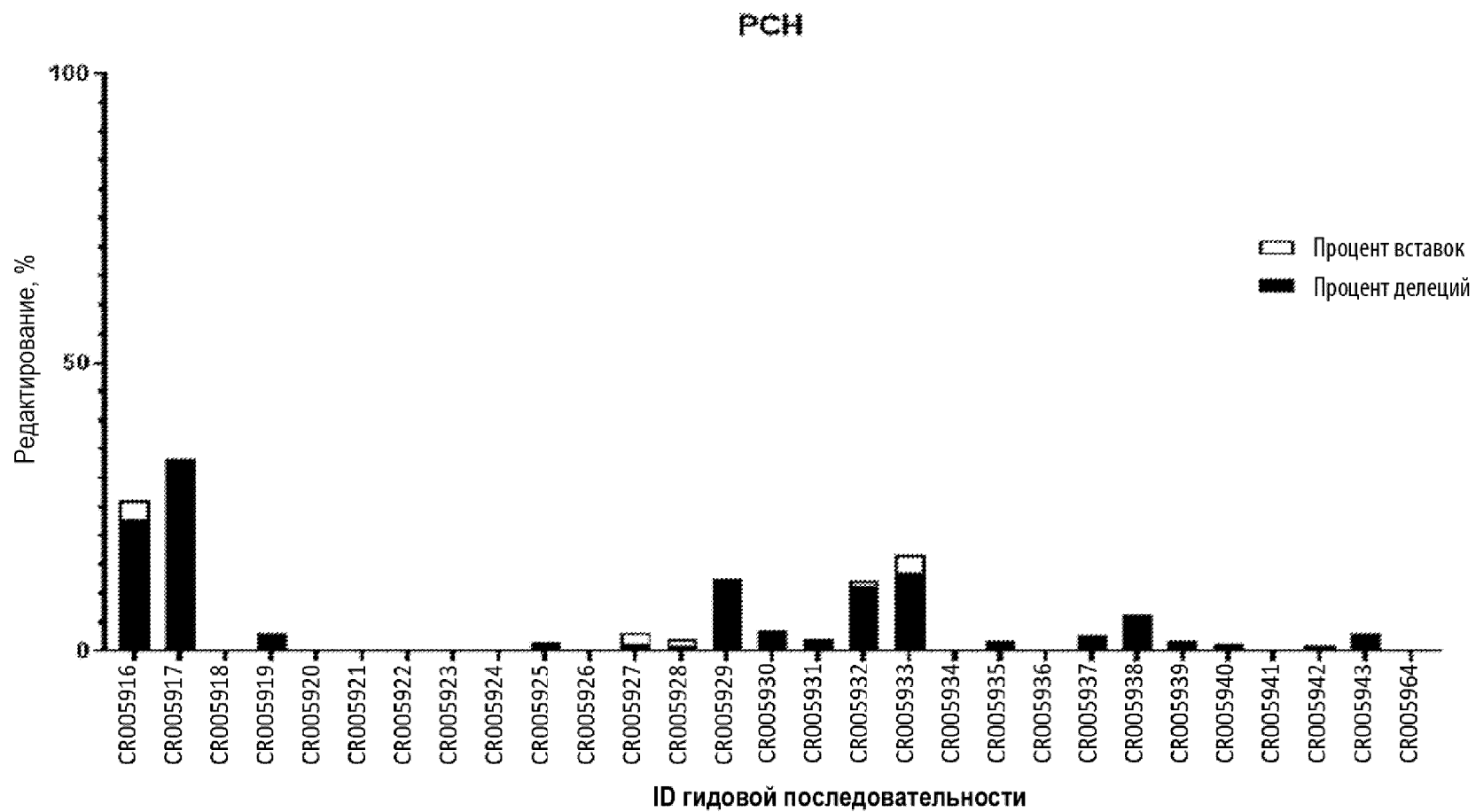
Фиг. 1А



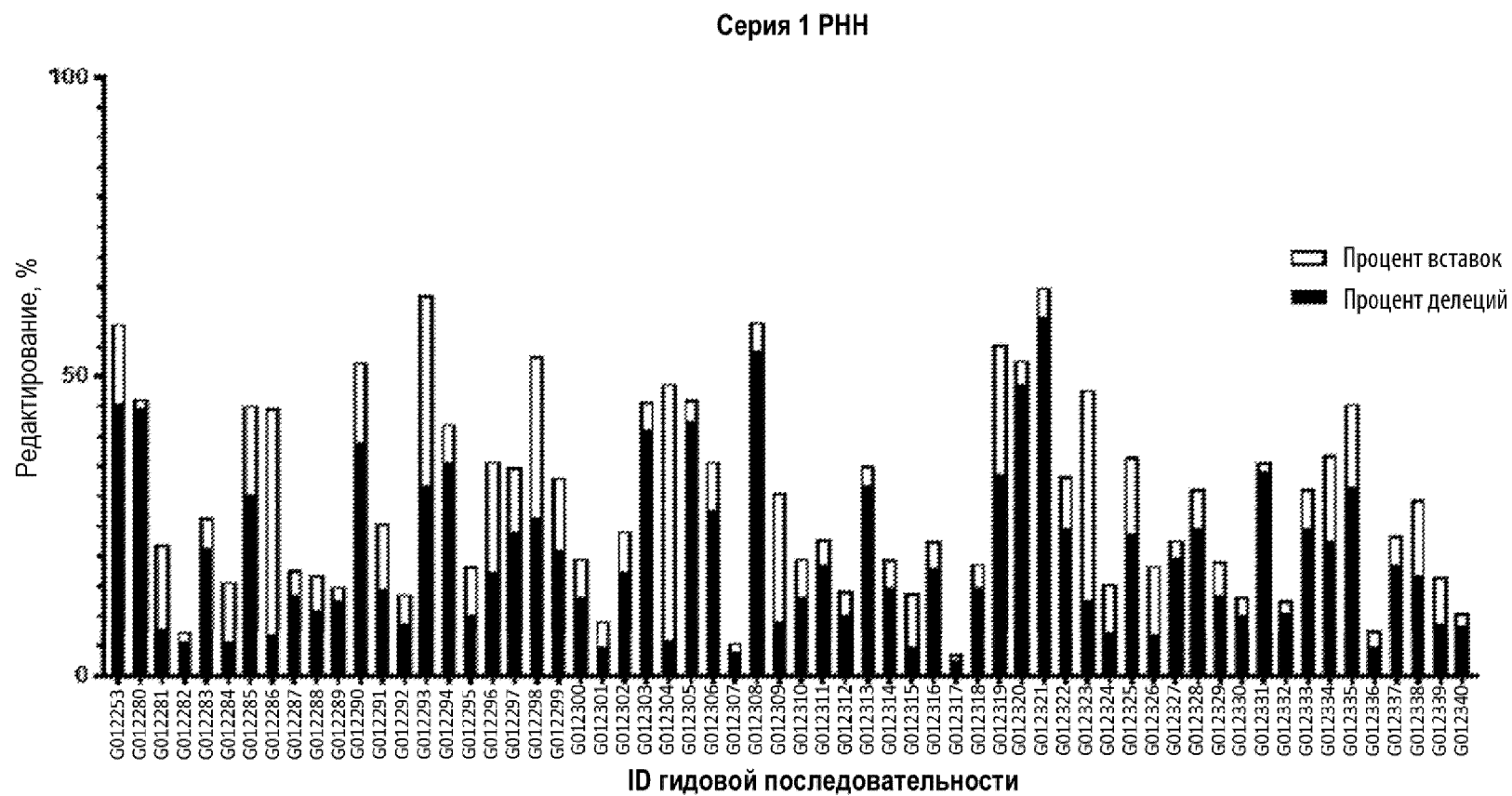
Фиг. 1В



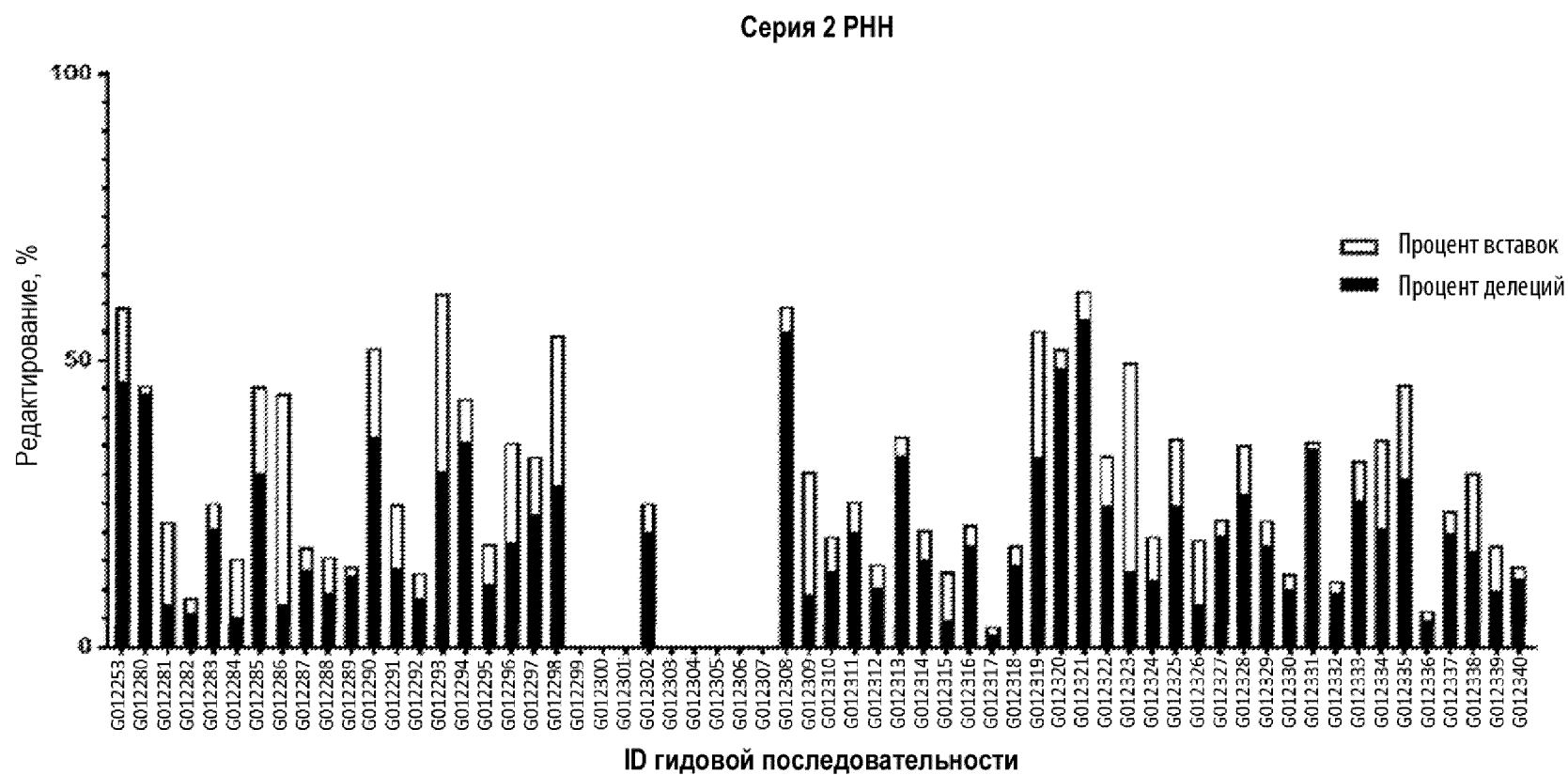
Фиг. 1С



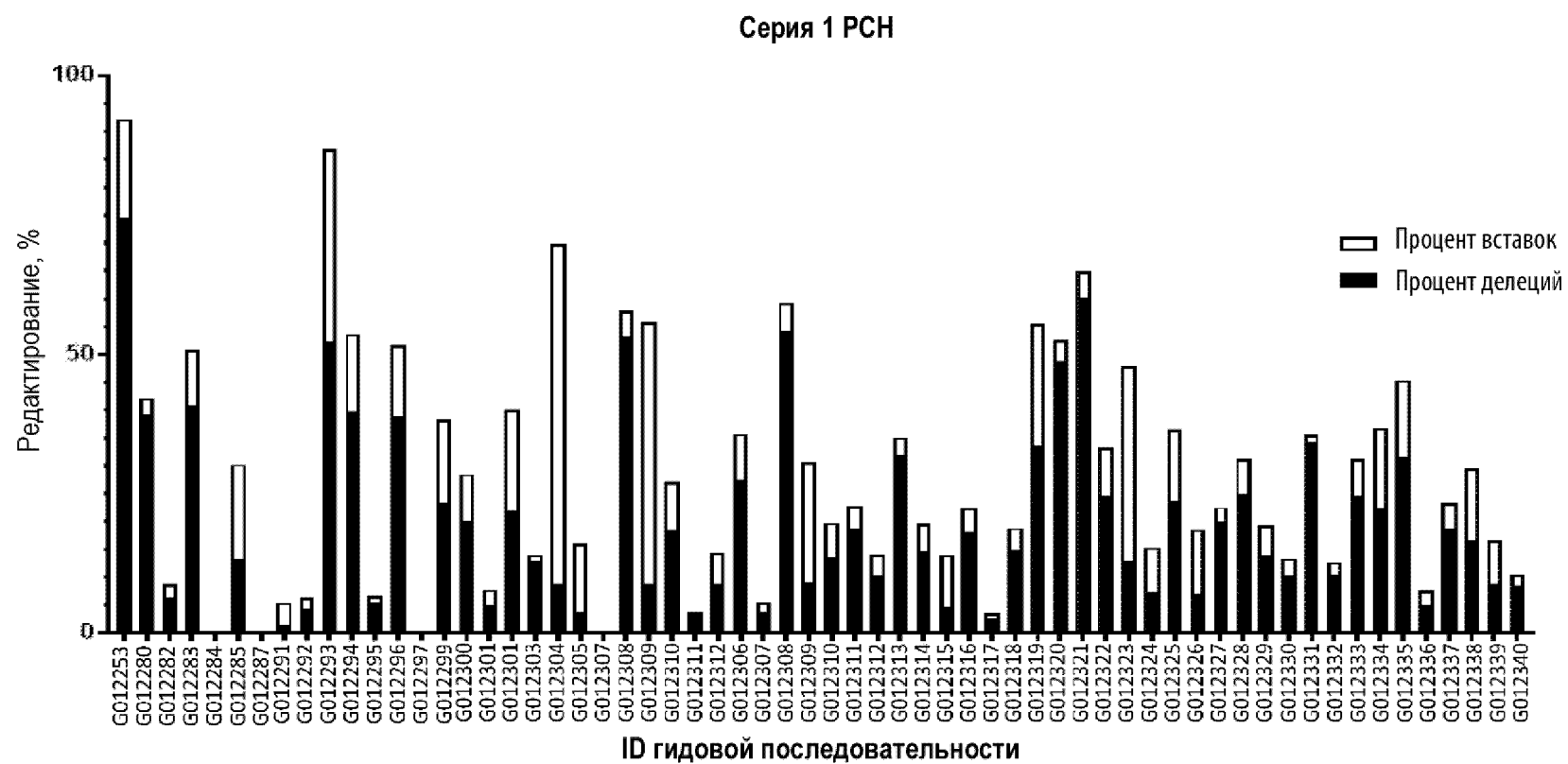
Фиг. 1D



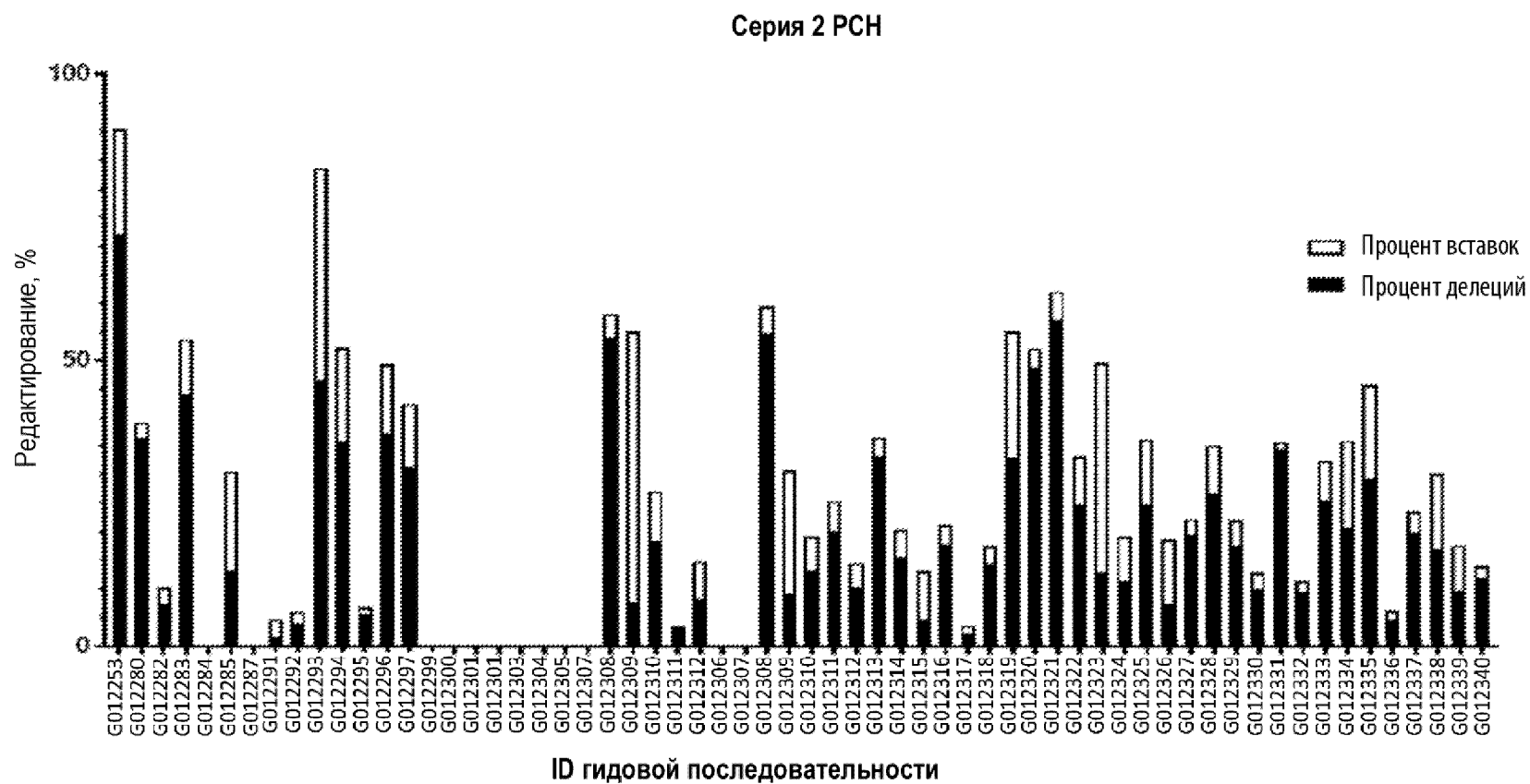
Фиг. 2А



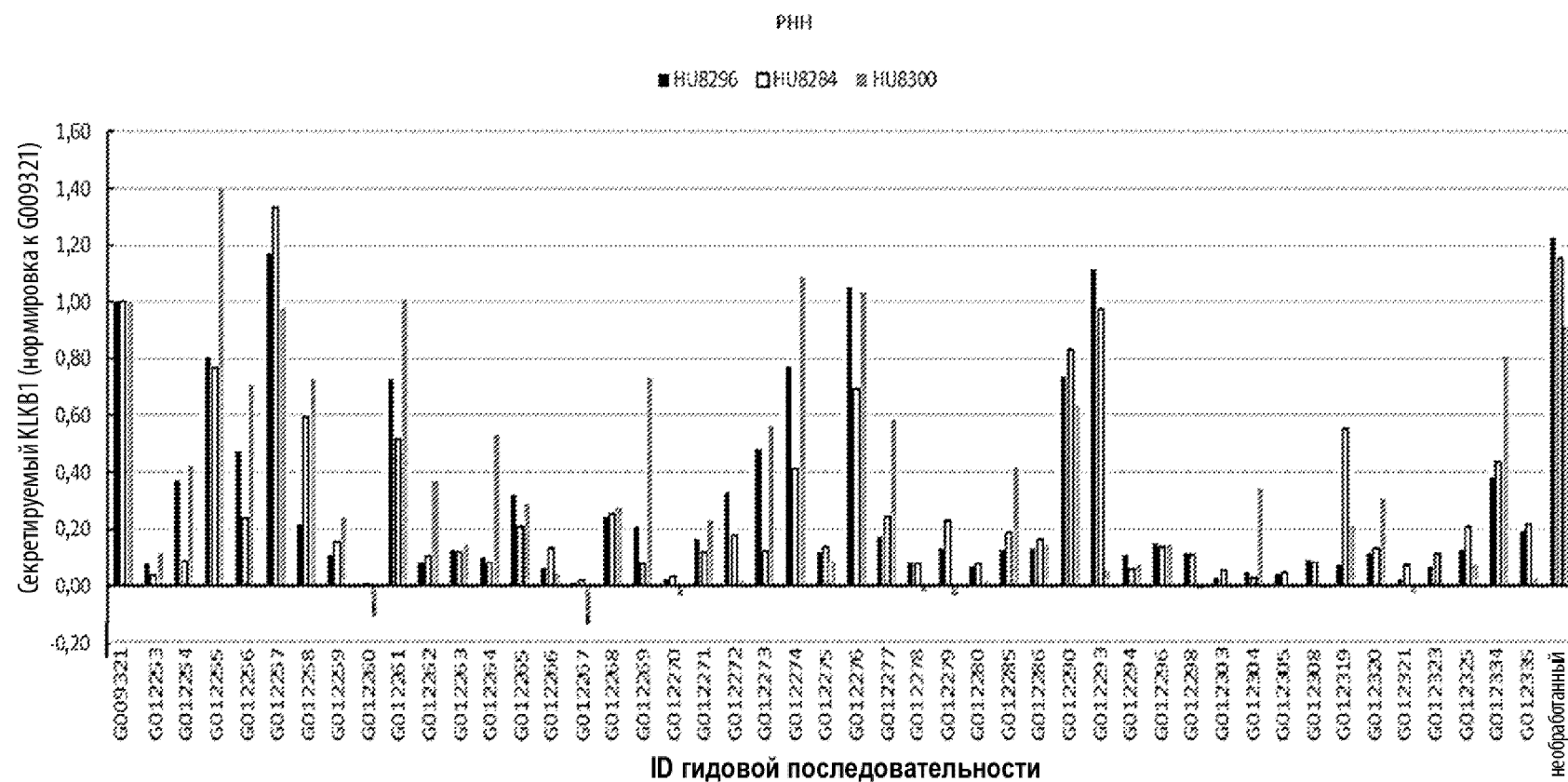
Фиг. 2В



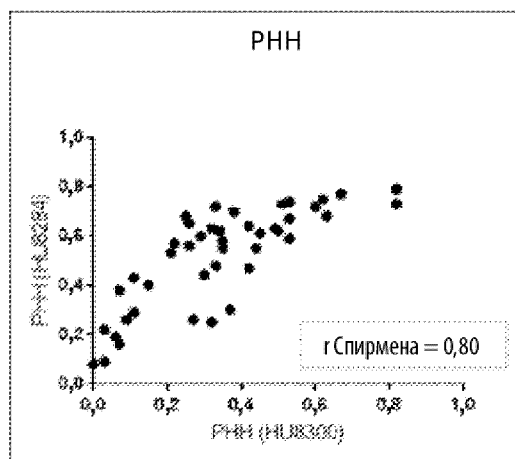
Фиг. 2С



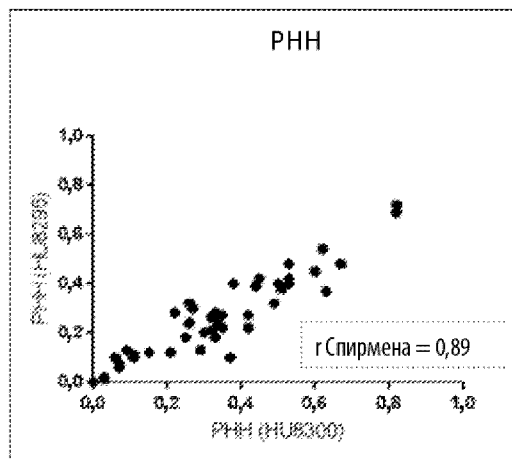
Фиг. 2D



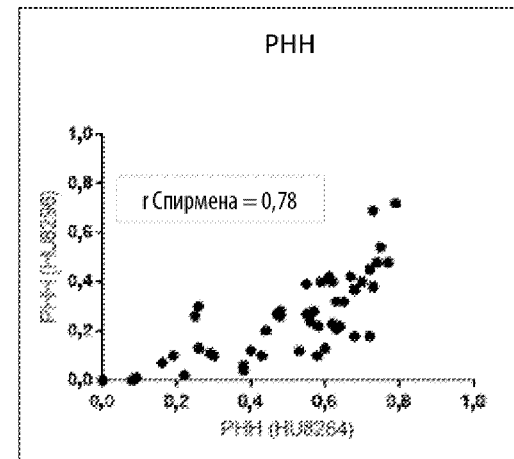
Фиг. 3В



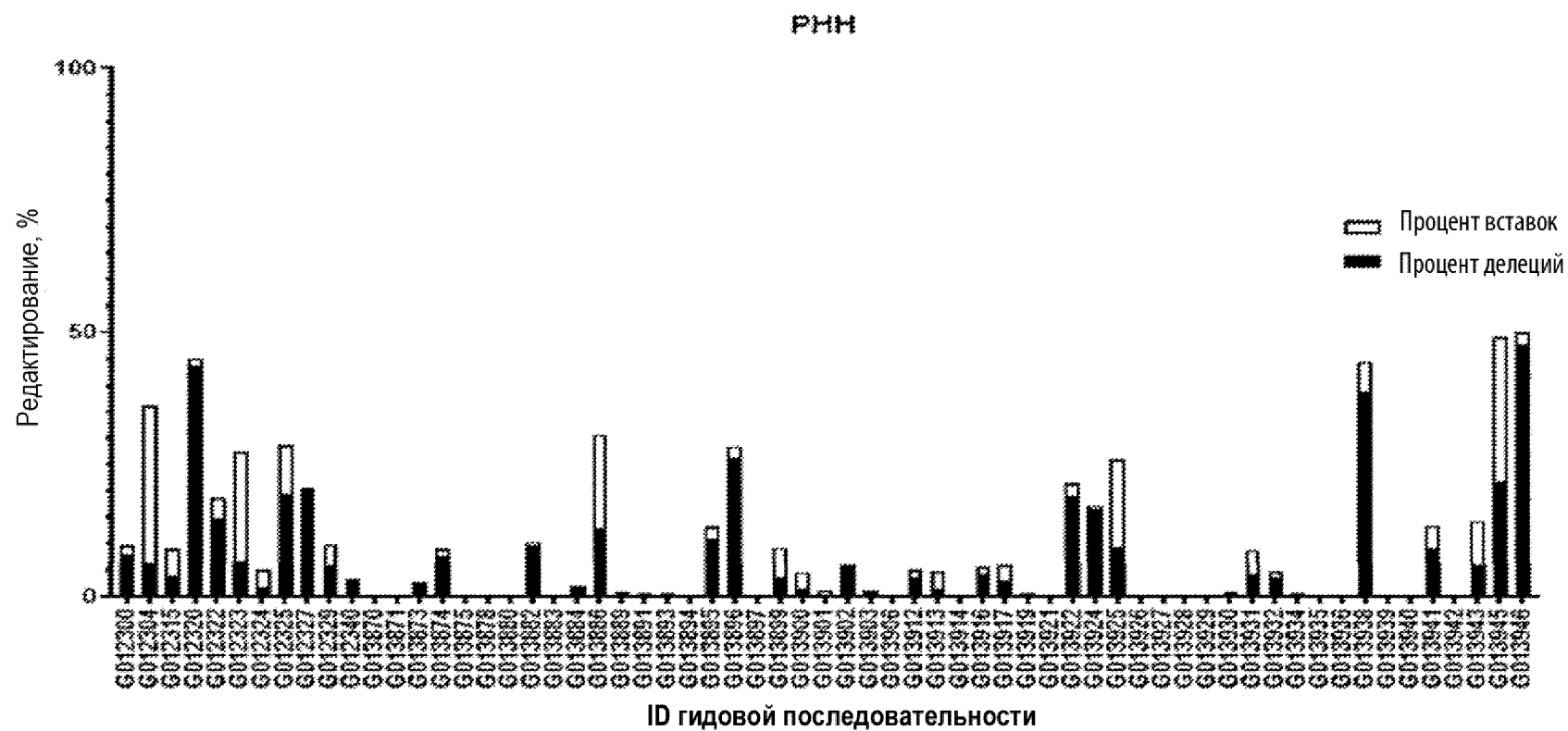
Фиг. 3С



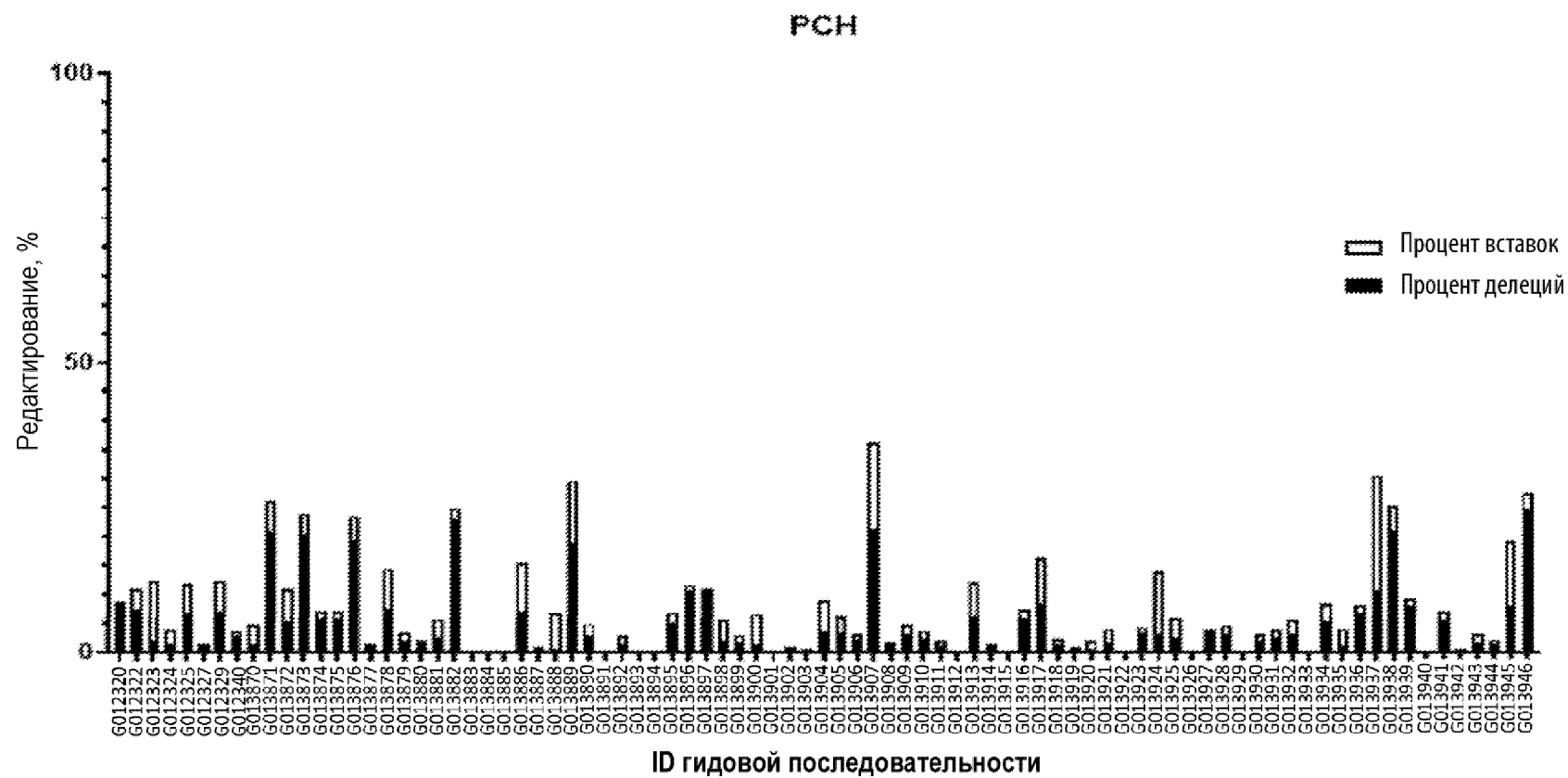
Фиг. 3D



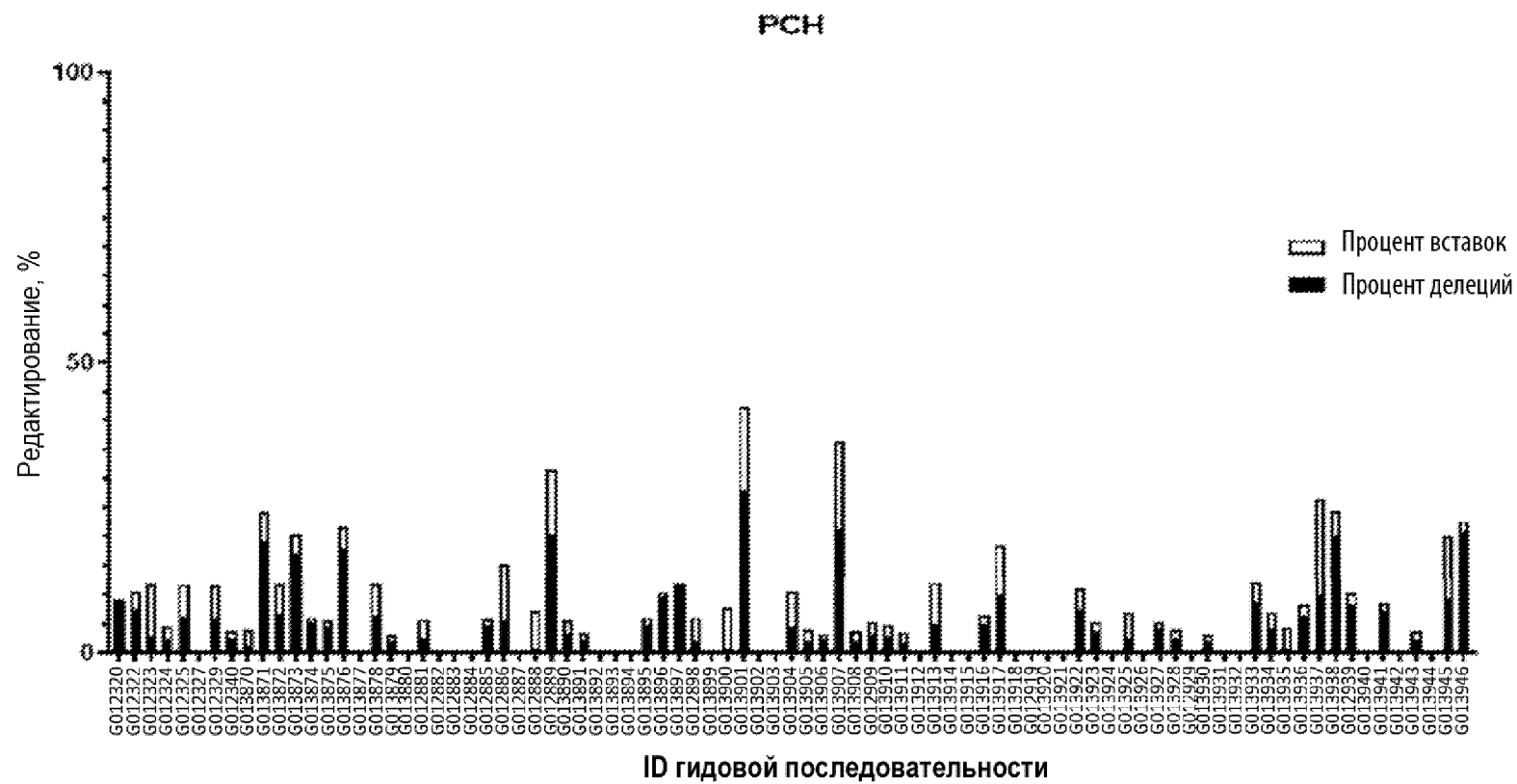
Фиг. 3Е



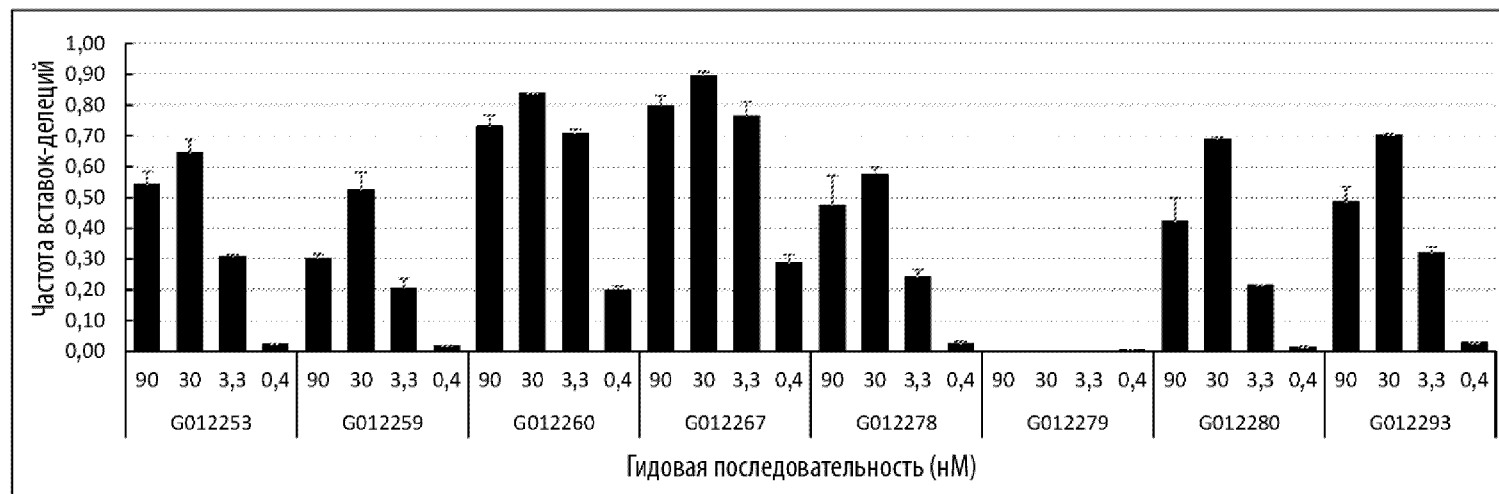
Фиг. 4А



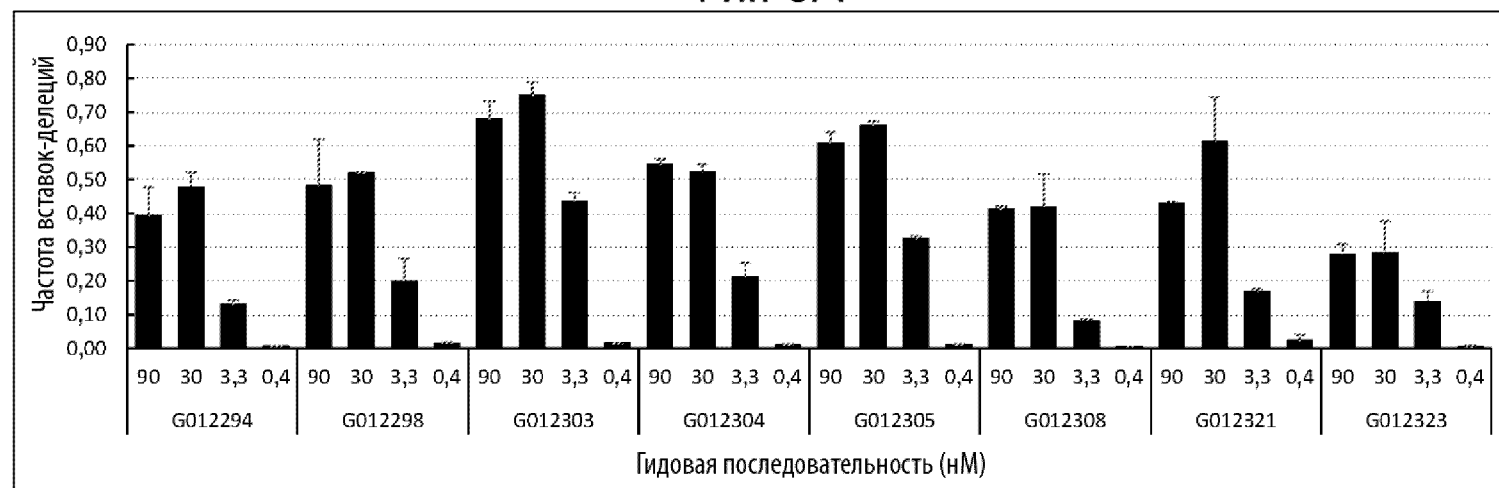
Фиг. 4С



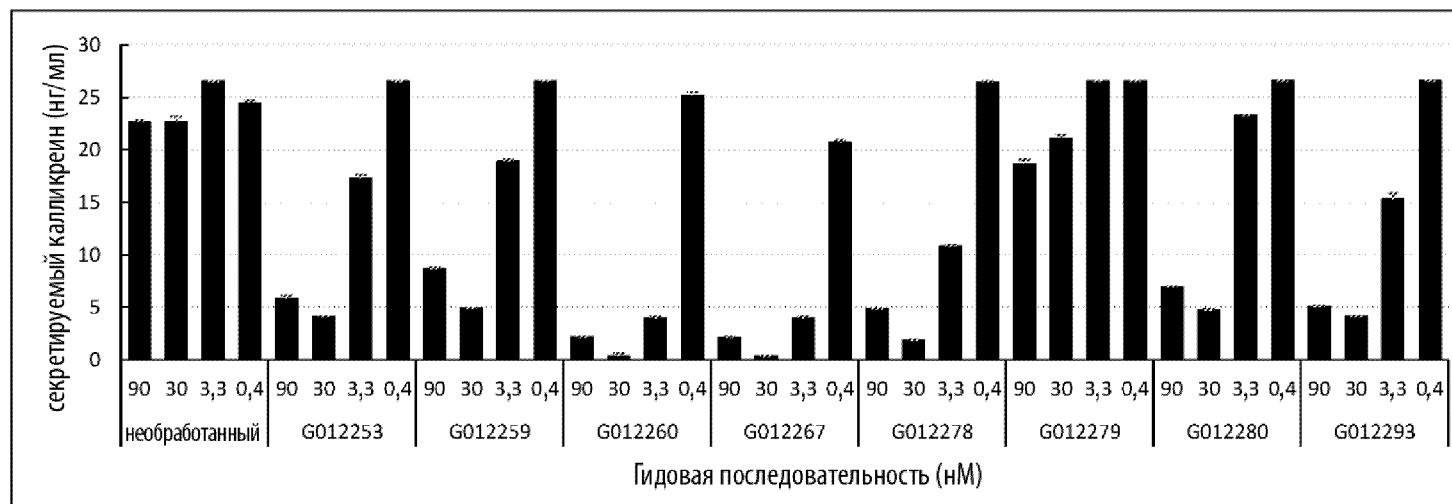
Фиг. 4D



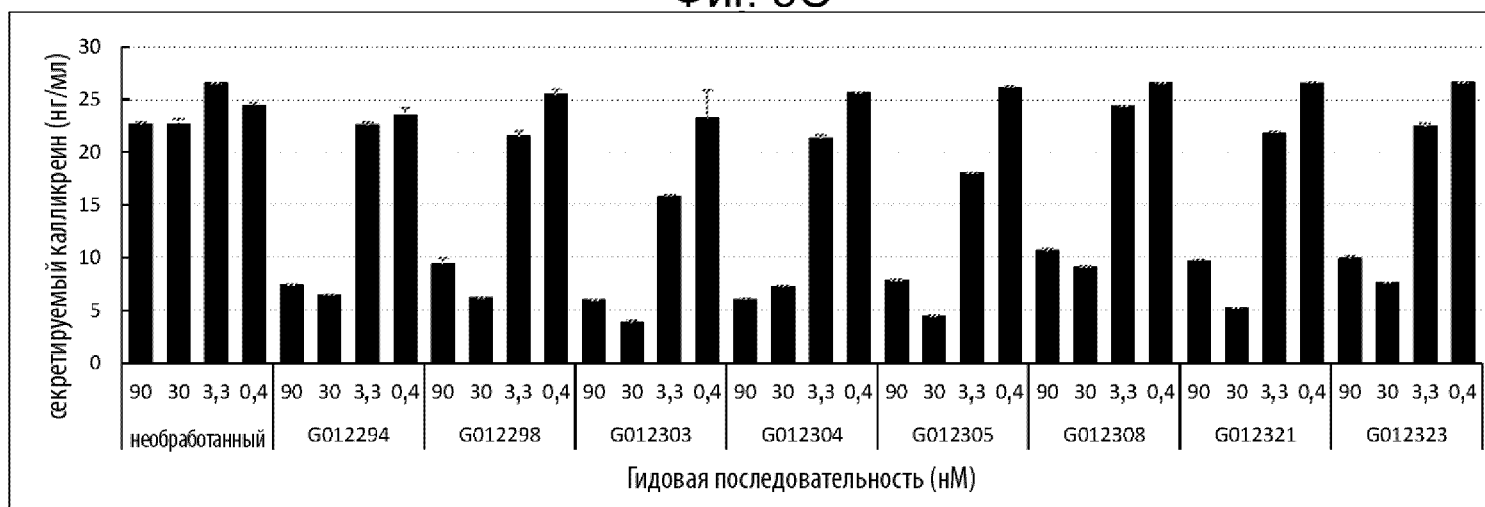
Фиг. 5А



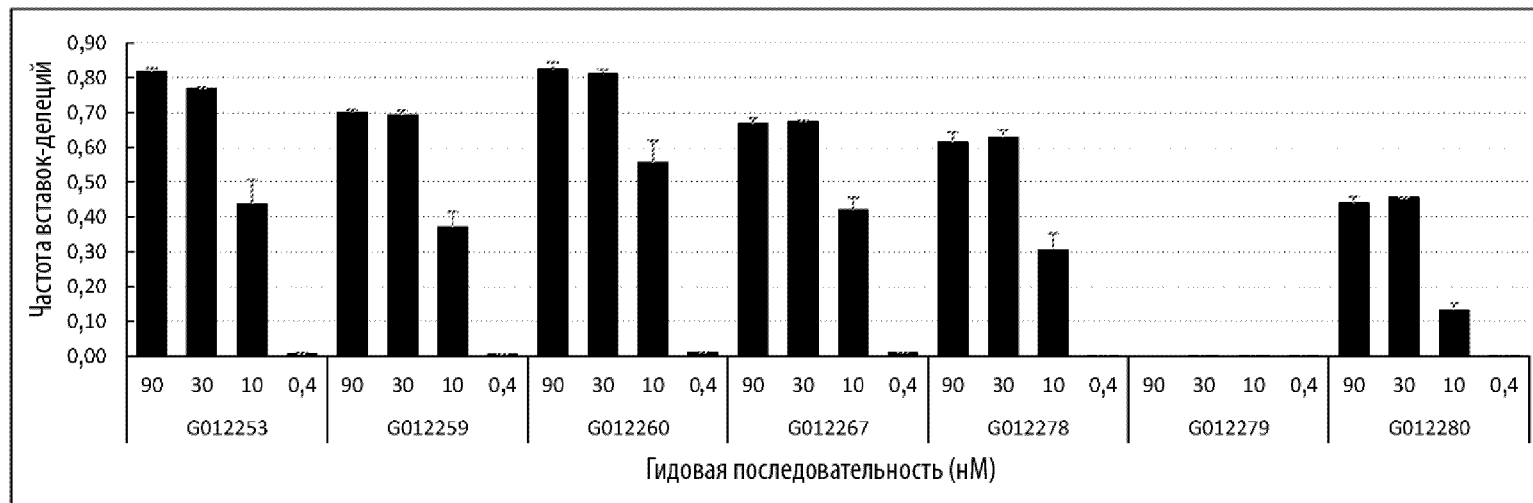
Фиг. 5В



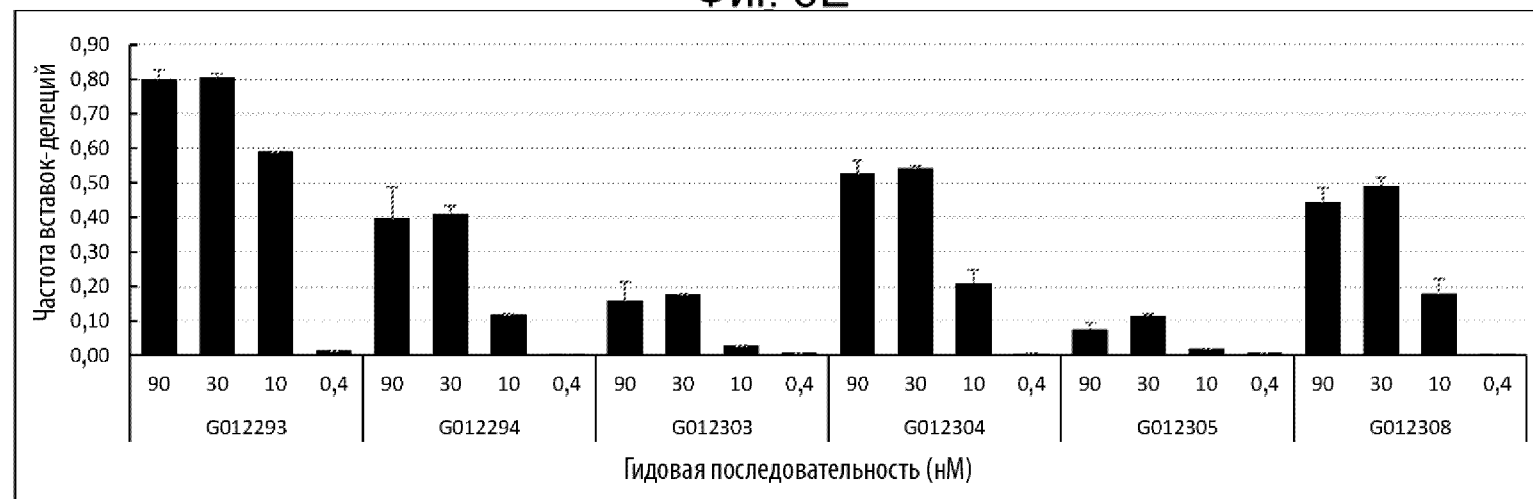
Фиг. 5C



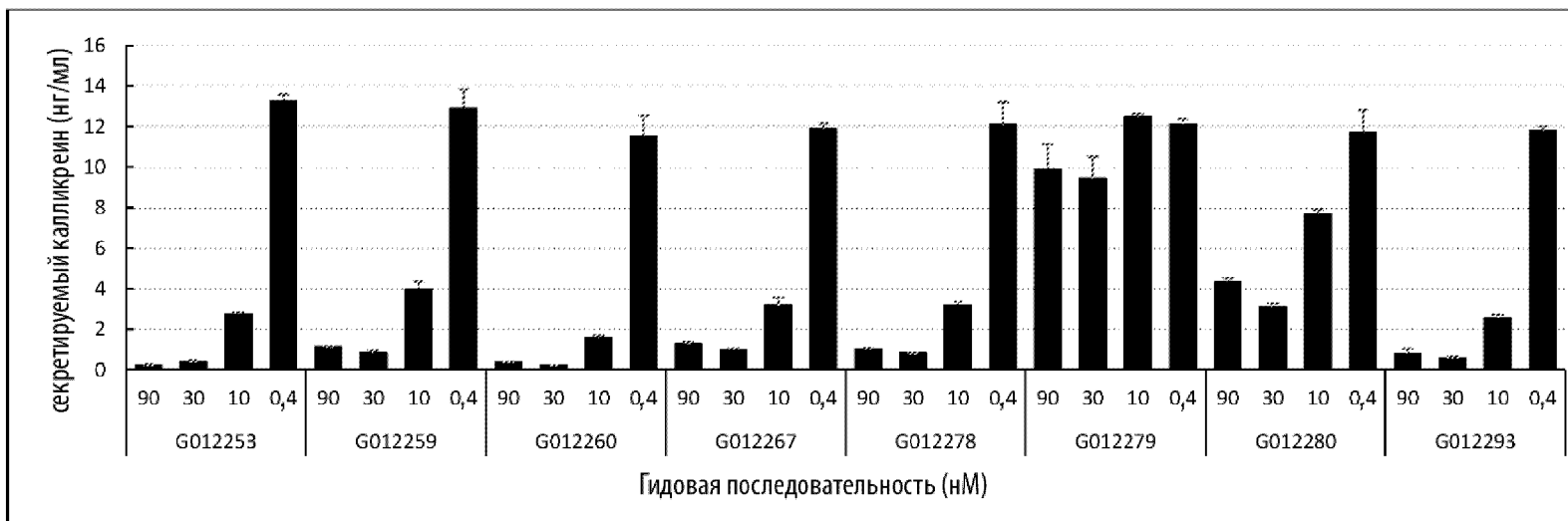
Фиг. 5D



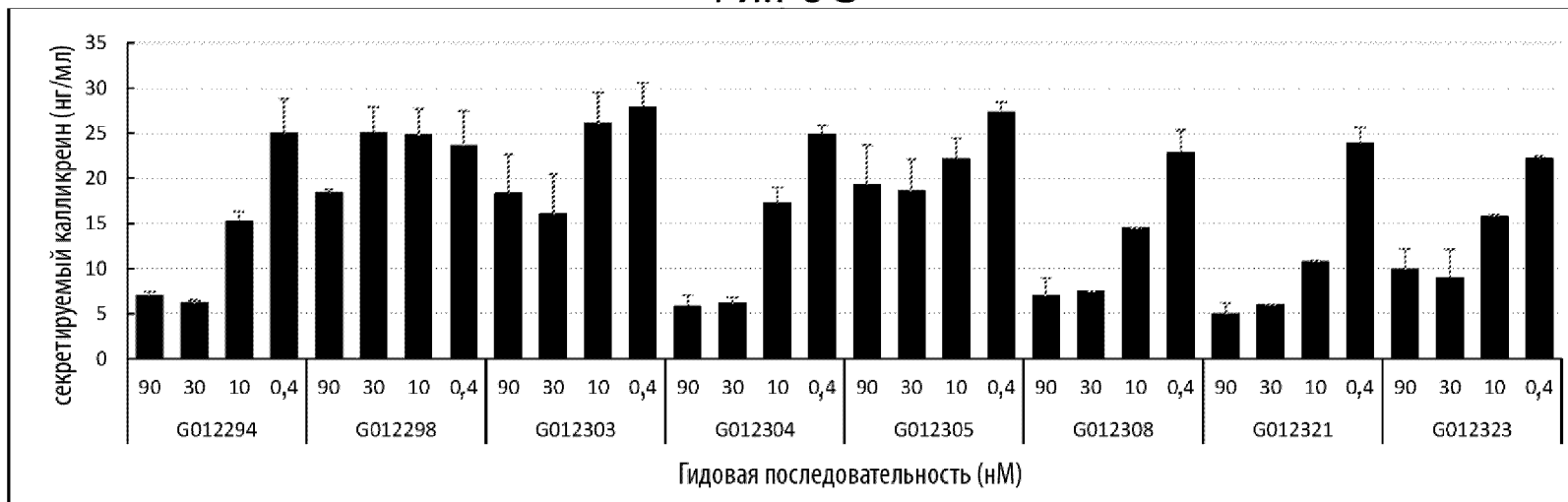
Фиг. 5Е



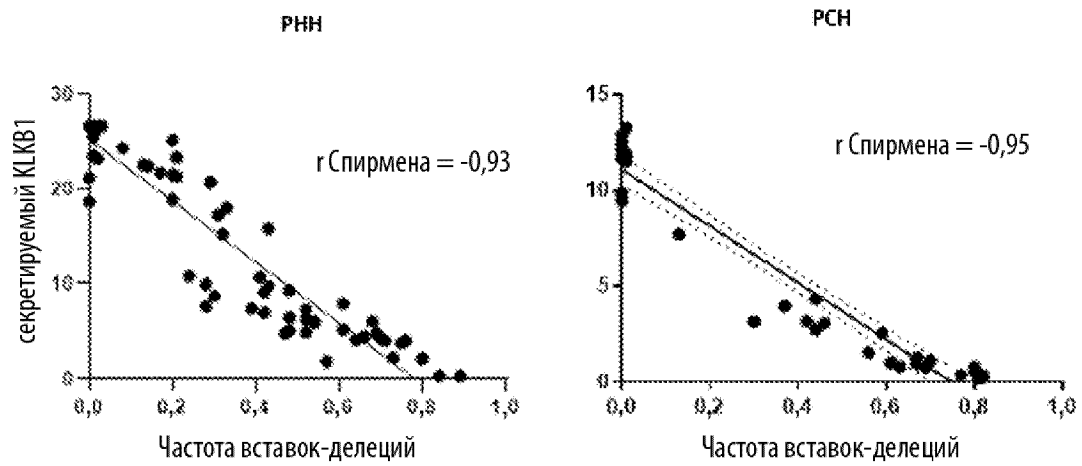
Фиг. 5F



Фиг. 5G

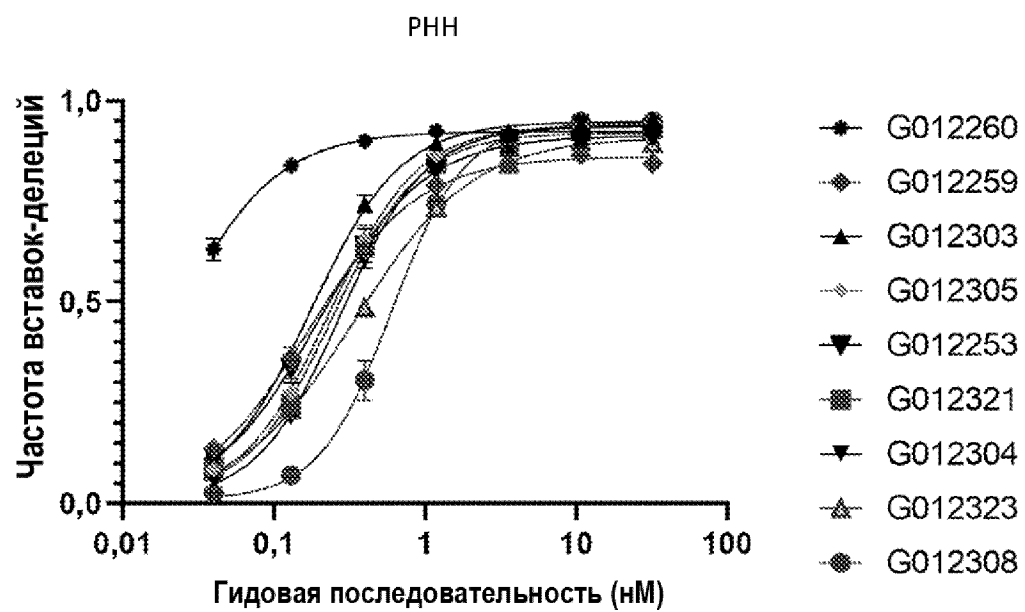


Фиг. 5H

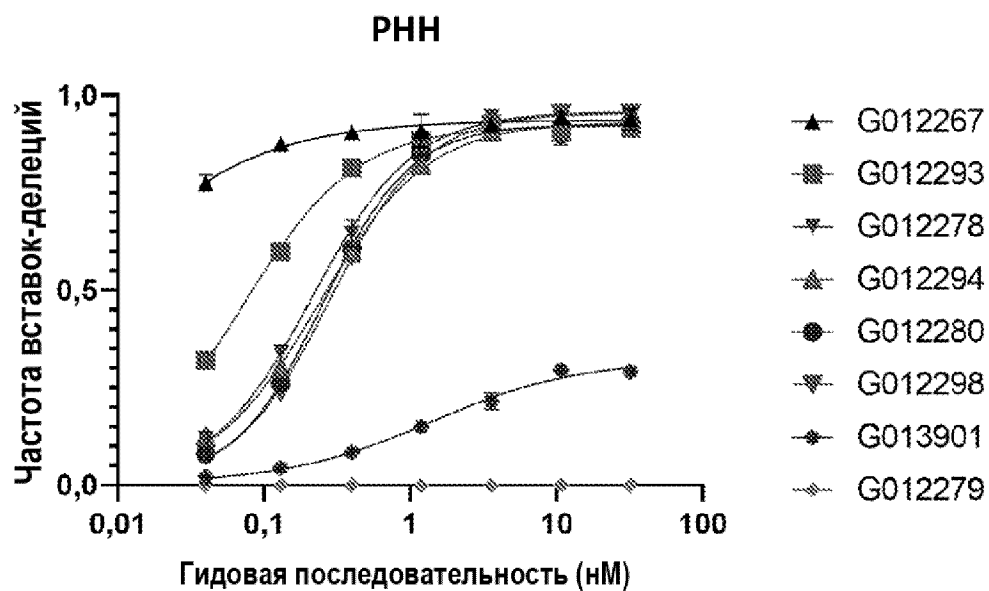


Фиг. 5I

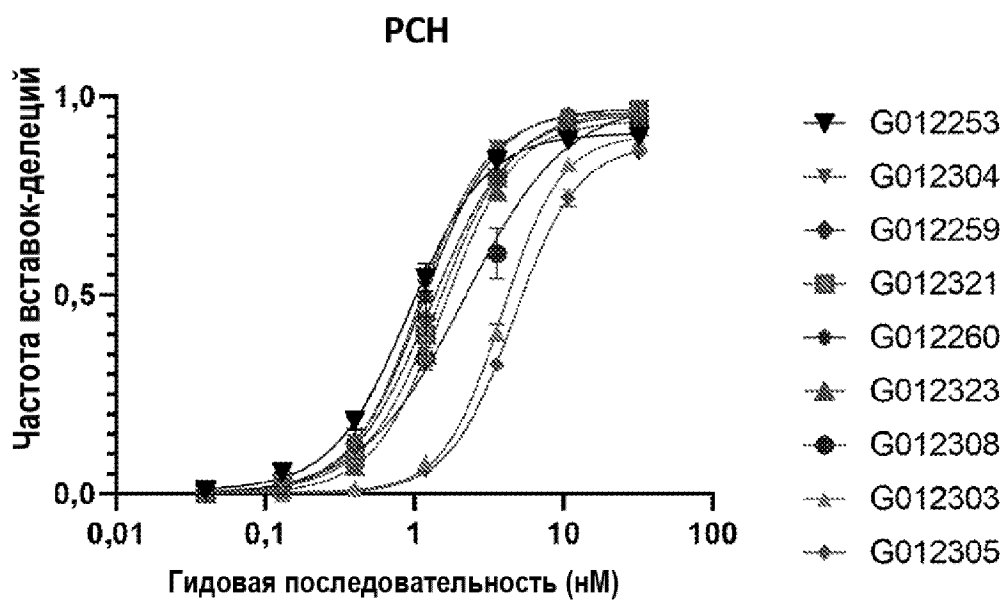
Фиг. 5J



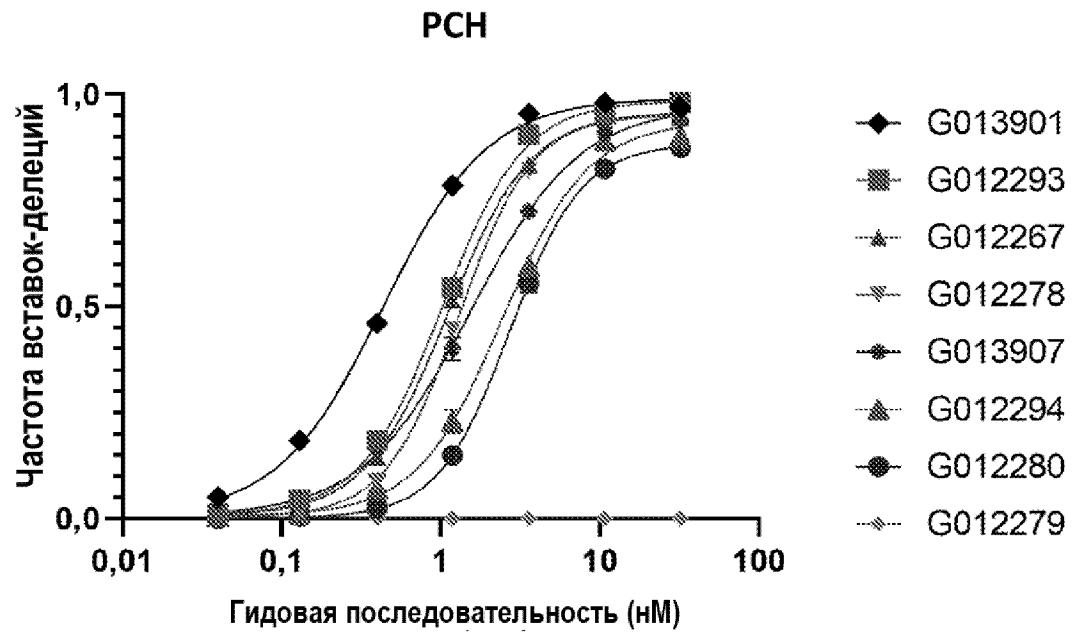
Фиг. 6A



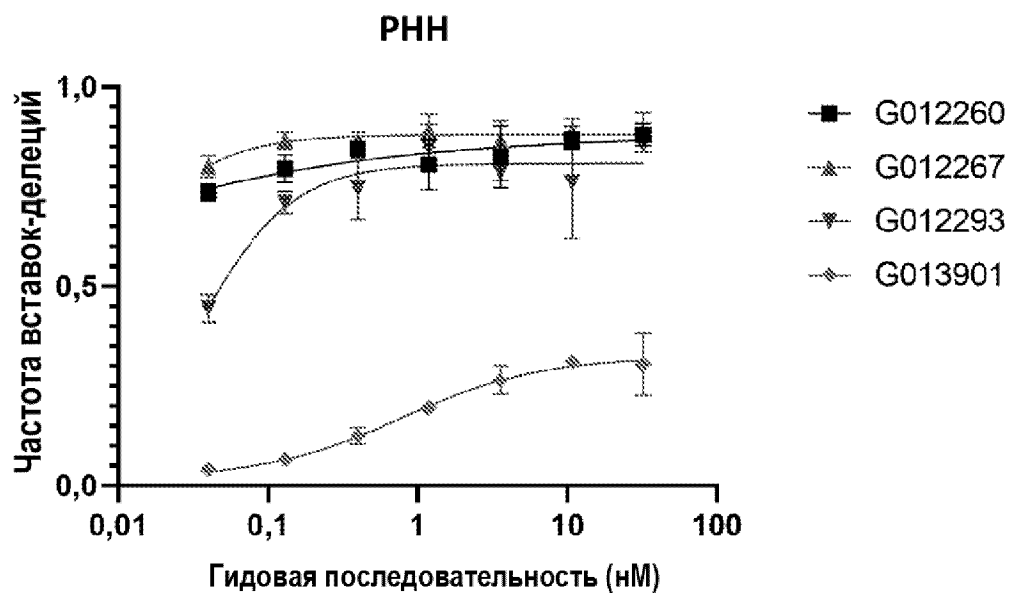
Фиг. 6В



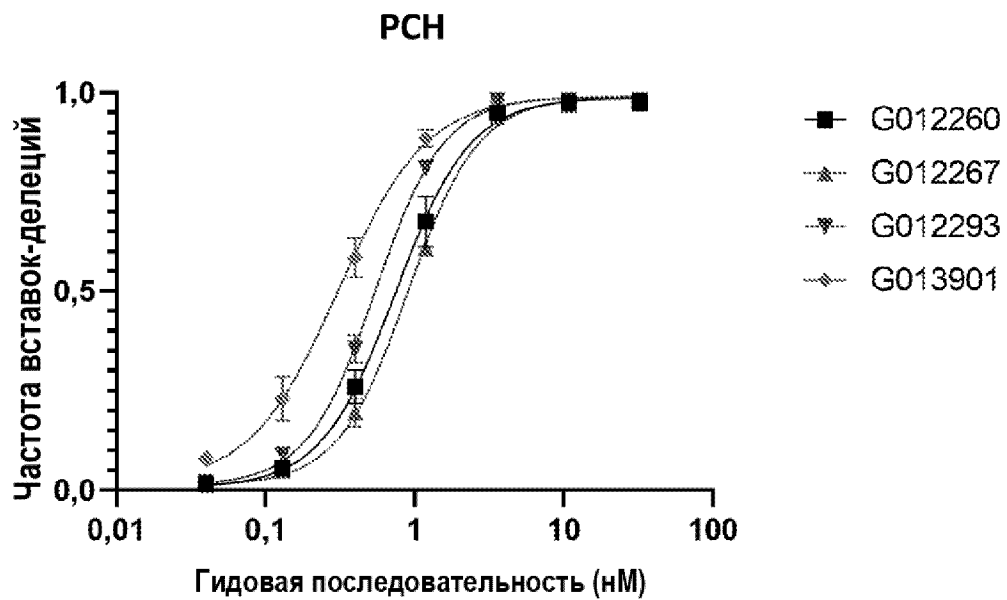
Фиг. 6С



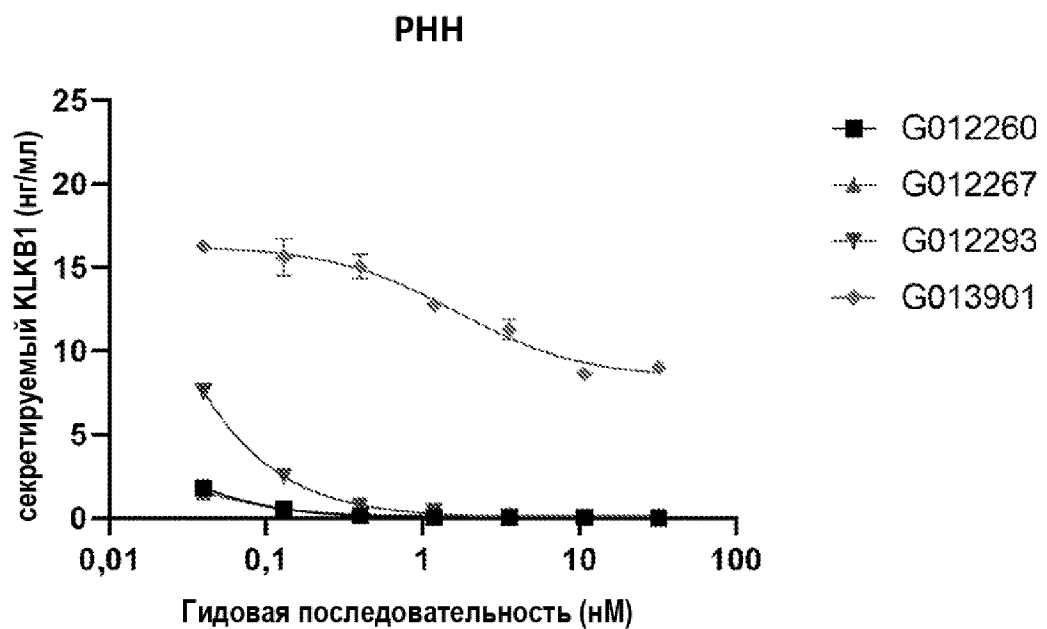
Фиг. 6D



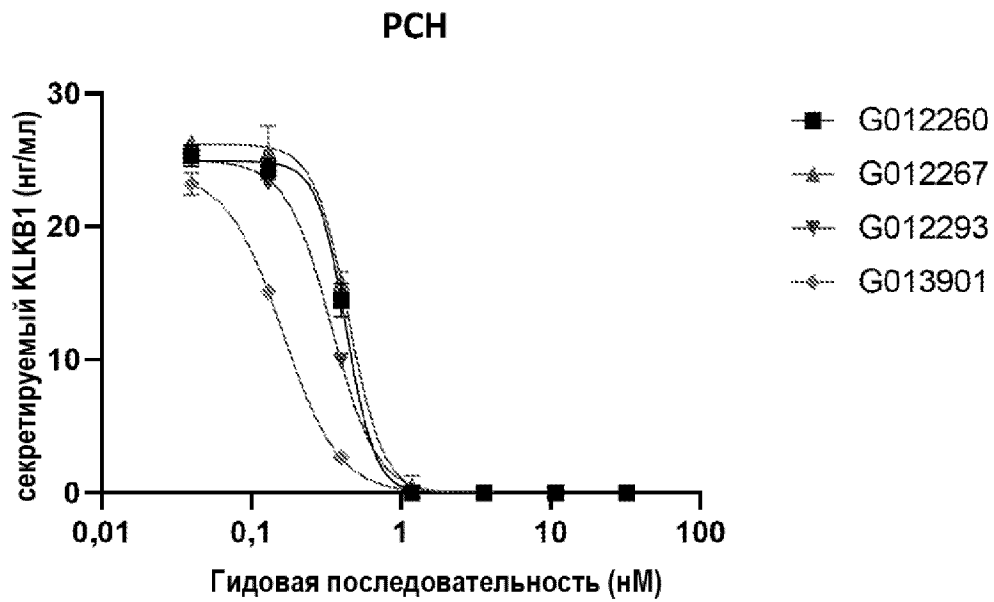
Фиг. 7A



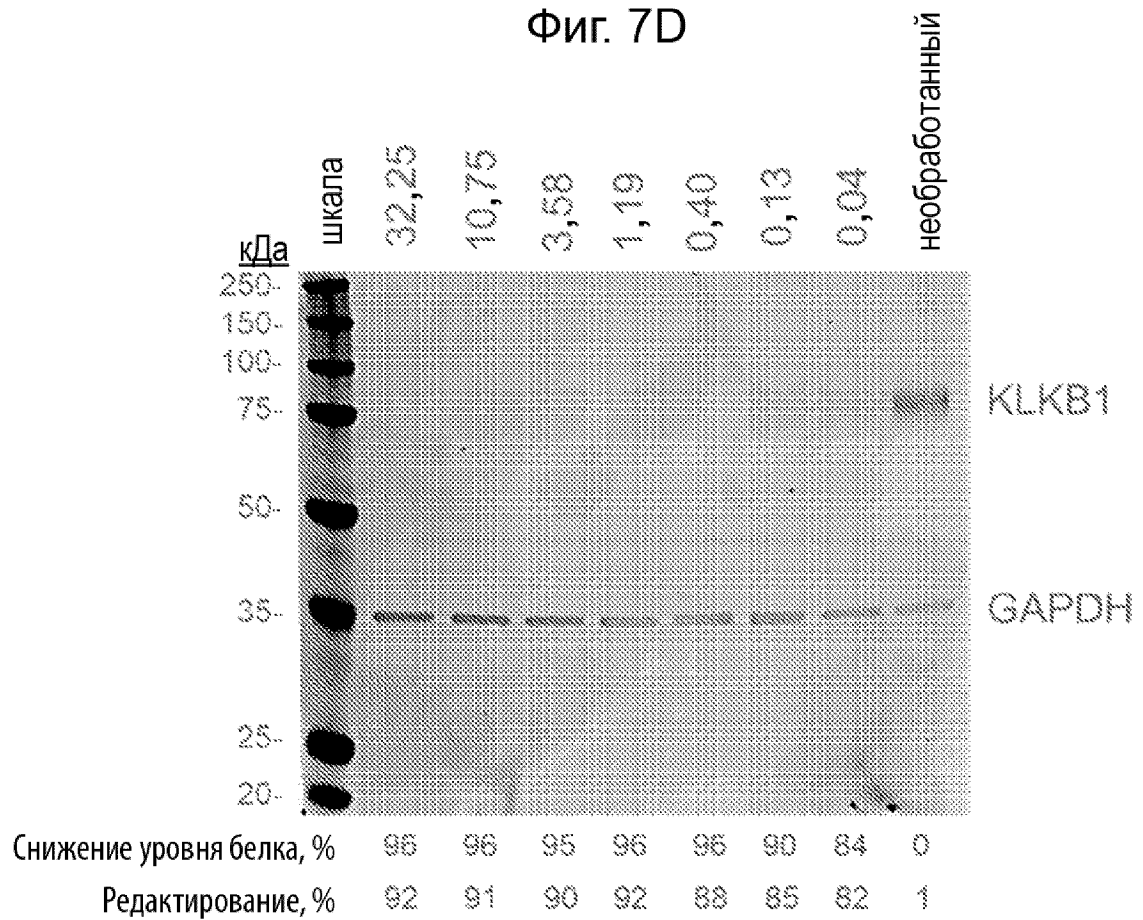
Фиг. 7В



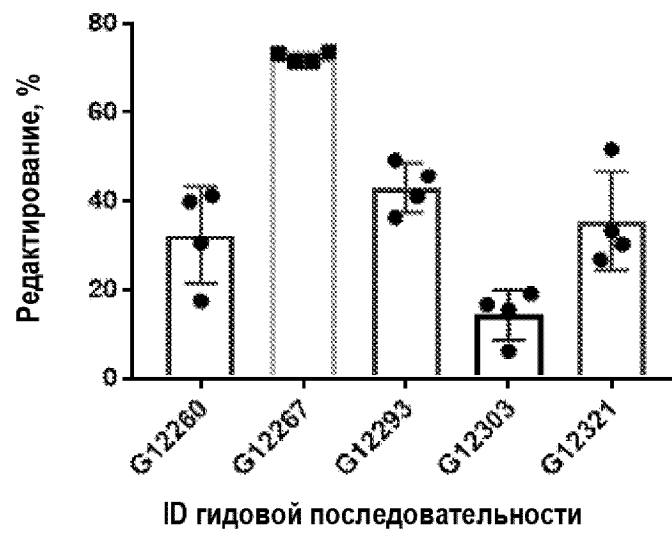
Фиг. 7С



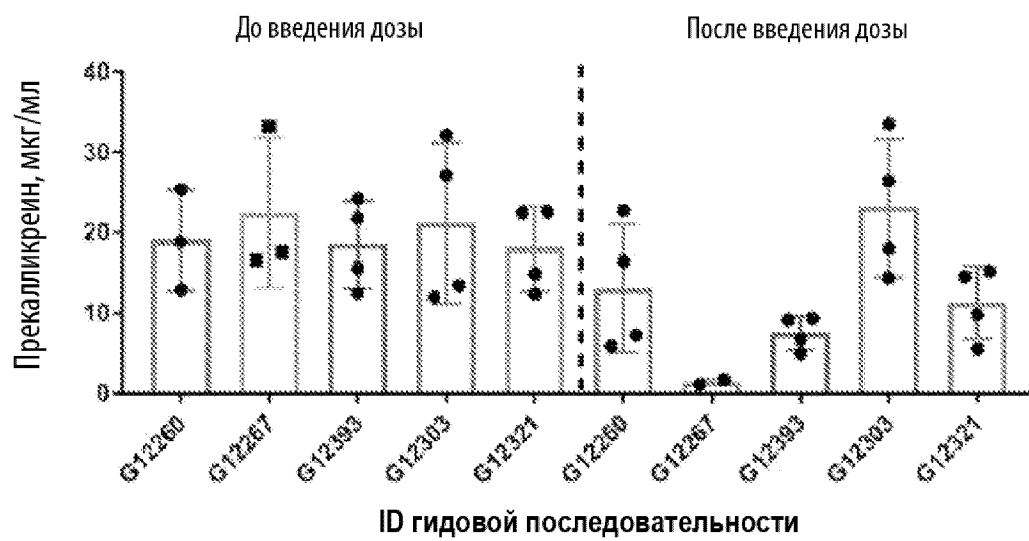
Фиг. 7D



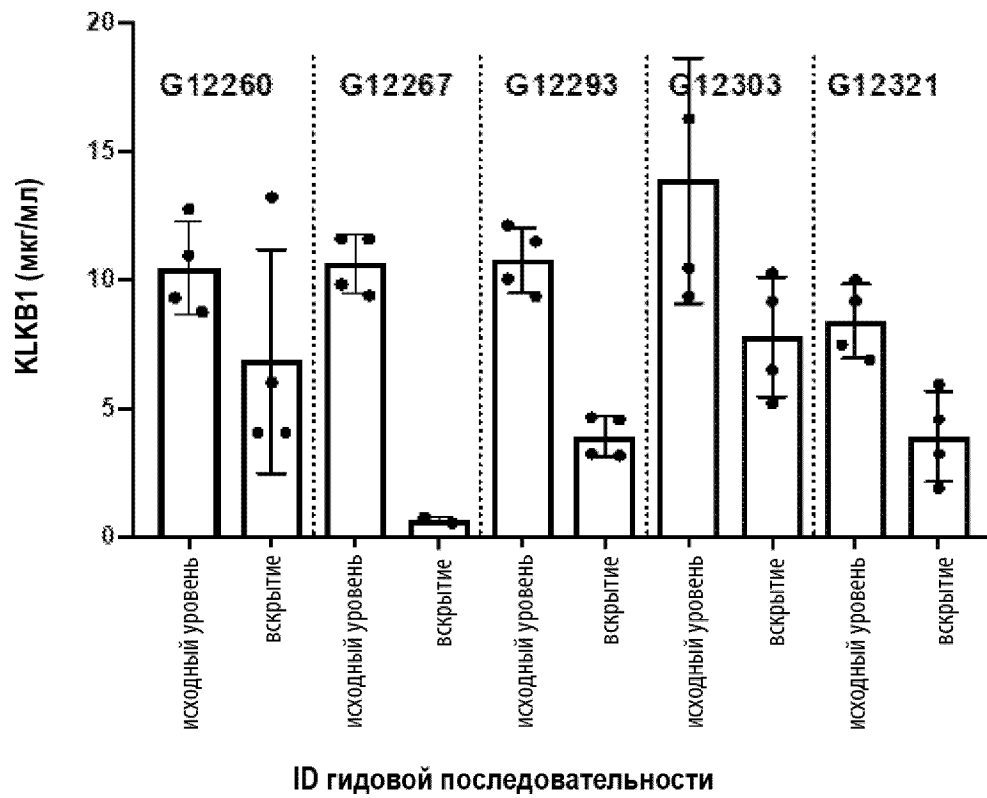
Фиг. 7E



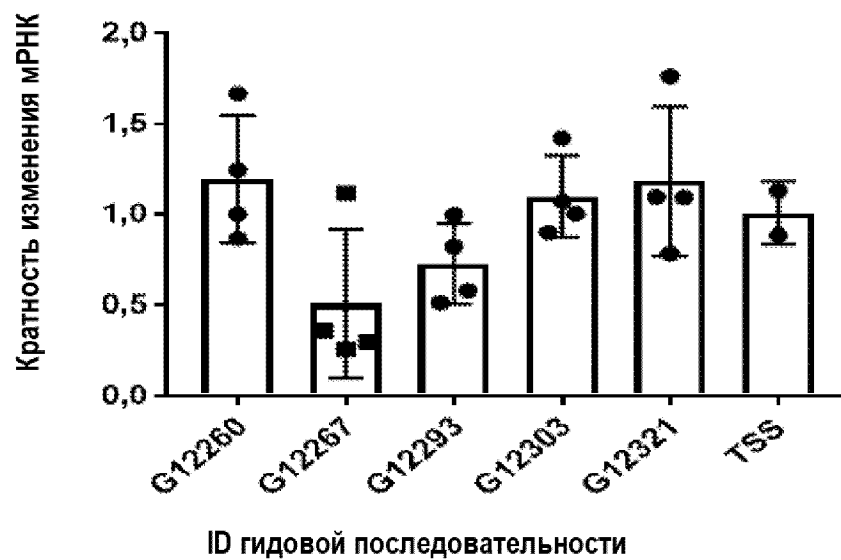
Фиг. 8А



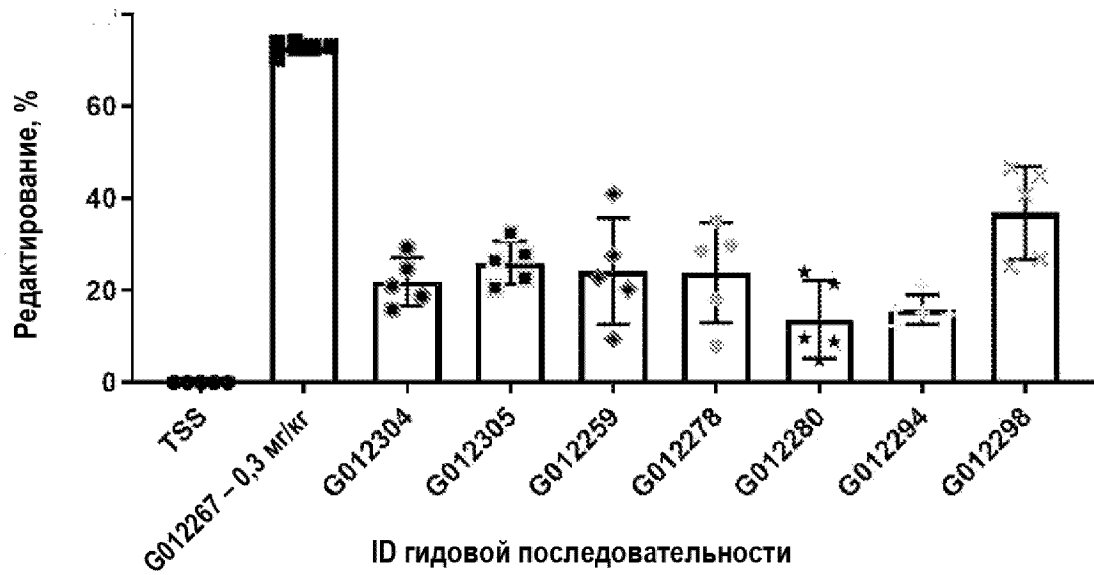
Фиг. 8В



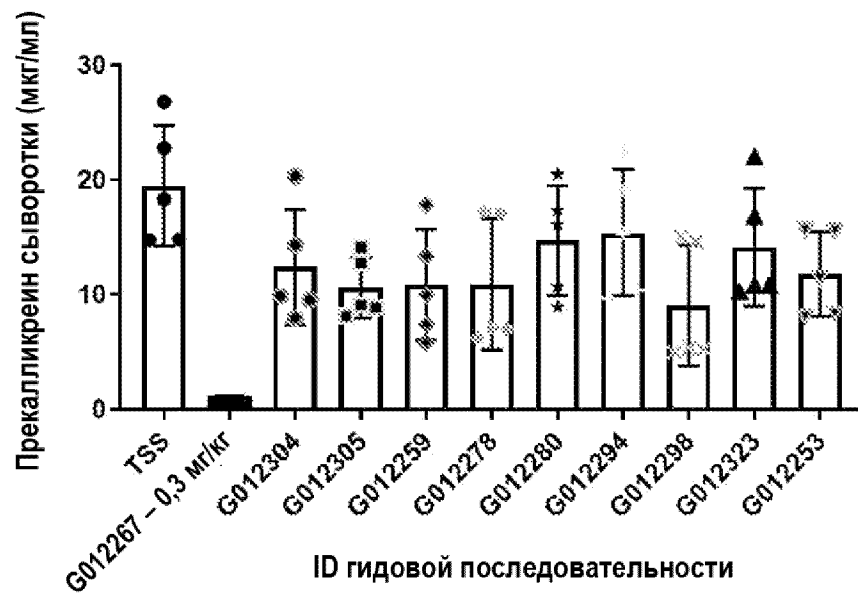
Фиг. 8С



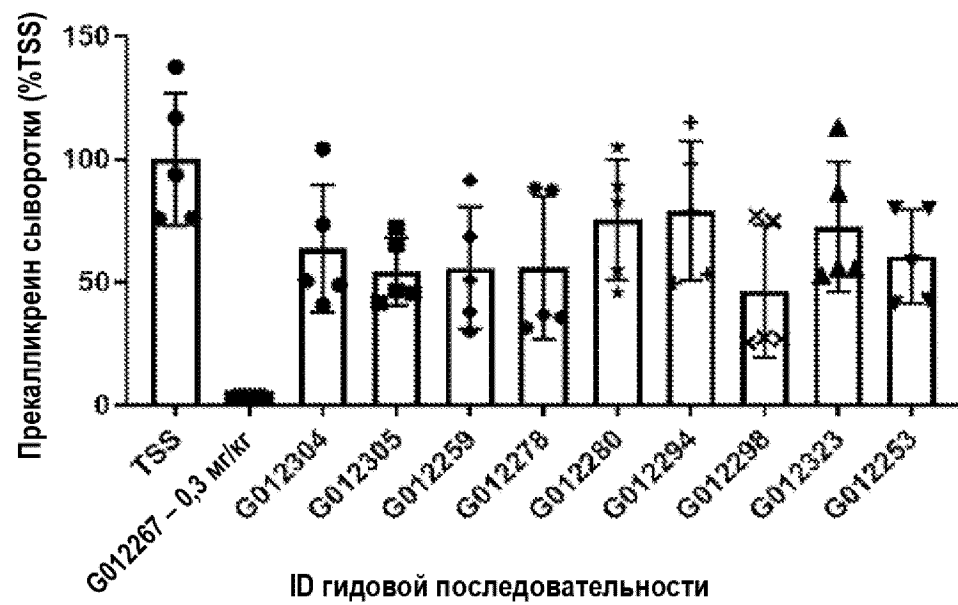
Фиг. 8D



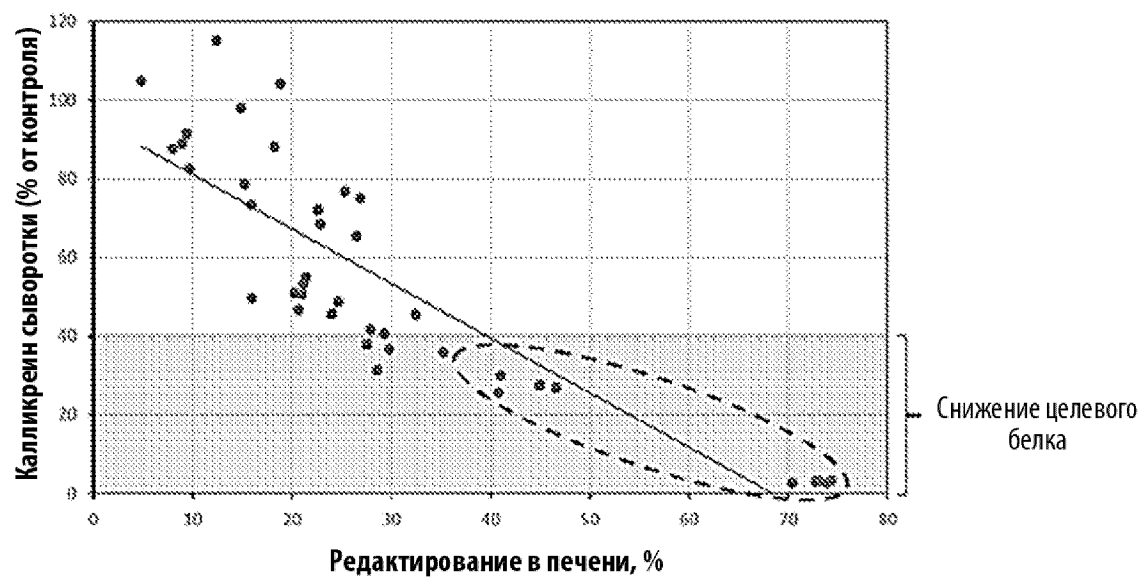
Фиг. 9А



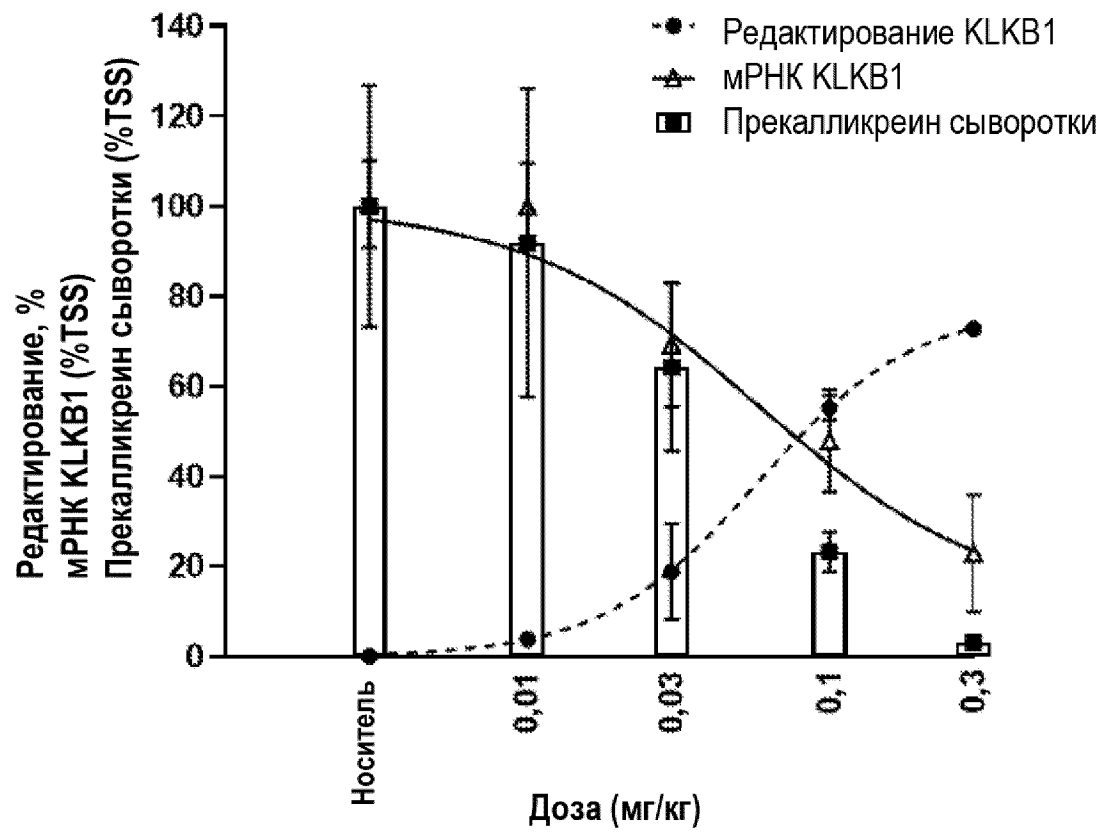
Фиг. 9В



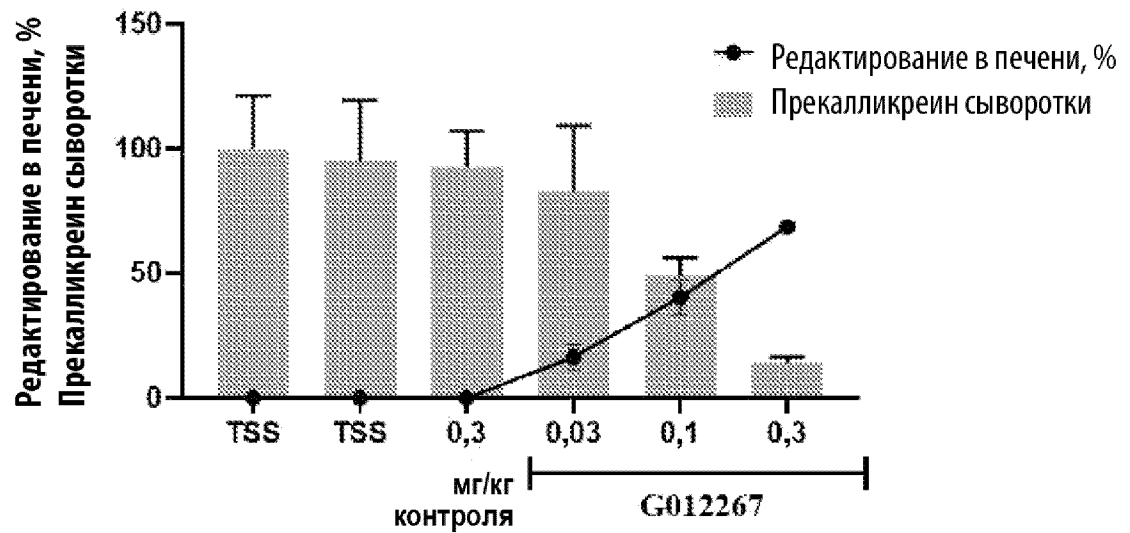
Фиг. 9C



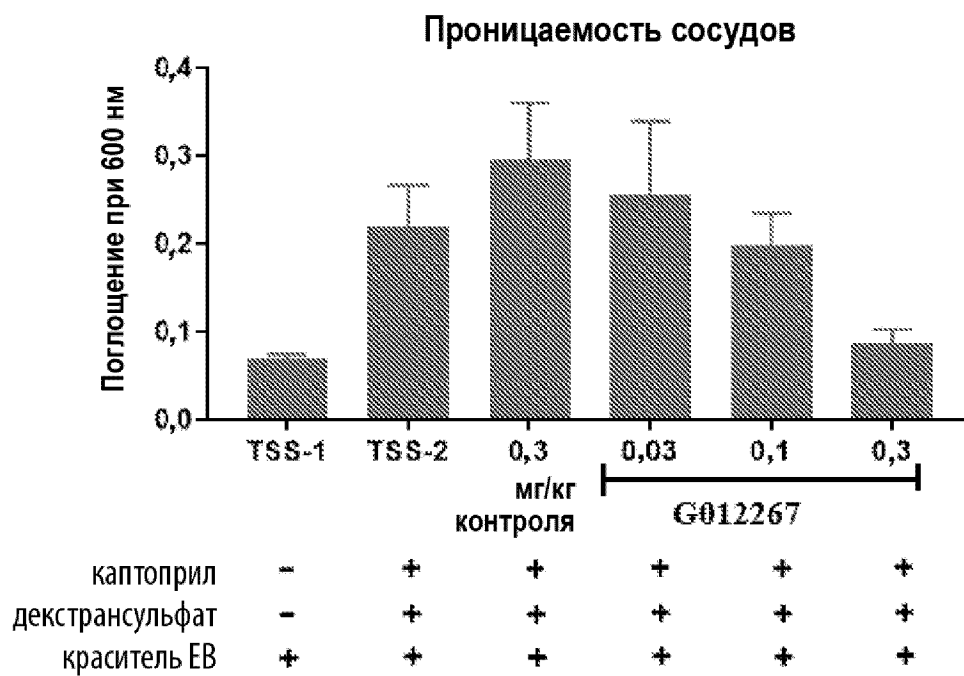
Фиг. 9D



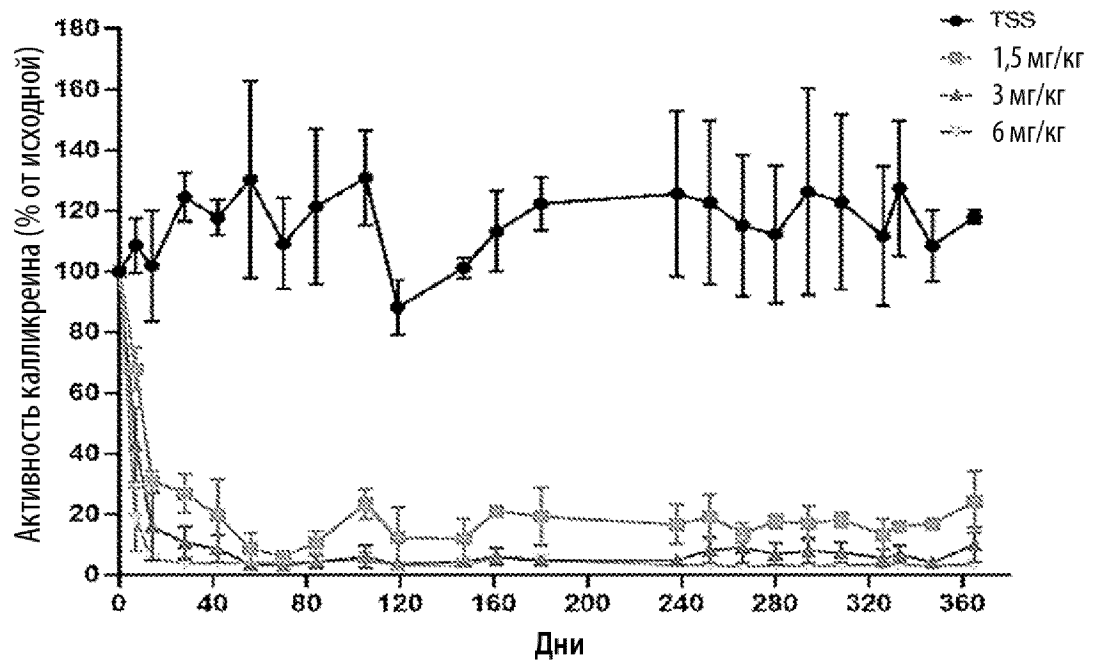
Фиг. 10



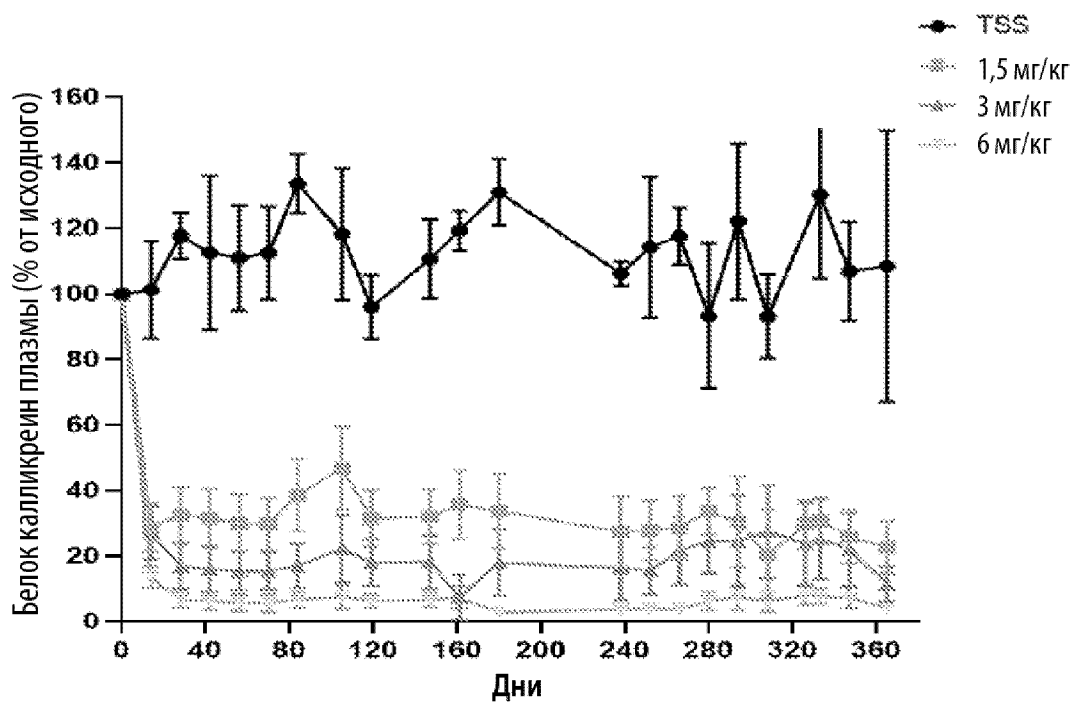
Фиг. 11А



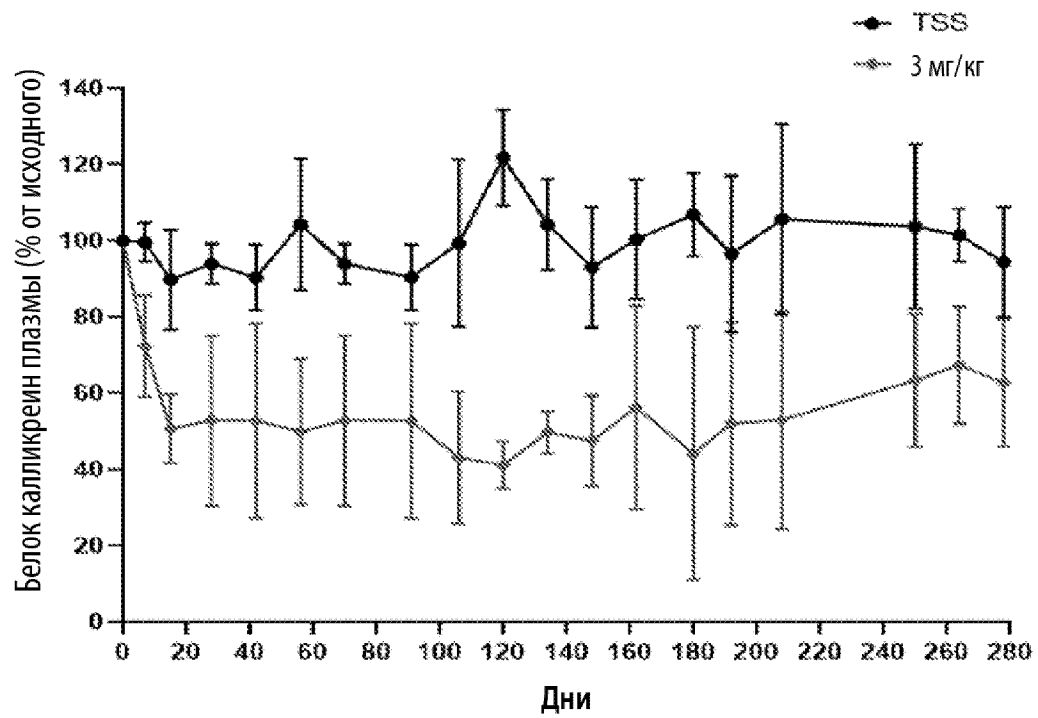
Фиг. 11В



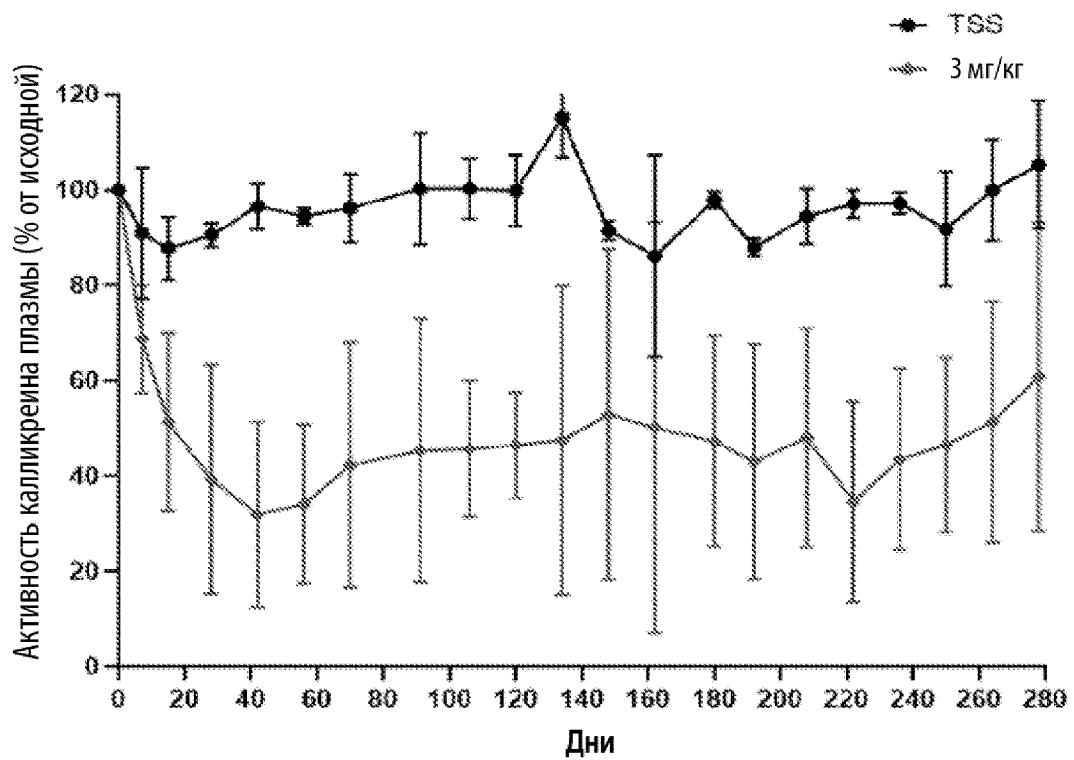
Фиг. 12А



Фиг. 12В

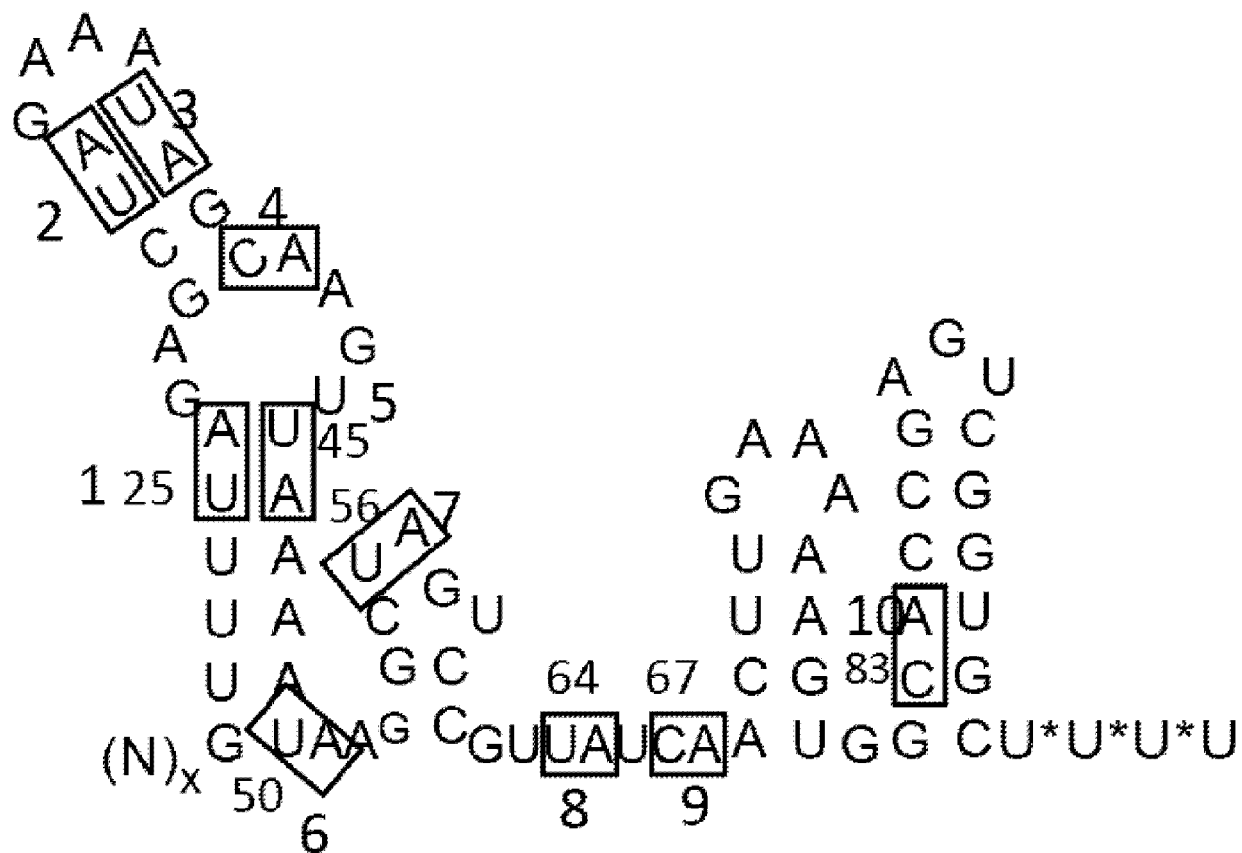


Фиг. 13А



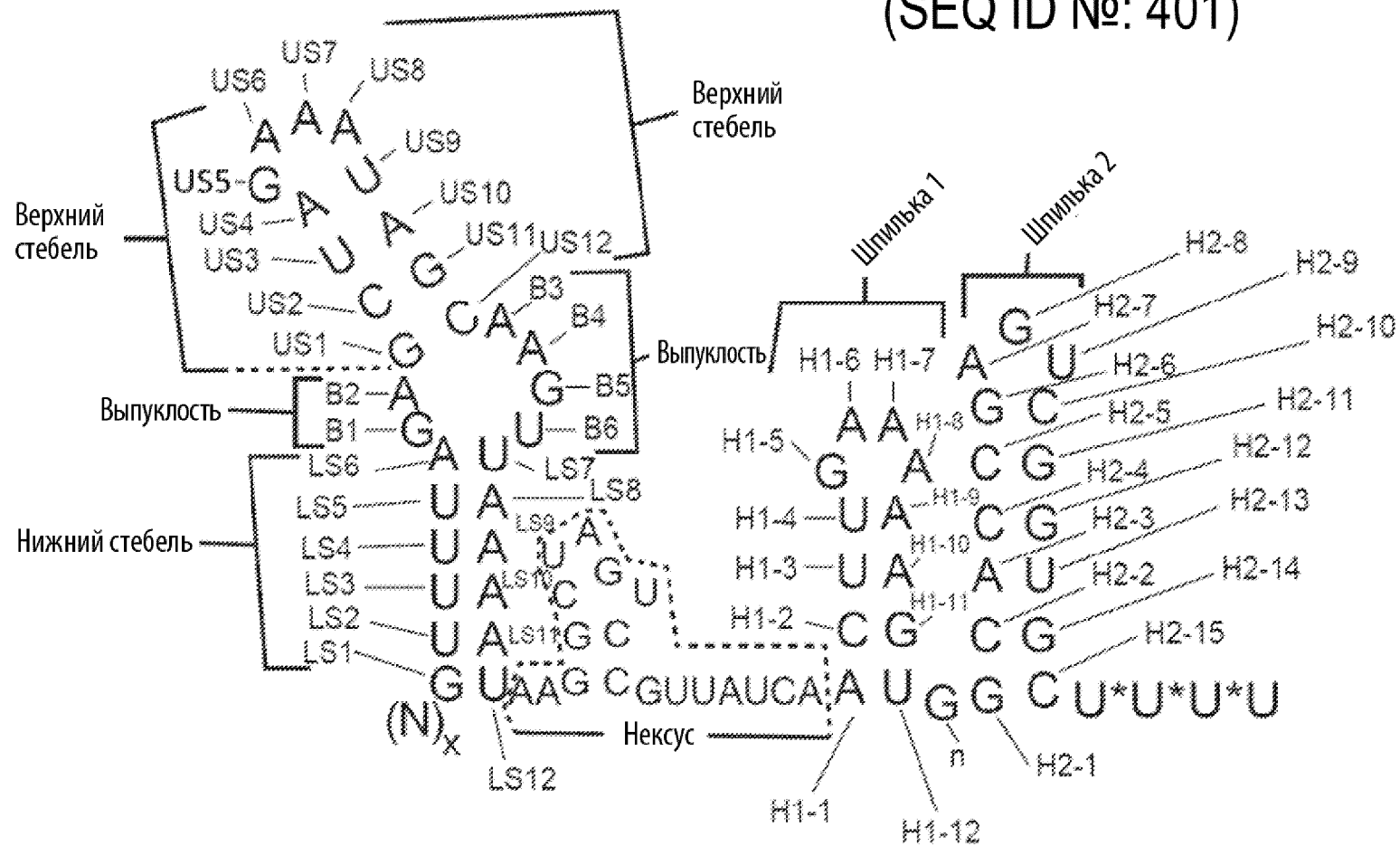
Фиг. 13В

ОСЛОВ Y/A (SEQ ID №: 201)



Фиг. 14

(SEQ ID №: 401)



Фиг. 15