

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **042798**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2023.03.27**

(51) Int. Cl. *C12Q 1/68* (2006.01)

(21) Номер заявки  
**201891317**

(22) Дата подачи заявки  
**2016.11.30**

---

(54) **ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ МИШЕНИ ДЛЯ КОРРЕКЦИИ ГЕНА ДИСТРОФИНА  
ЧЕЛОВЕКА С ПОМОЩЬЮ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОВ И СПОСОБЫ ИХ  
ПРИМЕНЕНИЯ**

---

(31) **62/260,712; 62/330,336**

(32) **2015.11.30; 2016.05.02**

(33) **US**

(43) **2018.12.28**

(86) **PCT/US2016/064285**

(87) **WO 2017/095967 2017.06.08**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**ДЬЮК ЮНИВЕРСИТИ (US)**

(72) Изобретатель:  
**Герсбах Чарльз А., Робинсон-Хамм  
Жаклин Н. (US)**

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

(56) **WO-A2-2014197748  
WO-A1-2015070083**

SHINICHI TSUCHIYA et al., The "Spanning Protocol": A new DNA extraction method for efficient single-cell genetic diagnosis, Journal of Assisted Reproduction Genetics, 2005, vol. 22, № 11/12, табл. 2

---

(57) Раскрыты терапевтические мишени для коррекции гена дистрофина человека с помощью редактирования генов и способы их применения.

---

**B1**

**042798**

**042798  
B1**

### **Перекрестная ссылка на родственные заявки**

Данная заявка заявляет приоритет по предварительной заявке на патент США № 62/260712, поданной 30 ноября 2015 г., и предварительной заявке на патент США № 62/330336, поданной 2 мая 2016 г., все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

### **Заявление о государственной заинтересованности**

Настоящее изобретение было создано при государственной поддержке в соответствии с программой стипендий для выпускников, присужденной Национальным научным фондом. Правительство США обладает определенными правами на настоящее изобретение.

### **Область техники изобретения**

Настоящее изобретение относится к области изменения экспрессии гена, конструирования генома и геномной перестройки генов с применением систем на основе коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами, на основе систем (CRISPR)/CRISPR-ассоциированного белка (Cas) 9 и вирусных систем доставки. Настоящее изобретение также относится к области геномной инженерии и геномной перестройки генов в мышце, такой как скелетная мышца и сердечная мышца.

### **Предпосылки изобретения**

Синтетические факторы транскрипции были разработаны для контроля экспрессии генов для многих различных медицинских и научных применений в системах, относящихся к млекопитающим, включая стимуляцию регенерации тканей, отбор лекарственных средств, компенсацию генетических дефектов, активацию молчащих онкосупрессоров, контроль дифференцировки стволовых клеток, проведение генетических скринингов и создание синтетических генных сетей. Эти факторы транскрипции способны целенаправленно воздействовать на промоторы или энхансеры эндогенных генов или могут быть целенаправленно сконструированы для распознавания последовательностей, ортогональных к геномам млекопитающих, для трансгенной регуляции. Наиболее общие стратегии конструирования новых факторов транскрипции, нацеленных на определяемые пользователем последовательности, основывались на программируемых ДНК-связывающих доменах белков "цинковых пальцев" и эффекторах, подобных активаторам транскрипции (TALE). Оба эти подхода предусматривают применение принципов взаимодействий белок-ДНК этих доменов с конструированием новых белков с уникальной ДНК-связывающей специфичностью. Хотя эти способы были очень успешны в большом числе применений, белковая инженерия, необходимая для манипулирования взаимодействиями белок-ДНК, может быть трудоемкой и нуждаться в специальных знаниях и навыках.

Кроме того, эти новые белки не всегда являются эффективными. Причины этого еще не известны, но могут быть связаны с эффектами эпигенетических модификаций и состоянием хроматина при связывании белка с целевым сайтом в геноме. Кроме того, существуют проблемы в обеспечении того, чтобы эти новые белки, а также другие компоненты доставлялись в каждую клетку. Существующие способы доставки этих новых белков и множества их компонентов включают доставку к клеткам в отдельных плаزمидных или векторных, что приводит к высоковариабельным уровням экспрессии в каждой клетке из-за различий в количестве копий. Кроме того, активация генов после трансфекции является временной вследствие растворения плазмидной ДНК, а непостоянная экспрессия генов может быть недостаточной для индукции терапевтических эффектов. Более того, данный подход не подходит для типов клеток, которые не легко трансфицировать. Таким образом, другим ограничением этих новых белков является эффективность активации транскрипции.

Системы редактирования генов на основе CRISPR/Cas9 могут использоваться для введения сайт-специфических двухнитевых разрывов в целевые геномные локусы. Такое расщепление ДНК стимулирует естественный механизм репарации ДНК, сводящийся к одному из двух возможных путей репарации. При отсутствии донорной матрицы разрыв подвергают репарации посредством негомологичного соединения концов (NHEJ), подверженного погрешностям пути репарации, что приводит к небольшим вставкам или делециям ДНК. Данный способ можно использовать для намеренного разрушения, делеции или изменения рамки считывания последовательностей целевых генов. Однако если донорная матрица предоставляется вместе с нуклеазами, то клеточный аппарат осуществляет репарацию разрыва путем гомологичной рекомбинации, которая усиливается на несколько порядков в присутствии расщепления ДНК. Данный способ можно применять для введения специфических изменений в последовательность ДНК в целевых сайтах. Сконструированные нуклеазы применялись для редактирования генов в различных стволовых клетках и линиях клеток человека, а также для редактирования генов в печени мыши. Однако основной преградой для реализации этих технологий является доставка к конкретным тканям *in vivo* таким образом, который является эффективным, действенным и способствует успешной модификации генома.

Наследственные генетические заболевания характеризуются разрушающими эффектами по отношению к детям в Соединенных Штатах. Эти заболевания в настоящее время поддаются лечению и можно лишь оказывать помощь, пытаясь облегчить симптомы. В течение нескольких десятилетий в области генной терапии обещали обеспечить лечение этих заболеваний. Однако технические преграды, связанные с безопасностью и действенностью доставки терапевтических генов к клеткам и пациентам, ограничивали данный подход. Мышечная дистрофия Дюшенна (DMD) представляет собой смертельное

генетическое заболевание, клинически характеризующееся мышечной атрофией, потерей способности к передвижению и смертью, как правило на третьем десятилетии жизни вследствие функциональной дистрофии. DMD является результатом врожденных или спонтанных мутаций в гене дистрофина. Большая часть мутаций, вызывающих DMD, является результатом делеций экзона(ов), сдвигая трансляционную рамку считывания за пределы рамки.

Дистрофин является ключевым компонентом белкового комплекса, который отвечает за регуляцию целостности и функции мышечных клеток. Пациенты с DMD обычно теряют способность физически поддерживать себя на протяжении детства, постепенно становятся слабее в подростковом возрасте и умирают в возрасте от двадцати до тридцати лет. Существующие на данный момент стратегии экспериментальной генной терапии по отношению к DMD требуют повторного введения средств доставки временных генов или полагаются на постоянное включение чужеродного генетического материала в геномную ДНК. Оба данных способа имеют серьезные проблемы с безопасностью. Более того, эти стратегии ограничивались неспособностью доставлять крупную и сложную последовательность гена дистрофина. Остается потребность в более точном и действенном инструменте для редактирования генов для коррекции и лечения пациентов с мутациями в гене дистрофина.

#### **Краткое описание изобретения**

Настоящее изобретение направлено на направляющую РНК (gRNA), содержащую нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, или комплементарную ей последовательность.

Настоящее изобретение также относится к композиции для нацеливания на ДНК, содержащей первую gRNA и вторую gRNA. Первая молекула gRNA и вторая молекула gRNA содержат нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, или комплементарную ей последовательность. Первая молекула gRNA и вторая молекула gRNA содержат нацеливающие домены.

Настоящее изобретение также относится к выделенному полинуклеотиду, содержащему вышеописанную молекулу gRNA или вышеописанную композицию для нацеливания на ДНК.

Настоящее изобретение относится к вектору, содержащему вышеописанную gRNA, вышеописанную композицию для нацеливания на ДНК или вышеописанный выделенный полинуклеотид.

Настоящее изобретение также относится к вектору, содержащему вышеописанную композицию для нацеливания на ДНК.

Настоящее изобретение также относится к вектору, кодирующему

- (a) первую молекулу направляющей РНК (gRNA);
- (b) вторую молекулу gRNA; и
- (c) по меньшей мере одну молекулу Cas9, которая распознает смежный с протоспейсером мотив (PAM) либо NNGRRT (SEQ ID NO: 24), либо NNGRRV (SEQ ID NO: 25).

Первая молекула gRNA и вторая молекула gRNA содержат нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, или комплементарную ей последовательность. Первая молекула gRNA и вторая молекула gRNA содержат нацеливающие домены.

Настоящее изобретение также относится к клетке, содержащей вышеописанную gRNA, вышеописанную композицию для нацеливания на ДНК, вышеописанный выделенный полинуклеотид или вышеописанный вектор.

Настоящее изобретение также относится к набору, содержащему вышеописанную gRNA, вышеописанную систему для нацеливания на ДНК, вышеописанный выделенный полинуклеотид, вышеописанный вектор или вышеописанную клетку и необязательно инструкции по применению.

Настоящее изобретение также относится к способу коррекции мутантного гена дистрофина в клетке. Способ предусматривает введение в клетку вышеописанной gRNA, вышеописанной системы для нацеливания на ДНК, вышеописанного выделенного полинуклеотида или вышеописанного вектора.

Настоящее изобретение также относится к способу редактирования мутантного гена дистрофина в геноме субъекта. Способ предусматривает введение субъекту композиции для редактирования генома, содержащей вышеописанную gRNA, вышеописанную систему для нацеливания на ДНК, вышеописанный выделенный полинуклеотид или вышеописанный вектор.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения субъекта, нуждающегося в этом, у ко-

того имеется мутантный ген дистрофина. Способ предусматривает введение субъекту вышеописанной gRNA, вышеописанной системы для нацеливания на ДНК, вышеописанного выделенного полинуклеотида или вышеописанного вектора.

Настоящее изобретение также относится к модифицированному вектору на основе аденоассоциированного вируса для редактирования мутантного гена дистрофина в геноме субъекта, содержащего первую полинуклеотидную последовательность, кодирующую вышеописанную gRNA, и вторую полинуклеотидную последовательность, кодирующую молекулу Cas9, которая распознает смежный с протоспейсером мотив (PAM) либо NNGRRT (SEQ ID NO: 24), либо NNGRRV (SEQ ID NO: 25).

Настоящее изобретение также относится к композиции для обеспечения делеции сегмента гена дистрофина, содержащей экзон 51, при этом композиция содержит

(а) первый вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность, кодирующую первую молекулу направляющей РНК (gRNA), и полинуклеотидную последовательность, кодирующую первую молекулу Cas9, которая распознает смежный с протоспейсером мотив (PAM) либо NNGRRT (SEQ ID NO: 24), либо NNGRRV (SEQ ID NO: 25); и

(b) второй вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность, кодирующую вторую молекулу gRNA, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую вторую молекулу Cas9, которая распознает смежный с протоспейсером мотив (PAM) либо NNGRRT (SEQ ID NO: 24), либо NNGRRV (SEQ ID NO: 25).

Каждая из первой и второй молекул gRNA содержит нацеливающий домен, длина которого составляет от 19 до 24 нуклеотидов, где первый вектор и второй вектор сконструированы с возможностью образования первого и второго двухнитевых разрывов в первом интроне и втором интроне, фланкирующих соответственно экзон 51 гена DMD человека, за счет чего обеспечивается делеция сегмента гена дистрофина, содержащего экзон 51.

Настоящее изобретение также относится к клетке, содержащей вышеописанную композицию.

Настоящее изобретение также относится к способу коррекции мутантного гена дистрофина в клетке, предусматривающему введение в клетку

(а) первого вектора, содержащего полинуклеотидную последовательность, кодирующую первую молекулу направляющей РНК (gRNA), и полинуклеотидную последовательность, кодирующую первую молекулу Cas9, которая распознает смежный с протоспейсером мотив (PAM) либо NNGRRT (SEQ ID NO: 24), либо NNGRRV (SEQ ID NO: 25); и

(b) второго вектора, содержащего полинуклеотидную последовательность, кодирующую вторую молекулу gRNA, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую вторую молекулу Cas9, которая распознает смежный с протоспейсером мотив (PAM) либо NNGRRT (SEQ ID NO: 24), либо NNGRRV (SEQ ID NO: 25).

Каждая из первой молекулы gRNA и второй молекулы gRNA содержит нацеливающий домен, длина которого составляет от 19 до 24 нуклеотидов, где вектор сконструирован с возможностью образования первого и второго двухнитевых разрывов соответственно в первом и втором интронах, фланкирующих экзон 51 гена дистрофина человека, за счет чего обеспечивается делеция сегмента гена дистрофина, содержащего экзон 51.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения субъекта, нуждающегося в этом, у которого имеется мутантный ген дистрофина. Способ предусматривает введение субъекту

(а) первого вектора, содержащего полинуклеотидную последовательность, кодирующую первую молекулу направляющей РНК (gRNA), и полинуклеотидную последовательность, кодирующую первую молекулу Cas9, которая распознает смежный с протоспейсером мотив (PAM) либо NNGRRT (SEQ ID NO: 24), либо NNGRRV (SEQ ID NO: 25); и

(b) второго вектора, содержащего полинуклеотидную последовательность, кодирующую вторую молекулу gRNA, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую вторую молекулу Cas9, которая распознает смежный с протоспейсером мотив (PAM) либо NNGRRT (SEQ ID NO: 24), либо NNGRRV (SEQ ID NO: 25).

Каждая из первой молекулы gRNA и второй молекулы gRNA содержит нацеливающий домен, длина которого составляет от 19 до 24 нуклеотидов, где вектор сконструирован с возможностью образования первого и второго двухнитевых разрывов соответственно в первом и втором интронах, фланкирующих экзон 51 гена дистрофина человека, за счет чего обеспечивается делеция сегмента гена дистрофина, содержащего экзон 51.

Настоящее изобретение также относится к способу получения трансгенного эмбриона грызуна, у которого имеется ген дистрофина человека (hDMD), с делецией экзона 52 ( $\Delta 52$ ). Способ предусматривает введение эмбриону грызуна вышеописанной gRNA, вышеописанной системы для нацеливания на ДНК, вышеописанного выделенного полинуклеотида, вышеописанного вектора, вышеописанного модифицированного вектора на основе аденоассоциированного вируса или вышеописанной композиции, за счет чего обеспечивается делеция экзона 52 из гена дистрофина человека, и отбор трансгенного эмбриона грызуна, у которого имеется делеция экзона 52 гена дистрофина человека, где эмбрион грызуна содержит нормальный ген дистрофина человека.

Настоящее изобретение также относится к трансгенному эмбриону грызуна, полученному с помощью вышеописанного способа.

Настоящее изобретение также относится к трансгенному грызуну, полученному из вышеописанного трансгенного эмбриона грызуна.

#### **Краткое описание графических материалов**

На фиг. 1 показана активность отдельных JCR89 и JCR91 gRNA, которые нацеливают ген дистрофина человека в клетках HEK293T (ген дистрофина дикого типа) и линии миобластов пациентов с DMD (DMD 8036 и DMD 6594, каждый из которых обладает мутантной формой гена дистрофина), определенной с помощью анализа Surveyor.

На фиг. 2A и 2B показана делеция экзона 51 в геномной ДНК клеток HEK293T и миобластах пациентов с DMD (DMD 8036 и DMD 6594) (фиг. 2A) и кДНК из миобластов миобластов пациентов с DMD (фиг. 2B) с помощью совместной обработки SaCas9, и gRNA JCR89, и JCR91.

На фиг. 3 показана система на основе AAV *in vivo* для совместной доставки SaCas9 и JCR89 и JCR91 gRNA в двух вирусных векторах к мышечным тканям.

На фиг. 4 показано выявление делеции экзона 51 человека у трансгенных мышей, несущих ген DMD человека (hDMD/mdx мышей), после местной доставки вирусных векторов AAV8, несущих SaCas9 и gRNA, в переднюю большеберцовую мышцу (ТА).

На фиг. 5 показано выявление делеции экзона 51 человека у трансгенных мышей, несущих ген hDMD, после системной доставки AAV8 с помощью инъекции в хвостовую вену.

На фиг. 6 показаны различные мишени gRNA, которые сохраняются между геномами человека и макака-резуса (см. последовательности gRNA в табл. 2). Расположение каждой gRNA указано по отношению к экзону 51 гена дистрофина человека.

На фиг. 7 показана активность отдельных gRNA после трансфекции клеток HEK293T человека, определенных с помощью анализа Surveyor.

На фиг. 8 показана специфичность кандидатных gRNA, предсказанных с применением программы CasOFFinder (Bae et al. (2014), *Bioinformatics*, 30: 1473-1475).

На фиг. 9 показана делеция экзона 51 с помощью JCR157 и JCR160 gRNA в клетках HEK293T и клетках DMD 6594, как определено с помощью ПЦР геномной ДНК.

На фиг. 10 показана активность, определенная с помощью Surveyor, различных целевых длин gRNA JCR157: 19, 20, 21, 22 и 23 нуклеотидов.

На фиг. 11 показана активность, определенная с помощью Surveyor, различных целевых длин gRNA JCR160: 19, 20, 21, 22 и 23 нуклеотидов.

На фиг. 12 показаны делеции, полученные путем объединения JCR157 и JCR160 различной длины (21, 22 или 23 нуклеотида), как определено с помощью ПЦР геномной ДНК.

На фиг. 13 показана целевая нуклеазная активность с помощью анализа Surveyor *in vitro*.

На фиг. 14 показана делеция экзона 51 в геномной ДНК *in vitro*.

На фиг. 15 показана делеция экзона 51 в кДНК миобластов DMD человека *in vitro*, дифференцированных в течение 7 дней.

На фиг. 16 показано соединение экзонов 47-52 в кДНК миобластов пациентов с DMD *in vitro*.

На фиг. 17 показана конструкция мышцы  $\Delta 52/mdx$  начиная со здоровой мышцы hDMD/mdx.

На фиг. 18 показана проверка соответствия направляющей последовательности *in vitro*: индивидуальная (анализ Surveyor).

На фиг. 19 показана проверка соответствия направляющей последовательности *in vitro*: парная, при этом делецию экзона 51 в геномной ДНК клеток HEK293T создавали с использованием пары gRNA.

На фиг. 20 показан схематический протокол для микроинъекций ДНК.

На фиг. 21 показано схематическое скрещивание мышей.

На фиг. 22 показаны результаты генотипирования мышей-основателей.

На фиг. 23 показана часть результатов секвенирования у мышей-основателей 7, 63 и 76.

На фиг. 24 показано схематическое дополнительное скрещивание мышей.

На фиг. 25 показано генотипирование помета 5 (только самцы) в результате скрещивания самца основателя 76+mdx/mdx. "63" представляет собой самца основателя (однако в данном случае не родителя). "293" представляет клетку HEK293T геномной контрольной ДНК.

На фиг. 26 показано генотипирование помета 1 в результате скрещивания самца основателя 63+mdx/mdx.

На фиг. 27 показана часть прочтения секвенирования размером 392 п.о. детенышей 54497 и 54498.

На фиг. 28 показано иммуногистохимическое окрашивание сердца и ТА из детенышей 54497 и 54498.

На фиг. 29 показано, что у мыши  $\Delta 52/mdx$  отсутствует белок дистрофин.

На фиг. 30 показан вестерн-блоттинг, указывающий на то, что у мыши  $\Delta 52/mdx$  отсутствует белок дистрофин, что согласуется с генотипом DMD, тогда как у здоровой мыши hDMD/mdx экспрессировался дистрофин.

На фиг. 31 показана общая активность мышцы  $\Delta 52/mdx$  по сравнению с мышцами  $mdx$  и мышцами  $hDMD/mdx$ , указанная на основании двигательной активности и осмотра.

На фиг. 32 показана стратегия коррекции мышцы  $\Delta 52/mdx$  с применением SaCas9 и gRNA для пропускa экзона 51 с помощью нацеливания gRNA выше и ниже экзона 51 в интронной области для удаления.

На фиг. 33 показано восстановление белка дистрофина *in vitro* из делеции экзона 51 в миообластах пациента с DMD (клетки DMD 6594) с применением SaCas9 и JCR179 и JCR183 gRNA.

На фиг. 34 показана схема эксперимента по обработке мышцы  $\Delta 52/mdx$  с применением gRNA и системы SaCas9.

На фиг. 35 показана делеция экзона 51 *in vivo* в правой ТА мышце.

На фиг. 36 показана делеция экзона 51 *in vivo* в правой ТА мышце.

На фиг. 37 показано восстановление белка дистрофина *in vivo* в обработанной ТА мышце.

На фиг. 38 показано восстановление белка дистрофина *in vivo* в обработанной ТА мышце.

На фиг. 39 показано среднее значение всех моментов времени для общего пройденного расстояния.

На фиг. 40 показано среднее значение всех моментов времени для общего количества поз со стоянием на задних лапах.

На фиг. 41 показана сила хватки 16-недельных необработанных и обработанных мышцей.

На фиг. 42 показаны результаты ПЦР кДНК сердечной ткани.

На фиг. 43 показано секвенирование кДНК, амплифицированной с помощью ПЦР, на основании полос из фиг. 42.

### Подробное описание изобретения

Описанные в данном документе определенные способы и сконструированные gRNA были раскрыты для того, чтобы быть полезными для систем редактирования генов на основе CRISPR/CRISPR-ассоциированной (Cas) 9 для изменения экспрессии, конструирования генома и коррекции или уменьшения эффектов мутаций в гене дистрофина, вовлеченном в генетические заболевания, например DMD. Раскрытые gRNA получали для целевых сайтов, которые больше поддаются переходу к клиническому применению. Например, ген, кодирующий Cas9 (SpCas9) *S. pyogenes*, слишком большой для доставки с помощью аденоассоциированного вируса (AAV), вектора, применяемого для системной доставки в мышцу, в случае если включены все другие необходимые регуляторные последовательности. Вместо этого раскрытые gRNA отбирали и подвергали скринингу для использования с Cas9 (SaCas9) *S. aureus*, который приблизительно на 1 т.о. меньше, чем SpCas9. Целевые отборы подвергали скринингу, для того чтобы быть совместимыми с мишенями SaCas9 в последовательностях, которые сохранялись между геномами человека и макаков-резусов, что значительно ограничивает количество возможных генных мишеней. Этот критерий отбора был выбран с тем, чтобы обеспечить возможность кандидатам gRNA, которые могут быть активными как у людей, так и у макаков-резусов, облегчить доклиническое тестирование на моделях приматов, отличных от человека. Раскрытые gRNA, которые нацеливаются на последовательности гена дистрофина как человека, так и макака-резуса, могут применяться с системой на основе CRISPR/Cas9 для нацеливания на интронные области вокруг экзона 51 гена дистрофина человека, вызывающая геномные делеции этой области, для восстановления экспрессии функционального дистрофина в клетках от пациентов с DMD.

Также в данном документе описаны генетические конструкции, композиции и способы доставки систем редактирования генов на основе CRISPR/Cas9 и множество gRNA для нацеливания на ген дистрофина. Раскрытый в настоящем изобретении объект изобретения также предусматривает способы доставки генетических конструкций (например, векторов) или содержащих их композиций в скелетную мышцу и сердечную мышцу. Вектор может представлять собой AAV, в том числе модифицированные векторы на основе AAV. Раскрытый в настоящем изобретении объект изобретения описывает способ доставки активных форм лекарственных средств данного класса в скелетную мышцу и сердечную мышцу, которые являются эффективными, действенными и способствуют успешной модификации генома, а также обеспечивает средства для исправления генома человека для терапевтических применений и целевых модельных видов для фундаментальных научных применений.

Заголовки разделов, используемые в данном разделе, и полное раскрытие данного документа представлены просто для организационных целей и не подразумеваются как ограничивающие.

#### 1. Определения.

Если не определено иное, то все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют такое же значение, как обычно понятно специалисту в данной области техники. В случае противоречий преимущественную силу будет иметь данный документ, содержащий определения. Предпочтительные способы и материалы описаны ниже, хотя при практическом осуществлении или тестировании настоящего изобретения можно использовать способы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным в данном документе. Все публикации, заявки на патенты, патенты и другие ссылаемые материалы, упомянутые в данном документе, включены посредством ссылки во всей своей полноте. Материалы, способы и примеры, раскрытые в данном документе, являются лишь иллюстративными и не

подразумеваются как ограничивающие.

Подразумевается, что термины "содержат(ит)", "в том числе", "имеющий", "имеет", "может", "включает(ют)" и их варианты, используемые в данном документе, являются открытыми переходными фразами, терминами или словами, которые не исключают возможность наличия дополнительных действий или структур. Формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если контекст явно не указывает на иное. Настоящее изобретение также охватывает другие варианты осуществления, "содержащие" варианты осуществления или элементы, представленные в данном документе, "состоящие из" них и "фактически состоящие из" них, независимо от того, изложены они явным образом или нет.

При упоминании в данном документе числовых диапазонов каждое промежуточное число в них охватывается явным образом с той же степенью точности. Например, в случае диапазона 6-9 в дополнение к 6 и 9 охватываются числа 7 и 8, а в случае диапазона 6,0-7,0 явным образом охватываются числа 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 и 7,0.

Используемый в данном документе термин "приблизительно" или "примерно" означает допустимый диапазон ошибок для конкретного уровня, определенного специалистом в данной области техники, который частично будет зависеть от того, как измеряют или определяют уровень, т.е. ограничений в системе измерения. Например, "приблизительно" может означать 3 или более 3 стандартных отклонений в соответствии с практикой в данной области техники. В качестве альтернативы "приблизительно" может означать диапазон до 20%, предпочтительно до 10%, более предпочтительно до 5% и более предпочтительно до 1% от данного уровня. В качестве альтернативы, в частности, в соответствии с биологическими системами или процессами термин может означать в пределах одного порядка величины предпочтительно в 5 раз и более предпочтительно в 2 раза от значения.

Термины "аденоассоциированный вирус" или "AAV", используемые в данном документе взаимозаменяемо, относятся к небольшому вирусу, принадлежащему к роду *Dependovirus* семейства *Parvoviridae*, который инфицирует людей и некоторые другие виды приматов. В настоящее время AAV не вызывает болезни, а следовательно вирус вызывает очень умеренный иммунный ответ.

Используемый в данном документе термин "область связывания" относится к области в целевой области для нуклеазы, которая распознается и связывается нуклеазой.

Термины "сердечная мышца" или "мышца сердца", используемые в данном документе взаимозаменяемо, означают тип рефлексивной поперечно-полосатой мышцы, обнаруженной в стенках и гистологической основе сердца - миокарде. Сердечная мышца состоит из кардиомиоцитов или миокардиоцитов. Миокардиоциты демонстрируют полосатость, сходную с таковой в скелетных мышечных клетках, однако содержат лишь одно уникальное ядро в отличие от многоядерных скелетных мышц. В определенных вариантах осуществления термин "состояние сердечной мышцы" относится к состоянию, связанному с сердечной мышцей, такому как кардиомиопатия, сердечная недостаточность, аритмия и воспалительная болезнь сердца.

Используемый в данном документе термин "кодирующая последовательность" или "кодирующая нуклеиновая кислота" означает нуклеиновые кислоты (молекулу РНК или ДНК), которые содержат нуклеотидную последовательность, кодирующую белок. Кодированная последовательность может дополнительно включать в себя сигналы инициации и терминации, функционально связанные с регуляторными элементами, в том числе промотор и сигнал полиаденилирования, способные управлять экспрессией в клетках индивидуума или млекопитающего, которому вводят нуклеиновую кислоту. Кодированная последовательность может являться кодон-оптимизированной.

Используемый в данном документе термин "комплементарная последовательность" или "комплементарный" означает, что нуклеиновая кислота может образовывать пары оснований согласно Уотсону-Крику (например, А-Т/У и С-Г) или Хугстону между нуклеотидами или нуклеотидными аналогами молекул нуклеиновых кислот. Термин "комплементарность" относится к свойству, разделяемому двумя последовательностями нуклеиновой кислоты, за счет которого, в случае если они выровнены антипараллельно друг другу, нуклеотидные основания в каждом положении будут комплементарными.

Термины "коррекция", "редактирование генома" и "восстановление", используемые в данном документе, относятся к изменению мутантного гена, который кодирует усеченный белок или вообще не кодирует какой-либо белок, за счет чего достигается экспрессия полноразмерного функционального или частично полноразмерного функционального белка. Коррекция или восстановление мутантного гена может предусматривать замену области гена, в которой имеется мутация, или замену всего мутантного гена копией гена, в которой мутация отсутствует, с помощью механизма репарации, такого как репарация с участием гомологичной рекомбинации (HDR). Коррекция или восстановление мутантного гена может также предусматривать репарацию мутации со сдвигом рамки, которая является причиной преждевременного стоп-кодона, абберрантного сайта акцептора сплайсинга или абберрантного сайта донора сплайсинга, путем создания двухнитевого разрыва в гене, который затем репарируют с использованием негомологичного соединения концов (NHEJ). За счет NHEJ может добавляться или удаляться по меньшей мере одна пара оснований в ходе репарации, что может восстанавливать соответствующую рамку считывания и устранять преждевременный стоп-кодон. Коррекция или восстановление мутантного гена также

может предусматривать разрушение аберрантного сайта акцептора сплайсинга или последовательности донора сплайсинга. Коррекция или восстановление мутантного гена может также предусматривать удаление сегмента гена, не являющегося существенно важным, путем одновременного воздействия двух нуклеаз на одну и ту же нить ДНК, для того чтобы восстановить соответствующую рамку считывания путем удаления ДНК между двумя сайтами-мишенями для нуклеаз и репарации разрыва ДНК с помощью NHEJ.

Термины "донорная ДНК", "донорная матрица" и "матрица репарации", используемые в данном документе взаимозаменяемо, относятся к фрагменту или молекуле двухнитевой ДНК, которая включает в себя по меньшей мере часть представляющего интерес гена. Донорная ДНК может кодировать полнофункциональный белок или частично функциональный белок.

Термин "мышечная дистрофия Дюшенна" или "DMD", используемый в данном документе взаимозаменяемо, относится к рецессивному, фатальному, X-сцепленному нарушению, которое приводит к дегенерации мышц и впоследствии смертельному исходу. DMD является распространенным наследственным моногенным заболеванием и встречается у 1 из 3500 мужчин. DMD является результатом врожденных или спонтанных мутаций, которые вызывают нонсенс-мутации или мутации со сдвигом рамки в гене дистрофина. Большинство мутаций дистрофина, которые являются причиной DMD, представляют собой делеции экзонов, которые разрушают рамку считывания и приводят к преждевременной терминации трансляции в гене дистрофина. Пациенты с DMD обычно теряют способность физически поддерживать себя на протяжении детства, постепенно становятся слабее в подростковом возрасте и умирают в возрасте от двадцати до тридцати лет.

Используемый в данном документе термин "дистрофин" относится к стержнеобразному цитоплазматическому белку, который является частью белкового комплекса, соединяющего цитоскелет мышечного волокна с окружающим внеклеточным матриксом через клеточную мембрану. Дистрофин обеспечивает структурную стабильность дистрогликанового комплекса клеточной мембраны, который отвечает за регуляцию целостности и функции мышечных клеток. Ген дистрофина или "ген DMD", используемые в данном документе взаимозаменяемо, образован 2,2 млн пар оснований в локусе Xp21. Размер первичного транскрипта составляет приблизительно 2400 т.о., при этом размер зрелой mRNA составляет приблизительно 14 т.о. 79 экзонов кодируют белок, образованный более чем 3500 аминокислотами.

Термин "экзон 51", используемый в данном документе, относится к 51-му экзону гена дистрофина. Экзон 51 у пациентов с DMD часто является смежным с положениями делеций, разрушающих рамку считывания, и в клинических испытаниях на него был направлен пропуск экзона, основанный на применении олигонуклеотидов. Недавно в клиническом испытании с пропуском экзона 51 с помощью соединения этерлипсена сообщалось о значительном положительном функциональном эффекте в течение 48 недель со средним количеством дистрофин-положительных волокон 47% по сравнению с исходным уровнем. Мутации в экзоне 51 идеально подходят для устойчивой коррекции посредством редактирования генома на основе NHEJ.

Термины "сдвиг рамки" или "мутация сдвига рамки", используемые в данном документе взаимозаменяемо, относятся к типу мутации гена, при которой добавление или делеция одного или нескольких нуклеотидов вызывает сдвиг в рамке считывания кодонов в mRNA. Сдвиг в рамке считывания может привести к изменению аминокислотной последовательности при трансляции белка, такой как миссенс-мутация или преждевременный стоп-кодон.

Термины "функциональный" и "полнофункциональный", используемые в данном документе взаимозаменяемо, описывают белок, который обладает биологической активностью. Термин "функциональный ген" относится к гену, транскрибируемому в mRNA, которая подвергается трансляции в функциональный белок.

Термин "слитый белок", используемый в данном документе, относится к химерному белку, созданному путем соединения двух или более генов, которые исходно кодировали отдельные белки. Трансляция гибридного гена приводит к получению одного полипептида с функциональными свойствами, полученными от каждого из исходных белков.

Термин "генетическая конструкция", используемый в данном документе, относится к молекулам ДНК или РНК, которые содержат нуклеотидную последовательность, кодирующую белок. Кодированная последовательность включает в себя сигналы инициации и терминации, функционально связанные с регуляторными элементами, в том числе промотор и сигнал полиаденилирования, способные управлять экспрессией в клетках индивидуума, которому вводят молекулу нуклеиновой кислоты. Используемый в данном документе термин "экспрессируемая форма" относится к генным конструкциям, которые содержат необходимые регуляторные элементы, функционально связанные с кодирующей последовательностью, которая кодирует белок, за счет чего, в случае если он присутствует в клетке индивидуума, кодирующая последовательность будет экспрессироваться.

Используемый в данном документе термин "генетическое заболевание" относится к заболеванию, частично или полностью, непосредственно или косвенно вызванному одним или несколькими нарушениями в геноме, особенно к состоянию, которое присутствует от рождения. Нарушение может являться мутацией, вставкой или делецией. Нарушение может влиять на кодирующую последовательность гена

или его регуляторную последовательность. Генетическое заболевание может представлять собой без ограничения DMD, мышечную дистрофию Беккера (BMD), гемофилию, кистозный фиброз, хорею Гантингтона, семейную гиперхолестеринемия (дефект рецептора LDL), гепатобластому, болезнь Вилсона, врожденную печеночную порфирию, наследственные нарушения обменных процессов в печени, синдром Леша-Нихана, серповидно-клеточную анемию, талассемию, пигментную ксеродермию, анемию Фанкони, пигментный ретинит, атаксию телеангиэктазию, синдром Блума, ретинобластому и болезнь Тай-Сакса.

Термин "репарация с участием гомологичной рекомбинации" или "HDR", используемый в данном документе взаимозаменяемо, относится к механизму в клетках для репарации двухнитевых повреждений ДНК, в случае если в ядре присутствует гомологичная часть ДНК, в основном в фазах G2 и S клеточного цикла. В HDR используется матрица донорной ДНК для управления репарацией, и ее можно использовать для создания специфических изменений последовательности в геноме, включая целенаправленное добавление целых генов. Если донорная матрица предоставляется вместе с системой редактирования генов на основе CRISPR/Cas9, то клеточный аппарат осуществляет репарацию разрыва путем гомологичной рекомбинации, которая усиливается на несколько порядков в присутствии расщепления ДНК. В случае если фрагмент гомологичной ДНК отсутствует, вместо этого может происходить негомологичное соединение концов.

Термин "редактирование генома", используемый в данном документе, относится к изменению гена. Редактирование генома может предусматривать коррекцию или восстановление мутантного гена. Редактирование генома может предусматривать нокаут гена, такого как мутантный ген или нормальный ген. Редактирование генома можно использовать для лечения заболеваний или улучшения восстановления мышц путем изменения представляющего интерес гена.

Термины "идентичный" или "идентичность", используемые в данном документе в контексте двух или более нуклеиновых кислот или полипептидных последовательностей, означают, что последовательности имеют определенный процент остатков, которые являются идентичными в указанной области. Процент может быть рассчитан путем оптимального выравнивания двух последовательностей, сравнения двух последовательностей в указанной области, определения количества положений, в которых одинаковый остаток встречается в обеих последовательностях, с получением количества совпадающих положений, разделяя количество совпадающих положений на общее количество положений в указанной области и умножая результат на 100, чтобы получить процент идентичности последовательности. В случаях если две последовательности имеют разную длину или выравнивание дает в результате одну или несколько ступеней в шахматном порядке, а указанная область сравнения включает в себя только одну последовательность, при расчете эти остатки одной последовательности включаются в знаменатель, но не в числитель. При сравнении ДНК и РНК тимин (Т) и урацил (U) можно считать эквивалентом. Идентификацию можно осуществлять вручную или с использованием компьютерного алгоритма для работы с последовательностями, такого как BLAST или BLAST 2.0.

Термины "мутантный ген" или "мутированный ген", используемые в данном документе взаимозаменяемо, относятся к гену, который был подвергнут выявляемой мутации. Мутантный ген подвергся изменению, такому как потеря, получение или обмен генетического материала, что влияет на нормальную передачу и экспрессию гена. Термин "разрушенный ген", используемый в данном документе, относится к мутантному гену, в котором имеется мутация, являющаяся причиной преждевременного стоп-кодона. Продукт разрушенного гена усечен по сравнению с продуктом полноразмерного неразрушенного гена.

Термин "путь негомологичного соединения концов (NHEJ)", используемый в данном документе, относится к пути репарации двухнитевых разрывов ДНК путем прямого лигирования концов разрыва без необходимости в гомологичной матрице. Независимое от матрицы повторное лигирование концов ДНК с помощью NHEJ представляет собой стохастический, подверженный ошибкам процесс репарации, который вводит случайные микровставки и микроделеции (вставки-делеции) в точке разрыва ДНК. Данный способ можно использовать для намеренного разрушения, делеции или изменения рамки считывания последовательностей целевых генов. Для управления репарацией в NHEJ обычно используются короткие гомологичные последовательности ДНК, называемые микрогомологиями. Эти микрогомологии часто присутствуют в одонитевых липких концах на конце двухнитевых разрывов. В случае если липкие концы идеально совместимы, то NHEJ обычно репарирует разрыв точно, однако может иметь место неточная репарация, приводящая к потере нуклеотидов, однако гораздо более часто липкие концы несовместимы.

Используемый в данном документе термин "нормальный ген" относится к гену, который не подвергался изменениям, таким как потеря, получение или обмен генетического материала. Нормальный ген подвергается нормальной передаче генов и экспрессии генов.

Термин "опосредованный нуклеазой NHEJ", используемый в данном документе, относится к NHEJ, который инициируется после того, как нуклеаза, такая как молекула Cas9, разрезает двухнитевую ДНК.

Используемые в данном документе термины "нуклеиновая кислота", или "олигонуклеотид", или "полинуклеотид" означают по меньшей мере два нуклеотида, ковалентно связанных друг с другом. Изображение одиночной нити также определяет последовательность комплементарной нити. Таким образом,

нуклеиновая кислота также охватывает комплементарную нить изображенной одиночной нити. Множество вариантов нуклеиновой кислоты можно использовать для той же цели, что и указанную нуклеиновую кислоту. Таким образом, нуклеиновая кислота также охватывает практически идентичные нуклеиновые кислоты и их комплементарные нити. Одиночная нить обеспечивает зонд, который может гибридизоваться с целевой последовательностью в жестких условиях гибридизации. Таким образом, нуклеиновая кислота также охватывает зонд, который гибридизуется в жестких условиях гибридизации.

Нуклеиновая кислота может быть одонитевой или двухнитевой или может содержать части как двухнитевой, так и одонитевой последовательности. Нуклеиновая кислота может представлять собой ДНК, как геномную, так и кДНК, РНК или гибридную молекулу, где нуклеиновая кислота может содержать комбинации дезоксирибо- и рибонуклеотидов, при этом комбинации оснований включают урацил, аденин, тимин, цитозин, гуанин, инозин, ксантин, гипоксантин, изоцитозин и изогуанин. Нуклеиновые кислоты можно получать с помощью способов химического синтеза или с помощью рекомбинантных способов.

Используемый в данном документе термин "функционально связанный" означает, что экспрессия гена находится под контролем промотора, с которым он пространственно соединен. Промотор может располагаться 5'-конце (выше) или 3'-конце (ниже) относительно гена под его контролем. Расстояние между промотором и геном может быть приблизительно таким же, как и расстояние между тем промотором и геном, который он контролирует, в гене, из которого получен промотор. Как известно из уровня техники, изменение этого расстояния может быть осуществлено без потери промоторной функции.

Термин "частично функциональный", используемый в данном документе, описывает белок, который кодируется мутантным геном и характеризуется меньшей биологической активностью, чем функциональный белок, но большей, чем нефункциональный белок.

Термин "преждевременный стоп-кодон" или "стоп-кодон вне рамки", используемый в данном документе взаимозаменяемо, относится к нонсенс-мутации в последовательности ДНК, которая является причиной стоп-кодона в месте, которое обычно не обнаруживается в гене дикого типа. Преждевременный стоп-кодон может приводить к усечению или укорочению белка по сравнению с полноразмерной версией белка.

Используемый в данном документе термин "промотор" означает молекулу синтетического или природного происхождения, которая способна обеспечивать, активировать или усиливать экспрессию нуклеиновой кислоты в клетке. Промотор может содержать одну или несколько специфических последовательностей регуляции транскрипции для дополнительного усиления экспрессии и/или для изменения пространственной экспрессии и/или временной экспрессии. Промотор может также содержать дистальные энхансерные или репрессорные элементы, которые могут располагаться в нескольких тысячах пар оснований от сайта инициации транскрипции. Промотор может быть получен из источников, в том числе вирусов, бактерий, грибов, растений, насекомых и животных. Промотор может регулировать экспрессию генетического компонента конститутивно или дифференциально с учетом клетки, ткани или органа, в которых происходит экспрессия, или с учетом стадии развития, на которой происходит экспрессия, или в ответ на внешние раздражители, такие как физиологические стрессы, патогены, ионы металлов или индуцирующие средства. Типичные примеры промоторов включают промотор бактериофага T7, промотор бактериофага T3, промотор SP6, промотор лактозного оперона, промотор tac, поздний промотор SV40, ранний промотор SV40, промотор RSV-LTR, промотор IE CMV, ранний промотор SV40 или поздний промотор SV40, промотор человека U6 (hU6) и промотор IE CMV.

Термин "скелетная мышца", используемый в данном документе, относится к типу поперечно-полосатой мышцы, которая находится под контролем соматической нервной системы и прикреплена к костям пучками коллагеновых волокон, известных как сухожилия. Скелетная мышца состоит из отдельных компонентов, известных как миоциты или "мышечные клетки", иногда в разговорной речи называемые "мышечными волокнами". Миоциты образуются в результате слияния развивающихся миобластов (тип эмбриональной клетки-предшественника, из которой возникает мышечная клетка) в процессе, известном как миогенез. Эти длинные цилиндрические многоядерные клетки также называются мышечными волокнами.

Термин "состояние скелетных мышц", используемый в данном документе, относится к состоянию, связанному со скелетной мышцей, как например: мышечные дистрофии, старение, дегенерация мышц, заживление ран и мышечная слабость или атрофия.

Термины "субъект" и "пациент", используемые в данном документе взаимозаменяемо, относятся к любому позвоночному животному, в том числе без ограничения млекопитающему (например, корове, свинье, верблюду, ламе, лошади, козе, кролику, овце, хомякам, морской свинке, кошке, собаке, крысе и мышши, приматам, не относящимся к человеку (например, обезьяне, такой как яванский макак или макак-резус, шимпанзе и т.д.), а также человеку). В некоторых вариантах осуществления субъект может являться человеком или не являться человеком. Субъекта или пациента можно подвергать другим формам лечения.

Термин "ген-мишень", используемый в данном документе, относится к любой нуклеотидной последовательности, кодирующей известный или предполагаемый генный продукт. Ген-мишень может пред-

ставлять собой мутированный ген, вовлеченный в генетическое заболевание. В определенных вариантах осуществления ген-мишень представляет собой ген дистрофина человека. В определенных вариантах осуществления ген-мишень представляет собой мутантный ген дистрофина человека.

Термин "целевая область", используемый в данном документе, относится к области гена-мишени, для которой сконструирована система редактирования генов на основе CRISPR/Cas9 для связывания и расщепления.

Используемый в данном документе термин "трансген" относится к гену или генетическому материалу, содержащему последовательность гена, которая была выделена из одного организма и введена в другой отличающийся организм. Этот ненативный сегмент ДНК может сохранять способность продуцировать РНК или белок в трансгенном организме или может изменять нормальную функцию генетического кода трансгенного организма. Введение трансгена может изменить фенотип организма.

Термин "вариант", используемый в данном документе в отношении нуклеиновой кислоты, означает

- (i) часть или фрагмент эталонной нуклеотидной последовательности;
- (ii) последовательность, комплементарную эталонной нуклеотидной последовательности или ее части;
- (iii) нуклеиновую кислоту, которая практически идентична эталонной нуклеиновой кислоте или комплементарной ей последовательности; или
- (iv) нуклеиновую кислоту, которая гибридизуется в жестких условиях с эталонной нуклеиновой кислотой, комплементарной ей последовательностью или последовательностями, практически идентичными им.

"Вариант" в отношении пептида или полипептида за счет вставки, делеции или консервативной замены аминокислот отличается по аминокислотной последовательности, однако сохраняет по меньшей мере один тип биологической активности. Вариант также может означать белок с аминокислотной последовательностью, которая практически идентична аминокислотной последовательности эталонного белка, который сохраняет по меньшей мере один тип биологической активности. В данной области техники признается, что консервативная замена аминокислоты, т.е. замена аминокислоты на другую аминокислоту с аналогичными свойствами (например, гидрофильностью, относительным количеством и распределением заряженных областей), обычно предусматривает незначительное изменение. Эти незначительные изменения можно частично идентифицировать, учитывая индекс гидропатичности аминокислот, как это понимается в данной области техники. Kyte et al., *J. Mol. Biol.*, 157: 105-132 (1982). Индекс гидропатичности аминокислоты определяется с учетом гидрофобности и заряда. Из уровня техники известно, что аминокислоты с аналогичными индексами гидропатичности можно заменять, при этом функция белка по-прежнему будет сохраняться. В одном аспекте заменяют аминокислоты с индексами гидропатичности, составляющими  $\pm 2$ . Гидрофобность аминокислот также можно использовать для выявления замен, которые в результате будут давать белки, сохраняющие биологическую функцию. Учет гидрофильности аминокислот в контексте пептида позволяет рассчитывать наибольшую локальную усредненную гидрофильность этого пептида. Замены можно осуществлять с аминокислотами, у которых различие значений гидрофильности находится в пределах  $\pm 2$ . Как на индекс гидрофобности, так и на значение гидрофильности аминокислот влияет определенная боковая цепь этой аминокислоты. В соответствии с этим наблюдением совместимость аминокислотных замен с биологической функцией зависит от относительного сходства аминокислот и, в частности, боковых цепей этих аминокислот, что выявляют на основе гидрофобности, гидрофильности, заряда, размера и других свойств.

Термин "вектор", используемый в данном документе, означает последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую точку начала репликации. Вектор может представлять собой вирусный вектор, бактериофаг, бактериальную искусственную хромосому или искусственную хромосому дрожжей. Вектор может представлять собой ДНК- или РНК-вектор. Вектор может представлять собой самореплицирующийся внехромосомный вектор, и предпочтительно представляет собой плазмидную ДНК. Например, вектор может кодировать белок Cas9 и по меньшей мере одну молекулу gRNA, такую как gRNA, содержащую нацеливающий домен под любой из SEQ ID NO: 1-19, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, или комплементарной ей последовательности. В некоторых вариантах осуществления белок Cas9 может характеризоваться аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 33 или SEQ ID NO: 45. В некоторых вариантах осуществления белок Cas9 может представлять собой Cas9 *S. aureus*, такой как Sa-Cas9 с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 33 или SEQ ID NO: 45. В некоторых вариантах осуществления белок Cas9 кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеиновую последовательность под SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 43 или SEQ ID NO: 44.

Если не указано иное, то научные и технические термины, используемые применительно к настоящему изобретению, должны иметь значения, которые обычно понимаются специалистами в данной области техники. Например, любые цифровые или словесные обозначения на иллюстрациях и методики, используемые применительно к клеточной и тканевой культуре, молекулярной биологии, иммунологии, микробиологии, генетике, химии и гибридизации белка и нуклеиновых кислот, описанные в данном до-

кументе, являются такими, которые хорошо известны и обычно используются в данной области техники. Смысл и объем терминов должны быть четкими и понятными; однако в случае любой скрытой двусмысленности определения, представленные в данном документе, превалируют над любым словарным или внешним определением. Кроме того, если иное не требуется по контексту, термины единственного числа включают множественное число, а термины множественного числа включают единственное число.

## 2. Генетические конструкции для редактирования гена дистрофина в геноме.

Настоящее изобретение направлено на генетические конструкции для редактирования генома, геномной перестройки или изменения экспрессии гена дистрофина (например, гена дистрофина человека). Генетические конструкции включают в себя по меньшей мере одну gRNA, которая нацеливается на последовательности гена дистрофина как человека, так и макака-резуса, такие как совместимые мишени SaCas9. Раскрытые gRNA могут включаться в систему редактирования генов на основе CRISPR/Cas9, в том числе системы, в которых применяется SaCas9, для нацеливания на интронные области вокруг экзона 51 гена дистрофина человека, вызывая геномные делеции этой области, для восстановления экспрессии функционального дистрофина в клетках от пациентов с DMD.

### а. Ген дистрофина.

Термин "дистрофин" представляет собой стержнеобразный цитоплазматический белок, который является частью белкового комплекса, соединяющего цитоскелет мышечного волокна с окружающим внеклеточным матриксом через клеточную мембрану. Дистрофин обеспечивает структурную стабильность дистрогликанового комплекса клеточной мембраны. Ген дистрофина образован 2,2 млн пар оснований в локусе Xp21. Размер первичного транскрипта составляет приблизительно 2400 т.о., при этом размер зрелой mRNA составляет приблизительно 14 т.о. 79 экзонов кодируют белок, образованный более чем 3500 аминокислотами. Нормальная скелетная мышечная ткань содержит лишь небольшое количество дистрофина, однако отсутствие его нормальной экспрессии приводит к развитию тяжелых и неизлечимых симптомов. Некоторые мутации в гене дистрофина приводят к образованию неполноценного дистрофина и тяжелому дистрофическому фенотипу у пораженных пациентов. Некоторые мутации в гене дистрофина приводят к образованию полнофункционального белка дистрофина и проявлению более мягкого дистрофического фенотипа у пораженных пациентов.

DMD является результатом врожденных или спонтанных мутаций, которые вызывают нонсенс-мутации или мутации со сдвигом рамки в гене дистрофина. Встречающиеся в природе мутации и их последствия относительно хорошо понятны в случае DMD. Известно, что делеции внутри рамки, которые происходят в областях экзонов 45-55 (например, экзона 51), содержащихся в пределах стержневого домена, могут обеспечивать образование высокофункциональных белков дистрофина, и многие носители являются бессимптомными или проявляют слабо выраженные симптомы. Более того, более 60% пациентов могут теоретически лечиться путем нацеливания на экзоны в данной области гена дистрофина (например, нацеливания на экзон 51). Усилия были предприняты для того, чтобы восстановить рамку считывания нарушенного дистрофина у пациентов с DMD посредством пропуска несущего(их) важного(ых) экзона(ов) (например, пропуск экзона 51) через сплайсинг mRNA с получением делетированных внутри, однако функциональных белков дистрофина. Делеция внутреннего(их) экзона(ов) дистрофина (например, делеция экзона 51) сохраняет соответствующую рамку считывания, однако обуславливает менее тяжелое проявление мышечной дистрофии Беккера или BMD. Генотип при мышечной дистрофии Беккера или BMD сходный с DMD в том, что делеции присутствуют в гене дистрофина. Однако эти делеции оставляют рамку считывания интактной. Таким образом, создается внутренне усеченный, однако частично функциональный белок дистрофина. BMD характеризуется широким спектром фенотипов, однако часто, если делеции находятся между экзонами 45-55 дистрофина, фенотип намного мягче по сравнению с DMD. Таким образом, изменение генотипа DMD на генотип BMD является распространенной стратегией для коррекции дистрофина. Существует много стратегий для коррекции дистрофина, многие из которых полагаются на восстановление рамки считывания эндогенного дистрофина. Это обеспечивает изменение генотипа заболевания от DMD до мышечной дистрофии Беккера. У многих пациентов с BMD имеются внутригенные делеции, которые сохраняют трансляционную рамку считывания, что приводит к образованию более короткого, однако в большинстве случаев функционального, белка дистрофина.

В определенных вариантах осуществления модификация экзона 51 (например, делеция или удаление экзона 51, например с помощью NHEJ) для восстановления рамки считывания ослабляет проявление фенотипа у субъектов с DMD, включая субъектов с DMD с мутациями в виде делеции. В определенных вариантах осуществления экзон 51 гена дистрофина относится к 51-му экзону гена дистрофина. Экзон 51 у пациентов с DMD часто является смежным с положениями делеций, разрушающих рамку считывания, и в клинических испытаниях на него был направлен пропуск экзона, основанный на применении олигонуклеотидов. В клиническом испытании с пропуском экзона 51 с помощью соединения этерлипсена сообщалось о значительном положительном функциональном эффекте в течение 48 недель со средним количеством дистрофин-положительных волокон, составляющим 47% по сравнению с исходным уровнем. Мутации в экзоне 51 идеально подходят для устойчивой коррекции посредством редактирования генома на основе NHEJ.

Раскрытые в настоящем изобретении векторы могут образовывать делеции в гене дистрофина, на-

пример гене дистрофина человека. В определенных вариантах осуществления вектор сконструирован с возможностью образования двух двухнитевых разрывов (первый двухнитевой разрыв и второй двухнитевой разрыв) в двух интронах (первом интроне и втором интроне) фланкирующих ген дистрофина, за счет чего обеспечивается делеция сегмента гена дистрофина, содержащего целевое положение. "Целевое положение дистрофина" может представлять собой экзонное целевое положение дистрофина или внутриэкзонное целевое положение дистрофина, как описано в данном документе. Делеция экзонного целевого положения дистрофина может обеспечить оптимизацию последовательности дистрофина у субъекта, страдающего от мышечной дистрофии Дюшенна, например она может улучшить действие или активность кодируемого белка дистрофина или привести к улучшению состояния заболевания у субъекта. В определенных вариантах осуществления удаление экзонного целевого положения дистрофина восстанавливает рамку считывания. Экзонное целевое положение дистрофина может содержать один или несколько экзонов гена дистрофина. В определенных вариантах осуществления целевое положение дистрофина содержит экзон 51 гена дистрофина (например, гена дистрофина человека).

Раскрытая в настоящем изобретении генетическая конструкция (например, вектор) может опосредовать высокоэффективное редактирование генов в экзоне 51 гена дистрофина (например, гена дистрофина человека). Раскрытая в настоящем изобретении генетическая конструкция (например, вектор) восстанавливает экспрессию белка дистрофина в клетках пациентов с DMD.

Экзон 51 у пациентов с DMD часто является смежным с положениями делеций, разрушающих рамку считывания. Элиминация экзона 51 из транскрипта дистрофина с помощью пропуска экзона может использоваться для лечения примерно 15% из всех пациентов с DMD. Данный класс мутаций дистрофина идеально подходит для устойчивой коррекции с помощью редактирования генома на основе NHEJ и HDR. Генетические конструкции (например, векторы), описанные в данном документе, разрабатывались для целенаправленной модификации экзона 51 в гене дистрофина человека. Раскрытая в настоящем изобретении генетическая конструкция (например, вектор) трансфицируется в клетки DMD человека и опосредует действенную модификацию генов и превращение в соответствующую рамку считывания. Восстановление белка сопутствует восстановлению рамки и обнаруживается в крупной популяции клеток, обработанных системой редактирования генов на основе CRISPR/Cas9.

#### b. Система CRISPR.

Раскрытая в настоящем изобретении генетическая конструкция (например, вектор) кодируется системой редактирования генов на основе CRISPR/Cas9, специфичной в отношении гена дистрофина (например, гену дистрофина человека). "Короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами" и "CRISPR", используемые в данном документе взаимозаменяемо, относятся к локусам, содержащим множественные короткие прямые повторы, которые встречаются в геномах примерно 40% секвенированных бактерий и 90% секвенированных архей. Система CRISPR представляет собой нуклеазную систему микроорганизмов, вовлеченную в защиту от встраивающихся фагов и плазмид, что обеспечивает форму приобретенного иммунитета. Локусы CRISPR в микробных хозяевах содержат комбинацию CRISPR-ассоциированных (Cas) генов, а также элементов некодирующей РНК, способных программировать специфичность CRISPR-опосредованного расщепления нуклеиновой кислоты. Короткие сегменты чужеродной ДНК, называемые спейсерами, включаются в состав генома между повторами CRISPR и служат в качестве "памяти" о прошлых воздействиях. Cas9 образует комплекс с 3'-концом sgRNA (также взаимозаменяемо называемой в данном документе как "gRNA"), и пара белок-РНК распознает свою геномную мишень посредством комплементарного спаривания оснований между 5'-концом последовательности sgRNA и предварительно определенной последовательностью ДНК размером 20 п.о., известной как протоспейсер. Этот комплекс направлен на гомологичные локусы патогенной ДНК через области, кодируемые в crRNA, т.е. протоспейсеры и мотивы, смежные с протоспейсером (PAM), в патогенном геноме. Некодирующая матрица CRISPR транскрибируется и расщепляется в пределах прямых повторов на короткие crRNA, содержащие отдельные спейсерные последовательности, которые направляют Cas-нуклеазы на целевой сайт (протоспейсер). Путем простого обмена последовательности распознавания размером 20 п.о. экспрессированной sgRNA, нуклеазу Cas9 можно направлять на новые мишени в геноме. Спейсеры CRISPR используются для распознавания и сайленсинга экзогенных генетических элементов с помощью способа, аналогичного RNAi у эукариотических организмов.

Известны три класса систем CRISPR (эффektorные системы типов I, II и III). Эффektorная система типа II осуществляет двухнитевой разрыв в целевой ДНК на четырех последовательных стадиях с использованием одного эффektorного фермента Cas9 для расщепления dsDNA. По сравнению с эффektorными системами типа I и типа III, для которых требуется несколько различных эффektorов, действующих как комплекс, эффektorная система типа II может функционировать в альтернативной среде, такой как эукариотические клетки. Эффektorная система типа II состоит из длинной pre-crRNA, которая транскрибируется из спейсер-содержащего локуса CRISPR, белка Cas9 и tracrRNA, которая участвует в процессинге pre-crRNA. При этом tracrRNA гибридизуется с областями повторов, разделяющими спейсеры pre-crRNA, инициируя тем самым расщепление dsRNA с помощью эндогенной РНКазы III. Это расщепление сопровождается вторым событием расщепления внутри каждого спейсера Cas9, производя зрелые crRNA, которые остаются связанными с tracrRNA и Cas9, образуя комплекс Cas9:crRNA-tracrRNA.

Комплекс Cas9:crRNA-tracrRNA раскручивает ДНК-дуплекс и ищет последовательности для расщепления, соответствующие crRNA. Распознавание мишени происходит при выявлении комплементарности между последовательностью "протоспейсера" в последовательности целевой ДНК и оставшейся слейсерной последовательности в crRNA. Cas9 опосредует расщепление целевой ДНК, если на 3'-конце протоспейсера также присутствует мотив, смежный с протоспейсером (PAM). Для нацеливания на протоспейсер последовательность должна непосредственно сопровождаться мотивом, смежным с протоспейсером (PAM), короткой последовательностью, распознаваемой нуклеазой Cas9, которая требуется для расщепления ДНК. Различные системы типа II имеют разные требования к PAM. Система CRISPR из *S. pyogenes* может содержать последовательность PAM для этой Cas9 (SpCas9) в виде 5'-NRG-3', где R представляет собой либо A, либо G, и характеризующей специфичность этой системы в клетках человека. Уникальной способностью системы редактирования генов на основе CRISPR/Cas9 является эффективная способность одновременно нацеливаться на несколько различных геномных локусов путем совместной экспрессии одного белка Cas9 с двумя или более sgRNA. Например, система типа II из *Streptococcus pyogenes* в естественных условиях предпочитает применение последовательности "NGG", где "N" может представлять собой любой нуклеотид, но также принимает другие последовательности PAM, такие как "NAG", в сконструированных системах (Hsu et al., *Nature Biotechnology* (2013) DOI: 10.1038/nbt.2647). Аналогично Cas9, полученная из *Neisseria meningitidis* (NmCas9), как правило, содержит нативный PAM из NNNNGATT, однако обладает активностью со множеством PAM, включая PAM NNNNGNNN с высокой степенью вырожденности (Esvelt et al., *Nature Methods* (2013), DOI: 10.1038/nmeth.2681).

Молекула Cas9 *S. aureus* распознает мотив последовательности NNGRR (R=A или G) (SEQ ID NO: 22) и управляет расщеплением целевой последовательности нуклеиновой кислоты от 1 до 10, например от 3 до 5 п.о., выше этой последовательности. В определенных вариантах осуществления молекула Cas9 *S. aureus* распознает мотив последовательности NNGRRN (R=A или G) (SEQ ID NO: 23) и управляет расщеплением целевой последовательности нуклеиновой кислоты от 1 до 10, например от 3 до 5 п.о., выше этой последовательности. В определенных вариантах осуществления молекула Cas9 *S. aureus* распознает мотив последовательности NNGRRR (R=A или G) (SEQ ID NO: 24) и управляет расщеплением целевой последовательности нуклеиновой кислоты от 1 до 10, например от 3 до 5 п.о., выше этой последовательности. В определенных вариантах осуществления молекула Cas9 *S. aureus* распознает мотив последовательности NNGRRV (R=A или G) (SEQ ID NO: 25) и управляет расщеплением целевой последовательности нуклеиновой кислоты от 1 до 10, например от 3 до 5 п.о., выше этой последовательности. В вышеупомянутых вариантах осуществления N может представлять собой нуклеотидный остаток, например любой из A, G, C или T. Молекулы Cas9 могут быть сконструированы для изменения специфичности PAM молекулы Cas9.

(1) Система редактирования генов на основе CRISPR/Cas9.

Было показано, что разработанная форма эффекторной системы типа II из *Streptococcus pyogenes* функционирует в клетках человека для конструирования генома. В этой системе белок Cas9 направляли на геномные целевые сайты с помощью синтетически восстановленной "направляющей РНК" ("gRNA", также используемой в данном документе взаимозаменяемо как химерная одиночная направляющая РНК ("sgRNA")), которая представляет собой слитую конструкцию crRNA-tracrRNA, которая устраняет необходимость в РНКазе III и процессинге crRNA в целом. В данном документе представлены сконструированные системы на основе CRISPR/Cas9 для применения в редактировании генома и лечении генетических заболеваний. Сконструированные системы на основе CRISPR/Cas9 могут быть сконструированы для нацеливания на любой ген, в том числе гены, вовлеченные в генетическое заболевание, старение, регенерацию тканей или заживление ран. Системы редактирования генов на основе CRISPR/Cas9 могут включать в себя белок Cas9 или слитый белок Cas9 и по меньшей мере одну gRNA. В определенных вариантах осуществления система включает две молекулы gRNA. Слитый белок Cas9 может, например, включать в себя домен с активностью, отличающейся от той, которая является эндогенной для Cas9, такой как домен транскрипции.

Ген-мишень (например, ген дистрофина, например ген дистрофина человека) может быть вовлечен в дифференцировку клетки или любой другой процесс, в котором может требоваться активация, или может содержать мутацию, такую как мутация со сдвигом рамки или нонсенс-мутация. Если ген-мишень содержит мутацию, которая является причиной преждевременного стоп-кодона, абберрантного сайта акцептора сплайсинга или абберрантного сайта донора сплайсинга, то система редактирования генов на основе CRISPR/Cas9 может быть сконструирована для распознавания и связывания нуклеотидной последовательности выше или ниже преждевременного стоп-кодона, абберрантного сайта акцептора сплайсинга или абберрантного сайта донора сплайсинга. Система на основе CRISPR-Cas9 может также использоваться для разрушения нормального сплайсинга гена путем целенаправленного воздействия на акцепторы и доноры сплайсинга, чтобы вызвать пропуск преждевременных стоп-кодонов или восстановить поврежденную рамку считывания. Система редактирования генов на основе CRISPR/Cas9 может опосредовать или не опосредовать нецелевые изменения в областях генома, кодирующих белок.

(a) Молекулы Cas9 и слитые белки Cas9.

Система редактирования генов на основе CRISPR/Cas9 может включать в себя белок Cas9 или сли-

тый белок Cas9. Белок Cas9 представляет собой эндонуклеазу, которая расщепляет нуклеиновую кислоту и кодируется локусами CRISPR, а также принимает участие в системе CRISPR типа II. Белок Cas9 может быть из любых видов бактерий или архей, в том числе без ограничения

*Streptococcus pyogenes, Staphylococcus aureus (S. aureus), Acidovorax avenae, Actinobacillus pleuropneumoniae, Actinobacillus succinogenes, Actinobacillus suis, Actinomyces sp., cycliphilus denitrificans, Aminomonas paucivorans, Bacillus cereus, Bacillus smithii, Bacillus thuringiensis, Bacteroides sp., Blastopirellula marina, Bradyrhizobium sp., Brevibacillus laterosporus, Campylobacter coli, Campylobacter jejuni, Campylobacter lari, Candidatus Puniceispirillum, Clostridium cellulolyticum, Clostridium perfringens, Corynebacterium accolens, Corynebacterium diphtheria, Corynebacterium matruchotii, Dinoroseobacter shibae, Eubacterium dolichum, gamma proteobacterium, Gluconacetobacter diazotrophicus, Haemophilus parainfluenzae, Haemophilus sputorum, Helicobacter canadensis, Helicobacter cinaedi, Helicobacter mustelae, Ilyobacter polytropus, Kingella kingae, Lactobacillus crispatus, Listeria ivanovii, Listeria monocytogenes, Listeriaceae bacterium, Methylocystis sp., Methylosinus trichosporium, Mobiluncus mulieris, Neisseria bacilliformis, Neisseria cinerea, Neisseria flavescens, Neisseria lactamica, Neisseria sp., Neisseria wadsworthii, Nitrosomonas sp., Parvibaculum lavamentivorans, Pasteurella multocida, Phascolarctobacterium succinatutens, Ralstonia syzygii, Rhodopseudomonas palustris, Rhodovulum sp., Simonsiella muelleri, Sphingomonas sp., Sporolactobacillus vineae, Staphylococcus lugdunensis, Streptococcus sp., Subdoligranulum sp., Tistrella mobilis, Treponema sp. или Verminephrobacter eiseniae.*

В определенных вариантах осуществления молекула Cas9 представляет собой белок Cas9, который представляет собой молекулу Cas9 *Streptococcus pyogenes* (также называемую в данном документе "SpCas9"). В определенных вариантах осуществления молекула Cas9 представляет собой молекулу Cas9 *Staphylococcus aureus* (также называемую в данном документе "SaCas9").

Молекула Cas9 или слитый белок Cas9 могут взаимодействовать с одной или несколькими молекулами gRNA и совместно с молекулой(ами) gRNA, расположенными в сайте, который включает целевой домен и в определенных вариантах осуществления последовательность PAM. Способность молекулы Cas9 или слитого белка Cas9 распознавать последовательность PAM может определяться, например, с применением анализа трансформации, как описано ранее (Jinek 2012).

В определенных вариантах осуществления способность молекулы Cas9 или слитого белка Cas9 взаимодействовать с целевой нуклеиновой кислотой и расщеплять ее зависит от последовательности PAM. Последовательность PAM представляет собой последовательность в целевой нуклеиновой кислоте. В определенных вариантах осуществления расщепление целевой нуклеиновой кислоты происходит выше последовательности PAM. Молекулы Cas9 из различных видов бактерий могут распознавать различные мотивы последовательностей (например, последовательностей PAM). В определенных вариантах осуществления молекула Cas9 *S. pyogenes* узнает мотив последовательности NGG и управляет расщеплением целевой последовательности нуклеиновой кислоты от 1 до 10 п.о., например от 3 до 5 п.о., выше этой последовательности (см., например, Mali, 2013). В определенных вариантах осуществления молекула Cas9 *S. thermophilus* распознает мотив последовательности NGGNG (SEQ ID NO: 36) и/или NNAGAAW (W=A или T) (SEQ ID NO: 20) и управляет расщеплением целевой последовательности нуклеиновой кислоты от 1 до 10 п.о., например от 3 до 5 п.о., выше этих последовательностей (см., например Horvath, 2010; Deveau, 2008). В определенных вариантах осуществления молекула Cas9 *S. mutans* распознает мотив последовательности NGG и/или NAAR (R=A или G) (SEQ ID NO: 21) и управляет расщеплением целевой последовательности нуклеиновой кислоты от 1 до 10 п.о., например от 3 до 5 п.о., выше этой последовательности (см., например Deveau 2008). В определенных вариантах осуществления молекула Cas9 *S. aureus* распознает мотив последовательности NNGRR (R=A или G) (SEQ ID NO: 22) и управляет

расщеплением целевой последовательности нуклеиновой кислоты от 1 до 10 п.о., например от 3 до 5 п.о., выше этой последовательности. В определенных вариантах осуществления молекула Cas9 *S. aureus* распознает мотив последовательности NNGRRN (R=A или G) (SEQ ID NO: 23) и управляет расщеплением целевой последовательности нуклеиновой кислоты от 1 до 10 п.о., например от 3 до 5 п.о., выше этой последовательности. В определенных вариантах осуществления молекула Cas9 *S. aureus* распознает мотив последовательности NNGRRT (R=A или G) (SEQ ID NO: 24) и управляет расщеплением целевой последовательности нуклеиновой кислоты от 1 до 10 п.о., например от 3 до 5 п.о., выше этой последовательности. В определенных вариантах осуществления молекула Cas9 *S. aureus* распознает мотив последовательности NNGRRV (R=A или G; V=A, или C, или G) (SEQ ID NO: 25) и управляет расщеплением целевой последовательности нуклеиновой кислоты от 1 до 10 п.о., например от 3 до 5 п.о., выше этой последовательности. В вышеупомянутых вариантах осуществления N может представлять собой нуклеотидный остаток, например, любой из A, G, C или T. Молекулы Cas9 могут быть сконструированы для изменения специфичности PAM молекулы Cas9.

В определенных вариантах осуществления вектор кодирует по меньшей мере одну молекулу Cas9, которая распознает смежный с протоспейсером мотив (PAM) либо NNGRRT (SEQ ID NO: 24), либо NNGRRV (SEQ ID NO: 25). В определенных вариантах осуществления по меньшей мере одна молекула Cas9 представляет собой молекулу Cas9 *S. aureus*. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере одна молекула Cas9 представляет собой мутантную молекулу Cas9 *S. aureus*.

Белок Cas9 может быть мутирован таким образом, что нуклеазная активность инактивирована. Инактивированный белок Cas9 ("iCas9", также называемый "dCas9") без эндонуклеазной активности ранее нацеливали на гены в клетках бактерий, дрожжей и человека с помощью gRNA для сайленсинга экспрессии генов посредством стерических затруднений. Иллюстративные мутации по отношению к последовательности Cas9 *S. pyogenes* включают D10A, E762A, H840A, N854A, N863A и/или D986A. Иллюстративные мутации по отношению к последовательности Cas9 *S. aureus* включают D10A и N580A. В определенных вариантах осуществления молекула Cas9 представляет собой мутантную молекулу Cas9 *S. aureus*. В определенных вариантах осуществления мутантная молекула Cas9 *S. aureus* содержит мутацию D10A. Нуклеотидная последовательность, кодирующая данную мутантную Cas9 *S. aureus*, изложена под SEQ ID NO: 34, которая представлена ниже.

```

atgaaaagga   actacattct   ggggctggcc   atcgggatta   caagcgtggg
gtatgggatt   attgactatg   aaacaaggga   cgtgatcgac   gcaggcgtca
gactgttcaa   ggaggccaac   gtggaaaaca   atgagggacg   gagaagcaag
aggggagcca   ggcgcctgaa   acgacggaga   aggcacagaa   tccagagggg
gaagaaactg   ctgttcgatt   acaacctgct   gaccgacctat   tctgagctga
gtggaattaa   tccttatgaa   gccagggtga   aaggcctgag   tcagaagctg
tcagaggaag   agttttccgc   agctctgctg   cacctggcta   agcggcagg
agtgcataac   gtcaatgagg   tggaagagga   caccggcaac   gagctgtcta
caaaggaaca   gatctcacgc   aatagcaaag   ctctggaaga   gaagtatgtc
gcagagctgc   agctggaacg   gctgaagaaa   gatggcgagg   tgagagggtc
aattaatagg   ttcaagacaa   gcgactacgt   caaagaagcc   aagcagctgc
tgaaagtgca   gaaggcttac   caccagctgg   atcagagctt   catcgatact
tatatcgacc   tgctggagac   tcggagaacc   tactatgagg   gaccaggaga
agggagcccc   ttcggatgga   aagacatcaa   ggaatggtac   gagatgctga
tgggacattg   cacctatttt   ccagaagagc   tgagaagcgt   caagtacgct
tataacgcag   atctgtacaa   cgccctgaat   gacctgaaca   acctggtcat
caccagggat   gaaaacgaga   aactggaata   ctatgagaag   tccagatca
tcgaaaacgt   gtttaagcag   aagaaaaagc   ctacactgaa   acagattgct
aaggagatcc   tgggtcaacga   agaggacatc   aagggtacc   ggggtgacaag
cactggaaaa   ccagagttca   ccaatctgaa   agtgtatcac   gatattaagg
acatcacagc   acggaaagaa   atcattgaga   acgccgaact   gctggatcag
attgctaaga   tcctgactat   ctaccagagc   tccgaggaca   tccaggaaga
gctgactaac   ctgaacagcg   agctgacca   ggaagagatc   gaacagatta
gtaatctgaa   ggggtacacc   ggaacacaca   acctgtccct   gaaagctatc

```

```

aatctgattc   tggatgagct   gtggcataca   aacgacaatc   agattgcaat
ctttaaccgg   ctgaagctgg   tcccaaaaaa   ggtggacctg   agtcagcaga
aagagatccc   aaccacactg   gtggacgatt   tcattctgtc   acccgtggtc
aagcggagct   tcatccagag   catcaaagtg   atcaacgcca   tcatcaagaa
gtacggcctg   cccaatgata   tcattatcga   gctggctagg   gagaagaaca
gcaaggacgc   acagaagatg   atcaatgaga   tgcagaaacg   aaaccggcag
accaatgaac   gcattgaaga   gattatccga   actaccggga   aagagaacgc
aaagtacctg   attgaaaaaa   tcaagctgca   cgatatgcag   gagggaaagt
gtctgtattc   tctggaggcc   atccccctgg   aggacctgct   gaacaatcca
ttcaactacg   aggtcgatca   tattatcccc   agaagcgtgt   ccttcgacaa
ttcctttaac   aacaaggtgc   tggtaagca   ggaagagaac   tctaaaaagg
gcaataggac   tcctttccag   tacctgtcta   gttcagattc   caagatctct
tacgaaacct   ttaaaaagca   cattctgaat   ctggccaaag   gaaagggccg
catcagcaag   accaaaaagg   agtacctgct   ggaagagcgg   gacatcaaca
gattctccgt   ccagaaggat   tttattaacc   ggaatctggt   ggacacaaga
tacgctactc   gcggcctgat   gaatctgctg   cgatcctatt   tccgggtgaa
caatctqqat   gtqaaaqtca   aqtccatcaa   cqqcqqgttc   acatcttttc
tgaggcgcaa   atggaagttt   aaaaaggagc   gcaacaaagg   gtacaagcac
catgccgaag   atgctctgat   tatcgcaaat   gccgacttca   tctttaagga
gtgaaaaaag   ctggacaaag   ccaagaaagt   gatggagaac   cagatgttcg
aagagaagca   ggccgaatct   atgcccgaaa   tcgagacaga   acaggagtac
aaggagattt   tcatcactcc   tcaccagatc   aagcatatca   aggatttcaa
ggactacaag   tactctcacc   gggtgataa   aaagcccaac   agagagctga
tcaatgacac   cctgtatagt   acaagaaaag   acgataaggg   gaataacctg
attgtgaaca   atctgaacgg   actgtacgac   aaagataatg   acaagctgaa
aaagctgac   aacaaaagtc   ccgagaagct   gctgatgtac   caccatgatc
ctcagacata   tcagaaactg   aagctgatta   tggagcagta   cggcgacgag
aagaaccac   tgtataagta   ctatgaagag   actgggaact   acctgaccaa
gtatagcaaa   aaggataatg   gccccgtgat   caagaagatc   aagtactatg
ggaacaagct   gaatgcccat   ctggacatca   cagacgatta   ccctaacagt
cgacaacaag   tggtaagct   gtcactgaag   ccatacagat   tcgatgtcta
tctggacaac   ggcgtgtata   aatttgtgac   tgtcaagaat   ctggatgtca
tcaaaaagga   gaactactat   gaagtgaata   gcaagtgcta   cgaagaggct
aaaaagctga   aaaagattag   caaccaggca   gagttcatcg   cctcctttta
caacaacgac   ctgattaaga   tcaatggcga   actgtatagg   gtcacggggg
tgaacaatga   tctgctgaac   cgcattgaag   tgaatatgat   tgacatcact
taccgagagt   atctggaaaa   catgaatgat   aagcgcccc   ctccaattat
caaaacaatt   gcctctaaga   ctcagagtat   caaaaagtac   tcaaccgaca
ttctgggaaa   cctgtatgag   gtgaagagca   aaaagcacc   tcagattatc   aaaaagggc

```

[SEQ ID NO: 34].

В определенных вариантах осуществления мутантная молекула Cas9 *S. aureus* содержит мутацию N580A. Нуклеотидная последовательность, кодирующая эту мутантную молекулу Cas9 *S. aureus*, изложена под SEQ ID NO: 35, которая представлена ниже.

atgaaaagga	actacattct	gggctggac	atcgggatta	caagcgtggg
gtatgggatt	attgactatg	aaacaaggga	cgtgatcgac	gcagggctca
gactgttcaa	ggaggccaac	gtggaaaaca	atgagggacg	gagaagcaag
aggggagcca	ggcgctgaa	acgacggaga	aggcacagaa	tccagagggt
gaagaaactg	ctgttcgatt	acaacctgct	gaccgacat	tctgagctga
gtggaattaa	tccttatgaa	gccaggggtg	aaggcctgag	tcagaagctg
tcagaggaag	agttttccgc	agctctgctg	cacctggcta	agcgccgagg
agtgcataac	gtcaatgagg	tggaagagga	caccggcaac	gagctgtcta
caaaggaaca	gatctcacgc	aatagcaaag	ctctggaaga	gaagtatgtc
gcagagctgc	agctggaacg	gctgaagaaa	gatggcgagg	tgagagggtc
aattaatagg	ttcaagacaa	gcgactacgt	caaagaagcc	aagcagctgc
tgaaagtgca	gaaggcttac	caccagctgg	atcagagctt	catcgatact
tatatcgacc	tgctggagac	tcggagaacc	tactatgagg	gaccaggaga
agggagcccc	ttcggatgga	aagacatcaa	ggaatggtac	gagatgctga
tgggacattg	cacctatfff	ccagaagagc	tgagaagcgt	caagtacgct
tataacgcag	atctgtacaa	cgccctgaat	gacctgaaca	acctgggtcat
caccagggat	gaaaacgaga	aactggaata	ctatgagaag	ttccagatca
tcgaaaacgt	gtttaagcag	aagaaaaagc	ctacactgaa	acagattgct
aaggagatcc	tggtcaacga	agaggacatc	aagggtacc	gggtgacaag
cactggaaaa	ccagagttca	ccaatctgaa	agtgtatcac	gatattaagg
acatcacagc	acggaaagaa	atcattgaga	acgccgaact	gctggatcag
attgctaaga	tcctgactat	ctaccagagc	tccgaggaca	tccaggaaga
gctgactaac	ctgaacagcg	agctgacca	ggaagagatc	gaacagatta
gtaatctgaa	gggttacacc	ggaacacaca	acctgtccct	gaaagctatc
aatctgattc	tggtatgagct	gtggcataca	aacgacaatc	agattgcaat
ctttaaccgg	ctgaagctgg	tcccaaaaaa	ggtggacctg	agtcagcaga
aagagatccc	aaccacactg	gtggacgatt	tcattctgtc	acccgtggtc
aagcggagcl	lcalccagag	calcaaaglg	alcaacgcc	lcalcaagaa
gtacggcctg	cccaatgata	tcattatcga	gctggctagg	gagaagaaca
gcaaggacgc	acagaagatg	atcaatgaga	tgcaaaaacg	aaaccggcag
accaatgaac	gcattgaaga	gattatccga	actaccggga	aagagaacgc
aaagtacctg	attgaaaaaa	tcaagctgca	cgatatgcag	gagggaaagt
gtctgtatcc	tctggaggcc	atccccctgg	aggacctgct	gaacaatcca

```

ttcaactacg aggtcgatca tattatcccc agaagcgtgt ccttcgacaa
ttcctttaac aacaaggtgc tggtaagca ggaagaggcc tctaaaaagg
gcaataggac tcctttccag tacctgtcta gttcagattc caagatctct
tacgaaacct ttaaaaagca cattctgaat ctggccaaag gaaagggccg
catcagcaag accaaaaagg agtacctgct ggaagagcgg gacatcaaca
gattctccgt ccagaaggat ttattaacc ggaatctggt ggacacaaga
tacgctactc gcggcctgat gaatctgctg cgtacctatt tccgggtgaa
caatctggat gtgaaagtca agtccatcaa cggcgggttc acatcttttc
tgaggcgcaa atggaagttt aaaaaggagc gcaacaaagg gtacaagcac
catgccgaag atgctctgat tatcgcaaat gccgacttca tctttaagga
gtgaaaaaag ctggacaaaag ccaagaaagt gatggagaac cagatgttcg
aagagaagca ggccgaatct atgcccgaaa tcgagacaga acaggagtac
aaggagattt tcatcactcc tcaccagatc aagcatatca aggatttcaa
ggactacaag tactctcacc ggggtggataa aaagcccaac agagagctga
tcaatgacac cctgtatagt acaagaaaag acgataaggg gaataccctg
attgtgaaca atctgaacgg actgtacgac aaagataatg acaagctgaa
aaagctgatc aacaaaagtc ccgagaagct gctgatgtac caccatgatc
ctcagacata tcagaaactg aagctgatta tggagcagta cggcgacgag
aagaacccac tgtataagta ctatgaagag actggggaact acctgaccaa
gtatagcaaa aaggataatg gcccctgat caagaagatc aagtactatg
ggaacaagct gaatgcccat ctggacatca cagacgatta ccctaacagt
cgacaacaag tggtaagct gtcactgaag ccatacagat tcgatgtcta
tctggacaac ggcgtgtata aatttgtgac tgtcaagaat ctggatgtca
tcaaaaagga gaactactat gaagtgaata gcaagtgcta cgaagaggct
aaaagctgaa aaaagattag caaccaggca gaggttcatcg cctcctttta
caacaacgac ctgattaaga tcaatggcga actgtatagg gtcacggggg
tgaacaatga tctgctgaac cgcattgaag tgaatatgat tgacatcact
taccgagagt atctggaaaa catgaatgat aagcgcccc ctcgaattat
caaaacaatt gcctctaaga ctcagagtat caaaaagtac tcaaccgaca
ttctgggaaa cctgtatgag gtgaagagca aaaagcacc tcagattatc aaaaagggc
[SEQ ID NO: 35].

```

Нуклеиновая кислота, кодирующая молекулу Cas9, может представлять собой синтетическую последовательность нуклеиновой кислоты. Например, синтетическая молекула нуклеиновой кислоты может быть химически модифицирована. Синтетическая последовательность нуклеиновой кислоты может быть кодон-оптимизированной, например, по меньшей мере один необычный кодон или малораспространенный кодон замещали обычным кодоном. Например, синтетическая нуклеиновая кислота может управлять синтезом оптимизированной информационной mRNA, например, оптимизированной для экспрессии в системе экспрессии млекопитающих, например, описанной в данном документе.

Дополнительно или как альтернатива нуклеиновая кислота, кодирующая молекулу Cas9 или полипептид Cas9, может содержать последовательность ядерной локализации (NLS). Последовательности ядерной локализации известны из уровня техники.

Иллюстративная кодон-оптимизированная последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая молекулу Cas9 S. pyogenes, изложена под SEQ ID NO: 26, которая представлена ниже.

atggataaaa	agtacagcat	cgggctggac	atcgggtacaa	actcagtggg
gtgggccgtg	attacggacg	agtacaaggt	accctccaaa	aaattttaaag
tgctgggtaa	cacggacaga	cactctataa	agaaaaatct	tattggagcc
ttgctgttcg	actcaggcga	gacagccgaa	gccacaaggt	tgaagcggac
cgccaggagg	cggtatacca	ggagaaagaa	ccgcatatgc	tacctgcaag
aaatcttcag	taacgagatg	gcaaagggtg	acgatagctt	tttccatcgc
ctggaagaat	cctttcttgt	tgaggaagac	aagaagcacg	aacggcacc
catctttggc	aatattgtcg	acgaagtggc	atatcacgaa	aagtaccgga
ctatctacca	cctcaggaag	aagctggtgg	actctaccga	taaggcggac
ctcagactta	tttatttggc	actcgccac	atgattaaat	ttagaggaca
tttcttgatc	gagggcgacc	tgaaccgga	caacagtgc	gtcgataagc
tgttcatcca	acttgtgcag	acctacaatc	aactgttcga	agaaaaccct
ataaatgctt	caggagtcca	cgctaaagca	atcctgtccg	cgcgctctc
aaaatctaga	agacttgaga	atctgattgc	tcagttgcc	ggggaaaaga
aaaatggatt	gtttggaac	ctgatcgccc	tcagtctcgg	actgacccca
aatttcaaaa	gtaacttcga	cctggccgaa	gacgctaagc	tccagctgtc
caaggacaca	tacgatgacg	acctcgacaa	tctgctggcc	cagattgggg
atcagtacgc	cgatctcttt	ttggcagcaa	agaacctgtc	cgacgccatc
ctgttgagcg	atatcttgag	agtgaacacc	gaaattacta	aagcaccctt
tagcgcacat	atgatcaagc	ggtacgacga	gcatcatcag	gatctgacc
tgctgaaggc	tcttgtgagg	caacagctcc	ccgaaaaata	caaggaaatc
ttctttgacc	agagcaaaaa	cggtacgct	ggctatatag	atgggtgggg
cagtcaggag	gaattctata	aattcatcaa	gccattctc	gagaaaatgg
acggcacaga	ggagttgctg	gtcaaactta	acagggagga	cctgctgcgg
aagcagcgga	cctttgacaa	cgggtctatc	ccccaccaga	ttcatctggg
cgaactgcac	gcaatcctga	ggaggcagga	ggatttttat	ccttttctta
aagataaccg	cgagaaaata	gaaaagattc	ttacattcag	gatcccgtac
tacgtgggac	ctctcgcccc	gggcaattca	cggtttgct	ggatgacaag
gaagtcagag	gagactatta	caccttgga	cttogaagaa	gtggtggaca
agggtgcatc	tgcccagtct	ttcatcgagc	ggatgacaaa	ttttgacaag
aacctcccta	atgagaaggt	gctgcccaaa	cattctctgc	tctacgagta
ctttaccgct	tacaatgaac	tgactaaagt	caagtacgct	accgagggaa
tgaggaagcc	ggcattcctt	agtggagaac	agaagaaggc	gattgtagac
ctgttgttca	agaccaacag	gaaggtgact	gtgaagcaac	ttaaagaaga
ctactttaag	aagatcgaat	gttttgacag	tgtggaaatt	tcaggggttg
aagaccgctt	caatgcgtca	ttggggactt	accatgatct	tctcaagatc
ataaaggaca	aagacttcct	ggacaacgaa	gaaaatgagg	atattctcga
agacatcgct	ctcaccctga	ccctgttcga	agacagggaa	atgatagaag
agcgcctgaa	aacctatgcc	cacctcttcg	acgataaagt	tatgaagcag
ctgaagcgca	ggagatacac	aggatgggga	agattgtcaa	ggaagctgat
caatggaatt	agggataaac	agagtggaac	gaccatactg	gatttctca
aatctgatgg	cttcgccaat	aggaacttca	tgcaactgat	tcacgatgac
tctcttacct	tcaaggagga	cattcaaaag	gctcaggtga	gcgggcaggg

agactccctt	catgaacaca	tcgcaattt	ggcaggttcc	cccgtatta
aaaagggcat	ccttcaaact	gtcaagggtg	tgatgaatt	ggtcaaggta
atgggcagac	ataagccaga	aaatattgtg	atcgagatgg	cccgcgaaaa
ccgaccacaca	cagaagggcc	agaaaaatag	tagagagcgg	atgaagagga
tcgaggaggg	catcaaagag	ctgggatctc	agattctcaa	agaacacccc
gtagaaaaca	cacagctgca	gaacgaaaaa	ttgtacttgt	actatctgca
gaacggcaga	gacatgtacg	tcgaccaaga	acttgatatt	aatagactgt
ccgactatga	cgtagaccat	atcgtgcccc	agtccttcct	gaaggacgac
tccattgata	acaaagtctt	gacaagaagc	gacaagaaca	ggggtaaaaag
tgataatgtg	cctagcgagg	aggtgggtgaa	aaaaatgaag	aactactggc
gacagctgct	taatgcaaag	ctcattacac	aacggaagtt	cgataatctg
acgaaagcag	agagaggtgg	cttgtctgag	ttggacaagg	cagggtttat
taagcggcag	ctggtggaag	ctaggcagat	cacaaagcac	gtggcgcaga
ttttggacag	ccggatgaac	acaaaatagc	acgaaaatga	taaactgata
cgagaggtca	aagttatcac	gctgaaaagc	aagctgggtg	ccgattttcg
gaaagacttc	cagttctaca	aagttcgcga	gattaataac	taccatcatg
ctcacgatgc	gtacctgaac	gctgttgcg	ggaccgcctt	gataaagaag
tacccaaagc	tggaatccga	gttcgtatac	ggggattaca	aagtgtacga
tgtgagggaaa	atgatagcca	agtccgagca	ggagattgga	aaggccacag
ctaagtactt	cttttattct	aacatcatga	atTTTTTTaa	gacggaaatt
accctggcca	acggagagat	cagaaagcgg	ccccttatag	agacaaatgg
tgaaacaggt	gaaatcgtct	gggataaggg	cagggatttc	gctactgtga
ggaaggtgct	gagtatgcca	caggtaaata	tcgtgaaaaa	aaccgaagta
cagaccggag	gattttccaa	ggaaagcatt	ttgcctaaaa	gaaactcaga
caagctcatc	gcccgcaaga	aagattggga	ccctaagaaa	tacgggggat
ttgactcacc	caccgtagcc	tattctgtgc	tggtggtagc	taagggtggaa
aaaggaaagt	ctaagaagct	gaagtccgtg	aaggaactct	tgggaatcac
tatcatggaa	agatcatcct	ttgaaaagaa	ccctatcgat	ttcctggagg
ctaagggtta	caaggaggtc	aagaaagacc	tcatcattaa	actgccaaaa
tactctctct	tcgagctgga	aaatggcagg	aagagaatgt	tggccagcgc
cggagagctg	caaaagggaa	acgagcttgc	tctgccctcc	aaatatgtta
atTTTctcta	tctcgcttcc	cactatgaaa	agctgaaagg	gtctcccgaa
gataacgagc	agaagcagct	gttcgctgaa	cagcacaagc	actatctgga
tgaaataatc	gaacaaataa	gcgagttcag	caaaagggtt	atcctggcgg
atgctaattt	ggacaaagta	ctgtctgctt	ataacaagca	ccgggataag
cctattaggg	aacaagccga	gaatataatt	cacctcttta	cactcacgaa
tctcggagcc	cccgcgcctt	tcaaataactt	tgatacgact	atcgaccgga
aacggtatac	cagtacccaa	gaggtcctcg	atgccaccct	catccaccag
tcaattactg	gcctgtacga	aacacggatcgacctctc	aactgggvcgg	cgactag

[SEQ ID NO: 26].

Соответствующая аминокислотная последовательность молекулы Cas9 *S. pyogenes* изложена под SEQ ID NO: 27, которая представлена ниже.

MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRL  
 KRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAY  
 HEKYPTIYHLRKKLVDSYTDKADLRLLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTY  
 NQLFEENPINASGVDAKAIL SARLSKSRLENLIAQLPGEKKNLFGNLIALSGLTPNFKSNF  
 DLAEADAKLQLSKDYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSAS  
 MIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMD  
 GTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRI

PYYVGPLARGNSRFAMWTRKSEETITPWNFEVVDKASASQSFIERMTNFDKLNLPNEKVLPHKS  
 LLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFD  
 SVEISGVEDRFNASLGTYHDLKI IKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIERLKYA  
 HLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKITLDFLKSDFANRNFMLIHDDSLTF  
 KEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGIQTQVKVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQ  
 TTQKGQKNSRERMKRIE EGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQELDINR  
 LSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLRSDKNRGKSDNVPSEEVVKMKKNYWRQLLNAKLITQRK  
 FDNLTKAERGGSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKS  
 KLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTA LIKKYPKLESEFVYGDYKVDVRKMIAK  
 SEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVL  
 MPQVNIKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKGFFSPTVAYSVLVAVKVEKG  
 KSKKLKSVKELLGITIMERSSFENPIDFLEAKGYKEVKKDLI IKLPKYSLFELENGRKRMLAS  
 AGELQKGNELALPSKYVNFYLASHYEKLGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRV  
 ILADANLDKVL SAYNKHRRDKPIREQAENI IHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLD  
 ATLIHQSIITGLYETRIDLSQLGGD [SEQ ID NO: 27]

Иллюстративные кодон-оптимизированные последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие молекулу Cas9 *S. aureus* и необязательно содержащие последовательности ядерной локализации (NLS), изложены под SEQ ID NO: 28-32, 43 и 44, которые представлены ниже. Другая иллюстративная кодон-оптимизированная последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая молекулу Cas9 *S. pyogenes*, предусматривает нуклеотиды 1293-4451 под SEQ ID NO: 83.

SEQ ID NO: 28 изложена ниже.

atgaaaagga	actacattct	ggggctggac	atcgggatta	caagcgtggg
gtatgggatt	attgactatg	aaacaaggga	cgtgatcgac	gcagggctca
gactgttcaa	ggaggccaac	gtggaaaaca	atgagggacg	gagaagcaag
aggggagcca	ggcgctgaa	acgacggaga	aggcacagaa	tccagagggt
gaagaaactg	ctgttcgatt	acaacctgct	gaccgaccat	tctgagctga
gtggaattaa	tccttatgaa	gccagggtga	aaggcctgag	tcagaagctg
tcagaggaag	agttttccgc	agctctgctg	cacctggcta	agcgccgagg
agtgcataac	gtcaatgagg	tggaagagga	caccggcaac	gagctgtcta
caaaggaaca	gatctcacgc	aatagcaaag	ctctggaaga	gaagtatgtc
gcagagctgc	agctggaacg	gctgaagaaa	gatggcgagg	tgagagggtc
aattaatagg	ttcaagacaa	gcgactacgt	caaagaagcc	aagcagctgc
tgaagtgca	gaaggcttac	caccagctgg	atcagagctt	catcgatact

tatatcgacc	tgctggagac	tcggagaacc	tactatgagg	gaccaggaga
aggagacccc	ttcggatgga	aagacatcaa	ggaatggtac	gagatgctga
tgggacattg	cacctatfff	ccagaagagc	tgagaagcgt	caagtacgct
tataacgcag	atctgtacaa	cgccctgaat	gacctgaaca	acctggtcac
caccagggat	gaaaacgaga	aactggaata	ctatgagaag	ttccagatca
tcgaaaacgt	gtttaagcag	aagaaaaagc	ctacactgaa	acagattgct
aaggagatcc	tggtaacgga	agaggacatc	aagggctacc	gggtgacaag
cactggaaaa	ccagagttca	ccaatctgaa	agtgtatcac	gatattaagg
acatcacagc	acggaaagaa	atcattgaga	acgccgaact	gctggatcag
attgctaaga	tcttgactat	ctaccagagc	tccgaggaca	tccaggaaga
gctgactaac	ctgaacagcg	agctgacca	ggaagagatc	gaacagatta
gtaatctgaa	gggttacacc	ggaacacaca	acctgtccct	gaaagctatc
aatctgattc	tggatgagct	gtggcataca	aacgacaatc	agattgcaat
ctttaaccgg	ctgaagctgg	tccccaaaaa	ggtggacctg	agtcagcaga
aagagatccc	aaccacactg	gtggacgatt	tcattctgtc	accctgggtc
aagcggagct	tcattccagag	catcaaagtg	atcaacgcca	tcatcaagaa
gtacggcctg	cccaatgata	tcattatcga	gctggctagg	gagaagaaca
gcaaggacgc	acagaagatg	atcaatgaga	tgcaaaaacg	aaaccggcag
accaatgaac	gcattgaaga	gattatccga	actaccggga	aagagaacgc
aaagtacctg	atgaaaaaaa	tcaagctgca	cgatatgcag	gagggaaaag
gtctgtattc	tctggaggcc	tccccctgg	aggacctgct	gaacaatcca
aggtcgatca	tattatcccc	agaagcgtgt	ccttcgacaa	ttcctttaac
aacaaggtgc	tggtaagca	ggaagagAAC	tctaaaaagg	gcaataggac
tcctttccag	tacctgtcta	gttcagattc	caagatctct	tacgaaacct
ttaaaaagca	cattctgaat	ctggccaaag	gaaagggccg	catcagcaag
accaaaaagg	agtacctgct	ggaagagcgg	gacatcaaca	gattctccgt
ccagaaggat	tttattaacc	ggaatctggt	ggacacaaga	tacgctactc
gcggcctgat	gaatctgctg	cgatcctatt	tccgggtgaa	caatctggat
gtgaaagtca	agtccatcaa	cggcgggttc	acatcttttc	tgagggcga
atggaagttt	aaaaaggagc	gcaacaaagg	gtacaagcac	catgccgaag
atgctctgat	tatcgcaaat	gccgacttca	tctttaagga	gtggaaaaag
ctggacaaag	ccaagaaagt	gatggagaac	cagatgttcg	aagagaagca
ggccgaatct	atgcccgaaa	tcgagacaga	acaggagtac	aaggagattt
tcactactcc	tcaccagatc	aagcatatca	aggatttcaa	ggactacaag
tactctcacc	gggtggataa	aaagcccaac	agagagctga	tcaatgacac
cctgtatagt	acaagaaaag	acgataaggg	gaataccctg	attgtgaaca

atctgaacgg	actgtacgac	aaagataatg	acaagctgaa	aaagctgadc
aacaaaagctc	ccgagaagct	gctgatgtac	caccatgatc	ctcagacata
tcagaaactg	aagctgatta	tggagcagta	cggcgacgag	aagaaccac
tgtataagta	ctatgaagag	actgggaact	acctgaccaa	gtatagcaaa
aaggataatg	gccccgtgat	caagaagatc	aagtactatg	ggaacaagct
gaatgcccat	ctggacatca	cagacgatta	ccctaacagt	cgcaacaagg
tggtaagct	gtcactgaag	ccatacagat	tcgatgtcta	tctggacaac
ggcgtgtata	aatttgtgac	tgtcaagaat	ctggatgtca	tcaaaaagga
gaactactat	gaagtgaata	gcaagtgcta	cgaagaggct	aaaaagctga
aaaagattag	caaccaggca	gagttcatcg	cctcctttta	caacaacgac
ctgattaaga	tcaatggcga	actgtatagg	gtcatcgggg	tgaacaatga
tctgctgaac	cgcattgaag	tgaatatgat	tgacatcact	taccgagagt
atctggaaaa	catgaatgat	aagcgcccc	ctcgaattat	caaaacaatt
gcctctaaga	ctcagagtat	caaaaagtac	tcaaccgaca	ttctgggaaa
cctgtatgag	gtgaagagca	aaaagcacc	tcagattatc	aaaaagggc [SEQ ID
				NO: 28]

SEQ ID NO: 29 изложена ниже.

atgaagcgga	actacatcct	gggcctggac	atcggcatca	ccagcgtggg
ctacggcatc	atcgactacg	agacacggga	cgtgatcgat	gccggcgtgc
ggctgttcaa	agaggccaac	gtggaaaaca	acgagggcag	gcggagcaag
agagggccca	gaaggctgaa	gcggcggagg	cggcatagaa	tccagagagt
gaagaagctg	ctgttcgact	acaacctgct	gaccgaccac	agcgagctga
gcggcatcaa	cccctacgag	gccagagtga	agggcctgag	ccagaagctg
agcgaggaag	agttctctgc	cgccctgctg	cacctggcca	agagaagagg
cgtgcacaac	gtgaacgagg	tggaagagga	caccggcaac	gagctgtcca
ccaaagagca	gatcagccgg	aacagcaagg	ccctggaaga	gaaatacgtg
gccgaactgc	agctggaacg	gctgaagaaa	gacggcgaag	tgcggggcag
catcaacaga	ttcaagacca	gcgactacgt	gaaagaagcc	aaacagctgc
tgaaggtgca	gaaggcctac	caccagctgg	accagagctt	catcgacacc
tacatcgacc	tgctggaaac	ccggcggacc	tactatgagg	gacctggcga
gggcagcccc	ttcggctgga	aggacatcaa	agaatggtac	gagatgctga
tgggccactg	cacctacttc	cccgaggaac	tgcggagcgt	gaagtacgcc
tacaacgccg	acctgtacaa	cgccctgaac	gacctgaaca	atctcgtgat
caccagggac	gagaacgaga	agctggaata	ttacgagaag	ttccagatca
tcgagaacgt	gttcaagcag	aagaagaagc	ccaccctgaa	gcagatcgcc
aaagaaatcc	tcgtgaacga	agaggatatt	aagggctaca	gagtgaccag

caccggcaag cccgagttca ccaacctgaa ggtgtaccac gacatcaagg  
acattaccgc ccgaaagag attattgaga acgccgagct gctggatcag  
attgccaaga tcctgaccat ctaccagagc agcgaggaca tccaggaaga  
actgaccaat ctgaactccg agctgaccca ggaagagatc gagcagatct  
ctaattctgaa gggctatacc ggcacccaca acctgagcct gaaggccatc  
aacctgatcc tggacgagct gtggcacacc aacgacaacc agatcgctat  
cttcaaccgg ctgaagctgg tgcccaagaa ggtggacctg tcccagcaga  
aagagatccc caccaccctg gtggacgact tcatcctgag ccccgctgtg  
aagagaagct tcatccagag catcaaagtg atcaacgcca tcatcaagaa  
gtacggcctg cccaacgaca tcattatcga gctggcccgc gagaagaact  
ccaaggacgc ccagaaaatg atcaacgaga tgcagaagcg gaaccggcag  
accaacgagc ggatcgagga aatcatccgg accaccggca aagagaacgc  
caagtacctg atcgagaaga tcaagctgca cgacatgcag gaaggcaagt  
gcctgtacag cctggaagcc atccctctgg aagatctgct gaacaacccc  
ttcaactatg aggtggacca catcatcccc agaagcgtgt ccttcgacaa  
cagcttcaac aacaaggtgc tcgtgaagca ggaagaaaac agcaagaagg  
gcaaccggac ccattccag tacctgagca gcagcgacag caagatcagc  
tacgaaacct tcaagaagca catcctgaat ctggccaagg gcaagggcag  
aatcagcaag accaagaaag agtatctgct ggaagaacgg gacatcaaca  
ggttctccgt gcagaaagac ttcatcaacc ggaacctggt ggataccaga  
tacgccacca gaggcctgat gaacctgctg cggagctact tcagagtgaa  
caacctggac gtgaaagtga agtccatcaa tggcggcttc accagctttc  
tgcggcggaa gtggaagttt aagaaagagc ggaacaaggg gtacaagcac  
cacgccgagg acgccctgat cattgccaac gccgatttca tcttcaaaga  
gtggaagaaa ctggacaagg ccaaaaaagt gatggaaaac cagatgttcg  
aggaaaagca ggccgagagc atgcccgaga tcgaaaccga gcaggagtac  
aaagagatct tcatcacccc ccaccagatc aagcacatta aggacttcaa  
ggactacaag tacagccacc ggtgggacaa gaagcctaat agagagctga  
ttaacgacac cctgtactcc acccgggaagg acgacaaggg caacaccctg  
atcgtgaaca atctgaacgg cctgtacgac aaggacaatg acaagctgaa  
aaagctgatc aacaagagcc ccgaaaagct gctgatgtac caccacgacc  
cccagaccta ccagaaactg aagctgatta tggaacagta cggcgacgag  
aagaatcccc tgtacaagta ctacgaggaa accgggaact acctgaccaa  
gtactccaaa aaggacaacg gccccgtgat caagaagatt aagtattacg  
gcaacaaact gaacgcccac ctggacatca ccgacgacta cccaacagc  
agaacaaggg tcgtgaagct gtccctgaag ccctacagat tcgacgtgta  
cctggacaat ggcgtgtaca agttcgtgac cgtgaagaat ctggatgtga  
tcaaaaaaga aaactactac gaagtgaata gcaagtgcta tgaggaagct  
aagaagctga agaagatcag caaccaggcc gagtttatcg cctcctteta  
caacaacgat ctgatcaaga tcaacggcga gctgtataga gtgatcggcg  
tgaacaacga cctgctgaac cggatcgaag tgaacatgat cgacatcacc  
taccgagagt acctggaaaa catgaacgac aagaggcccc ccaggatcat  
taagacaatc gcctccaaga cccagagcat taagaagtac agcacagaca  
ttctgggcaa cctgtatgaa gtgaaatcta agaagcacc tcagatcatc aaaaagggc  
[SEQ ID NO: 29]

SEQ ID NO: 30 изложена ниже.

atgaagcgca	actacatcct	cggactggac	atcggcatta	cctccgtggg
atacggcatc	atcgattacg	aaactagggg	tgtgatcgac	gctggagtca
ggctgttcaa	agaggcgaac	gtggagaaca	acgaggggcg	gcgctcaaag
agggggggccc	gccggctgaa	gcgccgccgc	agacatagaa	tccagcgcgt
gaagaagctg	ctgttcgact	acaaccttct	gaccgaccac	tccgaacttt
ccggcatcaa	cccataatgag	gctagagtga	agggattgtc	ccaaaagctg
tccgaggaag	agttctccgc	cgcggttgctc	cacctcgcca	agcgcagggg
agtgcacaat	gtgaacgaag	tggaagaaga	taccggaaac	gagctgtcca
ccaaggagca	gatcagccgg	aactccaagg	ccctggaaga	gaaatacgtg
gcggaactgc	aactggagcg	gctgaagaaa	gacggagaag	tgcgcggtctc
gatcaaccgc	ttcaagacct	cggactacgt	gaaggaggcc	aagcagctcc
tgaaagtgca	aaaggcctat	caccaacttg	accagtcctt	tatcgatacc
tacatcgatc	tgctcgagac	tcggcggact	tactacgagg	gtccagggga
gggctcccca	tttggttgga	aggatattaa	ggagtggtag	gaaatgctga
tgggacactg	cacatacttc	cctgaggagc	tgccggagcgt	gaaatacgc
tacaacgcag	acctgtacaa	cgcgctgaac	gacctgaaca	atctcgtgat
caccggggac	gagaacgaaa	agctcgagta	ttacgaaaag	ttccagatta
ttgagaacgt	gttcaaacag	aagaagaagc	cgacactgaa	gcagattgcc
aaggaaatcc	tcgtgaacga	agaggacatc	aagggctatc	gagtgacctc
aacgggaaag	ccggagttca	ccaatctgaa	ggtctaccac	gacatcaaag
acattaccgc	ccggaaggag	atcattgaga	acgccggagct	gttgaccag
attgcgaaga	ttctgacat	ctaccaatcc	tccgaggata	ttcaggaaga
actcaccaac	ctcaacagcg	aactgaccca	ggaggagata	gagcaaactc
ccaacctgaa	gggctacacc	ggaactcata	acctgagcct	gaaggccatc
aacttgatcc	tggacgagct	gtggcacacc	aacgataacc	agatcgctat
tttcaatcgg	ctgaagctgg	tccccaaaga	agtggacctc	tcacaacaaa

aggagatccc	tactaccctt	gtggacgatt	tcattctgtc	ccccgtggtc
aagagaagct	tcatacagtc	aatcaaagtg	atcaatgccca	ttatcaagaa
atacgggtctg	cccaacgaca	ttatcattga	gctcgccccg	gagaagaact
cgaaggacgc	ccagaagatg	attaacgaaa	tgacagaagag	gaaccgacag
actaacgaac	ggatcgaaga	aatcatccgg	accaccggga	aggaaaacgc
gaagtacctg	atcgaaaaga	tcaagctcca	tgacatgcag	gaaggaaagt
gtctgtactc	gctggaggcc	attccgctgg	aggacttgct	gaacaaccct
ttaactacg	aagtggatca	tatcattccg	aggagcgtgt	cattcgacaa
ttccttcaac	aacaaggtcc	tcgtgaagca	ggaggaaaac	tcgaagaagg
gaaaccgcac	gccgttccag	tacctgagca	gcagcgactc	caagatttcc
tacgaaacct	tcaagaagca	catcctcaac	ctggcaaagg	ggaagggctg
catctccaag	accaagaagg	aatatctgct	ggaagaaaga	gacatcaaca
gattctccgt	gcaaaaggac	ttcatcaacc	gcaacctcgt	ggatactaga
tacgtactc	gggtctgat	gaacctcctg	agaagctact	ttagagtgaa
caatctggac	gtgaaggcca	agtcgattaa	cggaggtttc	acctccttcc
tgccggcga	gtggaagttc	aagaaggaac	ggaacaaggg	ctacaagcac
cacgccgagg	acgccctgat	cattgccaac	gccgacttca	tcttcaaaga
atggaagaaa	cttgacaagg	ctaagaaggt	catggaaaac	cagatgttcg
aagaaaagca	ggccgagtct	atgcctgaaa	tcgagactga	acaggagtac
aaggaaatct	ttattacgcc	acaccagatc	aaacacatca	aggatttcaa
ggattacaag	tactcacatc	gcgtggacaa	aaagccgaac	agggaactga
tcaacgcac	cctctactcc	acccggaagg	atgacaaaagg	gaataccctc
atcgtcaaca	accttaacgg	cctgtacgac	aaggacaacg	ataagctgaa
gaagctcatt	aacaagtcgc	ccgaaaagtt	gctgatgtac	caccacgacc
ctcagactta	ccagaagctc	aagctgatca	tgagcagta	tggggacgag
aaaaaccgt	tgtacaagta	ctacgaagaa	actgggaatt	atctgactaa
gtactccaag	aaagataacg	gcccgtgat	taagaagatt	aagtactacg
gcaacaagct	gaacgcccat	ctggacatca	ccgatgacta	ccctaattcc
cgcaacaagg	tcgtcaagct	gagcctcaag	ccctaccggt	ttgatgtgta
ccttgacaat	ggagtgtaca	agttcgtgac	tgtgaagaac	cttgacgtga
tcaagaagga	gaactactac	gaagtcaact	ccaagtgcta	cgaggaagca
aagaagttga	agaagatctc	gaaccaggcc	gagttcattg	cctccttcta
taacaacgac	ctgattaaga	tcaacggcga	actgtaccgc	gtcattggcg
tgaacaacga	tctcctgaac	cgcacggaag	tgaacatgat	cgacatcact
taccgggaat	acctggagaa	tatgaacgac	aagcgccccg	cccgatcat
taagactatc	gcctcaaaga	cccagtcgat	caagaagtac	agcaccgaca
tcctgggcaa	cctgtacgag	gtcaaatcga	agaagcacc	ccagatcatc
				aagaaggga

[SEQ ID NO: 30]

SEQ ID NO: 31 изложена ниже.

ATGGCCCCAAAGAAGAAGCGGAAGGTCGGTATCCACGGAGTCCCAGCAGCCAAGCGGAACTACA  
TCCTGGGCCTGGACATCGGCATCACCAGCGTGGGCTACGGCATCATCGACTACGAGACACGGGA  
CGTGATCGATGCCGGCGTGC GGCTGTTCAAAGAGGCCAACCTGGAAAACAACGAGGGCAGGCGG  
AGCAAGAGAGGGCCAGAAGGCTGAAGCGGCGGAGGCGGCATAGAATCCAGAGAGTGAAGAAGC  
TGCTGTTTCGACTACAACCTGCTGACCGACCACAGCGAGCTGAGCGGCATCAACCCCTACGAGGC  
CAGAGTGAAGGGCCTGAGCCAGAAGCTGAGCGAGGAAGAGTTCTCTGCCGCCCTGCTGCACCTG  
GCCAAGAGAAGAGGGCTGCACAACCTGAACGAGGTGGAAGAGGACACCGGCAACGAGCTGTCCA  
CCAGAGAGCAGATCAGCCGGAACAGCAAGGCCCTGGAAGAGAAAATACGTGGCCGAACCTGCAGCT  
GGAACGGCTGAAGAAAGACGGCGAAGTGC GGCGGACCTACTATGAGGGACCTGGCGAGGGCAG  
GTGAAAGAAGCCAAACAGCTGCTGAAGGTGCAGAAGGCCACCACCAGCTGGACCAGAGCTTCA  
TCGACACCTACATCGACCTGCTGGAAAACCGCGGACCTACTATGAGGGACCTGGCGAGGGCAG  
CCCCCTTCGGCTGGAAGGACATCAAAGAATGGTACGAGATGCTGATGGGCCACTGCACCTACTTC  
CCCGAGGAACTGCGGAGCGTGAAGTACGCCTACAACGCCGACCTGTACAACGCCCTGAACGACC  
TGAACAATCTCGTGATCACCAGGGACGAGAACGAGAAGCTGGAATATTACGAGAAGTCCAGAT  
CATCGAGAACGTGTTCAAGCAGAAGAAGAAGCCACCCTGAAGCAGATCGCCAAAGAAATCCTC  
GTGAACGAAGAGGATATTAAGGGCTACAGAGTGACCAGCACCGGCAAGCCCGAGTTACCAACCC  
TGAAGGTGTACCACGACATCAAGGACATTACCGCCCGAAAGAGATTATTGAGAACGCCGAGCT  
GCTGGATCAGATTGCCAAGATCCTGACCATCTACCAGAGCAGCGAGGACATCCAGGAAGAACTG  
ACCAATCTGAACTCCGAGCTGACCCAGGAAGAGATCGAGCAGATCTCTAATCTGAAGGGCTATA  
CCGGCACCCACAACCTGAGCCTGAAGGCCATCAACCTGATCCTGGACGAGCTGTGGCACACCAA  
CGACAACCAGATCGCTATCTTCAACCGGCTGAAGCTGGTGCCCAAGAAGGTGGACCTGTCCCAG  
CAGAAAGAGATCCCCACCACCCTGGTGGACGACTTCATCCTGAGCCCCGTCGTGAAGAGAAGCT  
TCATCCAGAGCATCAAAGTGATCAACGCCATCATCAAGAAGTACGGCCTGCCCAACGACATCAT  
TATCGAGCTGGCCCGGAGAAGAACTCCAAGGACGCCAGAAAATGATCAACGAGATGCAGAAG  
CGGAACCGGCAGACCAACGAGCGGATCGAGGAAATCATCCGGACCACCGGCAAGAGAACGCCA  
AGTACCTGATCGAGAAGATCAAGCTGCACGACATGCAGGAAGGCAAGTGCCTGTACAGCCTGGA  
AGCCATCCCTCTGGAAGATCTGCTGAACAACCCCTTCAACTATGAGGTGGACCACATCATCCCC  
AGAAGCGTGTCTTCGACAACAGCTTCAACAACAAGGTGCTCGTGAAGCAGGAAGAAAACAGCA  
AGAAGGGCAACCGGACCCCATTCAGTACCTGAGCAGCAGCGACAGCAAGATCAGCTACGAAAC  
CTTCAAGAAGCACATCCTGAATCTGGCCAAGGGCAAGGGCAGAATCAGCAAGACCAAGAAAAGAG  
TATCTGCTGGAAGAACGGGACATCAACAGGTCTCCGTGCAGAAAGACTTCATCAACCGGAACC  
TGGTGGATACCAGATACGCCACCAGAGGCCTGATGAACCTGCTGCGGAGCTACTTCAGAGTGAA  
CAACCTGGACGTGAAAGTGAAGTCCATCAATGGCGGCTTACCAGCTTTCTGCGGCGGAAGTGG

AAGTTTAAGAAAGAGCGGAACAAGGGGTACAAGCACCACGCCGAGGACGCCCTGATCATTGCCA  
 ACGCCGATTTTCATCTTCAAAGAGTGGAAAGAACTGGACAAGGCCAAAAAAGTGATGGAAAACCA  
 GATGTTTCGAGGAAAGGCAGGCCGAGAGCATGCCCGAGATCGAAAACCGAGCAGGAGTACAAAGAG  
 ATCTTCATCACCCCCACCAGATCAAGCACATTAAGGACTTCAAGGACTACAAGTACAGCCACC  
 GGGTGGACAAGAAGCCTAATAGAGAGCTGATTAACGACACCCCTGTACTIONCACCCCGAAGGACGA  
 CAAGGGCAACACCCTGATCGTGAACAATCTGAACGGCCTGTACGACAAGGACAATGACAAGCTG  
 AAAAAAGCTGATCAACAAGAGCCCCGAAAAGCTGCTGATGTACCACCACGACCCCCAGACCTACC  
 AGAAACTGAAGCTGATTATGGAACAGTACGGCGACGAGAAGAATCCCCCTGTACAAGTACTACGA  
 GGAAACCGGGAACCTACCTGACCAAGTACTCCAAAAAGGACAACGGCCCCGTGATCAAGAAGATT  
 AAGTATTACGGCAACAACTGAACGCCCATCTGGACATCACCGACGACTACCCCAACAGCAGAA  
 ACAAGGTCGTGAAGCTGTCCCTGAAGCCCTACAGATTCGACGTGTACCTGGACAATGGCGTGT  
 CAAGTTCGTGACCGTGAAGAATCTGGATGTGATCAAAAAAGAAAATACTACGAAGTGAATAGC  
 AAGTGCTATGAGGAAGCTAAGAAGCTGAAGAAGATCAGCAACCAGGCCGAGTTTATCGCCTCCT  
 TCTACAACAACGATCTGATCAAGATCAACGGCGAGCTGTATAGAGTGATCGGCGTGAACAACGA  
 CCTGCTGAACCGGATCGAAGTGAACATGATCGACATCACCTACCGCGAGTACCTGGAAAACATG  
 AACGACAAGAGGCCCCCCCAGGATCATTAAGACAATCGCCTCCAAGACCCAGAGCATTAAGAAGT  
 ACAGCACAGACATCTGGGCAACCTGTATGAAGTGAAATCTAAGAAGCACCCCTCAGATCATCAA  
 AAAGGGCAAAAGGCCGGCGGCCACGAAAAGGCCGGCCAGGCAAAAAGAAAAAG [SEQ ID  
 NO: 31]

SEQ ID NO: 32 изложена ниже.

ACCGGTGCCA	CCATGTACCC	ATACGATGTT	CCAGATTACG	CTTCGCCGAA
GAAAAAGCGC	AAGGTCGAAG	CGTCCATGAA	AAGGAACTAC	ATTCTGGGGC
TGGACATCGG	GATTACAAGC	GTGGGGTATG	GGATTATTGA	CTATGAAACA
AGGGACGTGA	TCGACGCAGG	CGTCAGACTG	TTC AAGGAGG	CCAACGTGGA
AAACAATGAG	GGACGGAGAA	GCAAGAGGGG	AGCCAGGCGC	CTGAAACGAC
GGAGAAGGCA	CAGAATCCAG	AGGGTGAAGA	AACTGCTGTT	CGATTACAAC
CTGCTGACCG	ACCATTCTGA	GCTGAGTGG	ATTAATCCTT	ATGAAGCCAG
GGTGAAAGGC	CTGAGTCAGA	AGCTGTCAGA	GGAAGAGTTT	TCCGCAGCTC
TGCTGCACCT	GGCTAAGCGC	CGAGGAGTGC	ATAACGTCAA	TGAGGTGGAA
GAGGACACCG	GCAACGAGCT	GTCTACAAAG	GAACAGATCT	CACGCAATAG
CAAAGCTCTG	GAAGAGAAGT	ATGTCGCAGA	GCTGCAGCTG	GAACGGCTGA
AGAAAAGATGG	CGAGGTGAGA	GGGTCAATTA	ATAGGTTCAA	GACAAGCGAC
TACGTCAAAG	AAGCCAAGCA	GCTGCTGAAA	GTGCAGAAGG	CTTACCACCA
GCTGGATCAG	AGCTTCATCG	ATACTTATAT	CGACCTGCTG	GAGACTCGGA
GAACCTACTA	TGAGGGACCA	GGAGAAGGGA	GCCCCCTCGG	ATGGAAAGAC
ATCAAGGAAT	GGTACGAGAT	GCTGATGGGA	CATTGCACCT	ATTTTCCAGA

AGAGCTGAGA AGCGTCAAGT ACGCTTATAA CGCAGATCT TACAACGCC TGAATGACCT  
 GAACAACCTG GTCATCACCA GGGATGAAAA CGAGAACTG GAATACTATG  
 AGAAGTTCCA GATCATCGAA AACGTGTTTA AGCAGAAGAA AAAGCCTACA  
 CTGAAACAGA TTGCTAAGGA GATCCTGGTC AACGAAGAGG ACATCAAGGG  
 CTACCGGGTG ACAAGCACTG GAAAACCAGA GTTCACCAAT CTGAAAGTGT  
 ATCACGATAT TAAGGACATC ACAGCACGGA AAGAAATCAT TGAGAACGCC  
 GAACTGCTGG ATCAGATTGC TAAGATCCTG ACTATCTACC AGAGCTCCGA  
 GGACATCCAG GAAGAGCTGA CTAACCTGAA CAGCGAGCTG ACCCAGGAAG  
 AGATCGAACA GATTAGTAAT CTGAAGGGGT ACACCGGAAC ACACAACCTG  
 TCCTGAAAG CTATCAATCT GATTCTGGAT GAGCTGTGGC ATACAAACGA  
 CAATCAGATT GCAATCTTTA ACCGGCTGAA GCTGGTCCCA AAAAAGGTGG  
 ACCTGAGTCA GCAGAAAGAG ATCCCAACCA CACTGGTGGG CGATTTTATT  
 CTGTCACCCG TGGTCAAGCG GAGCTTCATC CAGAGCATCA AAGTGATCAA  
 CGCCATCATC AAGAAGTACG GCCTGCCCAA TGATATCATT ATCGAGCTGG  
 CTAGGGAGAA GAACAGCAAG GACGCACAGA AGATGATCAA TGAGATGCAG  
 AAACGAAACC GGCAGACCAA TGAACGCATT GAAGAGATTA TCCGAAC TAC  
 CGGGAAAGAG AACGCAAAGT ACCTGATTGA AAAAATCAAG CTGCACGATA  
 TGCAGGAGGG AAAGTGCTG TATTCTCTGG AGGCCATCCC CCTGGAGGAC  
 CTGCTGAACA ATCCATTCAA CTACGAGGTC GATCATATTA TCCCAGAAG  
 CGTGTCCTTC GACAATTCCT TTAACAACAA GGTGCTGGTC AAGCAGGAAG  
 AGAACTCTAA AAAGGGCAAT AGGACTCCTT TCCAGTACCT GTCTAGTTCA  
 GATTCCAAGA TCTCTTACGA AACCTTTAAA AAGCACATTC TGAATCTGGC  
 CAAAGGAAAG GGCCGCATCA GCAAGACCAA AAAGGAGTAC CTGCTGGAAG  
 AGCGGGACAT CAACAGATTC TCCGTCCAGA AGGATTTTAT TAACCGGAAT  
 CTGGTGGACA CAAGATACGC TACTCGCGGC CTGATGAATC TGCTGCGATC  
 CTATTTCCGG GTGAACAATC TGGATGTGAA AGTCAAGTCC ATCAACGGCG  
 GGTTCACATC TTTTCTGAGG CGCAAATGGA AGTTTAAAAA GGAGCGCAAC  
 AAAGGGTACA AGCACCATGC CGAAGATGCT CTGATTATCG CAAATGCCGA  
 CTTTCATCTTT AAGGAGTGGA AAAAGCTGGA CAAAGCCAAG AAAGTGATGG  
 AGAACCAGAT GTTCGAAGAG AAGCAGGCCG AATCTATGCC CGAAATCGAG  
 ACAGAACAGG AGTACAAGGA GATTTTCATC ACTCCTCACC AGATCAAGCA  
 TATCAAGGAT TTCAAGGACT ACAAGTACTC TCACCGGGTG GATAAAAAGC  
 CCAACAGAGA GCTGATCAAT GACACCCTGT ATAGTACAAG AAAAGACGAT  
 AAGGGGAATA CCCTGATTGT GAACAATCTG AACGGACTGT ACGACAAAGA  
 TAATGACAAG CTGAAAAAGC TGATCAACAA AAGTCCCAGG AAGCTGCTGA  
 TGTACCACCA TGATCCTCAG ACATATCAGA AACTGAAGCT GATTATGGAG  
 CAGTACGGCG ACGAGAAGAA CCCACTGTAT AAGTACTATG AAGAGACTGG  
 GAACTACCTG ACCAAGTATA GCAAAAAGGA TAATGGCCCC GTGATCAAGA  
 AGATCAAGTA CTATGGGAAC AAGCTGAATG CCCATCTGGA CATCACAGAC  
 GATTACCCTA ACAGTCGCAA CAAGGTGGTC AAGCTGTCAC TGAAGCCATA  
 CAGATTGAT GTCTATCTGG ACAACGGCGT GTATAAATTT GTGACTGTCA  
 AGAATCTGGA TGTCATCAAA AAGGAGAACT ACTATGAAGT GAATAGCAAG  
 TGCTACGAAG AGGCTAAAAA GCTGAAAAAG ATTAGCAACC AGGCAGAGTT  
 CATCGCCTCC TTTTACAACA ACGACCTGAT TAAGATCAAT GGCGAACTGT  
 ATAGGGTCAT CGGGGTGAAC AATGATCTGC TGAACCGCAT TGAAGTGAAT  
 ATGATTGACA TCACTTACCG AGAGTATCTG GAAAACATGA ATGATAAGCG  
 CCCCCTCGA ATTATCAAAA CAATTGCCTC TAAGACTCAG AGTATCAAAA  
 AGTACTCAAC CGACATTCTG GGAAACCTGT ATGAGGTGAA GAGCAAAAAG  
 CACCCTCAGA TTATCAAAA GGGCTAAGAA TTC [SEQ ID NO: 32]

SEQ ID NO: 43 изложена ниже.

ATGGCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTCGGTATCCACGGAGTCCCAGCAGCCAAGCGGAACTACA  
TCTTGGGCTTGGACATCGGCATCACCAGCGTGGGCTACGGCATCATCGACTACGAGACACGGGA  
CGTGATCGATGCCGGCTGCGGCTGTTCAAAGAGGCCAACCTGGAAAACAACGAGGGCAGGCGG  
AGCAAGAGAGGCGCCAGAAGGCTGAAGCGGCGGAGGCGGCATAGAATCCAGAGAGTGAAGAAGC  
TGCTGTTTCGACTACAACCTGCTGACCGACCACAGCGAGCTGAGCGGCATCAACCCCTACGAGGC  
CAGAGTGAAGGGCTGAGCCAGAAGCTGAGCGAGGAAGAGTTCTCTGCCGCCCTGCTGCACCTG  
GCCAAGAGAAGAGGCGTGCACAACCTGAACGAGGTGGAAGAGGACACCGGCAACGAGCTGTCCA  
CCAAAGAGCAGATCAGCCGGAACAGCAAGGCCCTGGAAGAGAAAATACGTGGCCGAACTGCAGCT  
GGAACGGCTGAAGAAAGACGGCGAAGTGCAGGGGACGATCAACAGATTCAGAGCCAGCGACTAC  
GTGAAAGAAGCCAAACAGCTGCTGAAGGTGCAGAAGGCCCTACCACCAGCTGGACCAGAGCTTCA  
TCGACACCTACATCGACCTGCTGGAAAACCGGGGACCTACTATGAGGGACCTGGCGAGGGCAG  
CCCCTTCCGGCTGGAAGGACATCAAAGAATGGTACGAGATGCTGATGGGCCACTGCACCTACTTC  
CCCAGGAACTGCGGAGCGTGAAGTACGCCTACAACGCCGACCTGTACAACGCCCTGAACGACC  
TGAACAATCTCGTGATCACCAGGGACGAGAACGAGAAGCTGGAATATTACGAGAAGTTCAGAT  
CATCGAGAACGTGTTCAAGCAGAAGAAGAAGCCACCCCTGAAGCAGATCGCCAAAGAAAATCCTC  
GTGAACGAAGAGGATATTAAGGGCTACAGAGTGACCAGCACCGGCAAGCCCGAGTTACCAACC  
TGAAGGTGTACCACGACATCAAGGACATTACCGCCCGGAAAGAGATTATTGAGAACCGCGAGCT  
GCTGGATCAGATTGCCAAGATCCTGACCATCTACCAGAGCAGCGAGGACATCCAGGAAGAACTG  
ACCAATCTGAACTCCGAGCTGACCCAGGAAGAGATCGAGCAGATCTCTAATCTGAAGGGCTATA  
CCGGCACCCACAACCTGAGCCTGAAGGCCATCAACCTGATCCTGGACGAGCTGTGGCACACCAA  
CGACAACCAGATCGCTATCTTCAACCGGCTGAAGCTGGTGCCCAAGAAGGTGGACCTGTCCCAG  
CAGAAAGAGATCCCCACCACCCTGGTGGACGACTTCATCCTGAGCCCCGTCGTGAAGAGAAGCT  
TCATCCAGAGCATCAAAGTGATCAACGCCATCATCAAGAAGTACGGCCTGCCCAACGACATCAT  
TATCGAGCTGGCCCGCAGAGAAGAACTCCAAGGACGCCAGAAAATGATCAACGAGATGCAGAAG  
CGGAACCGGCAGACCAACGAGCGGATCGAGGAAATCATCCGGACCACCGGCAAAGAGAACGCCA  
AGTACCTGATCGAGAAGATCAAGCTGCACGACATGCAGGAAGGCAAGTGCCTGTACAGCCTGGA  
AGCCATCCCTCTGGAAGATCTGCTGAACAACCCCTTCAACTATGAGGTGGACCACATCATCCCC  
AGAAGCGTGTCTTCGACAACAGCTTCAACAACAAGGTGCTCGTGAAGCAGGAAGAAAACAGCA  
AGAAGGGCAACCGGACCCCATTCAGTACCTGAGCAGCAGCAGCAAGATCAGCTACGAAAC  
CTTCAAGAAGCACATCCTGAATCTGGCCAAGGGCAAGGGCAGAATCAGCAAGACCAAGAAAGAG  
TATCTGCTGGAAGAACGGGACATCAACAGGTTCTCCGTGCAGAAAGACTTCATCAACCGGAACC  
TGGTGGATACCAGATACGCCACCAGAGGCTGATGAACCTGCTGCGGAGCTACTTCAGAGTGAA  
CAACCTGGACGTGAAAGTGAAGTCCATCAATGGCGGCTTACCAGCTTTCTGCGGCGAAGTGG  
AAGTTTAAGAAAGAGCGGAACAAGGGGTACAAGCACCACGCCGAGGACGCCCTGATCATTGCCA  
ACGCCGATTTTCATCTTCAAAGAGTGAAGAAAAGTGGACAAGGCCAAAAAAGTATGGAACAACA  
GATGTTTCGAGGAAAAGCAGGCCGAGAGCATGCCCGAGATCGAAACCGAGCAGGAGTACAAAGAG  
ATCTTCATCACCCCCACCAGATCAAGCACATTAAGGACTTCAAGGACTACAAGTACAGCCACC  
GGTGGACAAGAAGCCTAATAGAGAGCTGATTAACGACACCCTGTACTCCACCCGGAAGGACGA  
CAAGGGCAACACCCTGATCGTGAACAATCTGAACGGCCTGTACGACAAGGACAATGACAAGCTG  
AAAAAGCTGATCAACAAGAGCCCCGAAAAGCTGCTGATGTACCACCACGACCCCCAGACCTACC  
AGAAAAGTGAAGCTGATTATGGAACAGTACGGCGACGAGAAGAATCCCCTGTACAAGTACTACGA  
GGAACCCGGGAACTACCTGACCAAGTACTCCAAAAAGGACAACCGCCCCGTGATCAAGAAGATT  
AAGTATTACGGCAACAAACTGAACGCCCATCTGGACATCACCGAGACTACCCCAACAGCAGAA  
ACAAGGTGCTGAAGCTGTCCCTGAAGCCCTACAGATTCGACGTGTACTGGACAATGGCGTGTA  
CAAGTTCGTGACCGTGAAGAATCTGGATGTGATCAAAAAAGAAAAGTACTACGAAAGTGAATAGC  
AAGTGCTATGAGGAAGCTAAGAAGCTGAAGAAGATCAGCAACCAGGCCGAGTTTATCGCCTCCT  
TCTACAACAACGATCTGATCAAGATCAACGGCGAGCTGTATAGAGTATCGGCGTGAACAACGA

CCTGCTGAACCGGATCGAAGTGAACATGATCGACATCACCTACCGCGAGTACCTGGAAAACATG  
 AACGACAAGAGGCCCCCCAGGATCATTAAGACAATCGCCTCCAAGACCCAGAGCATTAAAGAGT  
 ACAGCACAGACATTCTGGGCAACCTGTATGAAGTAAAATCTAAGAAGCACCCCTCAGATCATCAA  
 AAAGGGCAAAAAGGCCGGCGGCCACGAAAAAGGCCGGCCAGGCAAAAAAGAAAAAG [SEQ ID  
 NO: 43]

В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая молекулу Cas9 *S. aureus*, предусматривает нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 44, которая представлена ниже.

AAGCGGAAC TACATCCTGGGCTGGACATCGGCATCACCAGCGTGGGCTACGGCATCATCGACT  
 ACGAGACACGGGACGTGATCGATGCCGGCGTGC GGCTGTTCAAAGAGGCCAACGTGGAAAACAA  
 CGAGGGCAGGGCAGCAAGAGAGGCCAGCAAGGCTGAAGCGGGCAGGGCGGCATAGAATCCAG  
 AGAGTGAAGAAGCTGCTGTTCGACTACAACCTGTGACCGACCACAGCGAGCTGAGCGGCATCA  
 ACCCTACGAGGCCAGAGTGAAGGGCTGAGCCAGAAGCTGAGCGAGGAAGAGTTCTCTGCCGC  
 CCTGCTGCACCTGGCCAAGAGAAGAGGCGTGCACAACGTGAACGAGGTGGAAGAGGACACCGGC  
 AACGAGCTGTCCACCAAAGAGCAGATCAGCCGGAACAGCAAGGCCCTGGAAGAGAAATACGTGG  
 CCGAACTGCAGCTGGAACGGCTGAAGAAAGACGGCGAAGTGC GGGGCAGCATCAACAGATCAA  
 GACCAGCGACTACGTGAAAGAAGCCAAACAGCTGCTGAAGGTGCAGAAGGCC TACCACCAGCTG  
 GACCAGAGCTTCATCGACACCTACATCGACCTGCTGGAAACCCGGCGGACCTACTATGAGGGAC  
 CTGGCGAGGGCAGCCCCTTCGGCTGGAAGGACATCAAAGAATGGTACGAGATGCTGATGGGCCA  
 CTGCACCTACTTCCCCGAGGAACTGCGGAGCGTGAAGTACGCC TACAACGCCGACCTGTACAAC  
 GCCCTGAACGACCTGAACAATCTCGTGATCACCAGGGACGAGAACGAGAAGCTGGAATATTACG  
 AGAAGTTCAGATCATCGAGAACGTGTTCAAGCAGAAGAAGAAGCCACCCTGAAGCAGATCGC  
 CAAAGAAATCCTCGTGAACGAAGAGGATATTAAGGGCTACAGAGTGACCAGCACCGGCAAGCCC  
 GAGTTCACCAACCTGAAGGTGTACCACGACATCAAGGACATTACCGCCCGAAAGAGATTATG  
 AGAACGCCGAGCTGCTGGATCAGATTGCCAAGATCCTGACCATCTACCAGAGCAGCGAGGACAT  
 CCAGGAAGAAGCTGACCAATCTGAACTCCGAGCTGACCCAGGAAGAGATCGAGCAGATCTCTAAT  
 CTGAAGGGCTATACCGGCACCCACAACCTGAGCCTGAAGGCCATCAACCTGATCCTGGACGAGC  
 TGTGGCACACCAACGACAACCAGATCGTATCTTCAACCGGCTGAAGCTGGTGCCCAAGAAGGT  
 GGACCTGTCCCAGCAGAAAGAGATCCCCACCACCCTGGTGGACGACTTCATCCTGAGCCCCGTC  
 GTGAAGAGAAGCTTCATCCAGAGCATCAAAGTGATCAACGCCATCATCAAGAAGTACGGCCTGC  
 CCAACGACATCATTATCGAGCTGGCCCGCAGAGAAGAACTCCAAGGACGCCCCAGAAAATGATCAA  
 CGAGATGCAGAAGCGGAACCGGCAGACCAACGAGCGGATCGAGGAAATCATCCGACCACCGGC  
 AAAGAGAACGCCAAGTACCTGATCGAGAAGATCAAGCTGCACGACATGCAGGAAGGCAAGTGCC  
 TGTACAGCCTGGAAGCCATCCCTCTGGAAGATCTGCTGAACAACCCCTTCAACTATGAGGTGGA  
 CCACATCATCCCAGAAGCGTGTCTTCGACAACAGCTTCAACAACAAGGTGCTCGTGAAGCAG  
 GAAGAAAACAGCAAGAAGGGCAACCGGACCCCATTCAGTACCTGAGCAGCAGCGACAGCAAGA  
 TCAGCTACGAAACCTTCAAGAAGCACATCTGAATCTGGCCAAGGGCAAGGGCAGAATCAGCAA  
 GACCAAGAAAGAGTATCTGCTGGAAGAACGGGACATCAACAGGTCTCCTGTCAGAAAGACTTC  
 ATCAACCGGAACCTGGTGGATACCAGATACGCCACCAGAGGCTGATGAACCTGCTGCGGAGCT  
 ACTTCAGAGTGAACAACCTGGACGTGAAAGTGAAGTCCATCAATGGCGGCTTACCAGCTTTCT  
 GCGGCGGAAGTGAAGTTTAAAGAAAGAGCGGAACAAGGGGTACAAGCACCCAGCCGAGGACGCC  
 CTGATCATTGCCAACGCCGATTTTCATCTCAAAGAGTGAAGAAACTGGACAAGGCCAAAAAAG  
 TGATGAAAACAGATGTTTCGAGGAAAAGCAGGCCGAGAGCATGCCGAGATCGAAACCGAGCA  
 GGAGTACAAAGAGATCTTCATCACCCCCACCAGATCAAGCACATTAAGGACTTCAAGGACTAC  
 AAGTACAGCCACCGGTGGACAAGAAGCCTAATAGAGAGCTGATTAACGACACCCCTGTACTCCA  
 CCCGGAAGGACGACAAGGGCAACACCCTGATCGTGAACAATCTGAACGGCCTGTACGACAAGGA

CAATGACAAGCTGAAAAAGCTGATCAACAAGAGCCCCGAAAAGCTGCTGATGTACCACCACGAC  
 CCCCAGACCTACCAGAACTGAAGCTGATTATGGAACAGTACGGCGACGAGAAGAATCCCCTGT  
 ACAAGTACTACGAGGAAACCGGGAACCTCTGACCAAGTACTCCAAAAGGACAACGGCCCCGT  
 GATCAAGAAGATTAAGTATTACGGCAACAACTGAACGCCATCTGGACATCACCGACGACTAC  
 CCCAACAGCAGAAAACAGGTCGTGAAGCTGTCCCTGAAGCCCTACAGATTCGACGTGTACCTGG  
 ACAATGGCGTGTACAAGTTCGTGACCGTGAAGAATCTGGATGTGATCAAAAAAGAACTACTA  
 CGAAGTGAATAGCAAGTGTATGAGGAAGCTAAGAAGCTGAAGAAGATCAGCAACCAGGCCGAG  
 TTTATCGCCTCCTTCTACAACAACGATCTGATCAAGATCAACGGCGAGCTGTATAGAGTGATCG  
 GCGTGAACAACGACCTGTGAACCGGATCGAAGTGAACATGATCGACATCACCTACCGCGAGTA  
 CCTGGAAAACATGAACGACAAGAGGCCCCCCAGGATCATTAAGACAATCGCCTCCAAGACCCAG  
 AGCATTAAGAAGTACAGCACAGACATCTGGGCAACCTGTATGAAGTGAATCTAAGAAGCACC  
 CTCAGATCATCAAAAAGGGC [SEQ ID NO: 44]

Аминокислотная последовательность молекулы Cas9 *S. aureus* изложена под SEQ ID NO: 33, кото-  
 рая представлена ниже.

MKRNYILGLDIGITSVGYGIIDYETRVDIDAGVRLFKEANVENNEGRRSKRGARRLKRRRRHRI  
 QRVKLLFDYNLLTDHSELGINPYEARVKGLSQKLSEEEFSAALLHLAKRRGVHNVNEVEEDT  
 GNElstKEQISRNskALEEKYVAELQLERLKKDGEVRSINRFKTSdyVKEAKQLLKVQKAYHQ  
 LDQSFIDTYIDLLETRRtyYEGPGEgSPFGWKDIKEWYEMLMGHCTYFPEELRSVKYAYNADLY  
 NALNDLNNLVI TRDENEKLEYEKFQIIENVFKQKKKPTLKQIAKEILVNEEDIKGYRVSTGK  
 PEFTNLKVYHDIKDITARKEI IENAELLDQIAKILTYQSSEDIQEELTNLNSELTQEEIEQIS  
 NLKGYTGTHNLSLKAINLILDELWHTNDNQIAI FNRLKLVPKKVDLSQQKEIPTTLVDDFILSP  
 VVKRSFIQSIVINAI IKKYGLPNDII IELAREKNSKDAQKMINEMQKRNRQTNERIEEII RTT  
 GKENAKYLIEKIKLHDMQEGKCLYSLEAIPLEDLLNPFNYEVDHII PRSVSFDNSFNKVLVK  
 QEENSKGNRTPFQYLSSSDSKISYETFKKHILNLAKGKRISKTKKEYLLEERDINRFSVQKD  
 FINRNLVDTRYATRGLMNNLLRSYFRVNNLDVKVKS INGGFTSFLRRKWKFKKERNKGYKHAED  
 ALIIANADFI FKewKkLDKAKKVMENQMFEEKQAESMPEIETEQEYKEIFITPHQIKHIKDFKD  
 YKSHRVDKPKNRELINDTLYSTRKDDKNTLIVNNLNGLYDKDNDKLLKLINKSPEKLLMYHH  
 DPQTYQKLKLIMEQYGDENPLYKYEEETGNLYTKYSKKNPVIKKIKYYGNKLNALHLDITDD  
 YPNSRNKVVKLSLKPYPYFDVYLDNGVYKFVTVKNLVDIKKENYEVNSKCYEEAKLKKISNQA  
 EFIASFYNNDLIKINGELYRVIGVNNDLLNRIEVNMIDITYREYLENMNDKRPPRIIKTIASKT  
 QSIKYSTDILGNLYEVKSKKHPQIIKKG [SEQ ID NO: 33]

Аминокислотная последовательность молекулы Cas9 *S. aureus* изложена под SEQ ID NO: 45, кото-  
 рая представлена ниже.

KRNYILGLDIGITSVGYGIIDYETRVDIDAGVRLFKEANVENNEGRRSKRGARRLKRRRRHRIQ  
 RVKLLFDYNLLTDHSELGINPYEARVKGLSQKLSEEEFSAALLHLAKRRGVHNVNEVEEDTG  
 NELSTKEQISRNskALEEKYVAELQLERLKKDGEVRSINRFKTSdyVKEAKQLLKVQKAYHQ  
 LDQSFIDTYIDLLETRRtyYEGPGEgSPFGWKDIKEWYEMLMGHCTYFPEELRSVKYAYNADLYN  
 ALNDLNNLVI TRDENEKLEYEKFQIIENVFKQKKKPTLKQIAKEILVNEEDIKGYRVSTGK  
 EFTNLKVYHDIKDITARKEI IENAELLDQIAKILTYQSSEDIQEELTNLNSELTQEEIEQISN  
 LKGYTGTHNLSLKAINLILDELWHTNDNQIAI FNRLKLVPKKVDLSQQKEIPTTLVDDFILSPV  
 VKRSFIQSIVINAI IKKYGLPNDII IELAREKNSKDAQKMINEMQKRNRQTNERIEEII RTTG  
 KENAKYLIEKIKLHDMQEGKCLYSLEAIPLEDLLNPFNYEVDHII PRSVSFDNSFNKVLVKQ  
 EENSKGNRTPFQYLSSSDSKISYETFKKHILNLAKGKRISKTKKEYLLEERDINRFSVQKDF  
 INRNLVDTRYATRGLMNNLLRSYFRVNNLDVKVKS INGGFTSFLRRKWKFKKERNKGYKHAEDA  
 LIIANADFI FKewKkLDKAKKVMENQMFEEKQAESMPEIETEQEYKEIFITPHQIKHIKDFKDY  
 KYSHRVDKPKNRELINDTLYSTRKDDKNTLIVNNLNGLYDKDNDKLLKLINKSPEKLLMYHHD  
 PQTYQKLKLIMEQYGDENPLYKYEEETGNLYTKYSKKNPVIKKIKYYGNKLNALHLDITDDY  
 PNSRNKVVKLSLKPYPYFDVYLDNGVYKFVTVKNLVDIKKENYEVNSKCYEEAKLKKISNQA  
 EFIASFYNNDLIKINGELYRVIGVNNDLLNRIEVNMIDITYREYLENMNDKRPPRIIKTIASKTQ  
 SIKKYSTDILGNLYEVKSKKHPQIIKKG [SEQ ID NO: 45]

Как альтернатива или дополнительно система редактирования генов на основе CRISPR/Cas9 может включать в себя слитый белок. Слитый белок может содержать два гетерологичных полипептидных домена, где первый полипептидный домен содержит белок Cas и второй полипептидный домен обладает активностью, такой как активность по отношению к активации транскрипции, активность по отношению к репрессии транскрипции, активность по отношению к фактору освобождения транскриптов, активность по отношению к модификации гистонов, нуклеазная активность, активность по отношению к ассоциации нуклеиновых кислот, метилазная активность или деметилазная активность. Слитый белок может предусматривать белок Cas9 или мутированный белок Cas9, слитый со вторым полипептидным доменом, который обладает активностью, такой как активность по отношению к активации транскрипции, активность по отношению к репрессии транскрипции, активность по отношению к фактору освобождения транскриптов, активность по отношению к модификации гистонов, нуклеазная активность, активность по отношению к ассоциации нуклеиновых кислот, метилазная активность или деметилазная активность.

(a) Активность по отношению к активации транскрипции.

Второй полипептидный домен может обладать активностью по отношению к активации транскрипции, т.е. трансактивирующим доменом. Например, экспрессия эндогенных генов млекопитающих, таких как гены человека, может достигаться за счет нацеливания слитого белка iCas9 и трансактивирующего домена на промоторы млекопитающих посредством комбинации gRNA. Трансактивирующий домен может включать в себя белок VP 16, множество белков VP 16, таких как домен VP48, или домен VP64, или домен p65 активатора активности транскрипции NF каппа В. Например, слитый белок может представлять собой iCas9-VP64.

(b) Активность по отношению к репрессии транскрипции.

Второй полипептидный домен может обладать активностью по отношению к репрессии транскрипции. Второй полипептидный домен может обладать активностью, связанной с Kruppel-боксом, таким как KRAB-домен, активностью по отношению к репрессии ERF-домена, активностью по отношению к репрессии Mxi1-домена, активностью по отношению к репрессии SID4X-домена, активностью по отношению к репрессии Mad-SID-домена или активностью по отношению к белку, связывающему TATA-бок. Например, слитый белок может представлять собой dCas9-KRAB.

(c) Активность по отношению к фактору освобождения транскриптов.

Второй полипептидный домен может обладать активностью по отношению к фактору освобождения транскриптов. Второй полипептидный домен может обладать активностью по отношению к эукариотическому фактору высвобождения 1 (ERF1) или активностью по отношению к эукариотическому фактору высвобождения 3 (ERF3).

(d) Активность по отношению к модификации гистонов.

Второй полипептидный домен может обладать активностью по отношению к модификации гистонов. Второй полипептидный домен может обладать гистондеацетилазной, гистонацетилтрансферазной, гистондеметиلاзной или гистонметилтрансферазной активностью. Гистонацетилтрансфераза может представлять собой p300 или CREB-связывающий белок (CBP белок) или их фрагмент. Например, слитый белок может представлять собой dCas9-p300.

(e) Нуклеазная активность.

Второй полипептидный домен может обладать нуклеазной активностью, которая отличается от нуклеазной активности белка Cas9. Нуклеазой или белком, обладающим нуклеазной активностью, является фермент, способный расщеплять фосфодиэфирные связи между нуклеотидными субъединицами нуклеиновых кислот. Нуклеазы обычно дополнительно разделяются на эндонуклеазы и экзонуклеазы, хотя некоторые из ферментов могут попадать в обе категории. Хорошо известными нуклеазами являются дезоксирибонуклеаза и рибонуклеаза.

(f) Активность по отношению к ассоциации нуклеиновых кислот.

Второй полипептидный домен может обладать активностью по отношению к ассоциации нуклеиновых кислот или ДНК-связывающего домена (DBD) белка, связывающего нуклеиновую кислоту, который представляет собой независимо уложенный домен белка, который содержит по меньшей мере один мотив, распознающий двухнитевую или однонитевую молекулу ДНК. DBD может распознавать конкретную последовательность ДНК (распознавание последовательности) или обладать общей аффинностью к ДНК. При этом область ассоциации нуклеиновых кислот выбрана из группы, состоящей из области спираль-поворот-спираль, области лейциновой "застежки", области "крылатая спираль", области "крылатая спираль-поворот-спираль", области спираль-петля-спираль, укладки цепи иммуноглобулинов, В3-домена, домена с "цинковыми пальцами", HMG-бокса, Woz3-домена, TAL-эффектора ДНК-связывающего домена.

(g) Метилазная активность.

Второй полипептидный домен может обладать метилазной активностью, которая предусматривает перенос метильной группы на ДНК, РНК, белок, малую молекулу, цитозин или аденин. Второй полипептидный домен может включать ДНК-метилтрансферазу.

(h) Деметилазная активность.

Второй полипептидный домен может обладать деметилазной активностью. Второй полипептидный

домен может включать в себя фермент, который удаляет метильные (CH<sub>3</sub>-) группы из нуклеиновых кислот, белков (в частности, гистонов) и других молекул. Как альтернатива второй полипептид может скрывать метильную группу к гидроксиметилцитозину в механизме деметилирования ДНК. Второй полипептид может катализировать данную реакцию. Например, второй полипептид, который катализирует данную реакцию, может представлять собой Tet1.

(b) gRNA, нацеливающая на ген дистрофина.

Система редактирования генов на основе CRISPR/Cas9 включает в себя по меньшей мере одну молекулу gRNA, например две молекулы gRNA. gRNA обеспечивает нацеливание системы редактирования генов на основе CRISPR/Cas9. gRNA является слитой конструкцией из двух некодирующих РНК: crRNA и tracrRNA. sgRNA может нацеливаться на любую требуемую последовательность ДНК путем обмена последовательности, кодирующей протоспейсер размером 20 п.о., который обеспечивает специфичность нацеливания, посредством комплементарного спаривания оснований с требуемой целевой ДНК. При этом gRNA имитирует встречающийся в природе дуплекс crRNA:tracrRNA, принимающий участие в эф-фекторной системе типа II. Этот дуплекс, который может включать в себя, например, 42-нуклеотидную crRNA и 75-нуклеотидную tracrRNA, действует как направляющий для Cas9 для расщепления целевой нуклеиновой кислоты. Термины "целевая область", "целевая последовательность" или "протоспейсер", используемые в данном документе взаимозаменяемо, относятся к области гена-мишени (например, гена дистрофина), на которую нацеливается система редактирования генов на основе CRISPR/Cas9. Система редактирования генов на основе CRISPR/Cas9 может включать в себя по меньшей мере одну gRNA, где gRNA нацеливаются на различные последовательности ДНК. Целевые последовательности ДНК могут быть перекрывающимися. После целевой последовательности или протоспейсера следует последовательность PAM на 3'-конце протоспейсера. Различные системы типа II имеют разные требования к PAM. Например, в системе типа II из *Streptococcus pyogenes* используется последовательность "NGG", где "N" может представлять собой любой нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления последовательность PAM может представлять собой "NGG", где "N" может представлять собой любой нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления последовательность PAM может представлять собой NNGRRT (SEQ ID NO: 24) или NNGRRV (SEQ ID NO: 25).

Количество молекул gRNA, кодируемых раскрытой в настоящем изобретении генетической конструкцией (например, вектор на основе AAV) может представлять собой по меньшей мере 1 gRNA, по меньшей мере 2 различные gRNA, по меньшей мере 3 различные gRNA, по меньшей мере 4 различные gRNA, по меньшей мере 5 различных gRNA, по меньшей мере 6 различных gRNA, по меньшей мере 7 различных gRNA, по меньшей мере 8 различных gRNA, по меньшей мере 9 различных gRNA, по меньшей мере 10 различных gRNA, по меньшей мере 11 различных gRNA, по меньшей мере 12 различных gRNA, по меньшей мере 13 различных gRNA, по меньшей мере 14 различных gRNA, по меньшей мере 15 различных gRNA, по меньшей мере 16 различных gRNA, по меньшей мере 17 различных gRNA, по меньшей мере 18 различных gRNA, по меньшей мере 19 различных gRNA, по меньшей мере 20 различных gRNA, по меньшей мере 25 различных gRNA, по меньшей мере 30 различных gRNA, по меньшей мере 35 различных gRNA, по меньшей мере 40 различных gRNA, по меньшей мере 45 различных gRNA или по меньшей мере 50 различных gRNA. Количество gRNA, кодируемых вектором, раскрытым в настоящем изобретении, может составлять от по меньшей мере 1 gRNA до по меньшей мере 50 различных gRNA, от по меньшей мере 1 gRNA до по меньшей мере 45 различных gRNA, от по меньшей мере 1 gRNA до по меньшей мере 40 различных gRNA, от по меньшей мере 1 gRNA до по меньшей мере 35 различных gRNA, от по меньшей мере 1 gRNA до по меньшей мере 30 различных gRNA, от по меньшей мере 1 gRNA до по меньшей мере 25 различных gRNA, от по меньшей мере 1 gRNA до по меньшей мере 20 различных gRNA, от по меньшей мере 1 gRNA до по меньшей мере 16 различных gRNA, от по меньшей мере 1 gRNA до по меньшей мере 12 различных gRNA, от по меньшей мере 1 gRNA до по меньшей мере 8 различных gRNA, от по меньшей мере 1 gRNA до по меньшей мере 4 различных gRNA, от по меньшей мере 4 gRNA до по меньшей мере 50 различных gRNA, от по меньшей мере 4 различных gRNA до по меньшей мере 45 различных gRNA, от по меньшей мере 4 различных gRNA до по меньшей мере 40 различных gRNA, от по меньшей мере 4 различных gRNA до по меньшей мере 35 различных gRNA, от по меньшей мере 4 различных gRNA до по меньшей мере 30 различных gRNA, от по меньшей мере 4 различных gRNA до по меньшей мере 25 различных gRNA, от по меньшей мере 4 различных gRNA до по меньшей мере 20 различных gRNA, от по меньшей мере 4 различных gRNA до по меньшей мере 16 различных gRNA, от по меньшей мере 4 различных gRNA до по меньшей мере 12 различных gRNA, от по меньшей мере 4 различных gRNA до по меньшей мере 8 различных gRNA, от по меньшей мере 8 различных gRNA до по меньшей мере 50 различных gRNA, от по меньшей мере 8 различных gRNA до по меньшей мере 45 различных gRNA, от по меньшей мере 8 различных gRNA до по меньшей мере 40 различных gRNA, от по меньшей мере 8 различных gRNA до по меньшей мере 35 различных gRNA, от 8 различных gRNA до по меньшей мере 30 различных gRNA, от по меньшей мере 8 различных gRNA до по меньшей мере 25 различных gRNA, от 8 различных gRNA до по меньшей мере 20 различных gRNA, от по меньшей мере 8 различных gRNA до по меньшей мере 16 различных gRNA или от 8 различных gRNA до по меньшей мере 12 различных gRNA. В определенных вариантах осуществления гене-

тическая конструкция (например, вектор AAV) кодируется одной молекулой gRNA, т.е. первой молекулой gRNA и необязательно молекулой Cas9. В определенных вариантах осуществления первая генетическая конструкция (например, первый вектор на основе AAV) кодируется одной молекулой gRNA, т.е. первой молекулой gRNA и необязательно молекулой Cas9, и вторая генетическая конструкция (например, второй вектор AAV) кодируется одной молекулой gRNA, т.е. второй молекулой gRNA и необязательно молекулой Cas9.

Молекула gRNA содержит нацеливающий домен, который комплементарен полинуклеотидной последовательности целевой ДНК, после которой следует последовательность PAM. При этом gRNA может содержать "G" на 5'-конце нацеливающего домена или комплементарной полинуклеотидной последовательности. Нацеливающий домен молекулы gRNA может содержать по меньшей мере 10 пар оснований, по меньшей мере 11 пар оснований, по меньшей мере 12 пар оснований, по меньшей мере 13 пар оснований, по меньшей мере 14 пар оснований, по меньшей мере 15 пар оснований, по меньшей мере 16 пар оснований, по меньшей мере 17 пар оснований, по меньшей мере 18 пар оснований, по меньшей мере 19 пар оснований, по меньшей мере 20 пар оснований, по меньшей мере 21 пар оснований, по меньшей мере 22 пары оснований, по меньшей мере 23 пары оснований, по меньшей мере 24 пары оснований, по меньшей мере 25 пар оснований, по меньшей мере 30 пар оснований или по меньшей мере 35 пар оснований, комплементарных последовательности целевой ДНК, после которой следует последовательность PAM. В определенных вариантах осуществления длина нацеливающего домена молекулы gRNA составляет 19-25 нуклеотидов. В определенных вариантах осуществления длина нацеливающего домена молекулы gRNA составляет 20 нуклеотидов. В определенных вариантах осуществления длина нацеливающего домена молекулы gRNA составляет 21 нуклеотид. В определенных вариантах осуществления длина нацеливающего домена молекулы gRNA составляет 22 нуклеотида. В определенных вариантах осуществления длина нацеливающего домена молекулы gRNA составляет 23 нуклеотида.

gRNA может нацеливаться на область гена дистрофина (DMD). В определенных вариантах осуществления gRNA может нацеливаться на по меньшей мере одно из экзонов, интронов, промоторной области, энхансерной области, транскрибируемой области гена дистрофина. В определенных вариантах осуществления молекула gRNA нацеливается на интрон 50 гена дистрофина человека. В определенных вариантах осуществления молекула gRNA нацеливается на интрон 51 гена дистрофина человека. В определенных вариантах осуществления молекула gRNA нацеливается на экзон 51 гена дистрофина человека. gRNA может включать в себя нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, или комплементарную ей последовательность.

Одиночную или мультиплексную gRNA можно сконструировать для восстановления рамки считывания дистрофина путем нацеливания мутационного участка горячих точек в экзоне 51 или как введение либо внутриэкзонных небольших вставок, так и делеций, либо удаление экзона 51. После лечения с помощью вектора, раскрытого в настоящем изобретении, может восстанавливаться экспрессия дистрофина в мышечных клетках пациента с Duchenne *in vitro*. Дистрофин человека был выявлен *in vivo* после трансплантации генетически скорректированных клеток пациента в иммунодефицитных мышей. Особенно важно то, что уникальные возможности многократного редактирования генов системы редактирования генов на основе CRISPR/Cas9 позволяют эффективно получать большие делеции этого мутационного участка горячих точек, которые могут корректировать до 62% мутаций пациента универсальными или специфичными для пациента подходами для редактирования гена. В некоторых вариантах осуществления кандидатные gRNA оценивали и выбирали на основании нецелевой активности, целевой активности, измеренных с помощью анализа Surveyor, а также расстояния от экзона.

### 3. Композиции для нацеливания на ДНК.

Настоящее изобретение также относится к композициям для нацеливания на ДНК, которые содержат данные генетические конструкции. Композиции для нацеливания на ДНК содержат по меньшей мере одну молекулу gRNA (например, две молекулы gRNA), которая нацеливается на ген дистрофина (например, ген дистрофина человека), как описано выше. По меньшей мере одна молекула gRNA может связывать и распознавать целевую область. Целевые области можно выбирать непосредственно выше возможных стоп-кодонах за пределами рамки считывания, так что вставки или делеции во время процесса репарации восстанавливают рамку считывания дистрофина путем преобразования рамки считывания. Целевые области также могут представлять собой сайты акцепторов сплайсинга или сайты доноров сплайсинга, так что вставки или делеции во время процесса репарации нарушают сплайсинг и восстанавливают рамку считывания дистрофина с помощью разрушения сайта сплайсинга и исключения экзона. Целевые области также могут представлять собой aberrантные стоп-кодона, так что вставки или делеции во время процесса репарации восстанавливают рамку считывания дистрофина, устраняя или разрушая стоп-кодон.

В определенных вариантах осуществления композиция для нацеливания на ДНК, раскрытая в настоящем изобретении, включает в себя первую gRNA и вторую gRNA, где первая молекула gRNA и вто-





зительно 300 п.о. до приблизительно 850 п.о., от приблизительно 300 п.о. до приблизительно 800 п.о., от приблизительно 300 п.о. до приблизительно 750 п.о., от приблизительно 300 п.о. до приблизительно 700 п.о., от приблизительно 300 п.о. до приблизительно 600 п.о., от приблизительно 300 п.о. до приблизительно 3000 п.о., от приблизительно 300 п.о. до приблизительно 400 п.о. или от приблизительно 300 п.о. до приблизительно 350 п.о. В определенных вариантах осуществления размер делеции может составлять приблизительно 118 п.о., приблизительно 233 п.о., приблизительно 326 п.о., приблизительно 766 п.о., приблизительно 805 п.о. или приблизительно 1611 п.о.

#### 4. Композиции для редактирования генома в мышце.

Настоящее изобретение направлено на генетические конструкции (например, векторы) или их композицию для редактирования гена-мишени в скелетной мышце или сердечной мышце в геноме субъекта. Композиция включает в себя модифицированный вектор на основе AAV и нуклеотидную последовательность, кодирующую систему редактирования генов на основе CRISPR/Cas9, например молекулу gRNA и молекулу Cas9. Композиция доставляет активные формы системы редактирования генов на основе CRISPR/Cas9 в скелетную мышцу или сердечную мышцу. Раскрытые в настоящем изобретении генетические конструкции (например, векторы) могут применяться в коррекции или уменьшении эффектов мутаций в гене дистрофина, вовлеченном в генетические заболевания и/или другие состояния, связанные со скелетной мышцей или сердечной мышцей, например DMD. Композиция может дополнительно содержать донорную ДНК или трансген. Эти композиции могут применяться в редактировании генома, в конструировании генома и коррекции или уменьшении эффектов мутаций в генах, вовлеченных в генетические заболевания и/или другие состояния, связанные со скелетной мышцей или сердечной мышцей.

##### а. Система редактирования генов на основе CRISPR/Cas9 для нацеливания на ген дистрофина.

В данном документе раскрыта система редактирования генов на основе CRISPR/Cas9, специфичная в отношении гена дистрофина. Система редактирования генов на основе CRISPR/Cas9 может включать в себя Cas9 и по меньшей мере одну gRNA для нацеливания на ген дистрофина. Система редактирования генов на основе CRISPR/Cas9 может связываться и распознавать целевую область. Целевые области можно выбирать непосредственно выше возможных стоп-кодонах за пределами рамки считывания, так что вставки или делеции во время процесса репарации восстанавливают рамку считывания дистрофина путем преобразования рамки считывания. Целевые области также могут представлять собой сайты акцепторов сплайсинга или сайты доноров сплайсинга, так что вставки или делеции во время процесса репарации нарушают сплайсинг и восстанавливают рамку считывания дистрофина с помощью разрушения сайта сплайсинга и исключения экзона. Целевые области также могут представлять собой aberrантные стоп-кодона, так что вставки или делеции во время процесса репарации восстанавливают рамку считывания дистрофина, устраняя или разрушая стоп-кодон.

gRNA может нацеливаться на нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-19, 41, 42, или комплементарную ей последовательность. Например, раскрытую систему редактирования генов на основе CRISPR/Cas9 конструировали с тем, чтобы опосредовать высокоэффективное редактирование генов в экзоне 51 гена дистрофина. Эта система редактирования генов на основе CRISPR/Cas9 восстанавливает экспрессию белка дистрофина в клетках пациентов с DMD. В некоторых вариантах осуществления композиция для нацеливания на ДНК содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 37, нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 38, нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 83 и/или нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 84. Например, композиция для нацеливания на ДНК включает нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 37, нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 38 и нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 83, или композиция для нацеливания на ДНК включает нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 37, нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 38 и нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 84.

##### б. Векторы на основе аденоассоциированного вируса.

Композиция может также включать в себя вирусную систему доставки. В определенных вариантах осуществления вектор представляет собой вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV). Вектор на основе AAV представляет собой небольшой вирус, принадлежащий к роду Dependovirus семейства Parvoviridae, который инфицирует людей и некоторые другие виды приматов. Векторы на основе AAV можно использовать для доставки системы редактирования генов на основе CRISPR/Cas9 с применением различных конфигураций конструкции. Например, векторы на основе AAV могут доставлять кассеты экспрессии Cas9 и gRNA на отдельные векторы или на тот же вектор. Как альтернатива, если используются небольшие белки Cas9, полученные из таких видов как *Staphylococcus aureus* или *Neisseria meningitidis*, то и кассета экспрессии Cas9, и не менее двух кассет экспрессии gRNA могут быть объединены в одном векторе на основе AAV с пределом упаковки, составляющим 4,7 т.о.

В определенных вариантах осуществления вектор на основе AAV представляет собой модифицированный вектор на основе AAV. Модифицированный вектор на основе AAV может обладать повышенным тропизмом к сердечной и скелетной мышечным тканям. Модифицированный вектор на основе AAV может быть способен к доставке и экспрессировать систему редактирования генов на основе

CRISPR/Cas9 в клетке млекопитающего. Например, модифицированный вектор на основе AAV может представлять собой вектор AAV-SASTG (Piacentino et al. (2012), *Human Gene Therapy*, 23: 635-646). Модифицированный вектор на основе AAV может доставлять нуклеазы в скелетную и сердечную мышцы *in vivo*. Модифицированный вектор на основе AAV может быть на основе одного или нескольких из ряда типов капсида, в том числе AAV1, AAV2, AAV5, AAV6, AAV8 и AAV9. Модифицированный вектор на основе AAV может быть на основе псевдотипа AAV2 с альтернативными тропными к мышцам капсидами AAV, таким как векторы AAV2/1, AAV2/6, AAV2/7, AAV2/8, AAV2/9, AAV2.5 и AAV/SASTG, которые эффективно трансдуцируют скелетную мышцу или сердечную мышцу путем системной и местной доставки (Seto et al., *Current Gene Therapy* (2012), 12: 139-151). Модифицированный вектор на основе AAV может представлять собой AAV2i8G9 (Shen et al., *J. Biol. Chem.* (2013), 288: 28814-28823). В некоторых вариантах осуществления композиция содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 39, и/или нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 40. В некоторых вариантах осуществления композиция включает в себя первый вектор, содержащий нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 39, и второй вектор, содержащий нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 40.

##### 5. Способы редактирования генома в мышце.

Настоящее изобретение направлено на способ редактирования генома в скелетной мышце или сердечной мышце субъекта. Способ предусматривает введение в скелетную мышцу или сердечную мышцу субъекта композиции для редактирования генома в скелетной мышце или сердечной мышце, как описано выше. Редактирование генома может предусматривать коррекцию мутантного гена или вставку трансгена. Коррекция мутантного гена может предусматривать удаление, перестройку или замену мутантного гена. Коррекция мутантного гена может включать опосредованный нуклеазой NHEJ или HDR.

##### 6. Способы коррекции мутантного гена и лечения субъекта.

Раскрытый в настоящем изобретении объект изобретения также предусматривает способы коррекции мутантного гена (например, мутантного гена дистрофина, например мутантного гена дистрофина человека) в клетке и лечение субъекта, страдающего от генетического заболевания, такого как DMD. Способ может предусматривать введение в клетку или субъекту генетической конструкции (например, вектора), раскрытой в настоящем изобретении, или содержащей ее композиции, как описано выше. Способ может предусматривать введение в скелетную мышцу или сердечную мышцу субъекта генетической конструкции (например, вектора), раскрытой в настоящем изобретении, или содержащей ее композиции для редактирования генома в скелетной мышце или сердечной мышце, как описано выше. Применение генетической конструкции (например, вектора), раскрытой в настоящем изобретении, или содержащей ее композиции для доставки системы редактирования генов на основе CRISPR/Cas9 в скелетную мышцу или сердечную мышцу может восстанавливать экспрессию полнофункционального или частично функционального белка с использованием матрицы репарации или донорной ДНК, которая может заменить весь ген или область, содержащую мутацию. Система редактирования генов на основе CRISPR/Cas9 может использоваться для введения сайт-специфических двухнитевых разрывов в целевые геномные локусы. Сайт-специфические двухнитевые разрывы создаются тогда, когда система редактирования генов на основе CRISPR/Cas9 связывается с последовательностями целевой ДНК, обеспечивая тем самым возможность расщепления целевой ДНК. Такое расщепление ДНК может стимулировать естественный механизм репарации ДНК, сводящийся к одному из двух возможных путей репарации: репарации с участием гомологичной рекомбинации (HDR) или негомологичного соединения концов (NHEJ).

Настоящее изобретение направлено на редактирование генома с использованием системы редактирования генов на основе CRISPR/Cas9 без матрицы репарации, которая может эффективно корректировать рамку считывания и восстанавливать экспрессию функционального белка, вовлеченного в генетическое заболевание. Раскрытые системы редактирования генов на основе CRISPR/Cas9 могут предусматривать использование подходов коррекции на основе репарации с участием гомологичной рекомбинации или опосредованного нуклеазой негомологичного соединения концов (NHEJ), что обеспечивает возможность эффективной коррекции в линиях первичных клеток с ограниченной пролиферацией, которые могут не поддаваться гомологичной рекомбинации или генной коррекции на основе отбора. Эта стратегия объединяет быструю и надежную сборку активных систем редактирования генов на основе CRISPR/Cas9 с эффективным способом редактирования генов для лечения генетических заболеваний, вызванных мутациями в несущественных кодирующих областях, которые являются причиной сдвига рамки, преждевременных стоп-кодонов, аберрантных сайтов доноров сплайсинга или аберрантных сайтов акцепторов сплайсинга.

##### а. Опосредованное нуклеазой негомологичное соединение концов.

Восстановление экспрессии белка из эндогенного мутированного гена может проводиться путем NHEJ-опосредованной репарации ДНК без участия матрицы. В отличие от временного способа нацеливания на РНК гена-мишени коррекция рамки считывания гена-мишени в геноме с помощью временно экспрессируемой системы редактирования генов на основе CRISPR/Cas9 может приводить к полному восстановлению экспрессии целевого гена каждой модифицированной клеткой и во всем ее потомстве. В определенных вариантах осуществления NHEJ представляет собой опосредованный нуклеазой NHEJ,

который в определенных вариантах осуществления относится к NHEJ, инициируемому молекулой Cas9, которая разрезает двухнитевую ДНК. Способ предусматривает введение генетической конструкции (например, вектора), раскрытой в настоящем изобретении, или содержащей ее композиции в скелетную мышцу или сердечную мышцу субъекта для редактирования генома в скелетной мышце или сердечной мышце.

Коррекция гена с помощью опосредованного нуклеазой NHEJ может исправлять мутированный ген-мишень и предлагает несколько потенциальных преимуществ над путем HDR. Например, для NHEJ не требуется донорная матрица, которая может вызывать неспецифический инсерционный мутагенез. В отличие от HDR, NHEJ эффективно работает на всех стадиях клеточного цикла и поэтому может эффективно использоваться как в делящихся, так и в постмитотических клетках, таких как мышечные волокна. Это обеспечивает надежное, полное восстановление гена, являющееся альтернативой пропуску экзонов на основе олигонуклеотидов или фармакологически инициируемому сквозному прохождению стоп-кодонов, и теоретически могла бы требоваться обработка всего лишь одним лекарственным средством. Коррекцию гена на основе NHEJ с использованием системы редактирования генов на основе CRISPR/Cas9, а также других сконструированных нуклеаз, включая мегануклеазы и нуклеазы типа "цинковые пальцы", можно комбинировать с другими существующими платформами *ex vivo* и *in vivo* для клеточной и генной видов терапии в дополнение к описанному в данном документе способу электропорации плазмид. Например, доставка системы редактирования генов на основе CRISPR/Cas9 путем переноса генов на основе mRNA или в виде очищенных белков, способных проникать в клетку, может обеспечить возможность использования подхода к редактированию генома без ДНК, что позволит избежать любой возможности инсерционного мутагенеза.

b. Репарация с участием гомологичной рекомбинации.

Восстановление экспрессии белка из эндогенного мутированного гена может предусматривать репарацию с участием гомологичной рекомбинации. Вышеописанный способ дополнительно предусматривает введение донорной матрицы в клетку. Донорная матрица может включать в себя нуклеотидную последовательность, кодирующую полнофункциональный белок или частично функциональный белок. Например, донорная матрица может включать в себя конструкцию дистрофина с уменьшенным размером, называемую минидистрофином ("минидис"), полнофункциональную конструкцию дистрофина для восстановления мутантного гена дистрофина или фрагмент гена дистрофина, который после гомологичной репарации приводит к восстановлению мутантного гена дистрофина.

c. Способы коррекции мутантного гена и лечения субъекта с применением CRISPR/Cas9.

Настоящее изобретение также направлено на редактирование генома с помощью системы редактирования генов на основе CRISPR/Cas9 для восстановления экспрессии полнофункционального или частично функционального белка с использованием матрицы репарации или донорной ДНК, которая может заменить весь ген или область, содержащую мутацию. Система редактирования генов на основе CRISPR/Cas9 может использоваться для введения сайт-специфических двухнитевых разрывов в целевые геномные локусы. Сайт-специфичные двухнитевые разрывы создаются тогда, когда система редактирования генов на основе CRISPR/Cas9 связывается с последовательностями целевой ДНК с помощью gRNA, обеспечивая тем самым возможность расщепления целевой ДНК. Система редактирования генов на основе CRISPR/Cas9 обладает преимуществом в отношении усовершенствованного редактирования генома из-за их высокого уровня успешной и эффективной генетической модификации. Такое расщепление ДНК может стимулировать естественный механизм репарации ДНК, сводящийся к одному из двух возможных путей репарации: репарации с участием гомологичной рекомбинации (HDR) или негомологичного соединения концов (NHEJ). Например, система редактирования генов на основе CRISPR/Cas9, направленная на ген дистрофина, может включать в себя gRNA, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты под любой из SEQ ID NO: 1-19, 41, 42 или комплементарную ей последовательность.

Настоящее изобретение направлено на редактирование генома с использованием системы редактирования генов на основе CRISPR/Cas9 без матрицы репарации, которая может эффективно корректировать рамку считывания и восстанавливать экспрессию функционального белка, вовлеченного в генетическое заболевание. Раскрытая система редактирования генов на основе CRISPR/Cas9 может предусматривать использование подходов с коррекцией на основе репарации с участием гомологичной рекомбинации или опосредованного нуклеазой негомологичного соединения концов (NHEJ), что обеспечивает возможность эффективной коррекции в линиях первичных клеток с ограниченной пролиферацией, которые могут не поддаваться гомологичной рекомбинации или генной коррекции на основе отбора. Эта стратегия объединяет быструю и надежную сборку активной системы редактирования генов на основе CRISPR/Cas9 с эффективным способом редактирования генов для лечения генетических заболеваний, вызванных мутациями в несущественных кодирующих областях, которые являются причиной сдвига рамки, преждевременных стоп-кодонов, абберрантных сайтов доноров сплайсинга или абберрантных сайтов акцепторов сплайсинга.

Настоящее изобретение предусматривает способы коррекции мутантного гена в клетке и лечения субъекта, страдающего от генетического заболевания, такого как DMD. Способ может предусматривать введение в клетку или субъекту системы редактирования генов на основе CRISPR/Cas9, полинуклеотида

или вектора, кодирующего указанную систему редактирования генов на основе CRISPR/Cas9, или композиции, содержащей указанную систему редактирования генов на основе CRISPR/Cas9, как описано выше. Способ может предусматривать введение системы редактирования генов на основе CRISPR/Cas9, как например, введение белка Cas9 или слитого белка Cas9, содержащего второй домен, обладающий нуклеазной активностью, нуклеотидной последовательности, кодирующей указанный белок Cas9 или слитый белок Cas9, и/или по меньшей мере одной gRNA, где gRNA нацеливаются на различные последовательности ДНК. Целевые последовательности ДНК могут быть перекрывающимися. Количество gRNA, вводимой в клетку, может составлять по меньшей мере 1 gRNA, по меньшей мере 2 разные gRNA, по меньшей мере 3 разные gRNA, по меньшей мере 4 разные gRNA, по меньшей мере 5 разных gRNA, по меньшей мере 6 разных gRNA, по меньшей мере 7 разных gRNA, по меньшей мере 8 разных gRNA, по меньшей мере 9 разных gRNA, по меньшей мере 10 разных gRNA, по меньшей мере 15 разных gRNA, по меньшей мере 20 разных gRNA, по меньшей мере 30 разных gRNA или по меньшей мере 50 разных gRNA, описанных выше. gRNA может включать в себя последовательность нуклеиновой кислоты по меньшей мере одной из SEQ ID NO: 1-19, 41, 42 или комплементарную ей последовательность. Способ может предусматривать репарацию с участием гомологичной рекомбинации или негомологичное соединение концов.

#### 7. Способы лечения заболевания.

Настоящее изобретение направлено на способ лечения заболевания у субъекта, нуждающегося в этом. Способ предусматривает введение в ткань или субъекту генетической конструкции (например, вектора), раскрытой в настоящем изобретении, или содержащей ее композиции, как описано выше. В определенных вариантах осуществления способ может предусматривать введение в скелетную мышцу или сердечную мышцу субъекта генетической конструкции (например, вектора), раскрытой в настоящем изобретении, или содержащей ее композиции, как описано выше. В определенных вариантах осуществления способ может предусматривать введение в вену субъекта генетической конструкции (например, вектора), раскрытой в настоящем изобретении, или содержащей ее композиции, как описано выше. В определенных вариантах осуществления субъект страдает от состояния, связанного со скелетной мышцей или сердечной мышцей, вызывающих дегенерацию, или слабость, или генетическое заболевание. Например, субъект может страдать от мышечной дистрофии Дюшенна, как описано выше.

##### а. Мышечная дистрофия Дюшенна.

Как описано выше, способ можно применять для коррекции гена дистрофина и удаления полнофункциональной или частично функциональной экспрессии белка указанного мутированного гена дистрофина. В некоторых аспектах и вариантах осуществления изобретение предусматривает способ уменьшения эффектов (например, клинических симптомов/признаков) DMD у пациента. В некоторых аспектах и вариантах осуществления изобретение предусматривает способ лечения DMD у пациента. В некоторых аспектах и вариантах осуществления изобретение предусматривает способ предупреждения DMD у пациента. В некоторых аспектах и вариантах осуществления изобретение предусматривает способ предупреждения дальнейшего прогрессирования DMD у пациента.

#### 8. Способы получения трансгенного грызуна с $\Delta 52$ hDMD.

Настоящее изобретение относится к способу получения трансгенного эмбриона грызуна, у которого имеется ген дистрофина человека с делецией экзона 52. Способ предусматривает введение эмбриону грызуна gRNA, за счет чего обеспечивается делеция экзона 52 из гена дистрофина человека, и отбор трансгенного эмбриона грызуна, у которого имеется делеция экзона 52 гена дистрофина человека, где эмбрион грызуна содержит нормальный ген дистрофина человека. В некоторых вариантах осуществления эмбрион грызуна представляет собой эмбрион мыши. В некоторых вариантах осуществления трансгенный эмбрион грызуна является гетерозиготным hDMD или гетерозиготным hDMD- $\Delta 52$ . В некоторых вариантах осуществления первую молекулу gRNA, содержащую нацеливающий домен, который включает в себя нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 41, и вторую молекулу gRNA, содержащую нацеливающий домен, который включает в себя нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 42, вводят в эмбрион грызуна для осуществления делеции экзона 52 гена дистрофина человека. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение в эмбрион грызуна белка Cas, содержащего аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 27. Настоящее изобретение направлено на трансгенный эмбрион грызуна, который получают с помощью данного способа. Настоящее изобретение также относится к трансгенному грызуну, полученному из трансгенного эмбриона грызуна.

#### 9. Конструкции и плазмиды.

Вышеописанные композиции могут содержать генетические конструкции, которые кодируют систему редактирования генов на основе CRISPR/Cas9, как раскрыто в данном документе. Генетическая конструкция, такая как плазида, может содержать нуклеиновую кислоту, которая кодирует систему редактирования генов на основе CRISPR/Cas9, такую как белок Cas9 и слитые белки Cas9 и/или по меньшей мере одну из gRNA. Вышеописанные композиции могут содержать генетические конструкции, которые кодируют модифицированный вектор на основе AAV и последовательность нуклеиновой кислоты,

которая кодирует систему редактирования генов на основе CRISPR/Cas9, как раскрыто в данном документе. Генетическая конструкция, такая как плазмида, может содержать нуклеиновую кислоту, которая кодирует систему редактирования генов на основе CRISPR/Cas9. Вышеописанные композиции могут содержать генетические конструкции, которые кодируют модифицированный лентивирусный вектор, раскрытый в данном документе.

Генетическая конструкция, такая как рекомбинантная плазмида или рекомбинантная вирусная частица, может содержать нуклеиновую кислоту, которая кодирует слитый белок Cas9, и по меньшей мере одну gRNA. В некоторых вариантах осуществления генетическая конструкция может содержать нуклеиновую кислоту, которая кодирует слитый белок Cas9 и по меньшей мере две различные gRNA. В некоторых вариантах осуществления генетическая конструкция может содержать нуклеиновую кислоту, которая кодирует слитый белок Cas9 и более двух различных gRNA. В некоторых вариантах осуществления генетическая конструкция может содержать промотор, который функционально связан с нуклеотидной последовательностью, кодирующей по меньшей мере одну молекулу gRNA и/или молекулу Cas9. В некоторых вариантах осуществления промотор функционально связан с нуклеотидной последовательностью, кодирующей первую молекулу gRNA, вторую молекулу gRNA и/или молекулу Cas9. Генетическая конструкция может присутствовать в клетке в виде функционирующей внехромосомной молекулы. Генетическая конструкция может представлять собой линейную минихромосому, включающую в себя центромеру, теломеры или плазмиды или космиды.

Генетическая конструкция также может представлять собой часть генома рекомбинантного вирусного вектора, в том числе рекомбинантного лентивируса, рекомбинантного аденовируса и рекомбинантного аденоассоциированного вируса. Генетическая конструкция может представлять собой генетического материала в аттенуированных живых микроорганизмах или рекомбинантных микробных векторах, которые заселяют клетки. Генетические конструкции могут содержать регуляторные элементы для экспрессии генов кодирующих последовательностей нуклеиновой кислоты. Регуляторные элементы могут представлять собой промотор, энхансер, иницирующий кодон, стоп-кодон или сигнал полиаденилирования.

В определенных вариантах осуществления генетическая конструкция представляет собой вектор. Вектор может представлять собой вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV), который кодирует по меньшей мере одну молекулу Cas9 и по меньшей мере одну молекулу gRNA; при этом вектор способен экспрессировать по меньшей мере одну молекулу Cas9 и по меньшей мере молекулу gRNA в клетке млекопитающего. Вектор может представлять собой плазмиду. Векторы можно применять для генной терапии *in vivo*. Вектор может являться рекомбинантным. Вектор может содержать гетерологичную нуклеиновую кислоту, кодирующую слитый белок, такой как слитый белок Cas9 или система редактирования генов на основе CRISPR/Cas9. Вектор может представлять собой плазмиду. Вектор может быть применим для трансфекции клеток нуклеиновой кислотой, кодирующей слитый белок Cas9 или систему редактирования генов на основе CRISPR/Cas9, при этом трансформированную клетку-хозяина культивируют и поддерживают в условиях, при которых происходит экспрессия слитого белка Cas9 или системы редактирования генов на основе CRISPR/Cas9.

Кодирующие последовательности могут быть оптимизированы для стабильности и высоких уровней экспрессии. В некоторых случаях кодоны выбирают для уменьшения образования вторичной структуры РНК, такой как структура, образовавшаяся вследствие внутримолекулярного связывания.

Вектор может содержать гетерологичную нуклеиновую кислоту, кодирующую систему редактирования генов на основе CRISPR/Cas9, и может дополнительно содержать иницирующий кодон, который может располагаться выше кодирующей последовательности системы редактирования генов на основе CRISPR/Cas9, а также стоп-кодон, который может располагаться ниже кодирующей последовательности системы редактирования генов на основе CRISPR/Cas9. Иницирующий кодон и кодон терминации могут находиться в рамке с кодирующей последовательностью системы редактирования генов на основе CRISPR/Cas9. Вектор также может содержать промотор, который функционально связан с кодирующей последовательностью системы редактирования генов на основе CRISPR/Cas9. Промотор, который функционально связан с кодирующей последовательностью системы редактирования генов на основе CRISPR/Cas9, может представлять собой промотор из вируса обезьяны 40 (SV40), промотор вируса опухоли молочной железы мыши (MMTV), промотор вируса иммунодефицита человека (HIV), такой как промотор длинного концевой повтора (LTR) вируса иммунодефицита крупного рогатого скота (BIV), промотор вируса Молони, промотор вируса птичьего лейкоза (ALV), промотор цитомегаловируса (CMV), такой как промотор гена немедленного раннего ответа CMV, промотор вируса Эпштейна-Барр (EBV), промотор U6, такой как промотор U6 человека, или промотор вируса саркомы Рауса (RSV). Промотор также может представлять собой промотор из гена человека, такого как ген убиквитина С человека (hUbC), актина человека, миозина человека, гемоглобина человека, креатина мышц человека или металлотioneина человека. Промотор также может представлять собой тканеспецифичный промотор, такой как промотор, специфичный в отношении мышц или кожи, природный или синтетический. Примеры таких промоторов описаны в публикациях патентных заявок США № US 2004/0175727 и US 2004/0192593, содержание которых включено в данный документ во всей своей полноте. Примеры промоторов, специ-

фичных в отношении мышц, включают промотор Spc5-12 (описанный в публикации патентной заявки США № US 2004/0192593, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте; Nakim et al., *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* (2014), 1: 14002; и Lai et al., *Hum Mol Genet.* (2014), 23(12): 3189-3199), промотор МНСК7 (описанный в Salva et al., *Mol. Ther.* (2007), 15: 320-329), промотор СК8 (описанный в Park et al., *PLoS ONE* (2015), 10(4): e0124914) и промотор СК8е (описанный в Muir et al., *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* (2014), 1: 14025). В некоторых вариантах осуществления экспрессией gRNA и/или белка Cas9 управляют с помощью tRNA.

Каждая из полинуклеотидных последовательностей, кодирующих молекулу gRNA и/или молекулу Cas9, может быть функционально связана с промотором. Промоторы, которые функционально связаны с молекулой gRNA и/или молекулой Cas9, могут представлять собой один и тот же промотор. Промоторы, которые функционально связаны с молекулой gRNA и/или молекулой Cas9, могут представлять собой разные промоторы. Промотор может представлять собой конститутивный промотор, индуцируемый промотор, репрессируемый промотор или регулируемый промотор.

Вектор также может содержать сигнал полиаденилирования, который может располагаться ниже системы редактирования генов на основе CRISPR/Cas9. Сигнал полиаденилирования может представлять собой сигнал полиаденилирования SV40, сигнал полиаденилирования LTR, сигнал полиаденилирования бычьего гормона роста (bGH), сигнал полиаденилирования гормона роста человека (hGH) или сигнал полиаденилирования  $\beta$ -глобина человека. Сигнал полиаденилирования SV40 может представлять собой сигнал полиаденилирования из вектора pCEP4 (Invitrogen, Сан-Диего, Калифорния).

Вектор также может содержать энхансер выше системы редактирования генов на основе CRISPR/Cas9, т.е. кодирующей последовательности белка Cas9, или слитого белка Cas9, или sgRNA, или системы редактирования генов на основе CRISPR/Cas9. Энхансер может быть необходим для экспрессии ДНК. Энхансер может представлять собой энхансер гена актина человека, миозина человека, гемоглобина человека, креатина мышц человека или вирусный энхансер, такой как один из CMV, HA, RSV или EBV. Энхансеры для осуществления функции полинуклеотидов описаны в патентах США № 5593972, 5962428 и в заявке WO 94/016737, содержание каждого из которых полностью включено посредством ссылки. Вектор также может содержать точку начала репликации млекопитающих, чтобы поддерживать вектор вне хромосомы и создавать множественные копии вектора в клетке. Вектор также может содержать регуляторную последовательность, которая может хорошо подходить для экспрессии генов в клетке млекопитающего или человека, в которую вводится вектор. Вектор также может содержать репортерный ген, такой как ген зеленого флуоресцентного белка ("GFP"), и/или селективируемый маркер, такой как ген резистентности к гигромицину ("Hygro").

Вектор может представлять собой векторы экспрессии или системы для получения белка с помощью стандартных методик и с помощью общедоступных исходных материалов, включенных в справочник Sambrook et al., *Molecular Cloning and Laboratory Manual*, Second Ed., Cold Spring Harbor (1989), который полностью включен посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления вектор может содержать последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую систему редактирования генов на основе CRISPR/Cas9, в том числе последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок Cas9 или слитый белок Cas9, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую по меньшей мере одну gRNA, содержащую последовательность нуклеиновой кислоты по меньшей мере под одной из SEQ ID NO: 1-19, 41, 42 или комплементарную ей последовательность. В некоторых вариантах осуществления белок Cas9 или слитый белок Cas9 кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты под любой из SEQ ID NO: 26. В некоторых вариантах осуществления вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 39 или SEQ ID NO: 40.

#### 10. Фармацевтические композиции.

Раскрытый в настоящем изобретении объект изобретения предусматривает композиции, содержащие вышеописанные генетические конструкции. Фармацевтические композиции в соответствии с настоящим изобретением могут состоять в соответствии с применяемым способом введения. В случаях если фармацевтические композиции представляют собой инъекционные фармацевтические композиции, они являются стерильными, свободными от пирогенов и не содержат частиц. Предпочтительным является использование изотонического состава. Как правило, добавки для изотоничности могут включать хлорид натрия, декстрозу, маннит, сорбит и лактозу. В некоторых случаях предпочтительными являются изотонические растворы, такие как фосфатно-буферный солевой раствор. Стабилизаторы включают в себя желатин и альбумин. В некоторых вариантах осуществления в состав добавляют сосудосуживающее средство.

Композиция может дополнительно содержать фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество. Фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество может представлять собой функциональные молекулы, такие как наполнители, адъюванты, носители или разбавители. Фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество может представлять собой средство, облегчающее трансфекцию, которое может включать поверхностно-активные средства, такие как иммуностимулирующие комплексы (ISCOMS), неполный адъювант Фрейнда, аналог LPS, в том числе монофосфорилипид А, мурамиловые пептиды, аналоги хинона, везикулы, такие как сквален и сквален, гиалуроновая кислота, липиды, липо-

сомы, ионы кальция, вирусные белки, полианионы, поликатионы или наночастицы или другие известные средства, облегчающие трансфекцию.

Средство, облегчающее трансфекцию, представляет собой полианион, поликатион, в том числе поли-L-глутамат (LGS), или липид. Средство, облегчающее трансфекцию, представляет собой поли-L-глутамат, а более предпочтительно, поли-L-глутамат присутствует в композиции для редактирования генома в скелетной мышце или сердечной мышце при концентрации, составляющей менее 6 мг/мл. Средство, облегчающее трансфекцию, может также включать поверхностно-активные средства, такие как иммуностимулирующие комплексы (ISCOMS), неполный адъювант Фрейнда, аналог LPS, в том числе монофосфориллипид А, мурамиловые пептиды, аналоги хинона и везикулы, такие как сквален и сквален, при этом также можно использовать гиалуроновую кислоту при введении в сочетании с генетической конструкцией. В некоторых вариантах осуществления ДНК-вектор, кодирующий композицию, также может включать в себя средство, облегчающее трансфекцию, такое как липиды, липосомы, в том числе лецитиновые липосомы, или другие липосомы, известные в данной области техники, в виде смеси ДНК-липосом (см., например, Международную патентную публикацию № WO 9324640), ионы кальция, вирусные белки, полианионы, поликатионы или наночастицы или другие известные средства, облегчающие трансфекцию. Предпочтительно средство, облегчающее трансфекцию, представляет собой полианион, поликатион, в том числе поли-L-глутамат (LGS), или липид.

#### 11. Способы доставки.

В данном документе предусмотрен способ доставки раскрытой в настоящем изобретении генетической конструкции (например, вектора) или ее композиции в клетку. Доставку композиций можно осуществлять с помощью трансфекции или электропорации композиции, в виде молекулы нуклеиновой кислоты, которая экспрессируется в клетке и доставляется на поверхность клетки. Молекулы нуклеиновых кислот можно подвергать электропорации с использованием устройств BioRad Gene Pulser Xcell или Amaha Nucleofector Ib. Можно использовать несколько различных буферов, в том числе раствор для электропорации BioRad, фосфатно-буферный солевой раствор от Sigma с № D8537 (PBS), Invitrogen OptiMEM I (OM) или Amaha Nucleofector solution V (N.V.). Трансфекции могут предусматривать реагент для трансфекции, такой как Lipofectamine 2000.

После доставки раскрытой в настоящем изобретении генетической конструкции или композиции в ткань и как результат вектора в клетки млекопитающего трансфицированные клетки будут экспрессировать молекулу(ы) gRNA и молекулу Cas9. Генетическую конструкцию или композицию можно вводить млекопитающему для изменения экспрессии генов или переконструирования либо изменения генома. Например, генетическую конструкцию или композицию можно вводить млекопитающему для коррекции гена дистрофина у млекопитающего. Млекопитающее может представлять собой человека, примата, отличного от человека, корову, свинью, овцу, козу, антилопу, бизона, водного буйвола, крупный рогатый скот, оленя, ежа, слоновых, ламу, альпаку, мышей, крыс или курицу, предпочтительно человека, корову, свинью или курицу.

Генетическую конструкцию (например, вектор), кодирующую молекулу(ы) gRNA и молекулу Cas9, можно доставлять млекопитающему с помощью инъекции ДНК (также называемой вакцинацией ДНК) с электропорацией *in vivo* и без нее, опосредованной липосомами, с помощью наночастиц и/или рекомбинантных векторов. Рекомбинантный вектор можно доставлять с помощью любой вирусной формы. Вирусная форма может представлять собой рекомбинантный лентивирус, рекомбинантный аденовирус и/или рекомбинантный аденоассоциированный вирус.

Генетическую конструкцию (например, вектор), раскрытую в настоящем изобретении, или содержащую ее композицию можно вводить в клетку для генетической коррекции гена дистрофина (например, гена дистрофина человека). В определенных вариантах осуществления генетическую конструкцию (например, вектор), раскрытую в настоящем изобретении, или содержащую ее композицию вводят в миобласт от пациента с DMD. В определенных вариантах осуществления генетическую конструкцию (например, вектор) или содержащую ее композицию вводят в клетку фибробласта от пациента с DMD, и генетически скорректированная клетка фибробласта может подвергаться обработке с помощью MyoD для индукции дифференцировки в миобласты, которые можно имплантировать субъектам, таким как субъект с поврежденными мышцами, чтобы проверить, что скорректированный белок дистрофина является функциональным и/или для лечения субъекта. Модифицированные клетки могут также являться стволовыми клетками, такими как индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, клетки-предшественники, полученные из костного мозга, клетки-предшественники скелетной мышцы, скелетные миобласты человека от пациентов с DMD, клетки CD 133<sup>+</sup>, мезоангиобласты и трансдуцированные клетки MyoD или Pax7 или другие миогенные клетки-предшественники. Например, система редактирования генов на основе CRISPR/Cas9 может вызывать нейрональную или миогенную дифференцировку индуцированной плюрипотентной стволовой клетки.

#### 12. Пути введения.

Раскрытые в настоящем изобретении генетические конструкции (например, векторы) или содержащую их композицию можно вводить субъекту различными путями, в том числе перорально, парентерально, сублингвально, трансдермально, ректально, трансмукозально, местно, посредством ингаляции,



тированного гена дистрофина или редактирования гена дистрофина в геноме скелетной мышцы или сердечной мышцы могут включать в себя модифицированный вектор на основе AAV, который включает в себя молекулу(ы) gRNA и молекулу Cas9, как описано выше, которые специфично связываются и расщепляют область гена дистрофина. Система редактирования генов на основе CRISPR/Cas9, как описано выше, может быть включена в набор для специфического связывания и нацеливания на конкретную область в мутированном гене дистрофина. Набор может дополнительно включать донорную ДНК, различные gRNA или трансген, как описано выше.

#### 15. Примеры.

Специалистам в данной области техники будет понятно, что другие подходящие модификации и адаптации способов по настоящему изобретению, описанных в данном документе, являются легко применимыми и существенными и могут осуществляться с применением подходящих эквивалентов без отступления от объема настоящего изобретения или аспектов и вариантов осуществления, раскрытых в данном документе. Теперь при наличии подробного описания настоящего изобретения указанное будет более ясно раскрыто при рассмотрении следующих примеров, которые просто подразумеваются для иллюстрации некоторых аспектов и вариантов осуществления настоящего изобретения и не должны рассматриваться как ограничивающие объем изобретения. Раскрытия всех журнальных ссылок, патентов США и публикаций, называемых в данном документе, включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Настоящее изобретение характеризуется множеством аспектов, проиллюстрированных с помощью следующих неограничивающих примеров.

#### Пример 1. Нацеливание на ген дистрофина человека.

Систему редактирования генов на основе CRISPR/Cas9 применяли для нацеливания и обеспечения делеции экзона 51 в гене дистрофина человека. Cas9 из *S. aureus* (SaCas9), размер которой на приблизительно 1 т.о. меньше, чем у Cas9 из *S. pyogenes*, применяли с аденоассоциированным вирусом (AAV) для доставки системы редактирования генов на основе CRISPR/Cas9. Кодон-оптимизированная последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая молекулу Cas9 из *S. aureus*, изложена под SEQ ID NO: 43 или SEQ ID NO: 44. На фиг. 3 показано схематическое изображение системы на основе AAV для совместной доставки *in vivo* SaCas9 и двух gRNA в двух вирусных векторах к мышечным тканям. Каждый вектор содержал копию SaCas9 и одной gRNA, управляемых соответственно промоторами CMV и hU6 (PT366-179 (SEQ ID NO: 39) и PT366-183 (SEQ ID NO: 40)).

Активность отдельных gRNA, нацеливающихся на ген дистрофина человека, JCR89 (осуществляет нацеливание выше экзона 51) и JCR91 (осуществляет нацеливание ниже экзона 51), которые разрабатывали в отношении генома человека, определяли с помощью анализа Surveyor в клетках HEK293T (содержат нормальный вариант гена дистрофина) и линиях миобластов от пациентов с DMD (DMD 8036 и DMD 6594, каждая из которых содержала мутантную форму гена дистрофина) (см. фиг. 1). Посредством анализа Surveyor выявляли ошибочно спаренные основания в геномной ДНК, которые являлись признаком вставок/делений, внесенных системой редактирования генов на основе CRISPR/Cas9. Что касается JCR89, то размер полосы, соответствующей исходной форме, составлял 555 нт, и применяемые праймеры представляли собой следующие: прямой праймер - aagttactgtccagcatga (SEQ ID NO: 91) и обратный праймер - gaaaaaactctgccactttatca (SEQ ID NO: 92). Ожидаемые размеры полос, соответствующих формам, полученным после разреза, составляли 134 и 421 нт. Что касается JCR91, то размер полосы, соответствующей исходной форме, составлял 632 нт, и применяемые праймеры представляли собой следующие: прямой праймер - tgcaataaasaaagtagccataca (SEQ ID NO: 93) и обратный праймер - tcttta-gaaagcttgaagctg (SEQ ID NO: 94). Ожидаемые размеры полос, соответствующих формам, полученным после разреза, составляли 210 и 422 нт.

Клетки HEK293T и миобласты DMD (DMD 8036 и DMD 6594) обрабатывали с помощью SaCas9 совместно с JCR89 и JCR91 gRNA (SEQ ID NO: 37 и SEQ ID NO: 38). Геномную ДНК амплифицировали с помощью прямого праймера - ctctactgtgccagttta (SEQ ID NO: 95) и обратного праймера - tcttta-gaaagcttgaagctg (SEQ ID NO: 94). Ожидаемый размер полосы, соответствующей исходной форме, составлял 1646 нт, и ожидаемый размер полосы, соответствующей форме с "наиболее подходящей" делецией, составлял 766 нт (фактический размер делеции между сайтами разрезов gRNA отличался от 766 нт вследствие наличия вставок/делений). На фиг. 2А показана делеция экзона 51 в геномной ДНК из клеток HEK293T и миобластов DMD. На фиг. 2В показана делеция экзона 51 в кДНК из миобластов DMD. "Без RT" представляет собой отрицательный контроль, при котором обратная транскриптаза не добавлялась.

Систему редактирования генов на основе CRISPR/Cas9 вводили посредством инъекции в трансгенных мышей, несущих ген DMD человека (мышь hDMD/mdx), для обеспечения делеции экзона 51. Обеспечивали местную доставку вирусных векторов AAV8, несущих SaCas9 и gRNA, в переднюю большеберцовую (ТА) мышцу. См. табл. 1. AAV8 вводили посредством инъекции 3 мышам: 1 мышь вводили посредством инъекции высокую дозу AAV8 в обе ТА ("НН"), 1 мышь вводили посредством инъекции низкую дозу AAV8 в обе ТА ("LL") и 1 мышь вводили посредством инъекции низкую дозу в левую ТА и высокую дозу в правую ТА ("LH"). Дозы перечислены в колонке 2 табл. 1. Мышей умерщвляли через

8 недель после обработки ("недели РТ") с целью сбора тканей для анализа. Посредством гнездовой ПЦР выявляли делецию экзона 51 в обеих конечностях у мыши с обработкой НН, в правой ТА у мыши с обработкой LL и в правой конечности у мыши с обработкой LH.

Эксперимент	Дозировка	Доставка	Недели РТ	Таблица 1 гнездовая
	AAV8			ПЦР - gDNA Δ51
НН, LL, LH	НН: 6.6E11	Внутримышечная, в переднюю большеберцовую (ТА) мышцу	8	НН: обе, LL: R, LH: R
	LL: 1E11			

Геномную ДНК, выделенную из ТА мышцы мыши, амплифицировали в первом раунде ПЦР-реакции с применением прямого праймера: cttcactgctggccagttta (SEQ ID NO: 95) и обратного праймера: tccttagaaggcttgaaagctg (SEQ ID NO: 94). Применяли 1-3 мкл продукта ПЦР во втором раунде ПЦР-реакции (2X ПЦР gDNA) с применением прямого праймера - aagtactgtccaggcatga (SEQ ID NO: 91) и обратного праймера - ttgaacatggcattgcataaA (SEQ ID NO: 96). Продукты этого второго цикла ПЦР характеризовались ожидаемым размером полосы, соответствующей исходной форме, составляющим 1089 нт, и ожидаемым размером полосы, соответствующей форме с делецией, составляющим 323 нт (фактический размер при делеции между сайтами разрезов gRNA отличался от 323 нт вследствие наличия вставок/делеций). На фиг. 4 показаны результаты второго цикла ПЦР. Дорожки "L" демонстрируют результаты для левой ТА мышцы, которую использовали в качестве контроля и в которую вводили солевым раствором. Дорожки "R" демонстрируют результаты для правой ТА мышцы, в которую вводили посредством инъекции 2 вирусных вектора, которые предварительно смешивали в равных количествах. Систему редактирования генов на основе CRISPR/Cas9 также вводили посредством инъекции в хвостовую вену мышей hDMD/mdx путем системной доставки AAV8 (см. фиг. 5). Геномную ДНК, выделенную из печени (фиг. 5 - левая панель) и сердца мыши (фиг. 5 - правая панель), также амплифицировали с применением аналогичного протокола, как для фиг. 4. Ожидаемая полоса, соответствующая размеру примерно 300 нуклеотидов, свидетельствовала о делеции экзона 51.

Получали и отбирали дополнительные gRNA, которые нацеливались на последовательности гена дистрофина человека и макака-резуса или последовательности гена дистрофина человека (см. фиг. 6 и табл. 2). В табл. 2 приведены основная мишень gRNA, распознаваемая геномная нить, последовательность gRNA и последовательность PAM, связанная с gRNA. Геномные последовательности-мишени для gRNA, указанные в геномной плюс-нити, перечислены в табл. 3. Эти gRNA тестировали на культивируемых клетках человека для выявления оптимальной активности gRNA и их комбинаций для получения делеций. Отобранные gRNA также ранжировали по преимуществу на основании предсказанной специфичности в отношении генома человека (фиг. 8) и подвергали скринингу в отношении оптимальных значений длины целевой последовательности, варьирующих от 19 до 23 нуклеотидов (фиг. 10 и 11). На фиг. 6 показаны различные мишени gRNA, перечисленные в табл. 2, которые являются консервативными среди геномов человека и макака-резуса. Расположение каждой gRNA указано по отношению к экзону 51 гена дистрофина человека.



	(выше)						
	Экзон 51 DMD						
JCR171	человека и макака-резуса	минус	АСТТАGAGGТСТТСТАСА ТАСА	9	АТGAGТ	62	
	(выше)						
	Экзон 51 DMD						
JCR156	человека и макака-резуса	минус	ТСAGAGGТGAGТGGТGAG GGGA	10	AGGAAT	63	
	(выше)						
	Экзон 51 DMD						
JCR157	человека и макака-резуса	минус	АСАСАСAGСТGGGТТАТС AGAG	11	GAGAGТ	57	
	(выше)						
	Экзон 51 DMD						
JCR176	человека и макака-резуса	минус	САСAGСТGGGТТАТСАGА G	12	GAGAGТ	57	
	(выше)						
	Экзон 51 DMD						
JCR177	человека и макака-резуса	минус	АСАСAGСТGGGТТАТСAG AG	13	GAGAGТ	57	
	(выше)						
	Экзон 51 DMD						
JCR178	человека и макака-резуса	минус	САСАСAGСТGGGТТАТСА GAG	14	GAGAGТ	57	
	(выше)						
	Экзон 51 DMD						
JCR179	человека и макака-резуса	минус	ААСАСАСAGСТGGGТТАТ СAGAG	15	GAGAGТ	57	
	(выше)						
	Экзон 51 DMD						
JCR180	человека и макака-резуса	минус	СТGGТGGGAAATGGТСТА G	16	GAGAGТ	57	
	(ниже)						
	Экзон 51 DMD						
JCR181	человека и макака-резуса	минус	АСТGGТGGGAAATGGТСТ AG	17	GAGAGТ	57	
	(ниже)						
	Экзон 51 DMD						
JCR182	человека и макака-резуса	минус	ААСТGGТGGGAAATGGТC TAG	18	GAGAGТ	57	
	(ниже)						
	Экзон 51 DMD						
JCR183	человека и макака-резуса	минус	AGAACTGGТGGGAAATGG ТСТАG	19	GAGAGТ	57	
	(ниже)						

Таблица 3

Целевые последовательности gRNA			
Название gRNA	Целевая последовательность (плюс-нить 5' - 3')	SEQ ID NO:	Комментарии
JCR89	AAAGATATATAATGTCATGAAT	64	
JCR91	GCAGAATCAAATATAATAGTCT	65	
JCR159	CAATTAAATTTGACTTATTTGTT	66	на 101 выше экзона 51
JCR160	CTAGACCATTTCCCACCAGTTC	67	на 78 ниже экзона 51
JCR167	AGGACTTTTATTTACCAAAGGA	68	на 1534 ниже экзона 51
JCR166	ATCCAAGTCCATTTGATTCCSTA	69	на 1266 ниже экзона 51
JCR168	TAATTCTTTCTAGAAAGAGCCT	70	на 1824 выше экзона 51
JCR170	GGACATGTGCAAGATGCAAGAG	71	на 2851 выше экзона 51
JCR171	TGTATGTAGAAGACCTCTAAGT	72	на 2947 выше экзона 51
JCR156	TCCCCTCACCACCTCACCTCTGA	73	на 1300 выше экзона 51
JCR157	CTCTGATAACCCAGCTGTGTGT	74	на 1284 выше экзона 51
JCR176	CTCTGATAACCCAGCTGTG	75	JCR157-19 нуклеотидов
JCR177	CTCTGATAACCCAGCTGTGT	76	JCR157-20 нуклеотидов
JCR178	CTCTGATAACCCAGCTGTGTG	77	JCR157-21 нуклеотид
JCR179	CTCTGATAACCCAGCTGTGTGTT	78	JCR157-23 нуклеотида
JCR180	CTAGACCATTTCCCACCAG	79	JCR160-19 нуклеотидов
JCR181	CTAGACCATTTCCCACCAGT	80	JCR160-20 нуклеотидов
JCR182	CTAGACCATTTCCCACCAGTT	81	JCR160-21 нуклеотид
JCR183	CTAGACCATTTCCCACCAGTTCT	82	JCR160-23 нуклеотида

Клетки HEK293T человека трансфицировали отдельными кандидатными gRNA, перечисленными в табл. 2. Активность кандидатных gRNA определяли с помощью анализа Surveyor (см. фиг. 7). Что касается JCR160, то размер полосы, соответствующей исходной форме, составлял 483 нт, и применяемые праймеры представляли собой следующие: прямой праймер - gggccttgacagaacttac (SEQ ID NO: 97) и обратный праймер - ctgcgtagtgcсааааааа (SEQ ID NO: 98). Ожидаемые размеры полос, соответствующих формам, полученным после разреза, составляли 192 и 291 нт. Что касается JCR157, то размер полосы, соответствующей исходной форме, составлял 631 нт, и применяемые праймеры представляли собой следующие: прямой праймер - gagatgtctttgcagctttcc (SEQ ID NO: 99) и обратный праймер - gggaccttgtaaa-gссаса (SEQ ID NO: 100). Ожидаемые размеры полос после разреза составляли 147 и 484 нт.

Специфичность кандидатных gRNA предсказывали с применением программы CasOFFinder (Baе et al. (2014), Bioinformatics, 30: 1473-1475; см. фиг. 8). Кандидатные gRNA оценивали и выбирали на основании нецелевой активности, целевой активности, измеренных с помощью анализа Surveyor, и расстояния от экзона. JCR157 и JCR160 gRNA имели низкий предсказанный уровень нецелевого связыва-

ния, и их применяли для дальнейшего тестирования.

Ими трансфицировали клетки HEK293T, и клетки DMD 6594 подвергали электропорации с применением модифицированной плазмиды pDO240, содержащей JCR157 gRNA, модифицированной плазмиды pDO240, содержащей JCR160 gRNA, и плазмиды, содержащей SaCas9 (pDO242; SEQ ID NO: 83). Предсказанный размер полосы, соответствующей исходной форме, составлял 2451 нт, и предсказанный размер полосы, соответствующей форме с делецией, составлял приблизительно 840-850 нт. На фиг. 9 показана делеция экзона 51, определенная с помощью ПЦР геномной ДНК (примерно 850 нуклеотидов) с применением прямого праймера - *tgcccttcaatcattgttccg* (SEQ ID NO: 101) и обратного праймера - *agaaggcaaatggcacaga* (SEQ ID NO: 102). Делеция, созданная между сайтами разрезов gRNA, составляла примерно 1611 нт.

На фиг. 10 показана активность JCR157 gRNA по отношению к мишеням с различными значениями длины (19, 20, 21, 22 и 23 нуклеотида), определенная с помощью анализа Surveyor в клетках HEK293T с применением праймеров и условий ПЦР, применяемых для JCR157 на фиг. 7. На фиг. 11 показана активность JCR160 gRNA по отношению к мишеням с различными значениями длины (19, 20, 21, 22 и 23 нуклеотида), определенная с помощью анализа Surveyor в клетках HEK293T с применением прямого праймера - *cgggcttgacagaacttac* (SEQ ID NO: 97) и обратного праймера - *ctgcgtagtgcscaaaacaaa* (SEQ ID NO: 98). Предсказанный размер полосы, соответствующей исходной форме, составлял 483 нт, и ожидаемые размеры полос, соответствующих формам, полученным после разреза, составляли 209 и 274 нт.

Комбинации JCR157 и JCR160 gRNA по отношению к мишеням с различными значениями длины (21, 22 или 23 нуклеотида) применяли в клетках HEK293T с применением условий, применяемых на фиг. 9. На фиг. 12 показаны результаты ПЦР геномной ДНК. Комбинация JCR157 и JCR160, каждая из которых содержала мишени из 23 нуклеотидов, обеспечивала почти 50% делецию.

Каждую gRNA, фланкирующую экзон 51 (JCR179 - выше и JCR183 - ниже), использовали отдельно с SaCas9 с применением целевых последовательностей из 23 нт для демонстрации целевой нуклеазной активности в клетках HEK293T ("293s") и клетках DMD6594 ("DMD6594s") (см. фиг. 13). Что касается JCR179, то размер полосы, соответствующей исходной форме, составлял 594 нт, и применяемые праймеры представляли собой следующие: прямой праймер - *tgcccttcaatcattgttccg* (SEQ ID NO: 101) и обратный праймер - *aaggccscaaaatgtgaaat* (SEQ ID NO: 103). Ожидаемые размеры полос, соответствующих формам, полученным после разреза, составляли 594 и 130 нт. Что касается JCR183, то размер полосы, соответствующей исходной форме, составлял 731 нт, и применяемые праймеры представляли собой следующие: прямой праймер - *gagtttgctcaaatgttactctt* (SEQ ID NO: 104) и обратный праймер - *ctgcgtagtgcscaaaacaaa* (SEQ ID NO: 98). Ожидаемые размеры полос, соответствующих формам, полученным после разреза, составляли 440 и 291 нт. На фиг. 13 показана целевая нуклеазная активность с помощью анализа Surveyor *in vitro*.

Ими трансфицировали клетки HEK293T человека, и миобласты DMD (DMD 6594) подвергали электропорации с применением плазмид, содержащих SaCas9, и JCR179, и JCR183 gRNA (мишени из 23 нт. JCR157 и JCR160; SEQ ID NO: 37 и SEQ ID NO: 38). Клетки DMD 6594 представляли собой иммортализованные миобласты от пациентов с DMD, которые изначально не содержали экзоны 48-50. Предсказанный размер полосы, соответствующей исходной форме, составлял 2451 нт., и предсказанный размер полосы, соответствующей форме с делецией, составлял приблизительно 823 нт. На фиг. 14 показана делеция *in vitro* экзона 51 в геномной ДНК клеток HEK293T человека (левые панели) и клеток DMD 6594 (правые панели), определенная с помощью ПЦР геномной ДНК с применением прямого праймера - *tgcccttcaatcattgttccg* (SEQ ID NO: 101) и обратного праймера - *agaaggcaaatggcacaga* (SEQ ID NO: 102). Делеция, созданная между сайтами разрезов gRNA, составляла примерно 1628 нт. На верхних панелях показано схематическое изображение гена-мишени для нацеливающихся выше и ниже него gRNA в клетках HEK293T и клетках DMD 6594, где фиолетовым цветом указаны нормально процессированные экзоны, и желтым цветом указаны мутантные экзоны. На средних панелях показан результат ПЦР в пределах области генома, подвергнутой делеции, где звездочкой указана делеция. На нижних панелях показаны данные капельной цифровой ПЦР геномной ДНК. В клетках HEK293T gRNA и SaCas9 обеспечивали 16% делецию, при этом в клетках DMD 6594 они обеспечивали редактирование на уровне приблизительно 10%.

Для определения того, транскрибировались ли изменения в геномной ДНК в РНК, выделяли РНК из миобластов DMD, которые котрансфицировали с помощью SaCas9 и обеих gRNA, и обеспечивали их дифференцировку в течение 7 дней (см. фиг. 15). РНК обратно транскрибировали в кДНК, и кДНК подвергали ПЦР-амплификации с применением стандартных способов, известных из уровня техники. На нижней левой панели фиг. 15 показан результат ПЦР-амплификации в пределах от экзона 44 до экзона 52 с применением прямого праймера - *tggcggcgtttcattat* (SEQ ID NO: 105) и обратного праймера - *TTCGATCCGTAATGATTGTTCTAGCC* (SEQ ID NO: 106). Предсказанный размер полосы, соответствующей исходной форме, составлял 948 нт, и предсказанный размер полосы, соответствующей форме с делецией, составлял приблизительно 715 нт. На фиг. 15 показана полоса, соответствующая форме с делецией, только в случае клеток, обработанных с помощью SaCas9 и обеих gRNA. На нижней правой панели показаны данные ddPCR, демонстрирующие редактирование кДНК на уровне приблизительно 14%.

Соединение экзона 47 с 52 в кДНК из миобластов от пациентов с DMD секвенировали *in vitro* (см. фиг. 16). На фиг. 16 последовательность, соответствующая полосам от необработанных клеток (контрольные клетки A48-50), указывает на то, что экзоны 47 и 51 соединялись, как этого и следовало ожидать, тогда как полоса, соответствующая форме с делецией, в обработанных клетках (A48-50+A51) указывала на соединение экзона 47 с 52. Таким образом, отчетливое отсутствие экзона 51 и результат раскрытой системы, осуществляющей нацеливание на уровне геномной ДНК, обеспечивались посредством транскрипции.

Пример 2. Получение мыши  $\Delta 52/mdx$ .

На фиг. 17 показана схема получения мыши  $\Delta 52/mdx$ . Из Лейденского университета получали мышью hDMD/mdx, и осуществляли манипуляции с получением релевантной модели DMD, в которой удален экзон 52, при этом данная делеция приводила к сдвигу рамки считывания и характерному для DMD генотипу. Мышь hDMD/mdx содержала полноразмерный человеческий ген дистрофина дикого типа на хромосоме 5 в окружении mdx, вследствие чего дистрофин мыши не экспрессировался.

Для получения релевантной модели DMD применяли систему редактирования CRISPR/Cas9 на основе SpCas9 и gRNA для нацеливания и обеспечения делеции экзона 52 в гене дистрофина человека. Различные gRNA, осуществляющие нацеливание выше и ниже экзона 52, тестировали и проверяли их соответствие с применением анализа Surveyor (см. фиг. 18). Для gRNA, осуществляющих нацеливание выше, применяли прямой праймер - ctccggaatgtctccattg (SEQ ID NO: 87) и обратный праймер - TTGTGTGTCCCATGCTTGTT (SEQ ID NO: 107), и при этом размер полосы, соответствующей исходной форме, составлял 402 нт. Что касается JCR94 (AACAAATATCCCTTAGTATC (SEQ ID NO: 41)), то ожидаемые размеры форм, полученных после разреза, составляли 243 и 159 нт. Для gRNA, осуществляющих нацеливание ниже, применяли прямой праймер - CAACGCTGAAGAACCCTGAT (SEQ ID NO: 108) и обратный - atgagggagagactggcatc (SEQ ID NO: 88), и при этом размер полосы, соответствующей исходной форме, составлял 509 нт. Что касается JCR99 (AATGTATTTCTTCTATTCAA (SEQ ID NO: 42)), то ожидаемые размеры форм, полученных после разреза, составляли 346 и 163 нт пары gRNA тестировали и проверяли их соответствие путем выявления делеции экзона 51 в геномной ДНК из клеток HEK293T, в том числе JCR94 и JCR99, с применением прямого праймера - ctccggaatgtctccattg (SEQ ID NO: 87) и обратного праймера - atgagggagagactggcatc (SEQ ID NO: 88) (см. фиг. 19). Размер полосы, соответствующей исходной форме, составлял 718 нт, размер полосы, соответствующей форме с делецией, составлял 392 нт, при этом делеция между gRNA составляла 326 нт пару JCR94 и JCR99 применяли в системе редактирования генома для получения мыши  $\Delta 52/mdx$ . В частности, мышью создавали путем введения посредством инъекции mRNA JCR94 gRNA, JCR99 gRNA и SaCas9 в эмбрионы мышей.

На фиг. 20 показан протокол осуществления микроинъекции ДНК, который включает использование услуги по рекомбинационной инженерии VAC. День 1: жеребых кобыл внутрибрюшинно обрабатывали гонадотропином сыворотки крови жеребой кобылы для индукции овуляции. День 3: жеребых кобыл внутрибрюшинно обрабатывали хорионическим гонадотропином человека. В 1-м цикле получали 471 эмбрион, однако наблюдали только 5 пробок. Использовали 150 эмбрионов, созданных оплодотворением (от 14 самок, подвергнутых суперовуляции). Инъекции в пронуклеус осуществляли с применением менее чем 50 нг Cas9 и 20 нг каждой направляющей. На фиг. 21 показан протокол скрещивания мышей для получения трансгенных мышей.

Мышей-основателей генотипировали с применением следующего протокола генотипирования. Геномную ДНК (gDNA) экстрагировали из срезов хвоста мышей с применением набора для выделения ДНК из крови и тканей DNEasy (Qiagen). Для генотипирования каждого детеныша gDNA амплифицировали с применением набора AccuPrime HiFi Taq в соответствии с нижеследующим:

- i) 100 нг дДНК;
- ii) 2,5 мкл буфера II из набора AccuPrime;
- iii) 0,1 мкл HiFi Taq из набора AccuPrime;
- iv) 1 мкл JRH261 (ctccggaatgtctccattg (SEQ ID NO: 87)) (10 мкМ);
- v) 1 мкл JRH264 (atgagggagagactggcatc (SEQ ID NO: 88)) (10 мкМ); и
- vi) вода до общего объема 25 мкл.

Реакции осуществляли на термоциклере в соответствии с нижеследующим:

- i) 95° в течение 4 минут;
- ii) 95° в течение 30 с;
- iii) 52° в течение 30 с;
- iv) 68° в течение 1:00 мин;
- v) циклическое повторение стадий ii)-iv) 35 раз, при этом постоянно при 4°.

Продукты ПЦР-реакций разделяли на геле (фиг. 22). Ожидаемые размеры полос составляли 718 нт в случае отсутствия делеции (т.е. экзон 52 по-прежнему присутствовал) и примерно 392 нт в случае делеции экзона 52. Как показано на фиг. 22, у мышей-основателей 7, 63 и 76 имелась делеция экзона 52.

Полосы амплифицированных продуктов секвенировали с применением праймера для JRH264 (см. фиг. 23) для определения последовательностей воссоединенных концов областей, подвергнутых на-

целиванию. На фиг. 23 показана секвенированная область, где буквы, выделенные жирным шрифтом, подчеркиванием и обычным начертанием, обозначают нативные последовательности, и буквы, выделенные курсивом, обозначают вставки или делеции. В ожидаемой последовательности ("дельта 52") буквы, выделенные жирным шрифтом, связаны с буквами, выделенными подчеркиванием. В последовательностях от мышей-основателей в этой области находились вставки (буквы, выделенные курсивом) и делеции (дефисы).

Самцов мышей-основателей спаривали с самками mdx/mdx для селекции химерных организмов (фиг. 24). Представители потомства, полученные от самцов мышей-основателей 76 или самцов мышей-основателей 63 и самок mdx/mdx, подвергали скринингу и генотипированию в отношении делеции экзона 52 с применением условий, используемых на фиг. 22 (фиг. 25 и 26 соответственно). Если экзон 52 был подвергнут делеции, то ожидаемый размер полосы составлял приблизительно 392 нт. Если присутствовал экзон 52, то ожидаемый размер полосы составлял приблизительно 718 нт. У детенышей 54497 и 54498 (от пары скрещивания: самец мыши-основателя 63+самка mdx/mdx) имелась делеция экзона 52, и в отношении нее осуществляли секвенирование (фиг. 27). Детеныши 54497 и 54498 характеризовались 92,86% идентичностью друг с другом согласно прочтению секвенирования размером 392 п.о., при этом вставки/делеции были идентичными.

Уровень экспрессии дистрофина у здоровой мыши hDMD/mdx и мыши Δ52/mdx сравнивали по результатам флуоресцентной иммуногистохимии. Как показано на фиг. 28, у детенышей 54497 и 54498 от мышей Δ52/mdx отсутствовал белок дистрофин. В случае окрашивания сердца выдержка для зонда ламинина составляла 100 мс, тогда как выдержка для дистрофина составляла 900 мс. В случае образца ТА мышцы выдержка для зонда ламинина и дистрофина составляла 2,0 с. См. также фиг. 29, на которой показано, что у мыши Δ52/mdx отсутствовал белок дистрофин. Экспрессия дистрофина утрачивалась как в сердце, так и ТА мышце мыши Δ52/mdx. В ТА мышце наблюдали несколько самопроизвольно образованных ревертантных волокон (случайные события сплайсинга или соматические мутации), однако это согласовывалось с мышинной моделью mdx. Результаты вестерн-блоттинга также указывали на то, что у мыши Δ52/mdx отсутствовал белок дистрофин, что согласовывалось с характерным для DMD генотипом, тогда как у здоровой мыши hDMD/mdx дистрофин экспрессировался. См. фиг. 30.

Мышь Δ52/mdx демонстрировала уровни активности, аналогичные мышам mdx, после первых пяти минут теста "открытого поля". В тесте "открытого поля" мышам давали возможность свободно изучить арену "открытого поля" (20×20×30 см) в течение 30 мин. Активность и положение животного автоматически контролировали с помощью инфракрасных диодов (по осям x, y и z), сопряженных с запущенным на компьютере программным обеспечением Fusion для анализа активности (версия 5.3, Omnitech, Колумбус, Огайо). На фиг. 31 показана общая активность мыши Δ52/mdx по сравнению с мышами mdx и мышами hDMD/mdx, указанная на основании двигательной активности и осмотра. Пройденное расстояние и вертикальные активности в виде стойки показаны соответственно на левой и правой панелях.

Пример 3. Восстановление экспрессии дистрофина путем удаления экзона 51.

Посредством удаления экзона 51 у мыши Δ52/mdx можно создать генотип, подобный таковому для мышечной дистрофии Беккера (BMD), и в теории восстановить экспрессию дистрофина. Мышь Δ52/mdx использовали для демонстрации восстановления экспрессии дистрофина путем удаления экзона 51 с применением раскрытой системы редактирования генов на основе CRISPR/Cas9. На фиг. 32 показана стратегия коррекций с применением SaCas9 и gRNA для пропуска экзона 51 с помощью нацеливания gRNA выше и ниже экзона 51 в интронной области.

Стандарт: плазмиды, содержащие JCR179 (выше) или JCR183 gRNA (ниже) (SEQ ID NO: 37 и SEQ ID NO: 38 соответственно) и SaCas9, электропорировали в миобласты от пациентов с DMD. Белок выделяли из дифференцированных клеток и анализировали с помощью вестерн-блоттинга с применением антитела к дистрофину. На фиг. 33 показано, что геномная ДНК может быть отредактирована с восстановлением экспрессии белка дистрофина, так как клетки, обработанные с помощью всех 3 компонентов (т.е. обеих gRNA и SaCas9), демонстрировали экспрессию дистрофина.

Затем систему тестировали на мышши Δ52/mdx. На фиг. 34 показана схема эксперимента по обработке мышши Δ52/mdx с применением системы на основе gRNA и SaCas9, в том числе схематические изображения 2 вирусных векторов, применяемых в схеме эксперимента. Конструкции на основе рекомбинантного вируса AAV8 создавали с применением векторов PT366-179 (SEQ ID NO: 39) и PT366-183 (SEQ ID NO: 40) и способов получения вирусных частиц, известных из уровня техники. Эти вирусные векторы (AAV8) совместно доставляли *in vivo* в виде двух вирусных частиц. Каждая вирусная частица содержала SaCas9 и одну из gRNA (см. фиг. 3). Мышей Δ52/mdx обрабатывали с помощью конструкций на основе рекомбинантного вируса AAV8 в количестве 5E11. Вирус вводили посредством внутримышечной инъекции в правую ТА мышцу, при этом левая ТА мышца служила в качестве контралатерального контроля, и в нее вводили посредством инъекции PBS. После обработки удаляли как левую, так и правую ТА мышцу, и из каждой получали срезы для анализов геномной ДНК. Как показано на фиг. 35, ПЦР осуществляли в пределах представляющей интерес области, и полосы, соответствующие форме с делецией, отмечали в случае обработанной правой ТА мышцы на приведенном слева геле, что указывает

на некоторый уровень редактирования генов. Полосу, соответствующую форме с делецией, секвенировали, и основной продукт представлял собой ожидаемый продукт лигирования 3 пар оснований от РАМ каждой gRNA. На фиг. 35 показана делеция экзона 51 *in vivo* в правой ТА мышце.

Аналогично анализировали срезы обработанной правой ТА мышцы и контрольной левой ТА мышцы для определения того, обеспечивалось ли редактирование посредством РНК. ПЦР осуществляли в пределах экзонов 50-53 в кДНК. Как показано на приведенном справа геле на фиг. 36, в двух из обработанных образцов наблюдалось отсутствие экзона 51 и 52. Полосу, соответствующую форме с делецией, секвенировали, при этом основной продукт представлял собой продукт лигирования экзона 50 с 53, как этого и следовало ожидать с учетом того, что у мыши уже отсутствовал экзон 52, и система редактирования генов на основе CRISPR/Cas9 удаляла экзон 51 (см. хроматограмму результатов секвенирования внизу справа). На фиг. 36 показана делеция экзона 51 *in vivo* в правой ТА мышце.

На фиг. 37 показано иллюстративное флуоресцентное иммуногистохимическое окрашивание, указывающее на присутствие небольшого количества дистрофина в контрольной левой ТА мышце, в которую вводили посредством инъекции PBS, у мыши Δ52/mdx. Причинами некоторой степени зеленого окрашивания на дистрофин в контрольной левой ТА могут являться ревертантные волокна или погибшие клетки, которые иногда также окрашиваются в зеленый цвет. Наблюдался четкое повышение степени зеленого окрашивания на дистрофин в обработанной правой ТА мышце, как показано на правой фотографии. На фиг. 37 показано восстановление белка дистрофина *in vivo* в обработанной ТА мышце.

Белок экстрагировали из левой и правой ТА мышц от 3 тестируемых мышей, при этом осуществляли вестерн-блот-анализ. На фиг. 38 показано восстановление белка дистрофина *in vivo* в обработанной ТА мышце. В контрольных левых ТА мышцах не наблюдали экспрессию белка, тогда как все три правые ТА мышцы демонстрировали различные уровни экспрессии белка дистрофина. Экспрессия белка в правой ТА мышце 1 была наиболее сильной, тогда как у мышей 2 и 3 она была слабой, но тем не менее проявлялась в виде полос. Раскрытая система редактирования генов на основе CRISPR/Cas9 функционировала *in vivo* с восстановлением экспрессии белка дистрофина до некоторой степени у мыши Δ52/mdx.

Физиологическое тестирование мышей. Мышей, подлежащих обработке (все самцы hDMD-Δ52(гетеро)/mdx(гем) мышей), обрабатывали с помощью конструкций на основе рекомбинантного вируса AAV8 (n=10) или AAV9 (n=10), содержащего SaCas9 и gRNA, и проводили сравнение с необработанными мышами (hDMD-Δ52/mdx) (n=10). Конструкции на основе рекомбинантного вируса AAV создавали с применением векторов PT366-179 (SEQ ID NO: 39) и PT366-183 (SEQ ID NO: 40) и с применением известных из уровня техники способов. Мышам, подлежащим обработке, вводили посредством инъекции 200 мкл вируса в хвостовую вену в возрасте 6-8 недель. Тестирование мышей осуществляли спустя 8 недель.

Тест "открытого поля" с определением расстояния. Мышам давали возможность свободно изучить арену "открытого поля" в течение 30 мин. Активность и положение животных автоматически контролировали с помощью инфракрасных диодов, совместимых с запущенным на компьютере программным обеспечением Fusion для анализа активности. Данные собирали непрерывно и группировали за 5-минутные промежутки времени. На фиг. 39 показано среднее значение всех моментов времени для общего пройденного расстояния у 16-недельных мышей, которых обрабатывали в возрасте 8 недель, по сравнению с 16-недельными мышами, которых не обрабатывали. Среднее значение всех моментов времени для общего числа поз со стоянием на задних лапах спустя 16 недель показаны на фиг. 40. Статистическими методами являлись следующие: однофакторный ANOVA, сравнение среднего значения каждого столбца со средним значением для необработанного контроля и апостериорный анализ с помощью критерия Даннета (среднее значение +/-SEM). Мыши, которых обрабатывали с помощью AAV8 и AAV9, демонстрировали статистически значимый результат в виде большего пройденного расстояния, чем необработанные мыши соответствующей возрастной группы (статистическая значимость). Все обработанные мыши демонстрировали статистически значимый результат в виде большего числа поз со стоянием на задних лапах по сравнению с необработанным контролем соответствующей возрастной группы.

Сила хватки. Силу хватки тестировали у 16-недельных необработанных и обработанных мышей. Мыши проходили 3-5 испытаний, каждое из которых предназначалось для тестирования силы хватки передних и задних лап. Средние результаты испытаний показаны на фиг. 41. Силу хватки отмечали в виде грамм-силы. Как показано на фиг. 41, мыши, которых обрабатывали с помощью AAV9, демонстрировали статистически значимый результат в виде повышенного значения силы хватки передними лапами по сравнению с необработанными мышами соответствующей возрастной группы. Статистическими методами были следующие: двухфакторный ANOVA, апостериорный анализ с помощью критерия Тьюки.

кДНК ПЦР. Ткани из образцов сердца мышей подвергали обработке с применением универсального мини-набора RNEasy Plus (Qiagen). Полученную РНК обратно транскрибировали в кДНК с применением набора для синтеза кДНК Superscript VILO. 1 мкл кДНК подвергали ПЦР-амплификации с применением ДНК-полимеразы из набора AccuPrime и праймеров к экзону 48 (прямой праймер: gtttcagagctttacctgagaa (SEQ ID NO: 89)) и экзону 54 (обратный праймер: СТТТТАТГААТГСТТСТССААГ (SEQ ID NO: 90)). Ожидаемые размеры полос составляли 997 нт в случае отсутствия делеции (т.е. экзон 52 по-прежнему

присутствовал) и примерно 764 нт в случае делеции экзона 52. На фиг. 42 показаны результаты для мышей P2, которым вводили посредством инъекции в лицевую вену AAV9 ("JA10 (P2 AAV9)") в возрасте 36-50 часов с момента рождения, и для взрослых мышей, которым вводили посредством инъекции в хвостовую вену AAV8 ("JA11 (TV AAV8)") в количестве 3,3-7,7E12 или AAV9 ("JA12 (TV AAV9)") в количестве 4,3-7,5E12. Как показано на фиг. 42, редактирование происходило в различной степени у мышей P2 (мышь возрастом 48-54 часов с момента рождения), которых обрабатывали с помощью AAV9, и взрослых мышей, которых обрабатывали с помощью AAV8 и AAV9, что дополнительно подтверждалось путем секвенирования полосы, соответствующей форме с делецией, с применением праймера ttctgtgat-ttcttttggattg (SEQ ID NO: 109), связывающегося с экзоном 53. На фиг. 43 показана иллюстративная хроматограмма, на которой показана делеция экзонов 51 и 52 в последовательности из полосы, соответствующей форме с делецией, от мыши 1, обработанной с помощью Ja10.

Подразумевается, что вышеприведенное подробное описание и сопровождающие примеры являются лишь иллюстративными и не должны рассматриваться в качестве ограничений объема настоящего изобретения, который определяется исключительно прилагаемой формулой изобретения и ее эквивалентами.

Различные изменения и модификации раскрытых вариантов осуществления будут очевидны для специалистов в данной области техники. Такие изменения и модификации, в том числе без ограничения те, которые связаны с химическими структурами, заместителями, производными, промежуточными соединениями, синтезами, композициями, составами или способами применения настоящего изобретения, могут быть сделаны без отхода от его сути и объема.

В целях обеспечения полноты, различные аспекты настоящего изобретения изложены в следующих пронумерованных пунктах.

1. Направляющая РНК (gRNA), содержащая нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, или комплементарную ей последовательность.

2. Композиция для нацеливания на ДНК, содержащая первую gRNA и вторую gRNA, при этом первая молекула gRNA и вторая молекула gRNA содержат нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, или комплементарную ей последовательность, где первая молекула gRNA и вторая молекула gRNA содержат разные нацеливающие домены.

3. Композиция для нацеливания на ДНК по п.2, где первая молекула gRNA представлена под SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 41, и вторая молекула gRNA представлена под SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 или SEQ ID NO: 42.

4. Композиция для нацеливания на ДНК по п.2 или 3, где первая молекула gRNA выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 15, и вторая молекула gRNA выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 и SEQ ID NO: 19.

5. Композиция для нацеливания на ДНК по любому из пп.2-4, где первая молекула gRNA и вторая молекула gRNA выбраны из группы, состоящей из

(i) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 1, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 2;

(ii) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 11, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 4;

(iii) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 15, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 19;

(iv) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 15, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 18;

(v) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 15, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 4;

(vi) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 14, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 19;

(vii) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 14, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 18;

(viii) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 14, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 4;

(ix) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 11, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 19;

(x) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 14, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 15;

(xi) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 11, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 18;  
и

(xii) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 41, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 42.

6. Композиция для нацеливания на ДНК по любому из пп.2-5, дополнительно содержащая белок (Cas), ассоциированный с короткими палиндромными повторами, регулярно расположенными группами.

7. Композиция для нацеливания на ДНК по п.6, где белок Cas предусматривает молекулу Cas9, которая распознает смежный с протоспейсером мотив (PAM) либо NNGRRT (SEQ ID NO: 24), либо NNGRRV (SEQ ID NO: 25).

8. Композиция для нацеливания на ДНК по п.6 или 7, где белок Cas предусматривает молекулу Cas9 из *Staphylococcus aureus*, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 45.

9. Композиция для нацеливания на ДНК по любому из пп.2-8, где композиция для нацеливания на ДНК содержит нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 83, нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 84, нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 37 и/или нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 38.

10. Выделенный полинуклеотид, содержащий молекулу gRNA по п.1 или композицию для нацеливания на ДНК по любому из пп.2-9.

11. Вектор, содержащий gRNA по п.1, композицию для нацеливания на ДНК по любому из пп.2-9 или выделенный полинуклеотид по п.10.

12. Вектор, содержащий композицию для нацеливания на ДНК по любому из пп.6-9.

13. Вектор, кодирующий

(a) первую молекулу направляющей РНК (gRNA);

(b) вторую молекулу gRNA; и

(c) по меньшей мере одну молекулу Cas9, которая распознает смежный с протоспейсером мотив (PAM) либо NNGRRT (SEQ ID NO: 24), либо NNGRRV (SEQ ID NO: 25),

где первая молекула gRNA и вторая молекула gRNA содержат нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, или комплементарную ей последовательность, где первая молекула gRNA и вторая молекула gRNA содержат разные нацеливающие домены.

14. Вектор по п.13, где вектор сконструирован с возможностью образования первого и второго двухнитевых разрывов в первом и втором интронах, фланкирующих экзон 51 гена DMD человека.

15. Вектор по п.13 или 14, где первая молекула gRNA представлена под SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 41, и вторая молекула gRNA представлена под SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 или SEQ ID NO: 42.

16. Вектор по любому из пп.13-15, где первая молекула gRNA выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 15, и вторая молекула gRNA выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 и SEQ ID NO: 19.

17. Вектор по любому из пп.13-16, при этом первая молекула gRNA и вторая молекула gRNA вы-

браны из группы, состоящей из

(i) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 1, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 2;

(ii) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 11, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 4;

(iii) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 15, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 19;

(iv) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 15, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 18;

(v) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 15, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 4;

(vi) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 14, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 19;

(vii) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 14, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 18;

(viii) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 14, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 4;

(ix) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 11, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 19;

(x) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 14, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 15;

и

(xi) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 11, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 18.

18. Вектор по любому из пп.11-17, где вектор представляет собой вирусный вектор.

19. Вектор по п.18, где вектор представляет собой вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV).

20. Вектор по п.19, где вектор на основе AAV представляет собой вектор на основе AAV8 или вектор на основе AAV9.

21. Вектор по любому из пп.11-20, где вектор содержит тканеспецифичный промотор, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей первую молекулу gRNA, вторую молекулу gRNA и/или молекулу Cas9.

22. Вектор по п.21, где тканеспецифичный промотор представляет собой промотор, специфичный в отношении мышц.

23. Клетка, содержащая gRNA по п.1, композицию для нацеливания на ДНК по любому из пп.2-9, выделенный полинуклеотид по п.10 или вектор по любому из пп.11-22.

24. Набор, содержащий gRNA по п.1, систему для нацеливания на ДНК по любому из пп.2-9, выделенный полинуклеотид по п.10, вектор по любому из пп.11-22 или клетку по п.23 и необязательно инструкции по применению.

25. Способ коррекции мутантного гена дистрофина в клетке, при этом способ предусматривает введение в клетку gRNA по п.1, системы для нацеливания на ДНК по любому из пп.2-9, выделенного полинуклеотида по п.10 или вектора по любому из пп.11-22.

26. Способ редактирования мутантного гена дистрофина в геноме субъекта, при этом способ предусматривает введение субъекту композиции для редактирования генома, содержащей gRNA по п.1, системы для нацеливания на ДНК по любому из пп.2-9, выделенного полинуклеотида по п.10, вектора по любому из пп.11-22 или клетки по п.23.

27. Способ по п.26, где композицию для редактирования генома вводят субъекту внутримышечно, внутривенно или с помощью их комбинации.

28. Способ по любому из пп.25-27, где коррекция мутантного гена дистрофина предусматривает опосредованное нуклеазой негомологичное соединение концов.

29. Способ лечения субъекта, нуждающегося в этом, у которого имеется мутантный ген дистрофина,

при этом способ предусматривает введение субъекту gRNA по п.1, системы для нацеливания на ДНК по любому из пп.2-9, выделенного полинуклеотида по п.10, вектора по любому из пп.11-22 или клетки по п.23.

30. Модифицированный вектор на основе аденоассоциированного вируса для редактирования мутантного гена дистрофина в геноме субъекта, содержащий первую полинуклеотидную последовательность, кодирующую gRNA по п.1, и вторую полинуклеотидную последовательность, кодирующую молекулу Cas9, которая распознает смежный с протоспейсером мотив (PAM) либо NNGRRT (SEQ ID NO: 24), либо NNGRRV (SEQ ID NO: 25).

31. Модифицированный вектор на основе аденоассоциированного вируса по п.30, где модифицированный вектор на основе аденоассоциированного вируса содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 39 или SEQ ID NO: 40.

32. Композиция для обеспечения делеции сегмента гена дистрофина, содержащего экзон 51, при этом композиция содержит

(а) первый вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность, кодирующую первую молекулу направляющей РНК (gRNA), и полинуклеотидную последовательность, кодирующую первую молекулу Cas9, которая распознает смежный с протоспейсером мотив (PAM) либо NNGRRT (SEQ ID NO: 24), либо NNGRRV (SEQ ID NO: 25); и

(b) второй вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность, кодирующую вторую молекулу gRNA, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую вторую молекулу Cas9, которая распознает смежный с протоспейсером мотив (PAM) либо NNGRRT (SEQ ID NO: 24), либо NNGRRV (SEQ ID NO: 25),

где каждая из первой и второй молекул gRNA содержит нацеливающий домен, длина которого составляет от 19 до 24 нуклеотидов, и

где первый вектор и второй вектор сконструированы с возможностью образования первого и второго двухнитевых разрывов в первом интроне и втором интроне, фланкирующих соответственно экзон 51 гена DMD человека, за счет чего обеспечивается делеция сегмента гена дистрофина, содержащего экзон 51.

33. Композиция по п.32, где длина сегмента составляет от приблизительно 50 п.о. до приблизительно 2000 п.о.

34. Композиция по п.33, где длина сегмента составляет приблизительно 118 п.о., приблизительно 233 п.о., приблизительно 326 п.о., приблизительно 766 п.о., приблизительно 805 п.о. или приблизительно 1611 п.о.

35. Композиция по любому из пп.32-34, где первая молекула Cas9 и вторая молекула Cas9 являются идентичными.

36. Композиция по п.35, где первая молекула Cas9 и вторая молекула Cas9 представляют собой молекулу Cas9 из *Staphylococcus aureus*.

37. Композиция по п.36, где первая молекула Cas9 и вторая молекула Cas9 представляют собой мутантную молекулу Cas9 из *Staphylococcus aureus*.

38. Композиция по любому из пп.32-34, где первая молекула Cas9 и вторая молекула Cas9 являются разными.

39. Композиция по п.38, где первая молекула Cas9 или вторая молекула Cas9 представляют собой молекулу Cas9 из *Staphylococcus aureus*.

40. Композиция по любому из пп.32-39, где первая молекула Cas9 и/или вторая молекула Cas9 предусматривают молекулу SaCas9, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 45.

41. Композиция по любому из пп.32-40, где первый вектор и/или второй вектор представляют собой вирусный вектор.

42. Композиция по п.41, где первый вектор и/или второй вектор представляют собой вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV).

43. Композиция по п.42, где вектор на основе AAV представляет собой вектор на основе AAV8 или вектор на основе AAV9.

44. Композиция по любому из пп.32-43, где ген дистрофина представляет собой ген дистрофина человека.

45. Композиция по любому из пп.32-44, где первая молекула gRNA и вторая молекула gRNA содержат нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, или комплементарную ей последовательность, где первая молекула gRNA и вторая молекула gRNA содержат разные нацеливающие домены.

46. Композиция по любому из пп.32-45, где первая молекула gRNA представлена под SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 или SEQ ID NO: 15, и вторая молекула

gRNA представлена под SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 19.

47. Композиция по любому из пп.32-46, где первая молекула gRNA выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 15, и вторая молекула gRNA выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 и SEQ ID NO: 19.

48. Композиция по любому из пп.32-47, где первая молекула gRNA и вторая молекула gRNA выбраны из группы, состоящей из

(i) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 1, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 2;

(ii) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 11, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 4;

(iii) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 15, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 19;

(iv) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 15, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 18;

(v) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 15, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 4;

(vi) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 14, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 19;

(vii) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 14, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 18;

(viii) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 14, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 4;

(ix) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 11, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 19;

(x) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 14, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 15;

и

(xi) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 11, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 18.

49. Композиция по любому из пп.32-48, где первый вектор содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 39, и второй вектор содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 40.

50. Композиция по любому из пп.32-49 для применения в составе лекарственного препарата.

51. Композиция по любому из пп.32-50 для применения в лечении мышечной дистрофии Дюшенна.

52. Клетка, содержащая композицию по любому из пп.32-51.

53. Способ коррекции мутантного гена дистрофина в клетке, предусматривающий введение в клетку

(a) первого вектора, содержащего полинуклеотидную последовательность, кодирующую первую молекулу направляющей РНК (gRNA), и полинуклеотидную последовательность, кодирующую первую молекулу Cas9, которая распознает смежный с протоспейсером мотив (PAM) либо NNGRRT (SEQ ID NO: 24), либо NNGRRV (SEQ ID NO: 25); и

(b) второго вектора, содержащего полинуклеотидную последовательность, кодирующую вторую молекулу gRNA, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую вторую молекулу Cas9, которая распознает смежный с протоспейсером мотив (PAM) либо NNGRRT (SEQ ID NO: 24), либо NNGRRV (SEQ ID NO: 25),

где каждая из первой молекулы gRNA и второй молекулы gRNA содержит нацеливающий домен, длина которого составляет от 19 до 24 нуклеотидов, и

где вектор сконструирован с возможностью образования первого и второго двухнитевых разрывов соответственно в первом и втором интронах, фланкирующих экзон 51 гена дистрофина человека, за счет чего обеспечивается делеция сегмента гена дистрофина, содержащего экзон 51.

54. Способ по п.53, где первая молекула gRNA и вторая молекула gRNA выбраны из группы, состоящей из

(i) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 1, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 2;

(ii) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 11, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 4;

(iii) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 15, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 19;

(iv) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 15, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 18;

(v) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 15, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 4;

(vi) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 14, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 19;

(vii) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 14, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 18;

(viii) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 14, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 4;

(ix) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 11, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 19;

(x) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 14, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 15;

и

(xi) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 11, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 18.

55. Способ по п.53 или 54, где мутантный ген дистрофина содержит преждевременный стоп-кодон, смещенную рамку считывания, аберрантный акцепторный сайт сплайсинга или аберрантный донорный сайт сплайсинга.

56. Способ по любому из пп.53-55, где мутантный ген дистрофина содержит мутацию со сдвигом рамки считывания, которая является причиной преждевременного стоп-кодона и усеченного продукта гена.

57. Способ по любому из пп.53-55, где мутантный ген дистрофина характеризуется делецией одного или нескольких экзонов, которая обеспечивает смещение рамки считывания.

58. Способ по любому из пп.53-57, где коррекция мутантного гена дистрофина предусматривает делецию преждевременного стоп-кодона, коррекцию смещенной рамки считывания или модуляцию сплайсинга путем смещения акцепторного сайта сплайсинга или смещения донорной последовательности сплайсинга.

59. Способ по любому из пп.53-58, где коррекция мутантного гена дистрофина предусматривает делецию экзона 51.

60. Способ по любому из пп.53-59, где коррекция мутантного гена дистрофина предусматривает репарацию с участием гомологичной рекомбинации.

61. Способ по п.60, дополнительно предусматривающий введение в клетку донорной ДНК.

62. Способ по любому из пп.53-61, где коррекция мутантного гена дистрофина предусматривает опосредованное нуклеазой негомологичное соединение концов.

63. Способ по любому из пп.53-62, где клетка представляет собой клетку-миобласт.

64. Способ по любому из пп.53-63, где клетка представляет собой клетку субъекта, страдающего мышечной дистрофией Дюшенна.

65. Способ по любому из пп.53-64, где клетка представляет собой миобласт субъекта-человека, страдающего мышечной дистрофией Дюшенна.

66. Способ по любому из пп.53-65, где первая молекула gRNA и вторая молекула gRNA выбраны из группы, состоящей из

(i) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 1, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 2;

(ii) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 11, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 4; и

(iii) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 15, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 19.

67. Способ лечения субъекта, нуждающегося в этом, у которого имеется мутантный ген дистрофина, при этом способ предусматривает введение субъекту

(a) первого вектора, содержащего полинуклеотидную последовательность, кодирующую первую молекулу направляющей РНК (gRNA), и полинуклеотидную последовательность, кодирующую первую молекулу Cas9, которая распознает смежный с протоспейсером мотив (PAM) либо NNGRRT (SEQ ID NO: 24), либо NNGRRV (SEQ ID NO: 25); и

(b) второго вектора, содержащего полинуклеотидную последовательность, кодирующую вторую молекулу gRNA, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую вторую молекулу Cas9, которая распознает смежный с протоспейсером мотив (PAM) либо NNGRRT (SEQ ID NO: 24), либо NNGRRV (SEQ ID NO: 25),

где каждая из первой молекулы gRNA и второй молекулы gRNA содержит нацеливающий домен, длина которого составляет от 19 до 24 нуклеотидов, и

где вектор сконструирован с возможностью образования первого и второго двухнитевых разрывов соответственно в первом и втором интронах, фланкирующих экзон 51 гена дистрофина человека, за счет чего обеспечивается делеция сегмента гена дистрофина, содержащего экзон 51.

68. Способ по п.67, где первая молекула gRNA и вторая молекула gRNA выбраны из группы, состоящей из

(i) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 1, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 2;

(ii) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 11, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 4;

(iii) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 15, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 19;

(iv) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 15, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 18;

(v) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 15, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 4;

(vi) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 14, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 19;

(vii) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 14, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 18;

(viii) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 14, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 4;

(ix) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 11, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 19;

(x) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 14, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 15; и

(xi) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 11, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 18.

69. Способ по п.68, где субъект страдает мышечной дистрофией Дюшенна.

70. Способ по любому из пп.67-69, где первый вектор и второй вектор вводят в мышцу субъекта.

71. Способ по п.70, где мышца представляет собой скелетную мышцу или сердечную мышцу.
72. Способ по п.71, где скелетная мышца представляет собой переднюю большеберцовую мышцу.
73. Способ по любому из пп.67-72, где первый вектор и второй вектор вводят субъекту внутримышечно, внутривенно или с помощью их комбинации.
74. Способ получения трансгенного эмбриона грызуна, у которого имеется ген дистрофина человека (hDMD) с делецией экзона 52 ( $\Delta 52$ ), при этом способ предусматривает введение в эмбрион грызуна gRNA по п.1, системы для нацеливания на ДНК по любому из пп.2-9, выделенного полинуклеотида по пункту 10, вектора по любому из пп.11-22, модифицированного вектора на основе аденоассоциированного вируса по п.30 или 31 или композиции по любому из пп.32-51, за счет чего обеспечивается делеция экзона 52 в гене дистрофина человека, и осуществления отбора трансгенного эмбриона грызуна, у которого имеется делеция экзона 52 в гене дистрофина человека, где эмбрион грызуна содержит нормальный ген дистрофина человека.
75. Способ по п.74, где эмбрион грызуна представляет собой эмбрион мыши.
76. Способ по п.74 или 75, где трансгенный эмбрион грызуна является гетерозиготным по hDMD или гетерозиготным по hDMD- $\Delta 52$ .
77. Способ по любому из пп.74-76, где первую молекулу gRNA, содержащую нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 41, и вторую молекулу gRNA, содержащую нацеливающий домен, который содержит нуклеотидную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 42, вводят в эмбрион грызуна для осуществления делеции экзона 52 гена дистрофина человека.
78. Способ по любому из пп.74-77, дополнительно предусматривающий введение в эмбрион грызуна белка Cas, содержащего аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 27.
79. Трансгенный эмбрион грызуна, полученный с помощью способа по любому из пп.74-78.
80. Трансгенный грызун, полученный из трансгенного эмбриона грызуна по п.79.

#### Приложение

pDO240 с JCR179 (SEQ ID NO: 37) (gRNA выделена жирным шрифтом)

ctaaattgtaagcgttaataatTTTTGTTAAAATTCGCGTTAAATTTTTGTTAAATCAGCTCATT  
 TTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAGAATAGACCGAGATAGGGT  
 TGAGTGTTGTTCCAGTTTGGAAACAAGAGTCCACTATTAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGG  
 GCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCACTACGTGAACCATCACCTAATCAAGTTTTTTG  
 GGGTCGAGGTGCCGTAAGCACTAAATCGGAACCCTAAAGGGAGCCCCGATTTAGAGCTTGAC  
 GGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGC  
 GCTGGCAAGTGTAGCGGTACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCGCGCTTAATGCGCCGCTA  
 CAGGGCGCGTCCCATTCGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGAAAGGGCGATCGGTGCGGGCCT  
 CTTGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGTAACGCC  
 AGGGTTTTCCAGTCAAGCAGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAGCGCGCTAATACGACTCACTA  
 TAGGGCGAATTGGGTACCAAGCTTGCCATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATA  
 CAAGGCTGTTAGAGAGATAATTGGAATTAATTTGACTGTAACACAAAGATATTAGTACAAAAT  
 ACGTGACGTAGAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTTAAAATGG  
 ACTATCATATGCTTACCCTAAGTAAAGTATTTGATTTCTTGGCTTTATATCTTGTGGAA  
 AGGACGAAACACC**AACACACAGCTGGGTATCAGAG**GTTTTAGTACTCTGGAACAGAATCTAC  
 TAAAAAAGGCAAAATGCCGTGTTTATCTCGTCAACTGTTGGCGAGATTTTTTTCGGCCGCC  
 CGCGGTGGAGCTCCAGCTTTGTTCCCTTAGTGAGGGTTAATTGCGCGCTTGGCGTAATCATG  
 GTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTATCCGCTCACAAATCCACACAACATACGAGCCGGA  
 AGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCT  
 CACTGCCCGCTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGC  
 GGGGAGAGGCGGTTTGCATATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCCTCGCTCACTGACTCGCTCGCTCG  
 GTCGTTCCGGCTCGGGCAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAA  
 CAGGGGATAACGCGAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAAGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAA  
 GGCCCGCTTGTGGCGTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCAAAAAATCGACGC  
 TCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAGATACCAGGCGTTTTCCCTGGAAAGCT  
 CCCTCGTGCCTCTCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCAGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTC  
 GGGAAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCAGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGGTGTAGGTCGTTCC

tccaagctgggctgtgtgcacgaacccccggttcagcccgaccgctgcgcccttatccggtaact  
atcgtcttgagtcacaacccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacag  
gattagcagagcgaggtatgtaggcggtgctacagagttcttgaagtggtggcctaactacggc  
tacctagaaggacagtatttggatctgctctgctgaagccagttaccttcggaaaaagag  
ttggtagctcttgatccggcaaacaccaccgctggtagcgggtgtttttttgtttgcaagca  
gcagattacgcgcaaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttctacggggtctgac  
gctcagtggaacgaaaactcacgttaagggattttggatcatgagattatcaaaaaggatcttca  
cctagatccttttaattaaaaatgaagttttaaatacaatctaaagtatatatgagtaaacctg  
gtctgacagttaccaatgcttaatcagtgaggcacctatctcagcgatctgtctatcttctgcca  
tccatagttgctgactccccgctgtagataactacgatacgggagggcttaccatctggcc  
ccagtgctgcaatgataccgagaccacgctcaccgctccagatttatcagcaataaacca  
gccagccggaagggccgagcgcagaagtggtcctgcaactttatccgctccatccagctctatt  
aattgttgccggaagctagagtaagtagttcgccagttaatagtttgcgcaacggtgttgcca  
ttgctacagcgcagtggtgctcagctcgtcgtttggatggcttcattcagctccggttccca  
acgatcaaggcgagttacatgatccccatggtgtgcaaaaaagcggtagctccttcggctct  
ccgatcgttgcagaagtaagttggccgagtggtatcactcatggttatggcagcactgcata  
attctcttactgtcatgccatccgtaagatgcttttctgtgactggtgagtactcaaccaagtc  
attctgagaatagtgtatgcgccgaccgagttgctcttgccggcgcaatacgggataataacc  
gcgccacatagcagaactttaaaagtgtcatcattggaaaacggttcttcggggcgaaaactct  
caaggatcttaccgctgttgagatccagttcagatgtaaccactcgtgcaccaactgatcttc  
agcatcttttactttcaccagcgtttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaatgccgcaaaa  
aaggaataagggcgacacggaatgttgaatactcatactcttcttttcaatattattgaa  
gcatttatcagggttattgtctcatgagcggatacatatttgaatgtatttagaaaaataaaca  
aataggggttccgcgacacatttccccgaaaagtgccac

pDO240 с JCR183 (SEQ ID NO: 38) (gRNA выделена жирным шрифтом)

ctaaattgtaagcgttaataatctttgttaaaattcgcggttaaattttgttaaatcagctcattt  
tttaaccaatagccgaaatcggcaaaatcccttataaatcaaaagaatagaccgagataggggt  
tgagtggtgttccagtttggacaagagtcactattaaagaacgtggactccaacgtcaaaagg  
gcgaaaaaccgctctatcagggcgatggccactacgtgaaccatcacctaatcaagttttttg  
gggtcgaggtgccgtaaaagcactaaatcggaaccctaaagggagccccgatttagagcttgac  
gggaaagccggcgaacgtggcgagaaaggaaggaagaaagcgaaggagcggcgctagggc  
gctggcaagtgtagcggtcacgctgcgctgtaaccaccacaccgcccggcttaatgcccgccta  
cagggcgctccattcgcattcaggtgcgcaactgttgggaagggcgatcgggtgcccggct  
cttcgctattacgccagctggcgaaaggggatgtgctgcaaggcgattaagttgggtaacgcc  
agggttttccagtcacgagcttgtaaaacgacggccagtgagcgcgctgtaatacgaactacta  
tagggcgaattgggtaccaagcttgcctatttccatgattccttcatatttgcatatacgata  
caaggctgttagagagataattggaattaattgactgtaaacacaaagatattagtacaaaat  
acgtgacgtagaagtaataatcttgggtagtttgagttttaaataatggtttttaaattg  
actatcatatgcttaccgtaacttgaagatatttcgatttcttgctttatatatcttgtggaa  
aggacgaaacacc**AGAACTGGTGGGAAATGGTCTAG**gttttagtactctggaacagaaatctac  
taaaacaaggcaaaatgccgtgtttatctcgtcaactgttggcgagattttttgcggccgccc

cgcggaggagctccagcttttgttcccttagtgagggtaattgCGcgttggcgtaatcatg  
gtcatagctgtttcctgtgtgaaattgttatccgctcacaattccacacaacatacagccgga  
agcataaagtgtaaagcctgggggcctaatagtgagctaaactcacattaattgCGttgcgt  
cactgcccgtttccagtcgggaaacctgtcgtgccagctgattaatgaatcgGCCAACgCG  
ggggagaggcggtttgcgtattggcgctcttccgcttccctcgtcactgactcgtcgcgtcg  
gtcgttcggctgcggcagcgggtatcagctcactcaaaggcggtaatacggttatccacagaat  
caggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaa  
ggcgcgttgcgtggcgtttttccataggctccgccccctgacgagcatcaaaaaatcgacgc  
tcaagtcagaggtggcgaacccgcagggactataaagataaccaggcgtttccccctggaagct  
ccctcgtgcgtctcctgttccgacctgCCGcttaccggatacctgtccgcttttctccctc  
gggaagcgtggcgttttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcgggtgtaggtcgttcgc  
tccaagctgggctgtgtgcacgaacccccgttcagcccgaccgctgcgccttatccggtaact  
atcgtcttgagtccaaccggtaagacacgacttatcGCCactggcagcagccactggtaacag  
gattagcagagcgaggtatgtaggcgggtctacagagttcttgaagtggggcctaactacggc  
tactactagaaggacagtatttggatctcgcgtctcgtgaagccagttaccttcggaaaaagag  
ttgtagctcttgatccggcaaaacaccaccgctggtagcgggtgttttttgtttgcaagca  
gcagattacgcgcagaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttctacggggtctgac  
gctcagtggaacgaaaactcacgttaagggatttggctcatgagattatcaaaaaggatcttca  
cctagatccttttaaataaaaatgaagtttaaatcaatctaaagtataatgagtaaacttg  
gtctgacagttaccaatgcttaatcagtgaggcacctatctcagcgtctgtctatctcgttca  
tccatagttgcgtgactccccgtcgtgtagataactacgatacgggagggttaccatctggcc  
ccagtgctgcaatgataccgcgagaccacgctcaccggctccagatttatcagcaataaacca  
gccagccggaagggccgagcgcagaagtggtcctgcaactttatccgcctccatccagcttatt  
aattgttgccgggaagctagagtaagtagttccagttaatagtttgcgcaacgttgttgcca  
ttgctacaggcatcgtggtgtcacgctcgtcgtttggatggcttcatcagctccggttccca  
acgatcaaggcgagttacatgatccccatgttgtgcaaaaaagcggttagctccttcggctct  
ccgatcgttgcagaagtaagttggcgcagtggtatcactcatggttatggcagcactgcata  
attctcttactgtcatgccatccgtaagatgcttttctgtgactgggtgagtactcaaccaagtc  
attctgagaatagtgatgcggcgaccgagttgctcttggccgctcaatacgggataatacc  
gcgccacatagcagaactttaaagtgctcatcattggaaaacgttcttcggggcgaactct  
caaggatcttaccgctgttgagatccagttcgtatgtaaccactcgtgcaccaactgatcttc  
agcatcttttactttcaccagcgtttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaaatgccgaaaa  
aagggataaaggcgcacggaaatgttgaatactcatactcttctttttcaataattattgaa  
gcatttatcagggttattgtctcatgagcggatacatatttgaatgtatttagaaaaataaaca  
aataggggttccgCGcacatttccccgaaaagtGCCac

PT366 с JCR179 - PT366AAV 179 (SEQ ID NO: 39) -плазмида для

AAV, применяемая для работы *in vivo* (gRNA выделена жирным шрифтом; SaCas9 выделена верхним регистром; NLS выделена нижним регистром, жирным шрифтом и подчеркиванием)

cctgcaggcagctgcgcgctcgctcgctcactgagggccgcccgggctcgggagacctttggtc  
gcccggcctcagtgagcgagcgagcgcgagagagggagtgggccaactccatcactaggggttc  
ctgcggcctctagactcgagggcgttgacattgattattgactagttattaatagtaataatcaatta  
cggggtcattagttcatagcccatataggagtcccggttacataacttacggtaaatggccc  
gcctggctgaccgcccacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgttcccatagta  
acgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaaactgccacttgg  
cagtacatcaagtgtatcatatgccaaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaatggcc  
cgctggcattatgccagtacatgaccttatgggactttcctacttggcagtacatctacgta  
ttagtcatcgctattaccatgggtgatgcggtttttggcagtacatcaatgggctggatagcggg  
ttgactcacgggatttccaagtctccacccccattgacgtcaatgggagtttggttttggcacca  
aatcaacgggactttccaaaatgtcgtacaactccgccccattgacgcaaatgggctgtagg  
cgtgtacgggtgggaggtctatataagcagagctctctggctaactaccgggtgccacatggccc  
caaagaagaagcgggaaggtcggtatcccagcagctccagcagccAAGCGGAAC TACATCCTGGG  
CCTGGACATCGGCATCACCAGCGTGGGCTACGGCATCATCGACTACGAGACACGGGACGTGATC  
GATGCCGGCGTGC GGCTGTCAAAGAGGCCAACGTGAAAAACAACGAGGGCAGGCGGAGCAAGA  
GAGGCGCCAGAAGGCTGAAGCGGCGGAGGCGGCATAGAATCCAGAGAGTGAAGAAGCTGCTGTT  
CGACTACAACCTGCTGACCGACCACAGCGAGCTGAGCGGCATCAACCCCTACGAGGCCAGAGTG  
AAGGGCTGAGCCAGAAGCTGAGCGAGGAAGAGTTCCTGCGCCCTGCTGCACCTGGCCAAGA  
GAAGAGGCGTGACACAACGTGAACGAGGTGGAAGAGGACACCGGCAACGAGCTGTCCACCAAAGA  
GCAGATCAGCCGGAACAGCAAGGCCCTGGAAGAGAAATACGTGGCCGAAC TGCAGCTGGAACGG  
CTGAAGAAAGACGGCGAAGTGC GGGG CAGCATCAACAGATTCAAGACCAGCGACTACGTGAAA  
AAGCCAAACAGCTGCTGAAGGTGCAGAAGGCCCTACCACAGCTGGACCAGAGCTTCATCGACAC  
CTACATCGACCTGCTGGAACCCGGCGGACCTACTATGAGGGACCTGGCGAGGGCAGCCCCCTC  
GGCTGGAAGGACATCAAAGAATGGTACGAGATGCTGATGGGCCACTGCACCTACTTCCCCGAGG  
AACTGCGGAGCGTGAAGTACGCC TACAACGCCGACCTGTACAACGCCCTGAACGACCTGAACAA  
TCTCGTGATCACCAGGGACGAGAACGAGAAGCTGGAATATTACGAGAAGTTCAGATCATCGAG  
AACGTGTTCAAGCAGAAGAAGAAGCCACCCCTGAAGCAGATCGCCAAAGAAATCCTCGTGAACG  
AAGAGGATATTAAGGGCTACAGAGTGACCAGCACCGGCAAGCCCAGTTCACCAACCTGAAGGT  
GTACCACGACATCAAGGACATTACGCCCGGAAAGAGATTATTGAGAACCGGAGCTGCTGGAT  
CAGATTGCCAAGATCTGACCATCTACCAGAGCAGCGAGGACATCCAGGAAGAACTGACCAATC  
TGAAC TCCGAGCTGACCCAGGAAGAGATCGAGCAGATCTTAATCTGAAGGGCTATACCGGCAC  
CCACAACCTGAGCCTGAAGGCCATCAACCTGATCCTGGACGAGCTGTGGCACACCAACGACAA  
CAGATCGCTATCTTCAACCGGCTGAAGCTGGTGCCCAAGAAGGTGGACCTGTCCCAGCAGAAAG

AGATCCCCACCACCCTGGTGGACGACTTCATCCTGAGCCCCGTCGTGAAGAGAAGCTTCATCCA  
 GAGCATCAAAGTGATCAACGCCATCATCAAGAAGTACGGCCTGCCAACGACATCATTATCGAG  
 CTGGCCCGGAGAAGAACTCCAAGGACGCCAGAAAATGATCAACGAGATGCAGAAGCGGAACC  
 GGCAGACCAACGAGCGGATCGAGGAAATCATCCGGACCACCGCAAAGAGAACGCCAAGTACCT  
 GATCGAGAAGATCAAGCTGCACGACATGCAGGAAGGCAAGTGCCTGTACAGCCTGGAAAGCCATC  
 CCTCTGGAAGATCTGCTGAACAACCCCTTCAACTATGAGGTGGACCACATCATCCCCAGAAGCG  
 TGTCTTCGACAACAGCTTCAACAACAAGGTGCTCGTGAAGCAGGAAGAAAACAGCAAGAAGGG  
 CAACCGGACCCCATTCAGTACCTGAGCAGCAGCGACAGCAAGATCAGCTACGAAACCTTCAAG  
 AAGCACATCCTGAATCTGGCCAAGGGCAAGGGCAGAATCAGCAAGACCAAGAAAGAGTATCTGC  
 TGGAAAGACGGGACATCAACAGGTTCTCCGTGCAGAAAGACTTCATCAACCGGAACCTGGTGGGA  
 TACCAGATACGCCACCAGAGGCCTGATGAACCTGCTGCGGAGCTACTTCAGAGTGAACAACCTG  
 GACGTGAAAGTGAAGTCCATCAATGGCGGCTTACCAGCTTCTGCGGGGAAAGTGGAAAGTTTA  
 AGAAAGAGCGGAACAAGGGGTACAAGCACCGCCGAGGACGCCCTGATCATTGCCAACGCCGA  
 TTTCATCTTCAAAGAGTGGAAAGAACTGGACAAGGCCAAAAAAGTGATGGAAAACAGATGTTT  
 GAGAAAAGCAGGCCGAGAGCATGCCGAGATCGAAACCGAGCAGGAGTACAAAGAGATCTTCA  
 TCACCCCCACCAGATCAAGCACATTAAGGACTTCAAGGACTACAAGTACAGCCACCGGGTGGGA  
 CAAGAAGCCTAATAGAGAGCTGATTAACGACACCTGTACTCCACCCGGAAGGACGACAAGGGC  
 AACACCCCTGATCGTGAACAATCTGAACGGCCTGTACGACAAGGACAATGACAAGCTGAAAAAGC  
 TGATCAACAAGAGCCCCGAAAAGCTGCTGATGTACCACCAGACCCCCAGACCTACCAGAAACT  
 GAAGCTGATTATGGAACAGTACGGCGACGAGAAGAATCCCTGTACAAGTACTACGAGGAAACC  
 GGGAACTACCTGACCAAGTACTCCAAAAAGGACAACGGCCCCGTGATCAAGAAGATTAAGTATT  
 ACGGCAACAACTGAACGCCATCTGGACATCACCGACGACTACCCCAACAGCAGAAACAAGGT  
 CGTGAAGCTGTCCCTGAAGCCCTACAGATTTCGACGTGTACCTGGACAATGGCGTGTACAAGTTC  
 GTGACCGTGAAGAATCTGGATGTGATCAAAAAAGAAAACCTACTACGAAGTGAATAGCAAGTGCT  
 ATGAGGAAGCTAAGAAGCTGAAGAAGATCAGCAACCAGGCCGAGTTTATCGCCTCCTTCTACAA  
 CAACGATCTGATCAAGATCAACGGCGAGCTGTATAGAGTGTATCGGCGTGAACAACGACCTGCTG  
 AACCGGATCGAAGTGAACATGATCGACATCACCTACCAGGAGTACCTGGAAAACATGAACGACA  
 AGAGGCCCCCCAGGATCATTAAAGACAATCGCCTCCAAGACCCAGAGCATTAAAGAAGTACAGCAC  
 AGACATTCTGGGCAACCTGTATGAAGTGAATCTAAGAAGCACCCCTCAGATCATCAAAAAGGGC  
aaaagqccgqccgqccacgaaaaagqccgqccagqcaaaaaagaaaaagggatcctaccatacg  
 atgtccagattacgcttaccatacgatgttccagattacgcttaccatacgatgttccaga  
 ttacgcttaagaattcctagagctcgcctgatcagcctcgaactgtgccttctagtgtccagccat  
 ctgtgttttgccctcccccgctccttgaccctggaaggtgccactcccactgtcctttc  
 ctaataaaatgaggaaattgcatcgcattgtctgagtaggtgtcattctattctgggggtggg  
 gtggggcaggacagcaagggggaggattgggaagagaatagcaggcatgctggggaggtaccga  
 gggcctatttccatgattccttcatatttgcataacgatacaaggctgttagagagataatt

ggaattaatttgactgtaaacacaaaagatatttagtacaaaatacgtgacgtagaaaagtaataat  
 ttcttgggtagtttgcagttttaaattatgttttaaattggactatcatatgcttacgtaac  
 ttgaaagtatttcgatttcttggctttatatacttgtggaaggacgaaacaccg**AACACACA**  
**GCTGGGTTATCAGAG**gttttagtactctggaacagaatctactaaaacaaggcaaaatgccgt  
 gtttatctcgtaacttgttggcgagattttgcggccgcaggaacccctagtgtgaggttgg  
 ccaactccctctctgcgcgctcgcctcactgagggcggcgaccaaaggctgccccgacggcc  
 gggctttgccccggcgctcagtgagcgagcgagcgcgagctgcctgcagggggcgctgatg  
 cggtattttctccttacgcatctgtgcggtatttcacaccgcatacgtcaaagcaaccatagta  
 cgcgcctgtagcggcgattaagcgcgggggtgtggtggttacgcgcagcgtgaccgctaca  
 ctgcccagcgcctagcggccgctcctttcgtttcttcccttcccttctcgcacggttgcgg  
 gctttccccgtcaagctctaaatcggggctcccttttagggttccgatttagtgctttacggca  
 cctcgacccccaaaaacttgatttgggtgatggttcacgtagtggccatcgccctgatagacg  
 gtttttgcctttgacggttggagtccacggttctttaaagtggactcttgttccaaactggaa  
 caaactcaaccctatctcgggctattcttttgatttataagggattttgcccgatctcggccta  
 ttggttaaaaaatgagctgatttaacaaaatttaacgcgaattttaaacaataattaacgttt  
 acaattttatggtgactctcagtaacaatctgctctgatgccgcatagttaagccagccccgac  
 acccgccaacaccgctgacgcgcctgacgggcttgtctgctcccggcatccgcttacagaca  
 agctgtgaccgtctccgggagctgcatgtgtcagaggtttccacgctcatcaccgaaacgcgcg  
 agacgaaaggcctcgtgatagcctatttttaggttaatgtcatgataataatggtttctt  
 agacgtcaggtggcacttttccgggaaatgtgcgcggaacccctatttgtttattttctaaat  
 acattcaaatatgtatccgctcatgagacaataaccctgataaatgcttcaataatattgaaa  
 aggaagagtatgagtattcaacatttccgtgtcgccttattcccttttttgcggcattttgcc  
 ttctgtttttgctcaccagaaacgctggtgaaagttaaagatgctgaagatcagttgggtgc  
 acgagtggttacatcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagtttgcccccgaa  
 gaacgttttccaatgatgagcacttttaaagttctgctatgtggcgcggtattatcccgtattg  
 acgccccgcaagagcaactcggctcgcgcatacactattctcagaatgacttgggttgagtctc  
 accagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgctgcata  
 accatgagtgataaacactcggccaacttacttctgacaacgatcggaggaccgaaggagctaa  
 ccgcttttttgcacaacatgggggatcatgtaactcgccttgatcgttgggaaccggagctgaa  
 tgaagccataccaaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgtagcaatggcaacaacgttgcgc  
 aactattaactggcgaactacttactctagcttcccggcaacaattaatagactggatggagg  
 cggataaagttgcaggaccacttctgcgctcggcccttccggctggctggtttattgctgataa  
 atctggagccggtgagcgtggaagccgcggtatcattgcagcactggggccagatggaagccc  
 tcccgatcgtagttatctacacgacggggagttaggcaactatggatgaacgaaatagacaga  
 tcgctgagataggtgcctcactgattaagcattggttaactgtcagaccaagtttactcatatat  
 acttttagattgatttaaaacttcatttttaatttaaaggatctaggtgaagatcctttttgat

aatctcatgaccaaaatcccttaacgtgagttttcgttccactgagcgtcagaccccgtagaaa  
 agatcaaaggatcttcttgagatcctttttttctgcgcgtaatctgctgcttgcaaacaaaaa  
 accaccgctaccagcgggtggtttgttgccgatcaagagctaccaactctttttccgaaggt  
 actggcttcagcagagcgcagataccaataactgtccttctagtgtagccgtagttaggccacc  
 acttcaagaactctgtagcaccgcctacatacctcgctctgctaactcctgttaccagtggctgc  
 tgcagtgccgataagtctgtcttaccgggttgactcaagacgatagttaccggataaggcg  
 cagcggctcgggtgaacggggggtcgtgcacacagcccagcttgagcgaacgacctacaccg  
 aactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcgcacgcttcccgaagggagaaaggcga  
 caggtatccggaagcggcaggggtcggaacagggagcgcacgagggagcttccaggggaaac  
 gcttggtatctttatagtcctgtcgggtttcgccacctctgacttgagcgtcgatttttgtgat  
 gctcgtcagggggcgagcctatggaaaaacccagcaacgcggcctttttacggttcctggc  
 cttttgctggcctttttgctcacatgt

**PT366 с JCR183 (SEQ ID NO: 40) -применяемая для работы in vivo (gRNA выделена жирным шрифтом; SaCas9 выделена верхним регистром; NLS выделена нижним регистром, жирным шрифтом и подчеркиванием)**

cctgcaggcagctgcgctcgcctcactgagccgcccggcgctcggcgacctttggtc  
 gccggcctcagtgagcagcgcgagcgcagagagggagtggccaactccatcactaggggttc  
 ctgcggcctctagactcagggcgttgacattgattattgactagttattaatagtaataatta  
 cggggtcattagttcatagccatataatggagtccgcgttacataacttacggtaaatggccc  
 gctggctgaccgccaacgacccccgccattgacgtcaataatgacgtatgttcccatagta  
 acgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaaactgcccacttg  
 cagtacatcaagtgtatcatatgccaagtacgccccctattgacgtcaatgacggtaaatggcc  
 cgctggcattatgcccagtacatgacctatgggactttcctacttggcagtacatctacgta  
 ttagtcatcgctattaccatgggtgatgcggttttggcagtacatcaatggcggtggatagcgg  
 ttgactcacgggatttccaagtctccacccattgacgtcaatgggagtttgtttggcacca  
 aatcaacgggactttccaaaatgtcgtacaactccgccccattgacgcaaatggcggtagg  
 cgtgtacgggtgggaggtctatataagcagagctctctggctaactaccggtgccaccatggccc  
 caaagaagaagcgaaggtcgggtatccacggagtccagcagcc**AAGCGGA**ACTACATCCTGGG  
 CCTGGACATCGGCATCACCAGCGTGGGCTACGGCATCATCGACTACGAGACACGGGACGTGATC  
 GATGCCGGCGTGC GGCTGTCAAAGAGGCCAACGTGGAAAACAACGAGGGCAGGCGGAGCAAGA  
 GAGGCCCAGAAGGCTGAAGCGGCGGAGGCGGCATAGAATCCAGAGAGTGAAGAAGCTGCTGTT  
 CGACTACAACCTGCTGACCGACCACAGCGAGCTGAGCGGCATCAACCCCTACGAGGCCAGAGTG  
 AAGGGCCTGAGCCAGAAGCTGAGCGAGGAAGAGTTCTCTGCCGCCCTGCTGCACCTGGCCAAGA  
 GAAGAGGCGTGACAACGTGAACGAGGTGGAAGAGGACACCGGCAACGAGCTGTCCACCAAGA  
 GCAGATCAGCCGGAACAGCAAGGCCCTGGAAGAGAAATACGTGGCCGAACTGCAGCTGGAACGG

CTGAAGAAAGACGGCGAAGTGCGGGGCAGCATCAACAGATTCAAGACCAGCGACTACGTGAAAG  
AAGCCAAACAGCTGCTGAAGGTGCAGAAGGCCACCACCAGCTGGACCAGAGCTTCATCGACAC  
CTACATCGACCTGCTGGAAACCCGGCGGACCTACTATGAGGGACCTGGCGAGGGCAGCCCCTTC  
GGCTGGAAGGACATCAAAGAATGGTACGAGATGCTGATGGGCCACTGCACCTACTTCCCCGAGG  
AACTGCGGAGCGTGAAGTACGCCTACAACGCCGACCTGTACAACGCCCTGAACGACCTGAACAA  
TCTCGTGATCACCAGGGACGAGAACGAGAAGCTGGAATATTACGAGAAGTTCCAGATCATCGAG  
AACGTGTTCAAGCAGAAGAAGAAGCCACCCTGAAGCAGATCGCCAAAGAAATCCTCGTGAACG  
AAGAGGATATTAAGGGCTACAGAGTGACCAGCACCCGGCAAGCCGAGTTCACCAACCTGAAGGT  
GTACCACGACATCAAGGACATTACCGCCCGAAAGAGATTATTGAGAACGCCGAGCTGCTGGAT  
CAGATTGCCAAGATCCTGACCATCTACCAGAGCAGCGAGGACATCCAGGAAGAAGTACCAATC  
TGAACCTCCGAGCTGACCCAGGAAGAGATCGAGCAGATCTCTAATCTGAAGGGCTATACCGGCAC  
CCACAACCTGAGCCTGAAGGCCATCAACCTGATCCTGGACGAGCTGTGGCACACCAACGACAAC  
CAGATCGCTATCTTCAACCGGCTGAAGCTGGTGCCCAAGAAGGTGGACCTGTCCCAGCAGAAAG  
AGATCCCCACCACCCTGGTGGACGACTTCATCCTGAGCCCCGTCGTGAAGAGAAGCTTCATCCA  
GAGCATCAAAGTGATCAACGCCATCATCAAGAAGTACGGCCTGCCCAACGACATCATTATCGAG  
CTGGCCCCGCGAGAAGAAGTCCAAGGACGCCAGAAAATGATCAACGAGATGCAGAAGCGGAACC  
GGCAGACCAACGAGCGGATCGAGGAAATCATCCGGACCACCCGCAAAGAGAACGCCAAGTACCT  
GATCGAGAAGATCAAGCTGCACGACATGCAGGAAGGCAAGTGCCTGTACAGCCTGGAAGCCATC  
CCTCTGGAAGATCTGCTGAACAACCCCTTCAACTATGAGGTGGACCACATCATCCCCAGAAGCG  
TGTCTTCGACAACAGCTTCAACAACAAGGTGCTCGTGAAGCAGGAAGAAAACAGCAAGAAGGG  
CAACCGGACCCCATTCAGTACCTGAGCAGCAGCGACAGCAAGATCAGCTACGAAACCTTCAAG  
AAGCACATCCTGAATCTGGCCAAGGGCAAGGGCAGAATCAGCAAGACCAAGAAAGAGTATCTGC  
TGGAAGAACGGGACATCAACAGGTTCTCCGTGCAGAAAGACTTCATCAACCGGAACCTGGTGG  
TACCAGATACGCCACCAGAGGCTGATGAACCTGCTGCGGAGCTACTTCAGAGTGAACAACCTG  
GACGTGAAAGTGAAGTCCATCAATGGCGGCTTACCAGCTTCTGCGGGGGAAGTGAAGTTTA  
AGAAAGAGCGGAACAAGGGGTACAAGCACCACGCCGAGGACGCCCTGATCATTGCCAACGCCGA  
TTTCATCTTCAAAGAGTGAAGAAACTGGACAAGGCCAAAAAAGTGATGGAAAACAGATGTTT  
GAGGAAAAGCAGGCCGAGAGCATGCCGAGATCGAAACCGAGCAGGAGTACAAAGAGATCTTCA  
TCACCCCCCACCAGATCAAGCACATTAAGGACTTCAAGGACTACAAGTACAGCCACCGGGTGGA  
CAAGAAGCCTAATAGAGAGCTGATTAACGACACCCTGTACTCCACCCGGAAGGACGACAAGGGC  
AACACCCTGATCGTGAACAATCTGAACGGCCTGTACGACAAGGACAATGACAAGCTGAAAAAGC  
TGATCAACAAGAGCCCCGAAAAGCTGCTGATGTACCACCACGACCCCCAGACCTACCAGAACT  
GAAGCTGATTATGGAACAGTACGGCGACGAGAAGAATCCCCGTGACAAGTACTACGAGGAAAC  
GGGAACTACCTGACCAAGTACTCCAAAAAGGACAACGGCCCCGTGATCAAGAAGATTAAGTATT  
ACGGCAACAACTGAACGCCATCTGGACATCACCGACGACTACCCCAACAGCAGAAACAAGGT  
CGTGAAGCTGTCCCTGAAGCCCTACAGATTCGACGTGTACCTGGACAATGGCGTGTACAAGTTC

GTGACCGTGAAGAATCTGGATGTGATCAAAAAAGAAACTACTACGAAGTGAATAGCAAGTGCT  
 ATGAGGAAGCTAAGAAGCTGAAGAAGATCAGCAACCAGGCCGAGTTTATCGCCTCCTTCTACAA  
 CAACGATCTGATCAAGATCAACGGCGAGCTGTATAGAGTGATCGGCGTGAACAACGACCTGCTG  
 AACCGGATCGAAGTGAACATGATCGACATCACCTACCGCGAGTACCTGGAAAACATGAACGACA  
 AGAGGCCCCCAGGATCATTAAGACAATCGCCTCCAAGACCCAGAGCATTAGAAGTACAGCAC  
 AGACATTCTGGGCAACCTGTATGAAGTGAATCTAAGAAGCACCCCTCAGATCATCAAAAAGGGC  
aaaagqccqgqccacgaaaaagqccqgqccagqcaaaaaagaaaaagggatcctaccatacg  
 atgttccagattacgcttaccatacagatgttccagattacgcttaccatacagatgttccaga  
 ttacgcttaagaattcctagagctcgtgatcagcctcgactgtgccttctagttgccagccat  
 ctgttgtttgccctccccctgcttcccttgaccctggaaggtgccactcccactgtcctttc  
 ctaataaaatgaggaaattgcatcgattgtctgagtaggtgtcattctattctgggggtggg  
 gtggggcaggacagcaaggggaggattgggaagagaatagcaggcatgctggggaggtagcca  
 gggcctatttcccatgattccttcatatgtcatatacagatacaaggctgttagagagataatt  
 ggaattaattgactgtaaacacaaagatattagtacaaaatcgtgacgtagaaagtaataat  
 ttcttgggtagtttgcagttttaaattatgttttaaattggactatcatatgcttaccgtaac  
 ttgaaagtatctcgatttcttggccttatatacttgtggaaggacgaaacaccg**AGAACTGG**  
**TGGGAAATGGTCTAG**gttttagtactctggaacagaatctactaaaacaaggcaaaatgccgt  
 gtttatctcgtcaacttgttggcgagattttgcggccgcaggaaccctagtgatggagttgg  
 ccactccctctctgcgcgctcgtcgtcactgaggccggcgaccaaaaggtcgcccagcggc  
 gggctttgccggggcgctcagtgagcgagcgagcgcgcagctgcctgcaggggcgccctgatg  
 cggatatttctccttacgcatctgtgcggtatctcacaccgcatacgtcaaagcaaccatagta  
 cgcgcctgtagcggcgcattaagcgcgggggtgtggtgttacgcgcagcgtgaccgctaca  
 cttgccagcgcctagcggcctccttctccttcttcccttcttctcgcacgcttcgccc  
 gctttccccgtcaagctctaaatcgggggctccctttaggggtccgatttagtgccttacggca  
 cctcgaccccaaaaaacttgatttgggtgatggttcacgtagtgggcatcgccctgatagacg  
 gtttttcgccccttgacgttggagtcacggttctttaaatagtggactctgttccaaactggaa  
 caaactcaaccctatctcgggctattcttttgatttataagggattttgccgatttcggccta  
 ttggttaaaaaatgagctgatttaacaaaaatlaacgcgaatttlaacaaaatattaacgttt  
 acaattttatggtgcaactctcagtaaatctgctctgatgccgatagttaagccagccccgac  
 acccgccaacaccgctgacgcgcctgacgggcttgtctgctcccggcatccgcttacagaca  
 agctgtgaccgtctccggagctgcatgtgtcagaggtttccaccgtcatcaccgaaacgcgcg  
 agacgaaaggcctcgtgatacgcctatttttatagggttaatgtcatgataataatggtttctt  
 agacgtcaggtggcacttttcggggaaatgtgcgcggaaccctatttgtttattttctaaat  
 acattcaaatatgtatccgctcatgagacaataaccctgataaatgcttcaataatattgaaa  
 aggaagagtatgagtattcaacatttccgtgtcgccttattcccttttttgcggcattttgcc  
 ttctgtttttgctcaccagaaacgctggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgc

acgagtggggttacatcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagttttcggccgaa  
 gaacggttttccaatgatgagcacttttaagttctgctatgtggcgcggtattatcccgtattg  
 acgcccggcaagagcaactcggtcgcccatacactattctcagaatgacttggttgagtactc  
 accagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgtgccata  
 accatgagtgataaacactgcccgaacttacttctgacaacgatcggaggaccgaaggagctaa  
 ccgcttttttgacacaacatgggggatcatgtaactcgccttgatcgttgggaaccggagctgaa  
 tgaagccataccaaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgtagcaatggcaacaacggttgcgc  
 aactattaactggcgaactacttactctagcttcccggcaacaattaatagactggatggagg  
 cggataaagttgcaggaccacttctgcgctcggcccttccggctggctggtttattgctgataa  
 atctggagccggtgagcgtggaagcccggtatcattgcagcactggggccagatggaagccc  
 tcccgatcgtagttatctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacaga  
 tcgctgagataggtgcctcactgattaagcattggtaactgtcagaccaagtttactcatatat  
 actttagattgatttaaaacttcatTTTTAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGAT  
 AATCTCATGACCAAAATCCCTAACGTGAGTTTTCGTTCCTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAA  
 AGATCAAAGGATCTTCTGAGATCCTTTTTTCTGCGGTAATCTGCTGCTTGCAACAACAAAA  
 ACCACCGCTACCAGCGGTGTTTGTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTTTTTTCCGAAGGTA  
 ACTGGCTTCAAGAGCGCAGATACCAATACTGCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACC  
 ACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGC  
 TGCCAGTGGCGATAAGTCGTGCTTACCAGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCAGGATAAGGCG  
 CAGCGGTCGGGTGAACGGGGGTTCTGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACCCG  
 AACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCAGCTTCCGGAAGGGAGAAAGCGGA  
 CAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCCGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAAC  
 GCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCCGGTTTTCCCACTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGAT  
 GTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACCCAGCAACCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGC  
 CTTTTGCTGGCCTTTTGTCCATGT

**pDO242 (SaCas9, применяемая во всех объектах с JCR89/91 и объектах с JCR157/160 для работы in vitro; SaCas9 выделена верхним регистром) (SEQ ID NO: 83)**

CTAaattgtaagcgttaataatTTTTGTTAAAATTCGCGTTAAATTTTTGTTAAATCAGCTCATT  
 TTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTATAAATCAAAGAATAGCCGAGATAGGGT  
 TGAGTGTGTTCCAGTTTGAACAAGAGTCCACTATTAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGG  
 GCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCACTACGTGAACCATCACCTAATCAAGTTTTTTG  
 GGTGCGAGGTGCCGTAAGCACTAAATCGGAACCTAAAGGGAGCCCCGATTTAGAGCTTGAC  
 GGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGC  
 GCTGGCAAGTGTAGCGGTCAAGCTGCGGTAACCAACACCCCGCGCTTAATGCGCGCTA  
 CAGGGCGCGTCCCATTCGCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCT

cttcgctattacgccagctggcgaaaggggatgtgctgcaaggcgattaagttgggtaacgcc  
agggttttcccagtcacgacgcttgtaaaacgacggccagtgagcgcgtaatacgaactcacta  
tagggcgaattgggtacCtttaattctagtactatgcaTgcggtgacattgattattgactagt  
tattaatagtaatacaattacggggtcattagttcatagcccataatggagttccgcggttacat  
aacttacggtaaatggcccgcctggctgaccgccaacgacccccgccattgacgtcaataat  
gacgtatgttcccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggtggagtattta  
cggtaaacctgccacttggcagtagatcaagtgtatcataatgccaagtagccccctattgacg  
tcaatgacggtaaatggcccgcctggcattatgccagtagacacattgaggttttccctac  
ttggcagtagacatctacgtattagtagctatgctattaccatgggtgatgacggttttggcagtagac  
aatgggctggatagcgggttgactcacgggattttcaagtctccacccattgacgtcaatg  
ggagtttgttttggcaccaaaatcaacgggactttccaaaatgtcgttaacaactccgccccatt  
gacgcaaatgggctgtagcgtgtacggtgggaggtctatataagcagagctctctggttaact  
accggtgccaccATGAAAAGGAACACATTCTGGGGCTGGACATCGGGATTACAAGCGTGGGGT  
ATGGGATTATTGACTATGAAACAAGGGACGTGATCGACGCAGGCGTCAGACTGTTCAAGGAGGC  
CAACGTGGAAAAAATGAGGGACGGAGAAGCAAGAGGGGAGCCAGGCGCTGAAACGACGGAGA  
AGGCACAGAAATCCAGAGGGTGAAGAACTGCTGTTTCGATTACAACCTGCTGACCGACATTCTG  
AGTGTAGTGGAAATTAATCCTTATGAAGCCAGGGTGAAGGGCTGAGTCAGAAGCTGTCAGAGGA  
AGAGTTTTCCGAGCTCTGCTGCACCTGGCTAAGCGCCGAGGAGTGCATAACGTCAATGAGGTG  
GAAGAGGACACCGGCAACGAGCTGTCTACAAAGGAACAGATCTCACGCAATAGCAAAGCTCTGG  
AAGAGAAGTATGTGCGCAGAGCTGCAGCTGGAACGGCTGAAGAAAGATGGCGAGGTGAGAGGGTC  
AATTAATAGGTTCAAGACAAGCGACTACGTCAAAGAAGCCAAGCAGCTGCTGAAAGTGCAGAAG  
GCTTACCACCAGCTGGATCAGAGCTTCATCGATACTTATATCGACCTGCTGGAGACTCGGAGAA  
CCTACTATGAGGGACCAGGAGAAGGGAGCCCCCTTCGGATGGAAAGACATCAAGGAATGGTACGA  
GATGCTGATGGGACATTGCACCTATTTTCCAGAAGAGCTGAGAAGCGTCAAGTACGCTTATAAC  
GCAGATCTGTACAACGCCCTGAATGACCTGAACAACCTGGTCATCACCGGGATGAAAACGAGA  
AACTGGAATACTATGAGAAGTTCCAGATCATCGAAAACGTGTTAAGCAGAAGAAAAAGCCTAC  
ACTGAAACAGATTGCTAAGGAGATCCTGGTCAACGAAGAGGACATCAAGGGCTACCGGGTGACA  
AGCACTGGAAAACCAGAGTTCACCAATCTGAAAGTGTATCACGATATTAAGGACATCACAGCAC  
GGAAAAGAAATCATTGAGAACGCCGAACCTGCTGGATCAGATTGCTAAGATCCTGACTATCTACCA  
GAGCTCCGAGGACATCCAGGAAGAGCTGACTAACCTGAACAGCGAGCTGACCCAGGAAGAGATC  
GAACAGATTAGTAATCTGAAGGGGTACACCGGAACACACAACCTGTCCCTGAAAGCTATCAATC  
TGATTCTGGATGAGCTGTGGCATAACAACGACAATCAGATTGCAATCTTTAACCGGCTGAAGCT  
GGTCCCAAAAAAGGTGGACCTGAGTCAGCAGAAAAGAGATCCCAACCACACTGGTGGACGATTTT  
ATCTGTACCCGTTGGTCAAGCGGAGCTTCATCCAGAGCATCAAAGTGTATCAACGCCATCATCA  
AGAAGTACGGCTGCCCAATGATATCATTATCGAGCTGGCTAGGGAGAAGAACAGCAAGGACGC  
ACAGAAGATGATCAATGAGATGCAGAAACGAAACCGGCAGACCAATGAACGCATTGAAGAGATT

ATCCGAACTACCGGGAAAGAGAACGCAAAGTACCTGATTGAAAAAATCAAGCTGCACGATATGC  
AGGAGGGAAAGTGTCTGTATTCTCTGGAGGCCATCCCCCTGGAGGACCTGCTGAACAATCCATT  
CAACTACGAGGTGATCATATTATCCCCAGAAGCGTGTCTTCGACAATTCTTTTAAACAAG  
GTGCTGGTCAAGCAGGAAGAGAACTCTAAAAAGGGCAATAGGACTCCTTTCCAGTACCTGTCTA  
GTTTCAGATTTCCAAGATCTCTTACGAAACCTTTAAAAAGCACATTCTGAATCTGGCCAAAGGAAA  
GGGCCGCATCAGCAAGACCAAAAAGGAGTACCTGCTGGAAGAGCGGGACATCAACAGATTCTCC  
GTCCAGAAGGATTTTATTAACCGGAATCTGGTGGACACAAGATACGCTACTCGCGGCTGATGA  
ATCTGCTGCGATCTTATTTCCGGGTGAACAATCTGGATGTGAAAGTCAAGTCCATCAACGGCGG  
GTTTCACATCTTTTCTGAGGCGCAAATGGAAGTTTAAAAAGGAGCGCAACAAAGGGTACAAGCAC  
CATGCCGAAGATGCTCTGATTATCGCAAATGCCGACTTTCATCTTTAAGGAGTGGAAAAAGCTGG  
ACAAAGCCAGAAAGTGTGAGAGAACCAGATGTTTCAAGAGAAGCAGGCCGAATCTATGCCCGA  
AATCGAGACAGAACAGGAGTACAAGGAGATTTTCATCACTCCTCACCAGATCAAGCATATCAAG  
GATTTCAAGGACTACAAGTACTCTCACCGGGTGGATAAAAAGCCCAACAGAGAGCTGATCAATG  
ACACCCTGTATAGTACAAGAAAAGACGATAAGGGGAATACCCTGATTGTGAACAATCTGAACGG  
ACTGTACGACAAAGATAATGACAAGCTGAAAAAGCTGATCAACAAAAGTCCCGAGAAGCTGCTG  
ATGTACCACCATGATCCTCAGACATATCAGAAACTGAAGCTGATTATGGAGCAGTACGGCGACG  
AGAAGAACCCTACTGTATAAGTACTATGAAGAGACTGGAACTACCTGACCAAGTATAGCAAAAA  
GGATAATGGCCCCGTGATCAAGAAGATCAAGTACTATGGGAACAAGCTGAATGCCCATCTGGAC  
ATCACAGACGATTACCCTAACAGTCGCAACAAGGTGGTCAAGCTGTCACTGAAGCCATACAGAT  
TCGATGTCTATCTGGACAACGGCGTGTATAAATTTGTGACTGTCAAGAATCTGGATGTCAACAA  
AAAGGAGAACTACTATGAAGTGAATAGCAAGTGTACGAAGAGGCTAAAAAGCTGAAAAAGATT  
AGCAACCAGGAGAGTTTCATCGCCTCCTTTTACAACAACGACCTGATTAAGATCAATGGCGAAC  
TGATATAGGGTCATCGGGTGAACAATGATCTGCTGAACCGCATTGAAGTGAATATGATTGACAT  
CACTTACCGAGAGTATCTGGAAAACATGAATGATAAGCGCCCCCTCGAATTATCAAAAACATT  
GCCTCTAAGACTCAGAGTATCAAAAAGTACTCAACCGACATCTGGGAAACCTGTATGAGGTGA  
AGAGCAAAAAGCACCCCTCAGATTATCAAAAAGGGCagcggaggcaagcgtcctgctgctactaa  
gaaagctggtcaagctaagaaaaagaaaggatcctaccatac gatgttccagattacgcttaa  
gaattcctagagctcgtgatcagcctcgactgtgccttctagttgccagccatctgttgtttg  
ccctcccccgcttccttgcacctggaaggtgccactcccactgtcctttcctaataaaat  
gaggaaattgcatcgcattgtctgagtaggtgtcattctattctggggggtgggggtggggcagg  
acagcaagggggaggattgggaagagaatagcaggcatgctggggaggtagcggccgcCCgcg  
tgagctccagcttttgtcccttagtgagggttaattgcgcttggcgtaatcatggtcat  
agctgtttcctgtgtgaaattgttatccgctcacaattccacacaacatacagccggaagcat  
aaagtgtaaagcctggggtgcctaagtgagtgagctaactcacattaattgcggttgcgctcactg  
cccgctttccagtcgggaaacctgtcgtgccagctgcattaatgaatcggccaacgcggggga  
gaggcggtttgcgtattgggcgctctccgcttctcgtcactgactcgtgcgctcggtcgt

tcggctgcgcgagcggtatcagctcactcaaaggcggttaatacggttatccacagaatcaggg  
gataacgcaggaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccg  
cgttgctggcggtttttccataggctccgccccctgacgagcatcacaataatcgacgctcaag  
tcagaggtggcgaaccgacaggaactataagataaccaggcggtttccccctggaagctccctc  
gtgcgctctcctgttccgaccctgccgcttaccggatacctgtccgctttctcccttcgggaa  
gcgtggcgctttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcggtgtaggtcgttcgctcaa  
gctgggctgtgtgcacgaacccccgttcagcccgaccgctgccccttatccggttaactatcgt  
cttgagtccaaccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggatta  
gcagagcgaggtatgtaggcggtgctacagagtcttgaagtggggcctaactacggctacac  
tagaaggacagtatgttgatctgcgctctgctgaagccagttaccttcggaaaaagagttggt  
agctcttgatccggcaaaacaccacgctgtagcggtggtttttttgtttgcaagcagcaga  
ttacgcgcaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatctttctacggggtctgacgctca  
gtggaacgaaaactcacgttaagggattttggtcatgagattatcaaaaaggatcttcacctag  
atccttttaaatataaatgaagtttaaatcaatctaaagtataatgagtaacttggtctg  
acagttaccaatgcttaacagtgagccacctatctcagcgatctgtctatctcgttcacctat  
agttgcctgactccccctgctgtagataactacgatacgggagggcttaccatctggccccagt  
gctgcaatgataccgagacccacgctcaccggctccagatttatcagcaataaacagccag  
ccggaagggccgagcgcaagaagtgtcctgcaactttatccgctccatccagctattaattg  
ttgccgggaagctagagtaagtagttcgccagttaatagtttgcgcaacggttggtgcatgct  
acagggcatcgtggtgtcacgctcgtcgtttggtatggcttcatcagctccgggtcccaacgat  
caaggcgagttacatgatccccatggtgtgcaaaaaagcggttagctccttcggtcctccgat  
cgttgtcagaagtaagttggccgagtggtatcactcatggttatggcagcactgcataattct  
cttactgtcatgccatccgtaagatgctttctgtgactggtgagtactcaaccaagtcatctc  
gagaatagtgatgcgggcaccgagttgctcttgcccggcgtaatacgggataataaccgccc  
acatagcagaactttaaaagtgtcatcattggaaaacgttcttcggggcgaaaactctcaagg  
atcttaccgctgttgagatccagttcgatgtaaccactcgtgcaccaactgatcttcagcat  
ctttactttaccagcgtttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaatgccgcaaaaaaggg  
aataagggcgacacggaatggtgaatactcactcttctcttttcaatattatgaagcatt  
tatcaggggtattgtctcatgagcggatacatatttgatgtatttagaaaaataaacaataag  
gggtccgcgacatttccccgaaaagtgccac

**pJRH1 (SaCas9, применяемая для всех объектов с JCR179/183, SaCas9 выделена верхним регистром; NLS выделена нижним регистром, жирным шрифтом и подчеркиванием) (SEQ ID NO: 84)**

стаaattgtaagcggttaataatgtttaaatttcggttaaatgtttaaattcagctcattt  
tttaaccaatagggcaaatcggcaaatcccttataaatcaaaagaatagaccgagatagggt  
tgagtgtttccagtttggaacaagagtcactattaaagaacgtggactccaacgtcaaagg

gcgaaaaaccgtctatcagggcgatggccactacgtgaaccatcacccaatcaagtttttg  
gggtcgaggtgccgtaaagcactaaatcggaaccctaaagggagccccgatttagagcttgac  
gggaaagccggcgaacgtggcgagaaaggaaggaagaaagcgaaaggagcgggcgctaggcc  
gctggcaagtgtagcggtcacgctgcgctgaaccaccacaccgcccgcgttaatgcgccccta  
cagggcgcgctccattcgcattcaggetgcgcaactggtggaagggcgatcggtgccggcct  
cttcgctattacgccagctggcgaaaggggatgtgctgcaaggcgattaagttgggtaacgcc  
agggttttccagtcacgacggttataaacgacggccagtgagcgcgtaatacgcactacta  
tagggcgaattgggtacctttaattctagtactatgcatgcgcttgacattgattattgactagt  
tattaatagtaatacattacggggctattagttcatagccatataatggagttccgcggtacat  
aacttacggtaaatggcccgcctggctgaccgccaacgacccccgccattgacgtcaataat  
gacgtatggtcccatagtaacgcaatagggactttccattgacgtcaatgggtggagtattta  
cggtaaacctgccacttgccagtcacatcaagtgtatcatatgccaaagtcgccccctattgacg  
tcaatgacggtaaatggcccgcctggcattatgccagtcacatgacctatgggactttcctac  
ttggcagtcacatctacgtattagtcacgctattaccatggtgatgcggttttggcagtcacatc  
aatgggctggttagcggtttgactcaggggattttccaagtctccacccattgacgtcaatg  
ggagtttggtttggcaccaaaatcaacgggactttccaaaatgctgtaacaactccgccccatt  
gacgcaaatggcggttagcgtgtacggtgggaggtctatataagcagagctctctggctaact  
accggtgccaccatggcccaagaagaagcgaaggtcggtatccacggagtcaccagcagccA  
AGCGGAACACTACATCCTGGGCTGGACATCGGCATCACCAGCGTGGGCTACGGCATCATCGACTA  
CGAGACACGGGACGTGATCGATGCCGGCGTGC GGCTGTTCAAAGAGGCCAACGTGGAAAACAAC  
GAGGGCAGGCGGAGCAAGAGAGGCCGCGAGAAGGCTGAAGCGGCGGAGGCGGCATAGAATCCAGA  
GAGTGAAGAAGCTGCTGTTGACTACAACCTGCTGACCGACCACAGCGAGCTGAGCGGCATCAA  
CCCCTACGAGGCCAGAGTGAAGGGCTGAGCCAGAAGCTGAGCGAGGAAGAGTTCTCTGCCGCC  
CTGCTGCACCTGGCCAAGAGAAGAGGCGTGCACAACGTGAACGAGGTGGAAGAGGACACCGGCA  
ACGAGCTGTCCACCAAAGAGCAGATCAGCCGGAACAGCAAGGCCCTGGAAGAGAAAATACGTGGC  
CGAACTGCAGCTGGAACGGCTGAAGAAAAGACGGCGAAGTGCGGGGCAGCATCAACAGATTCAAG  
ACCAGCGACTACGTGAAAGAAGCCAAACAGCTGCTGAAGGTGCAGAAGGCCCTACCACCAGCTGG  
ACCAGAGCTTCATCGACACCTACATCGACCTGCTGGAAACCCGGCGGACCTACTATGAGGGACC  
TGGCGAGGGCAGCCCCCTTCGGCTGGAAGGACATCAAAGAATGGTACGAGATGCTGATGGGCCAC  
TGCACCTACTTCCCCGAGGAACCTGCGGAGCGTGAAGTACGCCCTACAACGCCGACCTGTACAACG  
CCCTGAACGACCTGAACAATCTCGTGATCACCAGGGACGAGAACGAGAAGCTGGAATATTACGA  
GAAGTTCAGATCATCGAGAACGTGTTCAAGCAGAAGAAGAAGCCCACCTGAAGCAGATCGCC  
AAAGAAATCCTCGTGAACGAAGAGGATATTAAGGGCTACAGAGTGACCAGCACCGGCAAGCCCCG  
AGTTCACCAACCTGAAGGTGTACCACGACATCAAGGACATTACCGCCGGAAAGAGATTATTGA  
GAACGCCGAGCTGCTGGATCAGATTGCCAAGATCCTGACCATCTACCAGAGCAGCGAGGACATC  
CAGGAAGAAGTACCAATCTGAACTCCGAGCTGACCCAGGAAGAGATCGAGCAGATCTCTAATC

TGAAGGGCTATACCGGCACCCACAACCTGAGCCTGAAGGCCATCAACCTGATCCTGGACGAGCT  
 GTGGCACACCAACGACAACCAGATCGCTATCTTCAACCGGCTGAAGCTGGTGCCCAAGAAGGTG  
 GACCTGTCCCAGCAGAAAGAGATCCCCACCACCTGGTGGACGACTTCATCCTGAGCCCCGTG  
 TGAAGAGAAGCTTCATCCAGAGCATCAAAGTGATCAACGCCATCATCAAGAAGTACGGCCTGCC  
 CAACGACATCATTATCGAGCTGGCCCCGAGAGAAGTCCAAGGACGCCAGAAAATGATCAAC  
 GAGATGCAGAAGCGGAACCGGCAGACCAACGAGCGGATCGAGGAAATCATCCGACCACCGGCA  
 AAGAGAACGCCAAGTACCTGATCGAGAAGATCAAGCTGCACGACATGCAGGAAGGCAAGTGCCT  
 GTACAGCCTGGAAGCCATCCCTCTGGAAGATCTGCTGAACAACCCCTTCAACTATGAGGTGGAC  
 CACATCATCCCCAGAAGCGTGTCTTCGACAACAGCTTCAACAACAAGGTGCTCGTGAAGCAGG  
 AAGAAAACAGCAAGAAGGGCAACCGACCCCATTCAGTACCTGAGCAGCAGCGACAGCAAGAT  
 CAGCTACGAAACCTTCAAGAAGCACATCCTGAATCTGGCCAAGGGCAAGGGCAGAATCAGCAAG  
 ACCAAGAAAGAGTATCTGCTGGAAGAACGGGACATCAACAGGTTCTCCGTGCAGAAAGACTTCA  
 TCAACCGGAACCTGGTGGATAACCAGATACGCCACCAGAGGCTGATGAACCTGCTGCGGAGCTA  
 CTTCAGAGTGAACAACCTGGACGTGAAAGTGAAGTCCATCAATGGCGGCTTCACCAGCTTTCTG  
 CGGCGGAAGTGAAGTTTAAGAAAGAGCGGAACAAGGGGTACAAGCACCACGCCGAGGACGCC  
 TGATCATTGCCAACGCCGATTTTCATCTTCAAAGAGTGAAGAAAACCTGGACAAGGCCAAAAAAGT  
 GATGGAACACAGATGTTTCGAGGAAAAGCAGGCCGAGAGCATGCCCGAGATCGAAACCGAGCAG  
 GAGTACAAAGAGATCTTCATCACCCCCACCAGATCAAGCACATTAAGGACTTCAAGGACTACA  
 AGTACAGCCACCGGGTGGACAAGAAGCCTAATAGAGAGCTGATTAACGACACCCGTACTCCAC  
 CCGGAAGGACGACAAGGGCAACACCTGATCGTGAACAATCTGAACGGCCTGTACGACAAGGAC  
 AATGACAAGCTGAAAAAGCTGATCAACAAGAGCCCCGAAAAGCTGCTGATGTACCACCAGACC  
 CCCAGACCTACCAGAAACTGAAGCTGATTATGGAACAGTACGGCGACGAGAAGAATCCCCTGTA  
 CAAGTACTACGAGGAAACCGGAACTACCTGACCAAGTACTCCAAAAAGGACAACGGCCCCGTG  
 ATCAAGAAGATTAAGTATTACGGCAACAACTGAACGCCCATCTGGACATCACCGACGACTACC  
 CCAACAGCAGAAACAAGGTCGTGAAGCTGTCCCTGAAGCCCTACAGATTCGACGTGTACTGGGA  
 CAATGGCGTGTACAAGTTCGTGACCGTGAAGAATCTGGATGTGATCAAAAAAGAAAACACTAC  
 GAAGTGAATAGCAAGTGTATGAGGAAGCTAAGAAGCTGAAGAAGATCAGCAACCAGGCCGAGT  
 TTATCGCCTCCTTCTACAACAACGATCTGATCAAGATCAACGGCGAGCTGTATAGAGTGTACGG  
 CGTGAACAACGACCTGTGAACCGGATCGAAGTGAACATGATCGACATCACCTACCAGGATAC  
 CTGAAAACATGAACGACAAGAGGCCCCCCAGGATCATTAAAGACAATCGCCTCCAAGACCCAGA  
 GCATTAAGAAGTACAGCACAGACATTCTGGCAACCTGTATGAAGTGAATCTAAGAAGCACCC  
 TCAGATCATCAAAAAGGGCaaaagqccgqccacgaaaaaqqccgqccagqcaaaaaqaaa  
aaqgatcctaccatacagatggtccagattacgcttaagaattcctagagctcgctgatcagc  
 ctcgactgtgcttctagtggccagcatctgtgtttgcccctccccgctgccttcttgacc  
 ctggaaggtgccactcccactgtcctttcctaataaaatgaggaaattgcatcgcatgtctga  
 gtaggtgtcattctattctgggggtgggggtggggcaggacagcaagggggaggattgggaaga

gaatagcaggcatgctgggaggtagcggccgcccgcggtggagctccagcttttgtccctt  
agtgagggtaattgcgcgcttggcgtaatcatggtcatagctgttccctgtgtgaaattgtta  
tccgctcacaattccacacaacatacagaccggaagcataaagtgtaaagcctggggtgcctaa  
tgagtgagctaactcacattaattgcggtgctcactgcccgtttccagtcgggaaacctgt  
cgtgccagctgcattaatgaatcgccaacgcggggagaggcgtttgcgattgggcgctc  
ttccgcttctcgtcactgactcgtcgcctcggctcgttcggctgcggcgagcggtatcagct  
cactcaaaggcggtaatacggttatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtgag  
caaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgcttgctggcgttttccataggct  
ccgccccctgacgagcatcacaataatcgacgctcaagttagaggtggcgaaacccgacagga  
ctataaagataaccaggcgtttccccctggaagctccctcgtcgcctcctggtccgacctgc  
cgcttaccggatacctgtccgctttctcccttcgggaagcgtggcgctttctcatagctcacg  
ctgtaggatctcagttcgggtgtaggtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaaccccc  
gttcagcccagccgctgcgcttatccggtaactatcgtcttgagtccaacccgtaagacacg  
acttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcaggtatgtaggcgtgc  
tacagagttcttgaagtggcctaactacggctacactagaaggacagtatttggatctgc  
gctcgtgtaagccagttaccttcggaaaaaggttggtagctcttgatccggcaaaacaacca  
ccgctggtagcgggtgtttttttgttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaggatctca  
agaagatccttgatctttctacggggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgttaaggg  
attttggatgagattatcaaaaaggatcttcacctagatccttttaataaaaaatgaagtt  
ttaaataatctaaagtatatatgagtaaacttggctgacagttaccaatgcttaacagtgga  
ggcacctatctcagcagctgtctatctcgttcatccatagttgctgactccccgctgtgtag  
ataactacgatacgggagggccttaccatctggccccagtgctgcaatgataccgcgagaccac  
gctcaccggctccagatttatcagcaataaaccagccagccggaaggccgagcgcagaagtgg  
tcttgcaactttatccgctccatccagctctattaattgttgccgggaagctagagtaagtagt  
tcgccagttaatagtttgcgcaacggttggtgccattgctacagccatcgtgggtgcacgctcgt  
cgtttggatggcttattcagctccggttcccaacgatcaaggcgagttacatgatccccat  
gtgtgcaaaaaagcggtagctccttcggctcctccgatcgttgtcagaagtaagttggccgca  
gtgttatcactcatggttatggcagcactgcataattctcttactgtcatgccatccgtaagat  
gcttttctgtgactggtgagtagtcaaccaagtcattctgagaatagtgatgcggcgaccgag  
ttgctcttggccggcgtcaatacgggataataccgcgccacatagcagaactttaaagtgtc  
atcattggaaaaagcttcttcggggcgaaaactctcaaggatcttaccgctggtgagatccagtt  
cgatgtaaccactcgtgcacccaactgatcttcagcatctttactttcaccagcgtttctgg  
gtgagcaaaaacaggaaggcaaaatgccgcaaaaaagggaataagggcgacacggaatgttga  
atactcatactcttcccttttcaatattatgaagcatttatcagggttattgtctcatgagcg  
gatacatatttgaatgtatttagaaaaataacaaataggggttccgcgcacatttccccgaaa  
agtgccac

Последовательность NLS в PT366 (SEQ ID NO: 85)

AAAAGGCCGGCGCCACGAAAAAGGCCGGCCAGGCACAAAAAGAAAAAG

pDO203 - типичный каркас для клонирования gRNA с SpCas9; JCR94 и JCR99 помещали в сайт, выделенный жирным шрифтом, для тестирования в клетках, с последующим получением mRNA для получения мыши hDMD-дельта52/mdx (SEQ ID NO: 86)

ctaaattgtaagcggttaataatTTTTgttaaaattcgcgtaaaatTTTTgttaaatcagctcattt  
 ttaaccaatagggcgaatcggcaaaatcccttataaatcaaaagaatagaccgagatagggg  
 tgagtgttgtccagtttgaacaagagtccactattaagaacgtggactccaacgtcaaagg  
 gcgaaaaaccgtctatcagggcgatggccactacgtgaaccatcacccaatcaagttttttg  
 ggtcgcaggtgcccgaagcactaaatcggaaccctaaagggagccccgatttagagcttgac  
 gggaaagccggcgaacgtggcgagaaggaaggaagaaagcgaagagcgggcttagggc  
 gctggcaagtgtagcggtcacgctgcgcgtaaccaccaccccgccgcttaatgcgcccgtc  
 cagggcgcgtcccattcgccattcaggtgcgcaactgttgggaaggcgatcgggtcggggcct  
 ctctgctattacgccagctggcgaagggggatgtgctgcaaggcgattaagttgggtaacgcc  
 agggTTTTccagtcacgacggttgaaaacgacggccagtgagcgcgtaatacgaactacta  
 tagggcgaattgggtaccgagggcctatTTCCatgattccttcatatTTgcatatacgcataca  
 aggctgtagagagataattggaattaatTTgactgtaaacacaaagatattagtagcaaaatac  
 gtgacgtagaaagtaataatTTcttgggtagtttgcagTTTTaaattatgTTTTaaatggac  
 tatcatatgcttatcgtaacttgaaagtatTTcgatttcttggctTTtatatatcttTgTgaaag  
 gacgaaacacc**GGGTCTTCGAGAAGACCT**gttttagagctagaaatagcaagTTaaaaaaggc  
 tagtccgttatcaacttgaaaaagtggcaccgagtcgggtgctTTTTTccgcggtggagctcca  
 gTTTTgtccctTTtagtgagggTTaattgcgcgcttggcgtaatcatgggtcatagctgTTTTcc  
 tgtgtgaaattgttatccgctcacaattccacacaacatacagagccggaagcataaagtgtaaa  
 gcctggggTgcctaatgagtgagctaaactcacattaattgcgTtgcgctcactgccgctTTcc  
 agtcgggaaacctgtcgtgccagctgcattaatgaatcgccaacgcgcggggagagggcgttt  
 gcgtattgggcgctctccgcttccctcgctcactgactcgctgcgctcggctcgctcggctgcg  
 cgagcggtatcagctcactcaaaggcggtaatacggTTatccacagaatcaggggataacgcag  
 gaaagaacatgtgagcaaaagccagcaaaagccaggaaccgtaaaaaggccgcttgctggc  
 gTTTTccataggtccgccccctgacgagcatcaaaaaatcgacgctcaagtcaaggtgg  
 cgaaacccgacaggactataaagataaccaggcgtttccccctggaagctccctcgtgcgctctc  
 ctgttccgaccctgccgcttaccggatacctgtccgcctTTctccctcgggaagcgtggcgct  
 ttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcgggtgtaggtcgttcgcctcaagctgggctgt  
 gtgcacgaacccccgttcagcccagccgctgcgccttatccggtaactatcgtcttgagtcca  
 acccggtaaagacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgag  
 gtatgtaggcggTgctacagagttcttgaagtggTggcctaactacggctacactagaaggaca

gtatttggatctgcgctctgctgaagccagttaccttcgaaaaagagttggtagctcttgat  
 ccggcaaacaccaccgctggtagcgggtgtttttttgttgcaagcagcagattacgcgcag  
 aaaaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttctacggggtctgacgctcagtggaacgaa  
 aactcacgtaaggattttggatcatgagattatcaaaaaggatcttcacctagatccttttaa  
 attaaaaatgaagttttaaataatctaaagatatatgagtaaacttggctctgacagttacca  
 atgcttaatcagtgaggcacctatctcagcgatctgtctatcttctgcttcatccatagttgcctga  
 ctccccgctgtagataactacgatacgggagggcttaccatctggccccagtgctgcaatga  
 taccgcgagaccacgctcaccggctccagatttatcagcaataaacagccagccggaagggc  
 cgagcgcagaagtggctcctgcaactttatccgctccatccagtctattaattggtgcccggaa  
 gctagagtaagttagttcgccagttaatagtttgcgcaacgcttggccattgctacagggatcg  
 tgggtgcacgctcgtgctttggatggcttcattcagctccgggtcccaacgatcaaggcgagt  
 tacatgatccccatggtgtgcaaaaagcggtttagctccttcggctcctccgatcgttgctaga  
 agtaagttggccgagtggtatcactcatggttatggcagcactgcataattctcttactgtca  
 tgccatccgtaagatgcttttctgtgactggtagtactcaaccaagtcattctgagaatagtg  
 tatgcccgcagccaggtgctcttgcggcgctcaatacgggataataccgcccacatagcaga  
 actttaaagtgctcatcattggaaaacgcttcttcggggcgaaaactctcaaggatcttaccgc  
 tgttgagatccagttcgatgtaaccactcgtgcaccaactgatcttcagcatctttacttt  
 caccagcgtttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaatgccgcaaaaagggaataagggcg  
 acacggaaatggtgaatactcatactcttcttttcaatattattgaagcatttatcagggtt  
 atgtctcatgagcggatacatatttgaatgtatttagaaaaataacaaataggggttccgcg  
 cacatttccccgaaaagtgccac

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция для нацеливания на ДНК, содержащая первую молекулу gRNA и вторую молекулу gRNA, где первая молекула gRNA и вторая молекула gRNA выбраны из группы, состоящей из

(i) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который кодируется полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который кодируется полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2;

(ii) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который кодируется полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который кодируется полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4;

(iii) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который кодируется полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который кодируется полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19;

(iv) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который кодируется полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который кодируется полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18;

(v) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который кодируется полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который кодируется полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4;

(vi) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который кодируется полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который кодируется полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19;

(vii) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который кодируется полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который кодируется полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18;

(viii) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который кодируется полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который кодируется полинуклеотидом, содержащим



(vi) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который кодируется полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который кодируется полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19;

(vii) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который кодируется полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который кодируется полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18;

(viii) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который кодируется полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который кодируется полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4;

(ix) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который кодируется полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который кодируется полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19;

(x) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который кодируется полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который кодируется полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15;

(xi) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который кодируется полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который кодируется полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18; и

(xii) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который кодируется полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 41, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который кодируется полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 42.

6. Выделенный полинуклеотид по п.5, где первая молекула gRNA и вторая молекула gRNA выбраны из группы, состоящей из

(i) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который кодируется полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который кодируется полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2;

(ii) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который кодируется полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который кодируется полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4;

(iii) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который кодируется полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который кодируется полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19; и

(iv) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который кодируется полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 41, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который кодируется полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 42.

7. Выделенный полинуклеотид по п.5 или 6, дополнительно кодирующий белок, ассоциированный с короткими палиндромными повторами, регулярно расположенными группами, (Cas).

8. Выделенный полинуклеотид по п.7, где белок Cas содержит молекулу Cas9, которая распознает смежный с протоспейсером мотив (PAM) либо NNGRRT (SEQ ID NO: 24), либо NNGRRV (SEQ ID NO: 25).

9. Вектор, содержащий выделенный полинуклеотид по любому из пп.5-8.

10. Вектор по п.9, где вектор сконструирован с возможностью образования первого и второго двухнитевых разрывов в первом и втором интронах, фланкирующих экзон 51 гена DMD человека.

11. Вектор по п.9 или 10, где вектор представляет собой вирусный вектор.

12. Вектор по любому из пп.9-11, где вектор содержит тканеспецифичный промотор, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей первую молекулу gRNA, вторую молекулу gRNA и/или молекулу Cas9.

13. Клетка, содержащая композицию для нацеливания на ДНК по любому из пп.1-4, или выделенный полинуклеотид по любому из пп.5-8, или вектор по любому из пп.9-12.

14. Набор для обеспечения делеции сегмента гена дистрофина, содержащего экзон 51 или экзон 52, где набор содержит композицию для нацеливания на ДНК по любому из пп.1-4, или выделенный полинуклеотид по любому из пп.1-4, или вектор по любому из пп.9-12, или клетку по п.13.

15. Набор по п.14, дополнительно содержащий инструкции по применению.

16. Способ обеспечения делеции сегмента гена дистрофина, содержащего экзон 51 или экзон 52 в клетке, при этом способ предусматривает введение в клетку композиции для нацеливания на ДНК по любому из пп.1-4, или выделенного полинуклеотида по любому из пп.5-8, или вектора по любому из пп.9-12.

17. Способ обеспечения делеции сегмента гена дистрофина, содержащего экзон 51 или экзон 52 у субъекта, при этом способ предусматривает введение субъекту композиции для нацеливания на ДНК по любому из пп.1-4, или выделенного полинуклеотида, кодирующего композицию для нацеливания на ДНК по любому из пп.5-8, или вектора по любому из пп.9-12, или клетки по п.13.

18. Композиция для обеспечения делеции сегмента гена дистрофина, содержащего экзон 51 или экзон 52, при этом композиция содержит

(а) первый вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность, кодирующую первую молекулу направляющей РНК (gRNA), и полинуклеотидную последовательность, кодирующую первую молекулу Cas9, которая распознает смежный с протоспейсером мотив (PAM) либо NNGRRT (SEQ ID NO: 24), либо NNGRRV (SEQ ID NO: 25); и

(b) второй вектор, содержащий полинуклеотидную последовательность, кодирующую вторую молекулу gRNA, и полинуклеотидную последовательность, кодирующую вторую молекулу Cas9, которая распознает смежный с протоспейсером мотив (PAM) либо NNGRRT (SEQ ID NO: 24), либо NNGRRV (SEQ ID NO: 25),

где каждая из первой и второй молекул gRNA содержит нацеливающий домен, длина которого составляет от 19 до 24 нуклеотидов, и

где первый вектор и второй вектор сконструированы с возможностью образования первого и второго двухнитевых разрывов соответственно в первом интроне и втором интроне, фланкирующих экзон 51 или экзон 52 гена DMD человека, за счет чего обеспечивается делеция сегмента гена дистрофина, содержащего экзон 51 или экзон 52, и

где первая молекула gRNA и вторая молекула gRNA выбраны из группы, состоящей из

(i) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который кодируется полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который кодируется полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2;

(ii) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который кодируется полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который кодируется полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4;

(iii) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который кодируется полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который кодируется полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19;

(iv) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который кодируется полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который кодируется полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18;

(v) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который кодируется полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который кодируется полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4;

(vi) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который кодируется полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который кодируется полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19;

(vii) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который кодируется полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который кодируется полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18;

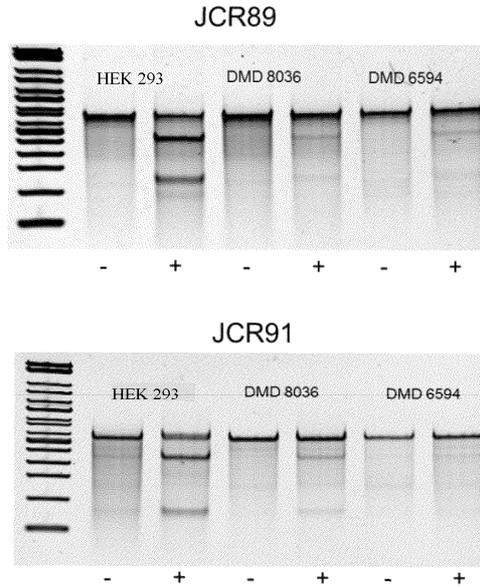
(viii) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который кодируется полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который кодируется полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4;

(ix) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который кодируется полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который кодируется полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19;

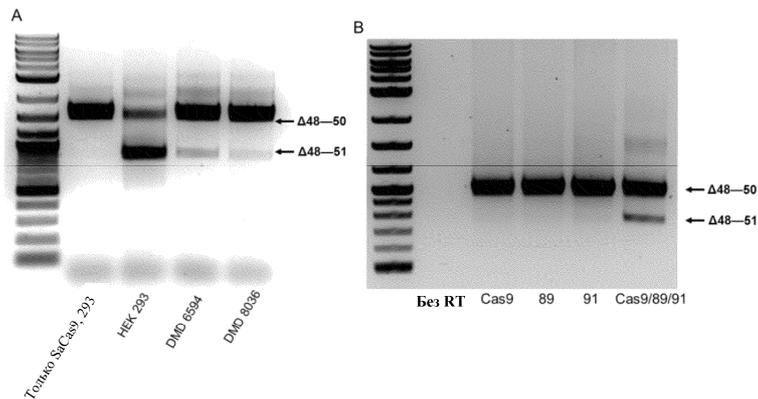
(x) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который кодируется полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который кодируется полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15;

(xi) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который кодируется полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который кодируется полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18; и

(xii) первой молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который кодируется полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 41, и второй молекулы gRNA, содержащей нацеливающий домен, который кодируется полинуклеотидом, содержащим нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 42.

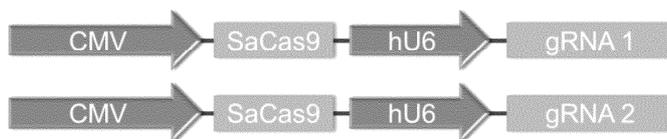


Фиг. 1



Фиг. 2

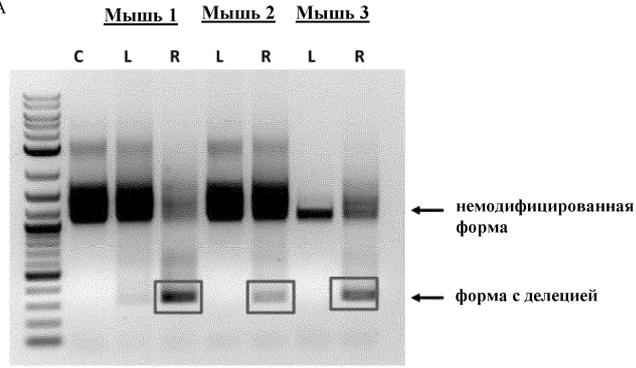
Система для доставки



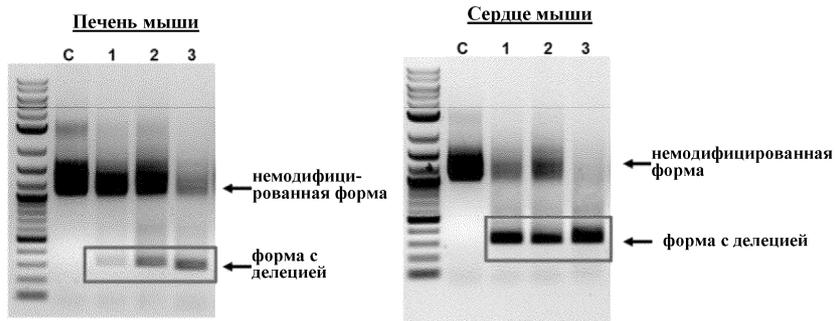
Совместная доставка 2 вирусов w/JCR89,91

Фиг. 3

2x ПЦР gDNA



Фиг. 4



Фиг. 5

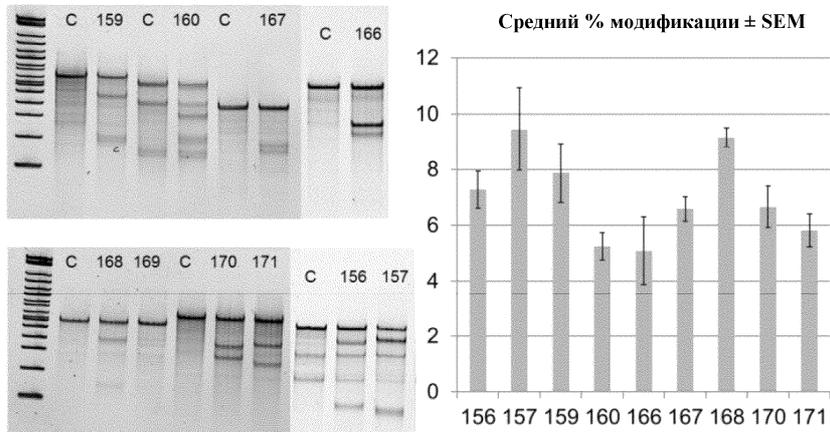


- 156 – на 1300 П. О. ВЫШЕ
- 157 – на 1284 П. О. ВЫШЕ
- 159 – на 101 П. О. ВЫШЕ
- 168 – на 1824 П. О. ВЫШЕ
- 170 – на 2851 П. О. ВЫШЕ
- 171 – на 2947 П. О. ВЫШЕ

- 160 – на 78 П. О. НИЖЕ
- 166 – на 1266 П. О. НИЖЕ
- 167 – на 1534 П. О. НИЖЕ

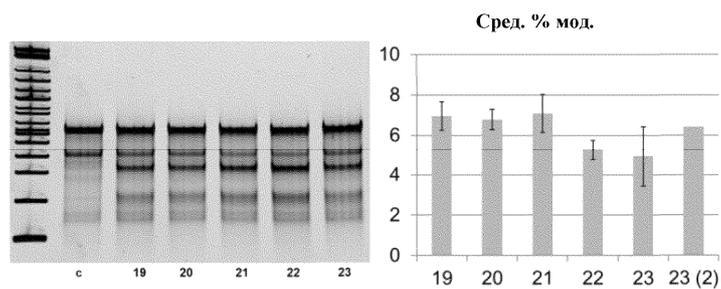
(П. О. ДЛЯ ГЕНОМА ЧЕЛОВЕКА)

Фиг. 6

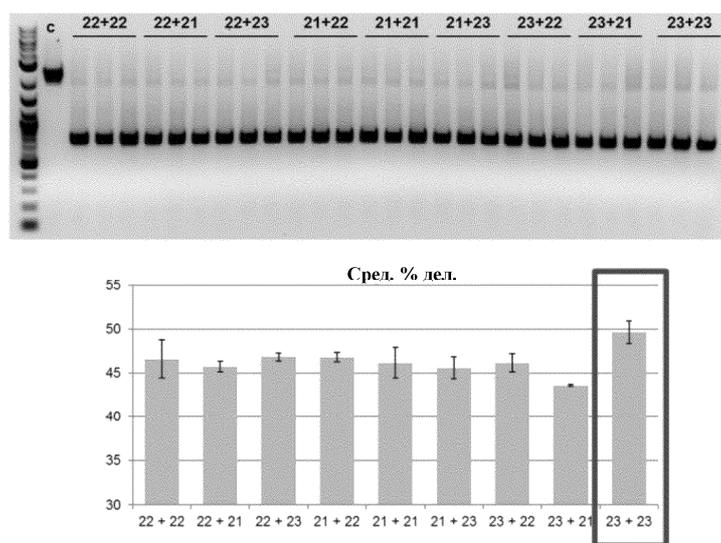


Фиг. 7

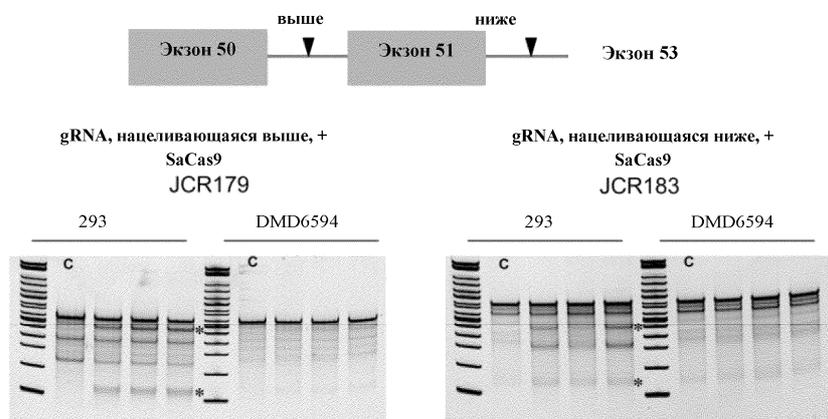




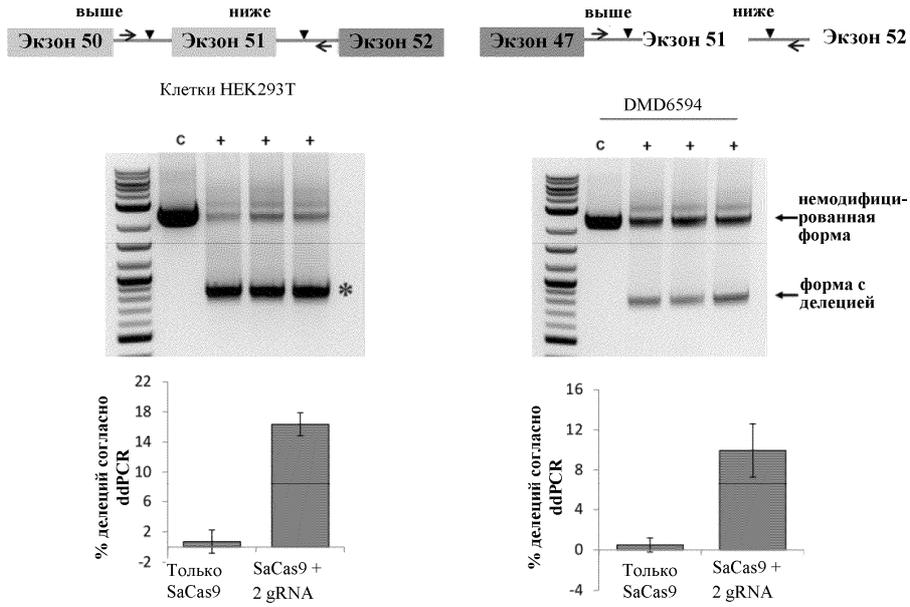
Фиг. 11



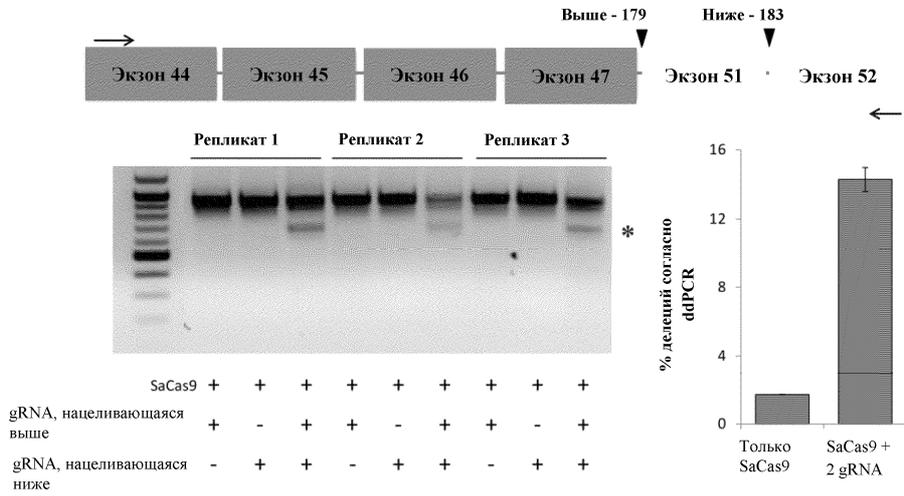
Фиг. 12



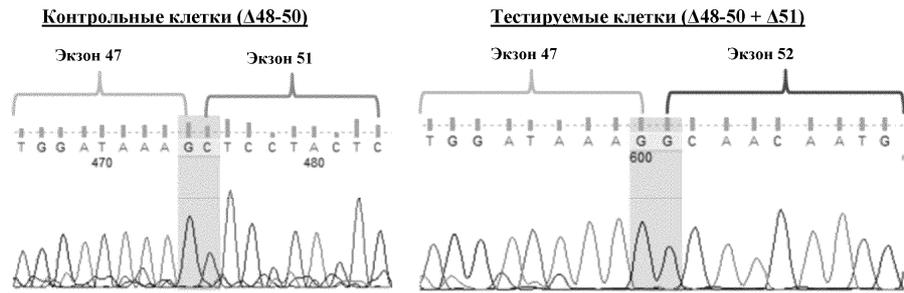
Фиг. 13



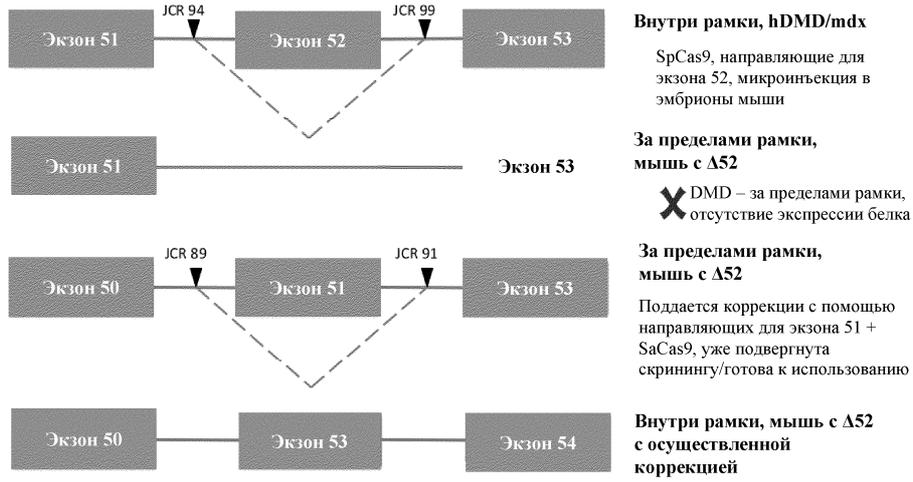
Фиг. 14



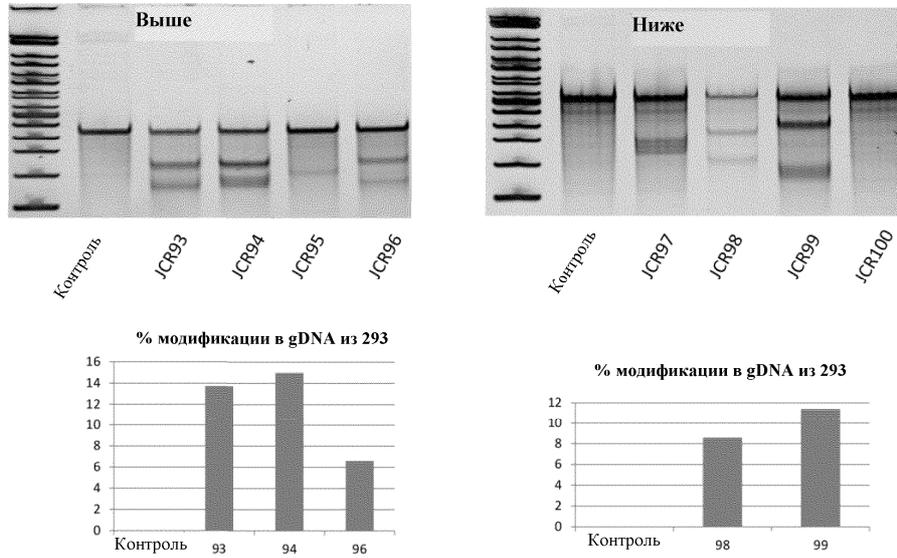
Фиг. 15



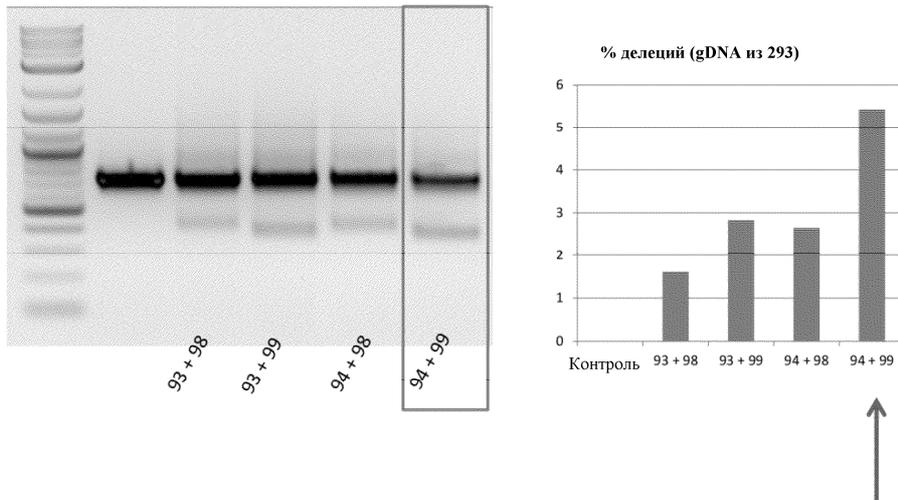
Фиг. 16



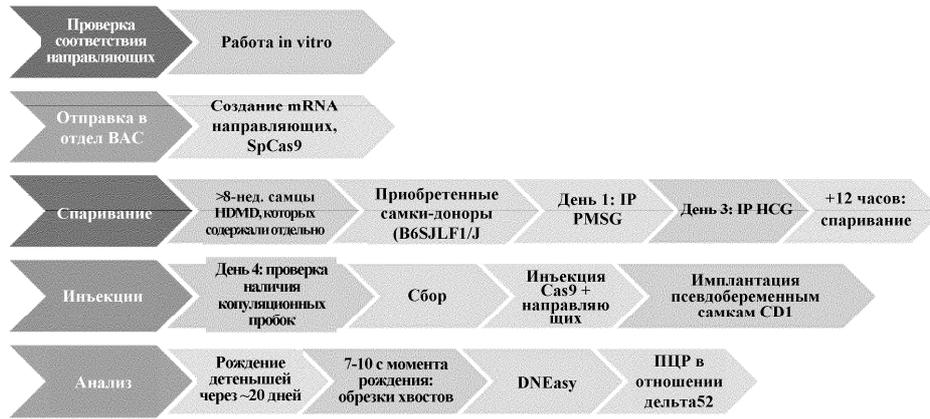
Фиг. 17



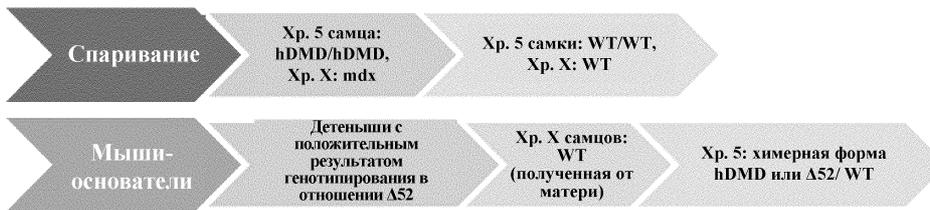
Фиг. 18



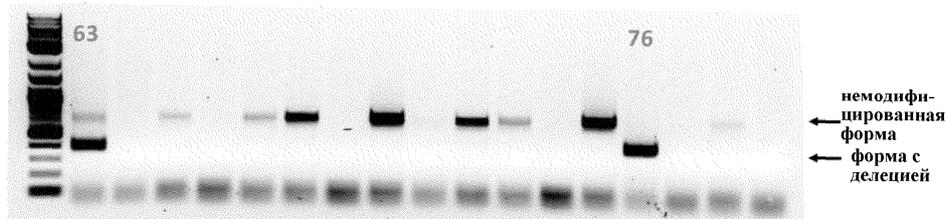
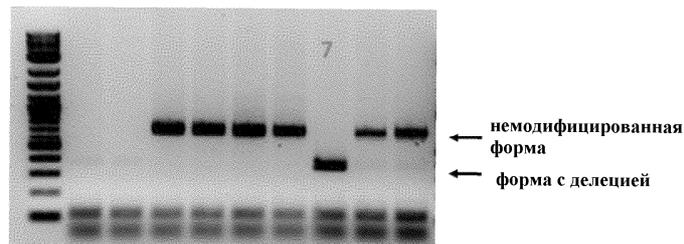
Фиг. 19



Фиг. 20



Фиг. 21



Фиг. 22

Фиолетовый цвет, жирный шрифт: JCR94; зеленый цвет, подчеркивание: JCR99; серый цвет, курсив: вставки/делеции

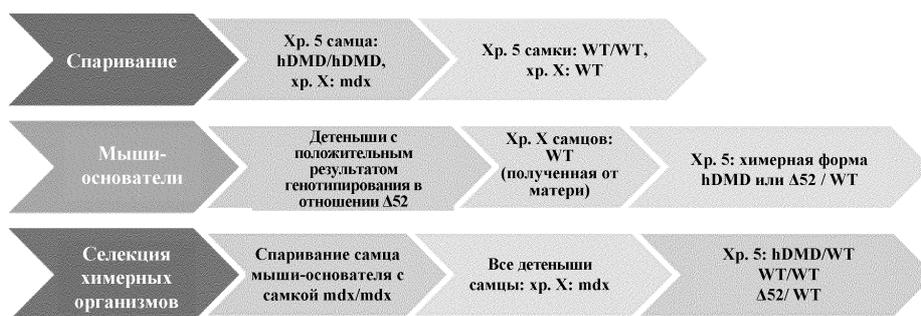
Дельта 52: AACGCTGAAGAACCCTGATAATAGAAGAAATACATTTTAAATCAATTCAGG (SEQ ID NO: 46)

Основатель 76: AAGAACCCTGATA-TTATCTTAGTAGATTA-ATAGAAGAAATACATTTTAAA (SEQ ID NO: 47)

Основатель 63: GCTGAAGAACCCTGA-----AAAATACATTTTТTATCAATTCAGG (SEQ ID NO: 48)

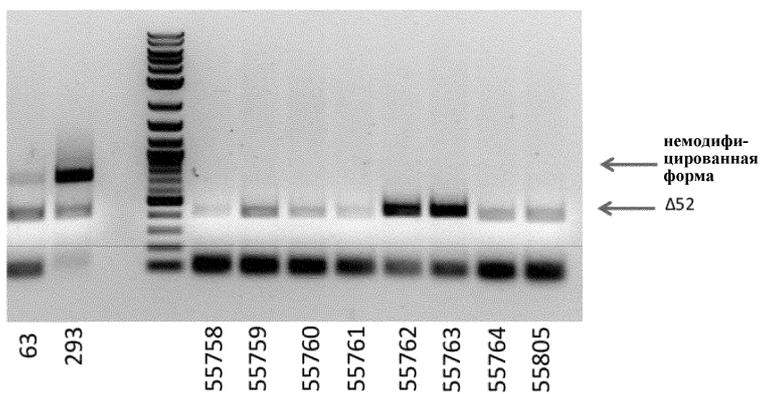
Основатель 7: GAAT----(19x)----GAT-TTCTTGTAGAAGAAATAACAAT- AAATC (SEQ ID NO: 49)

Фиг. 23

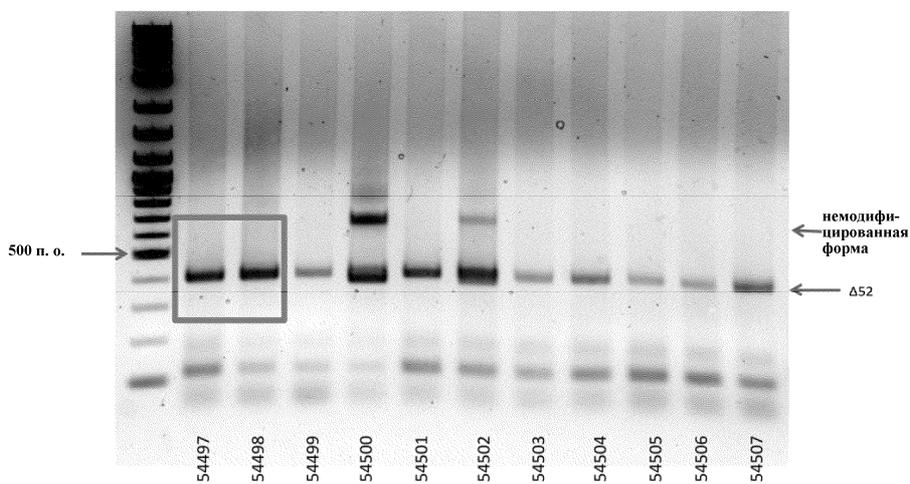


Фиг. 24

Самец мыши-основателя 76 + mdx/mdx



Фиг. 25



Фиг. 26

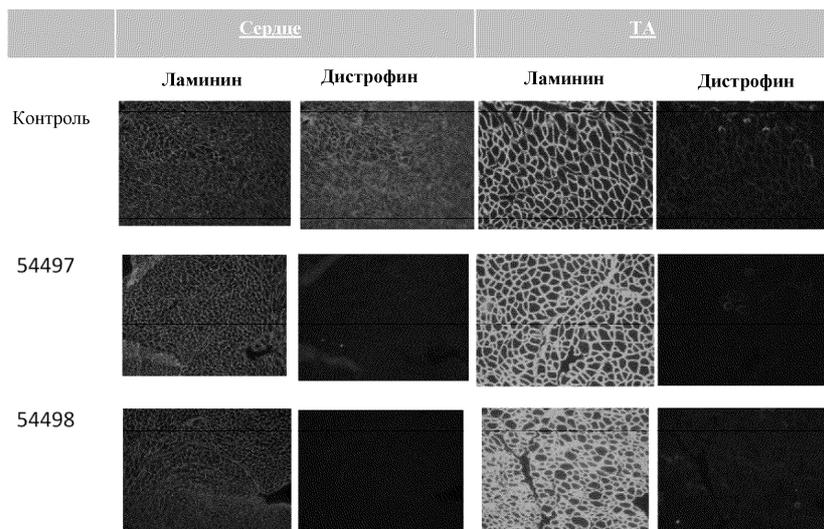
Фиолетовый цвет, жирный шрифт: JCR94; зеленый цвет, подчеркивание: JCR99; Серый цвет, курсив: вставки/делеции

Дельта 52: AACGCTGAAGAACCCTGATAATAGAAGAAATACATTTTAAATCAATTCAGG (SEQ ID NO: 50)

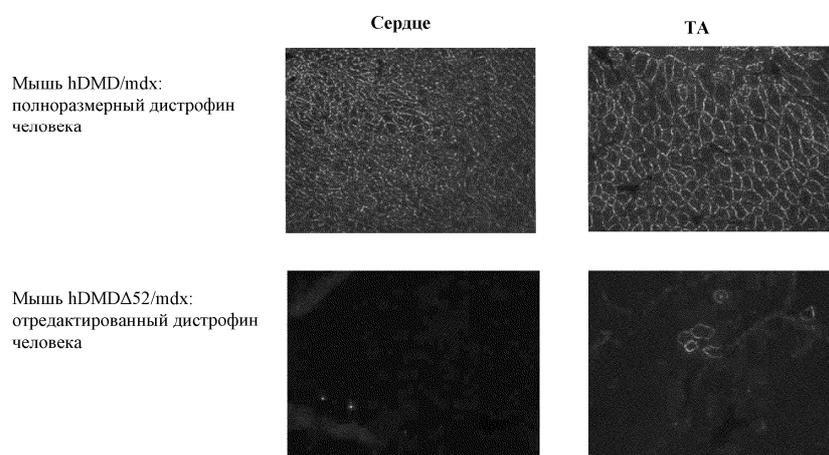
54497: AACGCTGAAGAACCCTGATATTATCTTAGTAGATTAAATAGAAGAAATACATTTTAAAT (SEQ ID NO: 51)

54498: AACGCTGAAGAACCCTGATATTATCTTAGTAGATTAAATAGAAGAAATACATTTTAAAT (SEQ ID NO: 52)

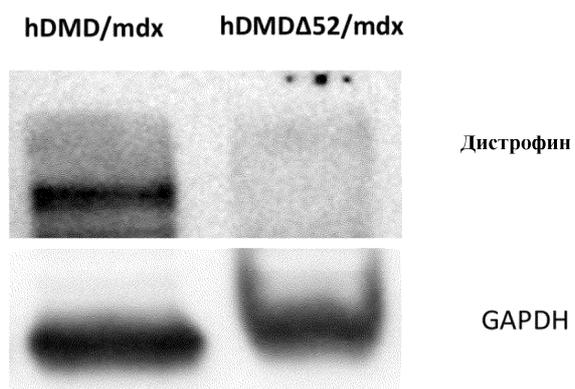
Фиг. 27



Фиг. 28

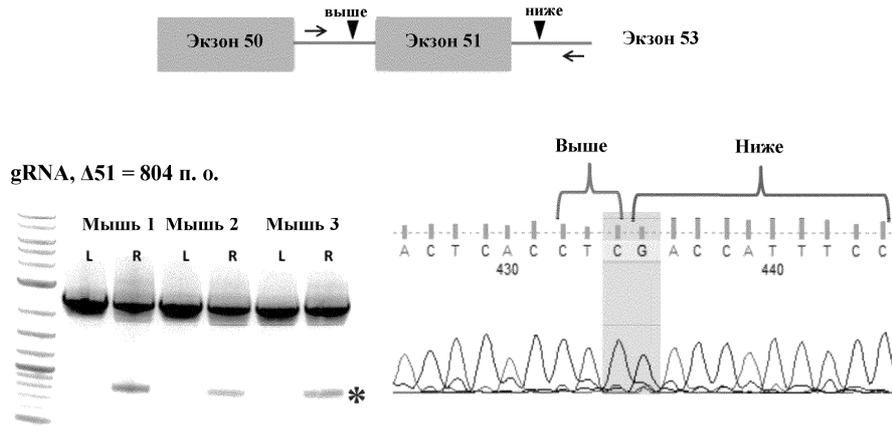


Фиг. 29

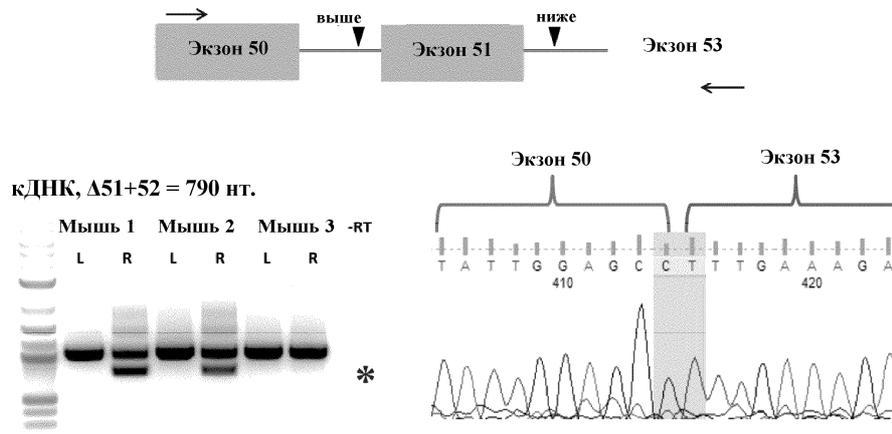


Фиг. 30





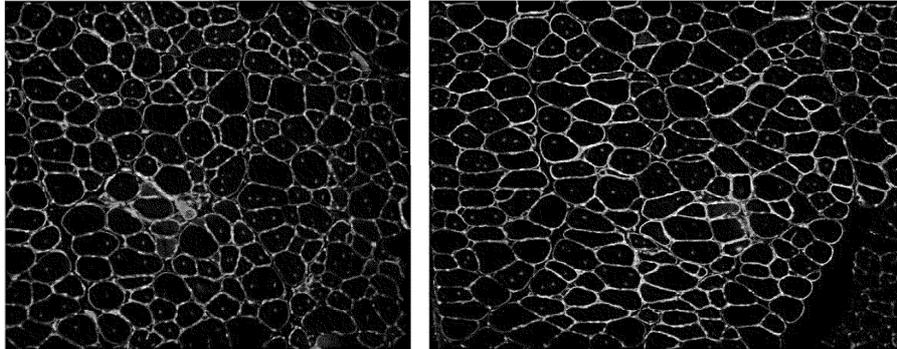
Фиг. 35



Фиг. 36

Контралатеральный контроль

Обработанная R TA

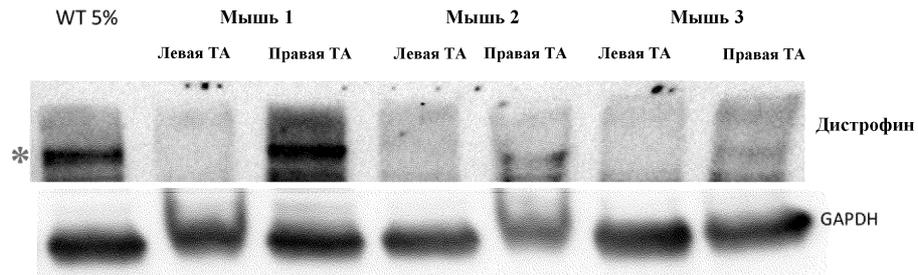


DAPI (голубой)

Ламинин (красный)

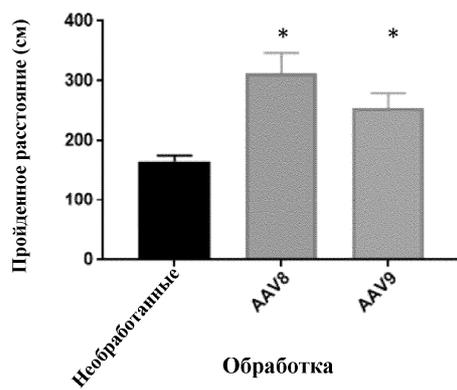
Дистрофин (зеленый)

Фиг. 37

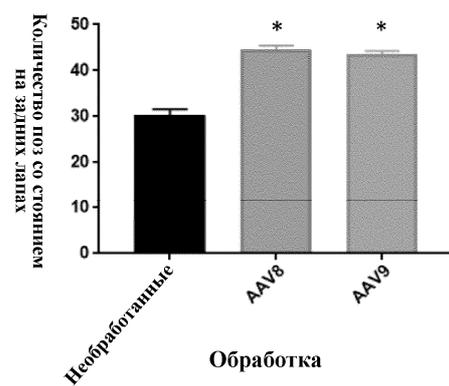


Фиг. 38

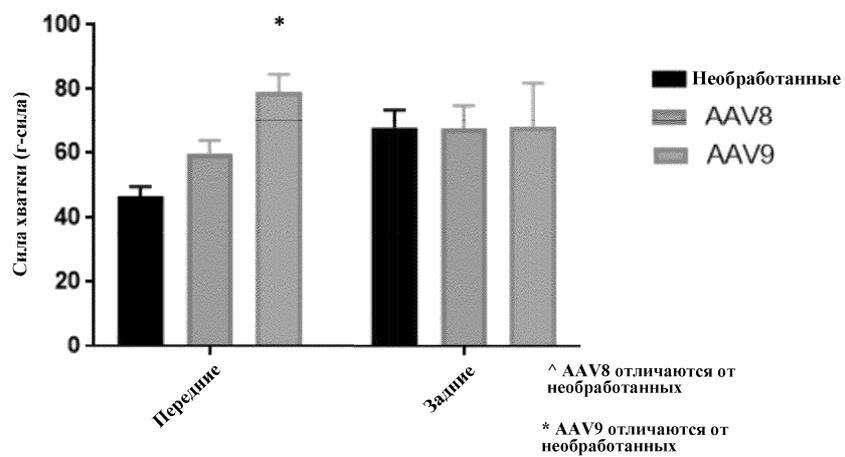
042798



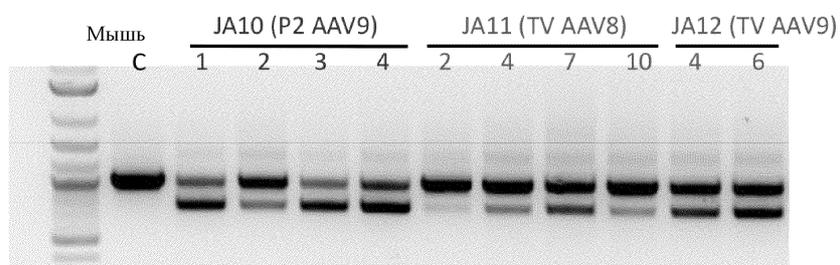
Фиг. 39



Фиг. 40



Фиг. 41



Фиг. 42

