

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202390806 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.07.06

(51) Int. Cl. C12N 15/113 (2010.01)
C12N 9/22 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.09.08

(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ МЫШЕЧНОЙ ДИСТРОФИИ ДЮШЕННА

(31) 63/076,250; 63/152,114; 63/166,174;
63/179,850

(32) 2020.09.09; 2021.02.22; 2021.03.25;
2021.04.26

(33) US

(86) PCT/US2021/049468

(87) WO 2022/056000 2022.03.17

(71) Заявитель:
ВЕРТЕКС ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ
ИНКОРПОРЕЙТЕД (US)

(72) Изобретатель:

Громада Джеспер, Фулга Тьюдор,
Маквай-Уили Элисон, Домингес
Гутьеррес Жизель, Синь Юйжун,
Минь И-Ли, Болукбаси Мехмет
Фатих, Андерсон Эрик (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Предложены композиции и способы лечения мышечной дистрофии Дюшенна (DMD).

202390806

A1

A1

202390806

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-577500EA/019

КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ МЫШЕЧНОЙ ДИСТРОФИИ ДЮШЕННА

Настоящая заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке США № 63/076250, поданной 9 сентября 2020 г.; предварительной заявке США № 63/152114, поданной 22 февраля 2021 г.; предварительной заявке на патент США № 63/166174, поданной 25 марта 2021 г.; и предварительной заявке США № 63/179850, поданной 26 апреля 2021 г.; все они включены посредством ссылки во всей своей полноте.

Данная заявка содержит перечень последовательностей, который был подан в электронной форме в формате ASCII и в полном объеме включен в данный документ посредством ссылки. Указанная копия в формате ASCII, созданная 07 сентября 2021 г., называется 2021-09-07_01245-0024-00PCT_ST25.txt и имеет размер 646734 байта.

ВВЕДЕНИЕ И КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Мышечные дистрофии (МД) представляют собой группу из более чем 30 генетических заболеваний, характеризующихся прогрессирующей слабостью и дегенерацией скелетных мышц, которые контролирующих движение. Мышечная дистрофия Дюшенна (DMD) - одна из наиболее тяжелых форм мышечной дистрофии, поражающая примерно 1 из 5000 мальчиков и характеризующаяся прогрессирующей мышечной слабостью и преждевременной смертью. Кардиомиопатия и сердечная недостаточность являются распространенными, неизлечимыми и смертельными симптомами DMD. Заболевание вызывается мутациями в гене, кодирующем дистрофин (DMD), которые приводят к потере экспрессии дистрофина, вызывая хрупкость мышечных мембран и прогрессирующую атрофию мышц.

Редактирование генома на основе CRISPR может обеспечить специфичное для последовательности расщепление геномной ДНК с использованием Cas9 и направляющей РНК. Например, нуклеиновая кислота, кодирующая фермент Cas9, и нуклеиновая кислота, кодирующая соответствующую направляющую РНК, могут быть представлены на отдельных векторах или вместе на одном векторе и введены *in vivo* или *in vitro*, например, для нокаута или коррекции генетической мутации. Приблизительно 20 нуклеотидов на 5'-конце направляющей РНК служат в качестве направляющей или спейсерной последовательности, которая может представлять собой любую последовательность, комплементарную одной цепи геномного целевого местоположения, которая имеет мотив, примыкающий к протоспейсеру, (PAM). Последовательность PAM представляет собой короткую последовательность, примыкающую к сайту рестрикции нуклеазы Cas9, которая необходима молекуле Cas9 для надлежащего связывания. Нуклеотиды 3' направляющей или спейсерной последовательности направляющей РНК служат каркасной последовательностью для взаимодействия с Cas9. Когда направляющая РНК и Cas9 экспрессируются, направляющая РНК связывается с Cas9 и направляет ее к последовательности, комплементарной направляющей последовательности, где затем

инициируется двухцепочечный разрыв (DSB). Для восстановления эти разрывов клетки, как правило, используют подверженный ошибкам механизм негомологичного соединения концов (NHEJ), который может привести к нарушению функции целевого гена из-за вставок или делеций кодонов, сдвигов в рамке считывания или привести к преждевременному стоп-кодону, запускающий нонсенс-опосредованную деградацию. См., например, Kumar et al. (2018) Front. Mol. Neurosci. Vol. 11, Article 413.

В то время как стратегии редактирования генов с использованием систем (например, CRISPR) для лечения DMD были изучены ранее, эти стратегии были сосредоточены в основном на: а) разрезании в нескольких разных местах для вырезания больших частей (например, одного или более экзонов) гена дистрофина (см., например, Ousterout et al., 2015, Nat Commun. 6:6244); или б) разрезании одного сайта для введения инделей, которые либо приводят к мутации со сдвигом рамки считывания и/или разрушают акцепторный/донорный сайт сплайсинга в гене дистрофина (см., например, Amoassi et al., 2018, Science, 362(6410):86-91). Однако остается потребность в дополнительных альтернативных и эффективных стратегиях редактирования генов для лечения таких заболеваний, как DMD.

Чтобы системы редактирования генов, такие как CRISPR, были эффективны при лечении заболеваний и нарушений, таких как DMD, у пациента, необходимы эффективные векторы доставки компонентов системы CRISPR. Аденоассоциированный вирус (AAV) с введением компонентов CRISPR-Cas *in vivo* или *in vitro* привлекателен из-за ранних и продолжающихся успехов в разработке векторов AAV, производстве и применении на клинической стадии для генной терапии. См., например, Wang et al. (2019) Nature Reviews Drug Discovery 18:358-378; Ran et al. (2015a) Nature 520: 186-101. Однако, как правило, используемый *Streptococcus pyogenes* (spCas9) очень большой, и при использовании в системах CRISPR/Cas на основе AAV требуется два вектора AAV: один вектор несет нуклеиновую кислоту, кодирующую spCas9, а другой несет нуклеиновую кислоту, кодирующую направляющую РНК. Одним из возможных способов преодоления этого технического препятствия является использование меньших ортологов Cas9, полученных из разных видов прокариот. Меньшие Cas9, такие как из *Staphylococcus aureus* (SaCas9) и *Staphylococcus lugdunensis* (SluCas9), можно производить на одном векторе AAV вместе с нуклеиновой кислотой, кодирующей одну или более направляющих РНК. Одним из преимуществ включения одной или более направляющих РНК в один вектор вместе с меньшими SaCas9 или SluCas9 является то, что это обеспечивает исключительную гибкость дизайна в ситуациях, когда для оптимальной работы требуется более одной направляющей РНК. Например, один вектор можно использовать для экспрессии SaCas9 или SluCas9 и одной или более направляющих РНК, нацеленных на первую геномную мишень (например, пару направляющих РНК, которые вместе связывают области, фланкирующие геномную мишень), а второй вектор можно использовать для экспрессии экспрессируют несколько копий одной и той же (например, одной и той же пары направляющих молекул в первом векторе) или разных направляющих РНК, нацеленных на одну и ту же или другую

геномную мишень. В качестве другого примера, несколько копий одной и той же направляющей РНК могут быть полезными, а использование Cas9 меньшего размера позволяет включать несколько копий направляющей РНК в тот же вектор, что и Cas9, а также еще большее количество копий направляющей РНК при комбинировании со вторым вектором. Преимущество композиций и способов, использующих эти конфигурации, заключается в снижении производственных затрат, уменьшении сложности способов и протоколов введения и обеспечении максимальной гибкости в отношении использования нескольких копий одной и той же или разных направляющих РНК, нацеленных на одни и те же или разные геномные целевые последовательности. В некоторых случаях предоставление нескольких копий одной и той же направляющей РНК повышает эффективность направляющей молекулы, что позволяет улучшить и без того эффективную систему.

В данном документе представлены композиции и способы лечения DMD с использованием более мелких клеток Cas9s из *Staphylococcus aureus* (SaCas9) и *Staphylococcus lugdunensis* (SluCas9). Предложены композиции, содержащие один вектор AAV, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую SaCas9 или SluCas9, и направляющую РНК.

Соответственно, предложены следующие неограничивающие варианты осуществления.

Вариант осуществления A1 представляет собой композицию, которая содержит:

a. одиночную молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую:

i. нуклеиновую кислоту, кодирующую Cas9 *Staphylococcus aureus* (SaCas9) или *Staphylococcus lugdunensis* (SluCas9), и по меньшей мере одну, по меньшей мере две или по меньшей мере три направляющие РНК; или

ii. нуклеиновую кислоту, кодирующую Cas9 *Staphylococcus aureus* (SaCas9) или *Staphylococcus lugdunensis* (SluCas9) и от одной до n направляющих РНК, где n не превышает максимальное количество направляющих РНК, которые могут быть экспрессированы из указанной нуклеиновой кислоты; или

iii. нуклеиновую кислоту, кодирующую Cas9 *Staphylococcus aureus* (SaCas9) или *Staphylococcus lugdunensis* (SluCas9), и 1, 2 или 3 направляющих РНК; или

b. две молекулы нуклеиновой кислоты, содержащие:

i. первую нуклеиновую кислоту, кодирующую Cas9 *Staphylococcus aureus* (SaCas9) или *Staphylococcus lugdunensis* (SluCas9); и

вторую нуклеиновую кислоту, которая не кодирует SaCas9 или SluCas9 и кодирует любое из следующего:

1. по меньшей мере одну, по меньшей мере две, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять или по меньшей мере шесть направляющих РНК; или

2. от одной до n направляющих РНК, где n равно максимальному количеству направляющих РНК, которые могут быть экспрессированы из указанной нуклеиновой кислоты; или

3. от одной до шести направляющих РНК; или
 ii. первую нуклеиновую кислоту, кодирующую Cas9 *Staphylococcus aureus* (SaCas9) или *Staphylococcus lugdunensis* (SluCas9) и

1. по меньшей мере одну, по меньшей мере две или по меньшей мере три направляющие РНК; или

2. от одной до n направляющих РНК, где n равно максимальному количеству направляющих РНК, которые могут быть экспрессированы из указанной нуклеиновой кислоты; или

3. 1, 2 или 3 направляющих РНК; и

вторую нуклеиновую кислоту, которая не кодирует SaCas9 или SluCas9, где вторая нуклеиновая кислота необязательно содержит любое из следующего:

1. по меньшей мере одну, по меньшей мере две, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять или по меньшей мере шесть направляющих РНК; или

2. от одной до n направляющих РНК, где n равно максимальному количеству направляющих РНК, которые могут быть экспрессированы из указанной нуклеиновой кислоты; или

3. от одной до шести направляющих РНК; или

iii. первую нуклеиновую кислоту, кодирующую Cas9 *Staphylococcus aureus* (SaCas9) или *Staphylococcus lugdunensis* (SluCas9), и по меньшей мере одну, по меньшей мере две или по меньшей мере три направляющие РНК; и

вторую нуклеиновую кислоту, которая не кодирует SaCas9 или SluCas9 и кодирует от одной до шести направляющих РНК; или

iv. первую нуклеиновую кислоту, кодирующую Cas9 *Staphylococcus aureus* (SaCas9) или *Staphylococcus lugdunensis* (SluCas9), и по меньшей мере две направляющие РНК, где по меньшей мере одна направляющая РНК связывается выше целевой последовательности, и по меньшей мере одна направляющая РНК связывается ниже целевой последовательности; и

вторую нуклеиновую кислоту, которая не кодирует SaCas9 или SluCas9 и кодирует по меньшей мере одну дополнительную копию каждой из направляющих РНК, закодированных в первой нуклеиновой кислоте,

где направляющая РНК нацелена на область гена дистрофина.

Вариант осуществления A2 представляет собой композицию, которая содержит две молекулы нуклеиновой кислоты, включающие i) первую нуклеиновую кислоту, кодирующую Cas9 *Staphylococcus aureus* (SaCas9) или *Staphylococcus lugdunensis* (SluCas9), и первую и вторую направляющие РНК, которые вырезают часть гена DMD; и ii) вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую по меньшей мере 2 или по меньшей мере 3 копии первой направляющей РНК и по меньшей мере 2 или по меньшей мере 3 копии второй направляющей РНК.

Вариант осуществления A3 представляет собой композицию, которая содержит одну или более молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих эндонуклеазу, и пару

направляющих РНК, где каждая направляющая РНК нацелена на отличную последовательность в гене DMD, где эндонуклеаза и пара направляющих РНК способны вырезать фрагмент ДНК из гена DMD ; где фрагмент ДНК имеет длину от 5 до 250 нуклеотидов.

Вариант осуществления A4 представляет собой композицию по п. 3, где эндонуклеаза представляет собой эндонуклеазу Cas класса 2 типа II.

Вариант осуществления A5 представляет собой композицию по п. 3, где эндонуклеаза Cas класса 2 типа II представляет собой SpCas9, SaCas9 или SluCas9.

Вариант осуществления A6 представляет собой композицию по п. 3, где эндонуклеаза не является эндонуклеазой Cas класса 2 типа V.

Вариант осуществления A7 представляет собой композицию по п. 3, где вырезаемый фрагмент ДНК содержит сайт акцептора сплайсинга или сайт донора сплайсинга.

Вариант осуществления A8 представляет собой композицию по п. 3, где вырезаемый фрагмент ДНК содержит преждевременный стоп-кодон в гене DMD.

Вариант осуществления A9 представляет собой композицию по п. 3, где вырезаемый фрагмент ДНК не содержит весь экзон гена DMD.

Вариант осуществления A10 представляет собой композицию по любому из пп. 1-9, где направляющая РНК содержит любое одно из следующего:

a. когда используется SaCas9, одну или более спейсерных последовательностей, выбранных из любой из SEQ ID NO: 1-35, 1000-1078 и 3000-3069; или

b. когда используется SluCas9a, одна или более спейсерных последовательностей, выбранных из любой из SEQ ID NO: 100-225, 2000-2116 и 4000-4251; или

c. когда используется SaCas9, одна или более спейсерных последовательностей, содержащих по меньшей мере 20 смежных нуклеотидов спейсерной последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 1-35, 1000-1078 и 3000-3069; или

d. когда используется SluCas9a, одна или более спейсерных последовательностей, содержащих по меньшей мере 20 смежных нуклеотидов спейсерной последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 100-225, 2000-2116 и 4000-4251; или

e. когда используется SaCas9, одна или более спейсерных последовательностей, которые имеют по меньшей мере 90% идентичности с любой из SEQ ID NO: 1-35, 1000-1078 и 3000-3069; или

f. когда используется SluCas9, одна или более спейсерных последовательностей, которые имеют по меньшей мере 90% идентичности с любой из SEQ ID NO: 100-225, 2000-2116 и 4000-4251; или

g. когда SaCas9 используется по меньшей мере с двумя направляющими РНК, первая и вторая спейсерные последовательности выбраны из любой из следующих пар спейсерных последовательностей: SEQ ID NO: 10 и 15; 10 и 16; 12 и 16; 1001 и 1005; 1001 и 15; 1001 и 16; 1003 и 1005; 16 и 1003; 12 и 1010; 12 и 1012; 12 и 1013; 10 и 1016; 1017 и 1005; 1017 и 16; 1018 и 16; 15 и 10; 16 и 10; 16 и 12; 1005 и 1001; 15 и 1001; 16 и 1001; 1005 и 1003; 1003 и 16; 1010 и 12; 1012 и 12; 1013 и 12; 1016 и 10; 1005 и 1017; 16 и 1017; и 16 и 1018; или

h. когда SaCas9 используется по меньшей мере с двумя направляющими РНК, по меньшей мере 17, 18, 19, 20 или 21 непрерывный нуклеотид первой и второй спейсерной последовательности, выбранной из любой из следующих пар спейсерных последовательностей: SEQ ID NO: 10 и 15; 10 и 16; 12 и 16; 1001 и 1005; 1001 и 15; 1001 и 16; 1003 и 1005; 16 и 1003; 12 и 1010; 12 и 1012; 12 и 1013; 10 и 1016; 1017 и 1005; 1017 и 16; 1018 и 16; 15 и 10; 16 и 10; 16 и 12; 1005 и 1001; 15 и 1001; 16 и 1001; 1005 и 1003; 1003 и 16; 1010 и 12; 1012 и 12; 1013 и 12; 1016 и 10; 1005 и 1017; 16 и 1017; и 16 и 1018; или

i. когда SaCas9 используется по меньшей мере с двумя направляющими РНК, по меньшей мере на 90% идентичными первой и второй спейсерным последовательностям, выбранным из любой из следующих пар спейсерных последовательностей: SEQ ID NO: 10 и 15; 10 и 16; 12 и 16; 1001 и 1005; 1001 и 15; 1001 и 16; 1003 и 1005; 16 и 1003; 12 и 1010; 12 и 1012; 12 и 1013; 10 и 1016; 1017 и 1005; 1017 и 16; 1018 и 16; 15 и 10; 16 и 10; 16 и 12; 1005 и 1001; 15 и 1001; 16 и 1001; 1005 и 1003; 1003 и 16; 1010 и 12; 1012 и 12; 1013 и 12; 1016 и 10; 1005 и 1017; 16 и 1017; и 16 и 1018; или

j. когда SluCas9 используют по меньшей мере с двумя направляющими РНК, первая и вторая спейсерные последовательности выбраны из любой из следующих пар спейсерных последовательностей: SEQ ID NO: 148 и 134; 149 и 135; 150 и 135; 131 и 136; 151 и 136; 139 и 131; 139 и 151; 140 и 131; 140 и 151; 141 и 148; 144 и 149; 144 и 150; 145 и 131; 145 и 151; 146 и 148; 134 и 148; 135 и 149; 135 и 150; 136 и 131; 136 и 151; 131 и 139; 151 и 139; 131 и 140; 151 и 140; 148 и 141; 149 и 144; 150 и 144; 131 и 145; 151 и 145; и 148 и 146; или

k. когда SluCas9 используется по меньшей мере с двумя направляющими РНК, по меньшей мере 17, 18, 19, 20 или 21 непрерывный нуклеотид первой и второй спейсерной последовательности, выбранной из любой из следующих пар спейсерных последовательностей: SEQ ID NO: 148 и 134; 149 и 135; 150 и 135; 131 и 136; 151 и 136; 139 и 131; 139 и 151; 140 и 131; 140 и 151; 141 и 148; 144 и 149; 144 и 150; 145 и 131; 145 и 151; 146 и 148; 134 и 148; 135 и 149; 135 и 150; 136 и 131; 136 и 151; 131 и 139; 151 и 139; 131 и 140; 151 и 140; 148 и 141; 149 и 144; 150 и 144; 131 и 145; 151 и 145; и 148 и 146; или

l. когда SluCas9 используется по меньшей мере с двумя направляющими РНК, по меньшей мере на 90% идентичными первой и второй спейсерным последовательностям, выбранным из любой из следующих пар спейсерных последовательностей: SEQ ID NO: 148 и 134; 149 и 135; 150 и 135; 131 и 136; 151 и 136; 139 и 131; 139 и 151; 140 и 131; 140 и 151; 141 и 148; 144 и 149; 144 и 150; 145 и 131; 145 и 151; 146 и 148; 134 и 148; 135 и 149; 135 и 150; 136 и 131; 136 и 151; 131 и 139; 151 и 139; 131 и 140; 151 и 140; 148 и 141; 149 и 144; 150 и 144; 131 и 145; 151 и 145; и 148 и 146; или

m. когда SluCas9 используется по меньшей мере с двумя направляющими РНК, по меньшей мере на 90% идентичными первой и второй спейсерным последовательностям, выбранным из любой из следующих пар спейсерных последовательностей:

- i. SEQ ID NO: 148 и 134,
- ii. SEQ ID NO: 145 и 131,
- iii. SEQ ID NO: 144 и 149;

iv. SEQ ID NO: 144 и 150; и

v. SEQ ID NO: 146 и 148; или

n. когда SaCas9-ККН используется по меньшей мере с двумя направляющими РНК, по меньшей мере на 90% идентичными первой и второй спейсерным последовательностям, выбранным из любой из следующих пар спейсерных последовательностей:

i. SEQ ID NO: 12 и 1013; и

ii. SEQ ID NO: 12 и 1016.

Вариант осуществления A11 представляет собой композицию, которая содержит одиночную молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую одну или более направляющих РНК и Cas9, где одиночная молекула нуклеиновой кислоты содержит:

a. первую нуклеиновую кислоту, кодирующую одну или более спейсерных последовательностей, выбранных из любой из SEQ ID NO: 1-35, 1000-1078 или 3000-3069, и вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую Cas9 *Staphylococcus aureus* (SaCas9); или

b. первую нуклеиновую кислоту, кодирующую одну или более спейсерных последовательностей, выбранных из любой из SEQ ID NO: 100-225, 2000-2116 или 4000-4251 и вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую *Staphylococcus lugdunensis* (SluCas9); или

c. первую нуклеиновую кислоту, кодирующую одну или более спейсерных последовательностей, содержащих по меньшей мере 20 смежных нуклеотидов спейсерной последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 1-35, 1000-1078 или 3000-3069, и вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую Cas9 *Staphylococcus aureus* (SaCas9); или

d. первую нуклеиновую кислоту, кодирующую одну или более спейсерных последовательностей, содержащих по меньшей мере 20 смежных нуклеотидов спейсерной последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 100-225, 2000-2116 или 4000-4251 и вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую *Staphylococcus lugdunensis* (SluCas9); или

e. первую нуклеиновую кислоту, кодирующую одну или более спейсерных последовательностей, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с любой из SEQ ID NO: 1-35, 1000-1078 или 3000-3069, и вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую Cas9 *Staphylococcus aureus* (SaCas9); или

f. первую нуклеиновую кислоту, кодирующую одну или более спейсерных последовательностей, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с любой из SEQ ID NO: 100-225, 2000-2116 или 4000-4251 и вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую *Staphylococcus lugdunensis* (SluCas9); или

g. первую нуклеиновую кислоту, кодирующую пару направляющих РНК, содержащую первую и вторую спейсерные последовательности, выбранные из любой из следующих пар спейсерных последовательностей: SEQ ID NO: 10 и 15; 10 и 16; 12 и 16; 1001 и 1005; 1001 и 15; 1001 и 16; 1003 и 1005; 16 и 1003; 12 и 1010; 12 и 1012; 12 и 1013; 10 и 1016; 1017 и 1005; 1017 и 16; 1018 и 16; 15 и 10; 16 и 10; 16 и 12; 1005 и 1001; 15 и 1001; 16 и 1001; 1005 и 1003; 1003 и 16; 1010 и 12; 1012 и 12; 1013 и 12; 1016 и 10; 1005 и 1017; 16 и 1017; и 16 и 1018; и вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую Cas9 *Staphylococcus*

aureus (SaCas9); или

h. первую нуклеиновую кислоту, кодирующую пару направляющих РНК, содержащую по меньшей мере 17, 18, 19, 20 или 21 смежный нуклеотид первой и второй спейсерных последовательностей, выбранных из любой из следующих пар спейсерных последовательностей: SEQ ID NO: 10 и 15; 10 и 16; 12 и 16; 1001 и 1005; 1001 и 15; 1001 и 16; 1003 и 1005; 16 и 1003; 12 и 1010; 12 и 1012; 12 и 1013; 10 и 1016; 1017 и 1005; 1017 и 16; 1018 и 16; 15 и 10; 16 и 10; 16 и 12; 1005 и 1001; 15 и 1001; 16 и 1001; 1005 и 1003; 1003 и 16; 1010 и 12; 1012 и 12; 1013 и 12; 1016 и 10; 1005 и 1017; 16 и 1017; и 16 и 1018; и вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую *Cas9 Staphylococcus aureus* (SaCas9); или

i. первую нуклеиновую кислоту, кодирующую пару направляющих РНК, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с первой и второй спейсерными последовательностями, выбранными из любой из следующих пар спейсерных последовательностей: SEQ ID NO: 10 и 15; 10 и 16; 12 и 16; 1001 и 1005; 1001 и 15; 1001 и 16; 1003 и 1005; 16 и 1003; 12 и 1010; 12 и 1012; 12 и 1013; 10 и 1016; 1017 и 1005; 1017 и 16; 1018 и 16; 15 и 10; 16 и 10; 16 и 12; 1005 и 1001; 15 и 1001; 16 и 1001; 1005 и 1003; 1003 и 16; 1010 и 12; 1012 и 12; 1013 и 12; 1016 и 10; 1005 и 1017; 16 и 1017; и 16 и 1018; и вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую *Cas9 Staphylococcus aureus* (SaCas9); или

j. первую нуклеиновую кислоту, кодирующую пару направляющих РНК, содержащую первую и вторую спейсерные последовательности, выбранные из любой из следующих пар спейсерных последовательностей: SEQ ID NO: 148 и 134; 149 и 135; 150 и 135; 131 и 136; 151 и 136; 139 и 131; 139 и 151; 140 и 131; 140 и 151; 141 и 148; 144 и 149; 144 и 150; 145 и 131; 145 и 151; 146 и 148; 134 и 148; 135 и 149; 135 и 150; 136 и 131; 136 и 151; 131 и 139; 151 и 139; 131 и 140; 151 и 140; 148 и 141; 149 и 144; 150 и 144; 131 и 145; 151 и 145; и 148 и 146; и вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую *Staphylococcus lugdunensis* (SluCas9); или

k. первую нуклеиновую кислоту, кодирующую пару направляющих РНК, содержащую по меньшей мере 17, 18, 19, 20 или 21 смежный нуклеотид первой и второй спейсерных последовательностей, выбранных из любой из следующих пар спейсерных последовательностей: SEQ ID NO: 148 и 134; 149 и 135; 150 и 135; 131 и 136; 151 и 136; 139 и 131; 139 и 151; 140 и 131; 140 и 151; 141 и 148; 144 и 149; 144 и 150; 145 и 131; 145 и 151; 146 и 148; 134 и 148; 135 и 149; 135 и 150; 136 и 131; 136 и 151; 131 и 139; 151 и 139; 131 и 140; 151 и 140; 148 и 141; 149 и 144; 150 и 144; 131 и 145; 151 и 145; и 148 и 146; и вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую *Staphylococcus lugdunensis* (SluCas9); или

l. первую нуклеиновую кислоту, кодирующую пару направляющих РНК, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с первой и второй спейсерными последовательностями, выбранными из любой из следующих пар спейсерных последовательностей: SEQ ID NO: 148 и 134; 149 и 135; 150 и 135; 131 и 136; 151 и 136; 139 и 131; 139 и 151; 140 и 131; 140 и 151; 141 и 148; 144 и 149; 144 и 150; 145 и 131; 145 и 151; 146 и 148; 134 и 148; 135 и 149; 135 и 150; 136 и 131; 136 и 151; 131 и 139; 151 и 139; 131 и 140; 151 и 140; 148 и 141; 149 и 144; 150 и 144; 131 и 145; 151 и 145; и 148 и 146; и вторую

нуклеиновую кислоту, кодирующую *Staphylococcus lugdunensis* (SluCas9); или

m. первую нуклеиновую кислоту, кодирующую пару направляющих РНК, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с первой и второй спейсерными последовательностями, выбранными из любой из следующих пар спейсерных последовательностей:

- i. SEQ ID NO: 148 и 134,
- ii. SEQ ID NO: 145 и 131,
- iii. SEQ ID NO: 144 и 149;
- iv. SEQ ID NO: 144 и 150;
- v. SEQ ID NO: 146 и 148;

и вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую *Staphylococcus lugdunensis* (SluCas9);

или

n. первую нуклеиновую кислоту, кодирующую пару направляющих РНК, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с первой и второй спейсерными последовательностями, выбранными из любой из следующих пар спейсерных последовательностей:

- i. SEQ ID NO: 12 и 1013; и
- ii. SEQ ID NO: 12 и 1016;
- iii. и вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую SaCas9-ККН.

Вариант осуществления A12 представляет собой композицию, которая содержит одну или более молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих *Staphylococcus lugdunensis* (SluCas9), и по меньшей мере две направляющие РНК, где первая и вторая направляющие РНК нацелены на разные последовательности в гене DMD, где первая и вторая направляющие РНК содержат последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с первой и второй спейсерными последовательностями, выбранными из любой из следующих пар спейсерных последовательностей:

- i. SEQ ID NO: 148 и 134,
- ii. SEQ ID NO: 145 и 131,
- iii. SEQ ID NO: 144 и 149;
- iv. SEQ ID NO: 144 и 150;
- v. SEQ ID NO: 146 и 148.

Вариант осуществления A13 представляет собой композицию, которая содержит одну или более молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих эндонуклеазу, и по меньшей мере две направляющие РНК, где каждая направляющая РНК нацелена на отличную последовательность в гене DMD, где каждая направляющая РНК содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с первой и второй спейсерными последовательностями, выбранными из любой из следующих пар спейсерных последовательностей:

- i. SEQ ID NO: 12 и 1013; и
- ii. SEQ ID NO: 12 и 1016; и

в. вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую SaCas9-ККН.

Вариант осуществления A14 представляет собой композицию по любому из предшествующих пунктов, где первая и/или вторая нуклеиновая кислота, если она присутствует, кодирует по меньшей мере две направляющие РНК.

Вариант осуществления A15 представляет собой композицию по любому из предшествующих пунктов, где первая и/или вторая нуклеиновая кислота, если она присутствует, кодирует по меньшей мере три направляющие РНК.

Вариант осуществления A16 представляет собой композицию по любому из предыдущих пунктов, где первая и/или вторая нуклеиновая кислота, если она присутствует, кодирует по меньшей мере четыре направляющие РНК.

Вариант осуществления A17 представляет собой композицию по любому из предшествующих пунктов, где первая и/или вторая нуклеиновая кислота, если она присутствует, кодирует по меньшей мере пять направляющих РНК.

Вариант осуществления A18 представляет собой композицию по любому из предшествующих пунктов, где первая и/или вторая нуклеиновая кислота, если она присутствует, кодирует по меньшей мере шесть направляющих РНК.

Вариант осуществления A19 представляет собой композицию по любому из предшествующих пунктов, где первая и/или вторая нуклеиновая кислота, если она присутствует, кодирует по меньшей мере семь направляющих РНК.

Вариант осуществления A20 представляет собой композицию по любому из предшествующих пунктов, где первая и/или вторая нуклеиновая кислота, если она присутствует, кодирует по меньшей мере восемь направляющих РНК.

Вариант осуществления A21 представляет собой композицию по любому из предшествующих пунктов, где первая нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую эндонуклеазу, и по меньшей мере одну, по меньшей мере две или по меньшей мере три направляющие РНК.

Вариант осуществления A22 представляет собой композицию по любому из предшествующих пунктов, где первая нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую эндонуклеазу, и от одной до n направляющих РНК, где n представляет собой не более максимального количества направляющих РНК, которые могут быть экспрессированы из указанной нуклеиновой кислоты.

Вариант осуществления A23 представляет собой композицию по любому из предшествующих пунктов, где первая нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую эндонуклеазу, и от одной до трех направляющих РНК.

Вариант осуществления A24 представляет собой композицию по любому из предшествующих пунктов, где вторая нуклеиновая кислота, если она присутствует, кодирует по меньшей мере одну, по меньшей мере две, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять или по меньшей мере шесть направляющих РНК.

Вариант осуществления A25 представляет собой композицию по любому из предшествующих пунктов, где вторая нуклеиновая кислота, если она присутствует,

кодирует от одной до n направляющих РНК, где n не превышает максимальное количество направляющих РНК, которые могут быть экспрессированы из указанной нуклеиновой кислоты.

Вариант осуществления A26 представляет собой композицию по любому из предшествующих пунктов, где вторая нуклеиновая кислота, если она присутствует, кодирует от одной до шести направляющих РНК.

Вариант осуществления A27 представляет собой композицию по любому из предшествующих пунктов, где вторая нуклеиновая кислота, если она присутствует, кодирует 2-10, 2-9, 2-8, 2-7, 2-6, 2-5, 2-4 или 2-3 направляющие РНК.

Вариант осуществления A28 представляет собой композицию по любому из предшествующих пунктов, где вторая нуклеиновая кислота, если она присутствует, кодирует 2, 3, 4, 5 или 6 направляющих РНК.

Вариант осуществления A29 представляет собой композицию по любому из предшествующих пунктов, содержащая по меньшей мере две молекулы нуклеиновой кислоты, где направляющая РНК, кодируемая первой нуклеиновой кислотой и второй нуклеиновой кислотой, является одной и той же.

Вариант осуществления A30 представляет собой композицию по любому из предшествующих пунктов, содержащая по меньшей мере две молекулы нуклеиновой кислоты, где направляющие РНК, кодируемые первой нуклеиновой кислотой и второй нуклеиновой кислотой, отличаются друг от друга.

Вариант осуществления A31 представляет собой композицию по любому из предшествующих пунктов, содержащая по меньшей мере две молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие по меньшей мере две направляющие РНК, где по меньшей мере одна направляющая РНК связывается с целевой последовательностью в экзоне гена DMD, расположенном выше преждевременного стоп-кодона, и где по меньшей мере одна направляющая РНК связывается с целевой последовательностью в экзоне гена DMD, расположенном ниже преждевременного стоп-кодона.

Вариант осуществления A32 представляет собой композицию по любому из предшествующих пунктов, содержащая по меньшей мере две молекулы нуклеиновой кислоты, где первая молекула нуклеиновой кислоты и вторая молекула нуклеиновой кислоты кодируют одну и ту же направляющую РНК.

Вариант осуществления A33 представляет собой композицию по любому из предшествующих пунктов, содержащая по меньшей мере две молекулы нуклеиновой кислоты, каждая из которых кодирует по меньшей мере одну направляющую РНК, где вторая молекула нуклеиновой кислоты кодирует направляющую РНК, которая связывается с той же целевой последовательностью, что и направляющая РНК в первой молекуле нуклеиновой кислоты.

Вариант осуществления A34 представляет собой композицию по любому из предшествующих пунктов, содержащая по меньшей мере две молекулы нуклеиновой кислоты, где вторая молекула нуклеиновой кислоты кодирует по меньшей мере 2, по

меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5 или по меньшей мере 6 направляющих РНК, где направляющие РНК во второй молекуле нуклеиновой кислоты связываются с той же целевой последовательностью, что и направляющая РНК в первой молекуле нуклеиновой кислоты.

Вариант осуществления А35 представляет собой композицию по любому из предшествующих пунктов, где композиция содержит по меньшей мере две молекулы нуклеиновой кислоты, где первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, кодирующую эндонуклеазу, где вторая молекула нуклеиновой кислоты кодирует первую направляющую РНК и вторую направляющую РНК, где первая направляющая РНК и вторая направляющая РНК имеют разные последовательности, и где вторая молекула нуклеиновой кислоты не кодирует эндонуклеазу.

Вариант осуществления А36 представляет собой композицию по п. 35, где первая молекула нуклеиновой кислоты также кодирует копию первой направляющей РНК и копию второй направляющей РНК.

Вариант осуществления А37 представляет собой композицию по п. 35 или п. 36, где вторая молекула нуклеиновой кислоты кодирует две копии первой направляющей РНК и две копии второй направляющей РНК.

Вариант осуществления А38 представляет собой композицию по любому из пп. 35-37, где вторая молекула нуклеиновой кислоты кодирует три копии первой направляющей РНК и три копии второй направляющей РНК.

Вариант осуществления А39 представляет собой композицию по любому из пп. 35-37, где молекула первой нуклеиновой кислоты содержит от 5' до 3' по отношению к плюс-цепи: обратную комплементарную цепь первой каркасной последовательности направляющей РНК, обратную комплементарную цепь нуклеотидной последовательности, кодирующей последовательность первой направляющей РНК, обратную комплементарную цепь промотора для экспрессии последовательности нуклеотидов, кодирующей последовательность первой направляющей РНК, промотор для экспрессии нуклеотидной последовательности, кодирующей эндонуклеазу, нуклеотидную последовательность, кодирующую эндонуклеазу, последовательность полиаденилирования, промотор для экспрессии второй направляющей РНК в том же направлении, что и промотор для эндонуклеазы, последовательность второй направляющей РНК и вторую каркасную последовательность направляющей РНК.

Вариант осуществления А40 представляет собой композицию по п. 39, где промотор для экспрессии нуклеотидной последовательности, кодирующей первую последовательность направляющей РНК, в первой молекуле нуклеиновой кислоты представляет собой промотор U6, и промотор для экспрессии нуклеотидной последовательности, кодирующей вторую направляющую РНК, в первой молекуле нуклеиновой кислоты является промотором U6.

Вариант осуществления А41 представляет собой композицию по любому из пп. 35-40, где первая молекула нуклеиновой кислоты находится в первом векторе, а вторая

нуклеиновая кислота находится в отдельном втором векторе.

Вариант осуществления А42 представляет собой композицию по любому из пп. 35-41, где первая молекула нуклеиновой кислоты кодирует эндонуклеазу *Cas9 Staphylococcus aureus* (SaCas9), и где первая направляющая РНК содержит первую последовательность, а вторая направляющая РНК содержит вторую последовательность из любой из следующих пар последовательностей: SEQ ID NO: 10 и 15; 10 и 16; 12 и 16; 1001 и 1005; 1001 и 15; 1001 и 16; 1003 и 1005; 16 и 1003; 12 и 1010; 12 и 1012; 12 и 1013; 10 и 1016; 1017 и 1005; 1017 и 16; 1018 и 16; 15 и 10; 16 и 10; 16 и 12; 1005 и 1001; 15 и 1001; 16 и 1001; 1005 и 1003; 1003 и 16; 1010 и 12; 1012 и 12; 1013 и 12; 1016 и 10; 1005 и 1017; 16 и 1017; и 16 и 1018.

Вариант осуществления А43 представляет собой композицию по п. 42, где первая направляющая РНК содержит последовательность SEQ ID NO: 12, а вторая направляющая РНК содержит последовательность SEQ ID NO: 1013.

Вариант осуществления А44 представляет собой композицию по любому из пп. 35-43, где первая молекула нуклеиновой кислоты кодирует эндонуклеазу *Staphylococcus lugdunensis* (SluCas9), и где первая направляющая РНК содержит первую последовательность, а вторая направляющая РНК содержит вторую последовательность из любой из следующих пар последовательностей: SEQ ID NO: 148 и 134; 149 и 135; 150 и 135; 131 и 136; 151 и 136; 139 и 131; 139 и 151; 140 и 131; 140 и 151; 141 и 148; 144 и 149; 144 и 150; 145 и 131; 145 и 151; 146 и 148; 134 и 148; 135 и 149; 135 и 150; 136 и 131; 136 и 151; 131 и 139; 151 и 139; 131 и 140; 151 и 140; 148 и 141; 149 и 144; 150 и 144; 131 и 145; 151 и 145; и 148 и 146.

Вариант осуществления А45 представляет собой композицию по п. 44, где:

- i. первая направляющая РНК содержит последовательность SEQ ID NO: 148, и вторая направляющая РНК содержит последовательность SEQ ID NO: 134; или
- ii. вторая направляющая РНК содержит последовательность SEQ ID NO: 145, и вторая направляющая РНК содержит последовательность SEQ ID NO: 131.

Вариант осуществления А46 представляет собой композицию по любому из пп. 35-45, где первая нуклеиновая кислота находится в первом векторе, а вторая нуклеиновая кислота находится в отдельном втором векторе.

Вариант осуществления А47 представляет собой композицию по п. 46, где первый и второй векторы представляют собой вирусные векторы.

Вариант осуществления А48 представляет собой композицию по п. 47, где вирусные векторы представляют собой векторы AAV9.

Вариант осуществления А49 представляет собой композицию по п. 48, где каждый из векторов AAV9 имеет размер менее 5 т.п.н., менее 4,9 т.п.н., менее 4,85 т.п.н., менее 4,8 т.п.н. или менее 4,75 т.п.н. от ITR до ITR, включая оба ITR.

Вариант осуществления А50 представляет собой композицию по п. 48 или п. 49, где каждый вектор AAV9 имеет размер 3,9-5 т.п.н., 4-5 т.п.н., 4,2-5 т.п.н., 4,4-5 т.п.н., 4,6-5 т.п.н., 4,7-5 т.п.н., 3,9-4,9 т.п.н., 4,2-4,9 т.п.н., 4,4-4,9 т.п.н., 4,7-4,9 т.п.н., 3,9-4,85 т.п.н., 4,2-4,85 т.п.н., 4,4-4,85 т.п.н., 4,6-4,85 т.п.н., 4,7-4,85 т.п.н., 4,7-4,9 т.п.н., 3,9-4,8 т.п.н., 4,2-4,8

т.п.н., 4,4-4,8 т.п.н. или 4,6-4,8 т.п.н. от ITR до ITR, включая оба ITR.

Вариант осуществления A51 представляет собой композицию по любому из пп. 47-50, где первый вектор имеет размер от 4,4 до 4,85 т.п.н. от ITR до ITR, включая оба ITR.

Вариант осуществления A52 представляет собой композицию по любому из предшествующих пунктов, где направляющая РНК связывается с одной или более целевыми последовательностями в гене DMD.

Вариант осуществления A53 представляет собой композицию по любому из предшествующих пунктов, где направляющая РНК связывается с одной или более целевыми последовательностями в экзоне гена DMD.

Вариант осуществления A54 представляет собой композицию по любому из предшествующих пунктов, содержащая две направляющие РНК, где i) каждая направляющая РНК нацелена на последовательность в пределах экзона; ii) одна направляющая РНК нацелена на последовательность внутри экзона, а другая нацелена на последовательность внутри интрона; или iii) каждая направляющая РНК нацелена на последовательность в интроне.

Вариант осуществления A55 представляет собой композицию по любому из предшествующих пунктов, содержащая по меньшей мере две направляющие РНК, где i) каждая направляющая РНК нацелена на одну и ту же геномную целевую последовательность; ii) каждая направляющая РНК нацелена на другую целевую последовательность; или iii) по меньшей мере одна направляющая РНК нацелена на одну последовательность, и по меньшей мере одна направляющая РНК нацелена на отличную последовательность.

Вариант осуществления A56 представляет собой композицию по любому из предшествующих пунктов, содержащая направляющую РНК, которая связывается с экзоном гена DMD, где экзон выбран из экзонов 43, 44, 45, 50, 51 и 53.

Вариант осуществления A57 представляет собой композицию по любому из предшествующих пунктов, содержащая по меньшей мере две направляющие РНК, которые связываются с экзоном гена DMD, где по меньшей мере одна направляющая РНК связывается с целевой последовательностью в экзоне гена DMD, и по меньшей мере одна направляющая РНК связывается с другой целевой последовательностью в том же экзоне гена DMD.

Вариант осуществления A58 представляет собой композицию по любому из предшествующих пунктов, содержащая по меньшей мере две направляющие РНК, где по меньшей мере одна направляющая РНК связывается с целевой последовательностью в экзоне, расположенном выше преждевременного стоп-кодона, и по меньшей мере одна направляющая РНК связывается с целевой последовательностью в экзоне, расположенном ниже преждевременного стоп-кодона.

Вариант осуществления A59 представляет собой композицию по любому из предшествующих пунктов, содержащая по меньшей мере две направляющие РНК, где по меньшей мере одна направляющая РНК связывается с целевой последовательностью в

экзоне гена DMD, и по меньшей мере одна направляющая РНК связывается с другой целевой последовательностью в одном и том же экзоне гена DMD, где при экспрессии *in vitro* или *in vivo* часть экзона вырезается.

Вариант осуществления A60 представляет собой композицию по любому из предшествующих пунктов, содержащая по меньшей мере две направляющие РНК, где после экспрессии *in vitro* или *in vivo* в комбинации с РНК-направляемой эндонуклеазой направляющие РНК вырезают часть экзона.

Вариант осуществления A61 представляет собой композицию по любому из предшествующих пунктов, содержащая по меньшей мере две направляющие РНК, где после экспрессии *in vitro* или *in vivo* в комбинации с РНК-направляемой эндонуклеазой направляющие РНК вырезают часть экзона, и где часть экзона, оставшаяся после вырезания, повторно соединяется с однонуклеотидной вставкой.

Вариант осуществления A62 представляет собой композицию по любому из предшествующих пунктов, содержащая по меньшей мере две направляющие РНК, где после экспрессии *in vitro* или *in vivo* в комбинации с РНК-направляемой эндонуклеазой направляющие РНК вырезают часть экзона, где часть экзона, оставшаяся после вырезания, повторно соединяется без нуклеотидной вставки.

Вариант осуществления A63 представляет собой композицию по любому из предшествующих пунктов, содержащая по меньшей мере две направляющие РНК, где после экспрессии *in vitro* или *in vivo* в комбинации с РНК-направляемой эндонуклеазой направляющие РНК вырезают часть экзона, где вырезаемая часть экзона имеет размер 5-250 нуклеотидов.

Вариант осуществления A64 представляет собой композицию по любому из предшествующих пунктов, содержащая по меньшей мере две направляющие РНК, где после экспрессии *in vitro* или *in vivo* в комбинации с РНК-направляемой эндонуклеазой направляющие РНК вырезают часть экзона, где вырезаемая часть экзона имеет размер 5-250, 5-200, 5-150, 5-100, 5-75, 5-50, 5-25, 5-10, 20-250, 20-200, 20-150, 20-100, 20-75, 20-50, 20-25, 50-250, 50-200, 50-150, 50-100, 50-75 нуклеотидов.

Вариант осуществления A65 представляет собой композицию по любому из предшествующих пунктов, содержащая по меньшей мере две направляющие РНК, где после экспрессии *in vitro* или *in vivo* в комбинации с РНК-направляемой эндонуклеазой направляющие РНК вырезают часть экзона, где вырезаемая часть экзона имеет размер 8-167 нуклеотидов.

Вариант осуществления A66 представляет собой композицию по любому из предшествующих пунктов, где направляющая РНК представляет собой онРНК.

Вариант осуществления A67 представляет собой композицию по любому из предшествующих пунктов, где направляющая РНК является модифицированной.

Вариант осуществления A68 представляет собой композицию по любому из предшествующих пунктов, где направляющая РНК модифицирована, и где модификация изменяет одно или более 2'-положений и/или фосфодиэфирных связей.

Вариант осуществления A69 представляет собой композицию по любому из предшествующих пунктов, где направляющая РНК модифицирована и где модификация изменяет один или более или все первые три нуклеотида направляющей РНК и/или последние три нуклеотида онРНК.

Вариант осуществления A70 представляет собой композицию по любому из пп. 66-68, где модификация изменяет один или более или все последние три нуклеотида направляющей РНК.

Вариант осуществления A71 представляет собой композицию по любому из предшествующих пунктов, где направляющая РНК является модифицированной, и где модификация включает одну или более из фосфоротиоатной модификации, 2'-ОМе модификации, 2'-О-МОЕ модификации, 2'-F модификации, 2'-О-метин-4' мостиковой модификации, 3'-тиофосфоацетатной модификации или 2'-дезоксид модификации.

Вариант осуществления A72 представляет собой композицию по любому из предшествующих пунктов, где дополнительно содержит фармацевтически приемлемый эксципиент.

Вариант осуществления A73 представляет собой композицию по любому из предшествующих пунктов, где связана с липидной наночастицей (ЛНЧ).

Вариант осуществления A74 представляет собой композицию по любому из предшествующих пунктов, где связана с вирусным вектором.

Вариант осуществления A75 представляет собой композицию по любому из предшествующих пунктов, где связана с вирусным вектором, и где вирусный вектор представляет собой вектор на основе аденоассоциированного вируса, лентивирусный вектор, дефицитный по интегразе лентивирусный вектор, аденовирусный вектор, вектор на основе вируса осповакцины, альфавирусный вектор или вектор на основе вируса простого герпеса.

Вариант осуществления A76 представляет собой композицию по любому из предшествующих пунктов, где связана с вирусным вектором, и где вирусный вектор представляет собой вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV).

Вариант осуществления A77 представляет собой композицию по любому из предшествующих пунктов, где связана с вирусным вектором, где вирусный вектор представляет собой вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV) и где вектор AAV представляет собой вектор AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh10, AAVrh74 или AAV9, где номер после AAV указывает на серотип AAV.

Вариант осуществления A78 представляет собой композицию по любому из предшествующих пунктов, где связана с вирусным вектором, где вирусный вектор представляет собой вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV) и где вектор AAV представляет собой вектор AAV серотипа 9 (AAV9).

Вариант осуществления A79 представляет собой композицию по п. 78, где вектор AAV серотипа 9 имеет размер менее 5 т.п.н., менее 4,9 т.п.н., менее 4,85 т.п.н., менее 4,8 т.п.н. или менее 4,75 т.п.н. от ITR до ITR, включая оба ITR.

Вариант осуществления А80 представляет собой композицию по п. 78 или п. 79, где вектор AAV серотипа 9 имеет размер 3,9-5 т.п.н., 4-5 т.п.н., 4,2-5 т.п.н., 4,4-5 т.п.н., 4,6-5 т.п.н., 4,7-5 т.п.н., 3,9-4,9 т.п.н., 4,2-4,9 т.п.н., 4,4-4,9 т.п.н., 4,7-4,9 т.п.н., 3,9-4,85 т.п.н., 4,2-4,85 т.п.н., 4,4-4,85 т.п.н., 4,6-4,85 т.п.н., 4,7-4,85 т.п.н., 4,7-4,9 т.п.н., 3,9-4,8 т.п.н., 4,2-4,8 т.п.н., 4,4-4,8 т.п.н. или 4,6-4,8 т.п.н. от ITR до ITR, включая оба ITR.

Вариант осуществления А81 представляет собой композицию по любому из пп. 78-80, где вектор AAV серотипа 9 имеет размер 4,4-4,85 т.п.н. от ITR до ITR, включая оба ITR.

Вариант осуществления А82 представляет собой композицию по любому из предшествующих пунктов, где связана с вирусным вектором, где вирусный вектор представляет собой вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV) и где вектор AAV представляет собой вектор AAVrh10.

Вариант осуществления А83 представляет собой композицию по любому из предшествующих пунктов, где связана с вирусным вектором, где вирусный вектор представляет собой вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV) и где вектор AAV представляет собой вектор AAVrh74.

Вариант осуществления А84 представляет собой композицию по любому из предшествующих пунктов, где связана с вирусным вектором, где вирусный вектор содержит тканеспецифический промотор.

Вариант осуществления А85 представляет собой композицию по любому из предшествующих пунктов, где связана с вирусным вектором, где вирусный вектор содержит специфический для мышц промотор, необязательно где специфический для мышц промотор представляет собой промотор мышечной креатинкиназы, промотор десмина, промотор МНСК7, промотор SPc5-12 или промотор СК8е.

Вариант осуществления А86 представляет собой композицию по любому из предшествующих пунктов, где связана с вирусным вектором, где вирусный вектор содержит любой один или более из следующих промоторов: промотор U6, H1 и 7SK.

Вариант осуществления А87 представляет собой композицию по любому из предшествующих пунктов, содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую SaCas9, где по меньшей мере одна направляющая РНК содержит спейсерную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 12, 15, 16, 20, 27, 28, 32, 33 и 35.

Вариант осуществления А88 представляет собой композицию по любому из предшествующих пунктов, содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую SaCas9, где SaCas9 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 711.

Вариант осуществления А89 представляет собой композицию по любому из предшествующих пунктов, содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую SaCas9, где SaCas9 представляет собой вариант аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 711.

Вариант осуществления А90 представляет собой композицию по любому из предшествующих пунктов, содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую SaCas9, где SaCas9 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 715-717.

Вариант осуществления A91 представляет собой композицию по любому из предшествующих пунктов, содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую SluCas9, где по меньшей мере одна направляющая РНК содержит спейсерную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 131, 134, 135, 136, 139, 144, 148, 149, 150, 151, 179, 184, 201, 210, 223, 224, и 225.

Вариант осуществления A92 представляет собой композицию по любому из предшествующих пунктов, содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую SluCas9, где SluCas9 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 712.

Вариант осуществления A93 представляет собой композицию по любому из предшествующих пунктов, содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую SluCas9, где SluCas9 представляет собой вариант аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 712.

Вариант осуществления A94 представляет собой композицию по любому из предшествующих пунктов, содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую SluCas9, где SluCas9 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 718-720.

Вариант осуществления A95 представляет собой композицию по п. 1, где одиночная молекула нуклеиновой кислоты или первая нуклеиновая кислота содержит от 5' к 3' плюс-цепи: обратную комплементарную цепь нуклеотидной последовательности, кодирующей последовательность первой направляющей РНК, обратную комплементарную цепь нуклеотидной последовательности, кодирующей последовательность первой направляющей РНК, обратную комплементарную цепь промотора для экспрессии нуклеотидной последовательности, кодирующей последовательность первой направляющей РНК, промотор для экспрессии нуклеотидной последовательности, кодирующей Cas9 *Staphylococcus aureus* (SaCas9) или *Staphylococcus lugdunensis* (SluCas9), нуклеотидную последовательность, кодирующую SaCas9 или SluCas9, последовательность полиаденилирования, промотор для экспрессии второй направляющей РНК в том же направлении, что и промотор для SaCas9 или SluCas9, нуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность второй направляющей РНК, и нуклеотидную последовательность, кодирующую вторую каркасную последовательность направляющей РНК.

Вариант осуществления A96 представляет собой композицию по п. 95, где промотор для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей первую последовательность направляющей РНК, представляет собой промотор U6, а промотор для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей вторую направляющую РНК, представляет собой промотор U6.

Вариант осуществления A97 представляет собой композицию по п. 95 или п. 96, где SaCas9 или SluCas9 содержат по меньшей мере два сигнала ядерной локализации (NLS).

Вариант осуществления A98 представляет собой композицию по п. 97, где SaCas9 или SluCas9 содержат с-Мус NLS, слитую с N-концом SaCas9 или SluCas9, необязательно посредством линкера.

Вариант осуществления A99 представляет собой композицию по п. 97 или п. 98, где SaCas9 или SluCas9 содержат NLS SV40, слитую с С-концом SaCas9 или SluCas9, необязательно посредством линкера.

Вариант осуществления A100 представляет собой композицию по любому из пп. 97-99, где SaCas9 или SluCas9 содержат NLS нуклеоплазмин, слитый с С-концом SaCas9 или SluCas9, необязательно посредством линкера.

Вариант осуществления A101 представляет собой композицию по любому из пп. 97-100, где SaCas9 или SluCas9 содержат:

- i. NLS с-Мус, слитый с N-концом SaCas9 или SluCas9, необязательно с помощью линкера,
- ii. NLS SV40, слитый с С-концом SaCas9 или SluCas9, необязательно с помощью линкера, и
- iii. NLS, нуклеоплазмина, слитый с С-концом SV40 NLS, необязательно с помощью линкера,

Вариант осуществления A102 представляет собой композицию по любому из пп. 95-101, где каркасная последовательность для первой направляющей РНК содержит последовательность SEQ ID NO: 901.

Вариант осуществления A103 представляет собой композицию по любому из пп. 95-101, где каркасная последовательность для второй направляющей РНК содержит последовательность SEQ ID NO: 901.

Вариант осуществления A104 представляет собой композицию по любому из пп. 95-103, где одиночная молекула нуклеиновой кислоты или первая нуклеиновая кислота имеет размер менее 5 т.п.н., менее 4,9 т.п.н., 4,85, 4,8 или 4,75 т.п.н.

Вариант осуществления A105 представляет собой композицию по любому из пп. 95-104, где одиночная молекула нуклеиновой кислоты или первая нуклеиновая кислота имеет размер 3,9-5 т.п.н., 4-5 т.п.н., 4,2-5 т.п.н., 4,4-5 т.п.н., 4,6-5 т.п.н., 4,7-5 т.п.н., 3,9-4,9 т.п.н., 4,2-4,9 т.п.н., 4,4-4,9 т.п.н., 4,7-4,9 т.п.н., 3,9-4,85 т.п.н., 4,2-4,85 т.п.н., 4,4-4,85 т.п.н., 4,6-4,85 т.п.н., 4,7-4,85 т.п.н., 4,7-4,9 т.п.н., 3,9-4,8 т.п.н., 4,2-4,8 т.п.н., 4,4-4,8 т.п.н. или 4,6-4,8 т.п.н.

Вариант осуществления A106 представляет собой композицию по п. 105, где одиночная молекула нуклеиновой кислоты или первая нуклеиновая кислота имеет размер 4,4-4,85 т.п.н. от ITR до ITR.

Вариант осуществления A107 представляет собой композицию, которая содержит направляющую РНК, кодируемую последовательностью, включающей любую из SEQ ID NO: 1-35, 1000-1078 или 3000-3069, или их комплементарные цепи.

Вариант осуществления A108 представляет собой композицию, которая содержит направляющую РНК, кодируемую последовательностью, содержащей любую из SEQ ID NO: 100-225, 2000-2116, или 4000-4251 или их комплементарные цепи.

Вариант осуществления A109 представляет собой композицию по любому из пп. 1-108 для применения при лечении мышечной дистрофии Дюшенна (DMD).

Вариант осуществления A110 представляет собой композицию по любому из пп. 1-108 для применения для создания одного или более двухцепочечных разрывов в любом одном или более экзонах 43, 44, 45, 50, 51 или 53 гена дистрофина.

Вариант осуществления A111 представляет собой способ лечения мышечной дистрофии Дюшенна (DMD), включающий доставку в клетку композиции по любому из пп. 1-107.

Вариант осуществления A112 представляет собой способ лечения мышечной дистрофии Дюшенна (DMD), включающий доставку в клетку одиночной молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей:

i. нуклеиновую кислоту, кодирующую одну или более направляющих РНК, где одна или более направляющих РНК содержат:

1. спейсерную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-35, 1000-1078 или 3000-3069;

2. спейсерную последовательность, содержащую по меньшей мере 20 смежных нуклеотидов спейсерной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1-35, 1000-1078, или 3000-3069; или

3. спейсерную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с любой из SEQ ID NO: 1-35, 1000-1078, 3000-3069; и

ii. нуклеиновую кислоту, кодирующую *Cas9 Staphylococcus aureus* (SaCas9).

Вариант осуществления A113 представляет собой способ лечения мышечной дистрофии Дюшенна (DMD), включающий доставку в клетку одиночной молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей:

a. молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую одну или более направляющих РНК, где одна или более направляющих РНК содержат:

i. спейсерную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 100-225, 2000-2116, или 4000-4251;

ii. спейсерную последовательность, содержащую по меньшей мере 20 смежных нуклеотидов спейсерной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 100-225, 2000-2116, или 4000-4251; или

iii. спейсерную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с любой из SEQ ID NO: 100-225, 2000-2116, или 4000-4251; и

b. молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую *Staphylococcus lugdunensis* (SluCas9).

Вариант осуществления A114 представляет собой способ лечения мышечной дистрофии Дюшенна (DMD), включающий доставку в клетку одиночной молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей:

i. нуклеиновую кислоту, кодирующую пару направляющих РНК, содержащую:

1. первую и вторую спейсерные последовательности, выбранные из любой из SEQ ID NO: 10 и 15; 10 и 16; 12 и 16; 1001 и 1005; 1001 и 15; 1001 и 16; 1003 и 1005; 16 и 1003; 12 и 1010; 12 и 1012; 12 и 1013; 10 и 1016; 1017 и 1005; 1017 и 16; 1018 и 16; 15 и 10; 16 и

10; 16 и 12; 1005 и 1001; 15 и 1001; 16 и 1001; 1005 и 1003; 1003 и 16; 1010 и 12; 1012 и 12; 1013 и 12; 1016 и 10; 1005 и 1017; 16 и 1017; и 16 и 1018;

2. первую и вторую спейсерные последовательности, содержащие по меньшей мере 17, 18, 19, 20 или 21 смежный нуклеотид любой из SEQ ID NO: 10 и 15; 10 и 16; 12 и 16; 1001 и 1005; 1001 и 15; 1001 и 16; 1003 и 1005; 16 и 1003; 12 и 1010; 12 и 1012; 12 и 1013; 10 и 1016; 1017 и 1005; 1017 и 16; 1018 и 16; 15 и 10; 16 и 10; 16 и 12; 1005 и 1001; 15 и 1001; 16 и 1001; 1005 и 1003; 1003 и 16; 1010 и 12; 1012 и 12; 1013 и 12; 1016 и 10; 1005 и 1017; 16 и 1017; и 16 и 1018; или

3. первую и вторую спейсерные последовательности, которые имеют по меньшей мере 90% идентичности с любой из SEQ ID NO: 10 и 15; 10 и 16; 12 и 16; 1001 и 1005; 1001 и 15; 1001 и 16; 1003 и 1005; 16 и 1003; 12 и 1010; 12 и 1012; 12 и 1013; 10 и 1016; 1017 и 1005; 1017 и 16; 1018 и 16; 15 и 10; 16 и 10; 16 и 12; 1005 и 1001; 15 и 1001; 16 и 1001; 1005 и 1003; 1003 и 16; 1010 и 12; 1012 и 12; 1013 и 12; 1016 и 10; 1005 и 1017; 16 и 1017; и 16 и 1018; и

ii. нуклеиновую кислоту, кодирующую Cas9 *Staphylococcus aureus* (SaCas9).

Вариант осуществления A115 представляет собой способ лечения мышечной дистрофии Дюшенна (DMD), включающий доставку в клетку одиночной молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей:

i. нуклеиновую кислоту, кодирующую пару направляющих РНК, содержащую:

1. первую и вторую спейсерные последовательности, выбранные из любой из SEQ ID NO: 148 и 134; 149 и 135; 150 и 135; 131 и 136; 151 и 136; 139 и 131; 139 и 151; 140 и 131; 140 и 151; 141 и 148; 144 и 149; 144 и 150; 145 и 131; 145 и 151; и 146 и 148;

2. первую и вторую спейсерные последовательности, содержащие по меньшей мере 17, 18, 19, 20 или 21 смежный нуклеотид любой из SEQ ID NO: 148 и 134; 149 и 135; 150 и 135; 131 и 136; 151 и 136; 139 и 131; 139 и 151; 140 и 131; 140 и 151; 141 и 148; 144 и 149; 144 и 150; 145 и 131; 145 и 151; 146 и 148; 134 и 148; 135 и 149; 135 и 150; 136 и 131; 136 и 151; 131 и 139; 151 и 139; 131 и 140; 151 и 140; 148 и 141; 149 и 144; 150 и 144; 131 и 145; 151 и 145; и 148 и 146; или

3. первую и вторую спейсерные последовательности, которые имеют по меньшей мере 90% идентичности с любой из SEQ ID NO: 148 и 134; 149 и 135; 150 и 135; 131 и 136; 151 и 136; 139 и 131; 139 и 151; 140 и 131; 140 и 151; 141 и 148; 144 и 149; 144 и 150; 145 и 131; 145 и 151; 146 и 148; 134 и 148; 135 и 149; 135 и 150; 136 и 131; 136 и 151; 131 и 139; 151 и 139; 131 и 140; 151 и 140; 148 и 141; 149 и 144; 150 и 144; 131 и 145; 151 и 145; и 148 и 146; и

нуклеиновую кислоту, кодирующую *Staphylococcus lugdunensis* (SluCas9).

Вариант осуществления A116 представляет собой способ по любому из предшествующих пунктов способов или применения, где одиночную молекулу нуклеиновой кислоты доставляют в клетку в одном векторе.

Вариант осуществления A117 представляет собой способ по любому из предшествующих пунктов способов или применения, включающий молекулу нуклеиновой

кислоты, кодирующую SaCas9, где спейсерная последовательность выбрана из любой из SEQ ID NO: 12, 15, 16, 20, 27, 28, 32, 33 и 35.

Вариант осуществления A118 представляет собой способ по любому из предшествующих пунктов способов или применения, включающий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую SaCas9, где SaCas9 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 711.

Вариант осуществления A119 представляет собой способ по любому из предшествующих пунктов способов или применения, включающий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую SaCas9, где SaCas9 представляет собой вариант аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 711.

Вариант осуществления A120 представляет собой способ по любому из предшествующих пунктов способов или применения, включающий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую SaCas9, где SaCas9 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 715-717.

Вариант осуществления A121 представляет собой способ по любому из предшествующих пунктов способов или применения, включающий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую SluCas9, где спейсерная последовательность выбрана из любой из SEQ ID NO: 131, 134, 135, 136, 139, 144, 148, 149, 150, 151, 179, 184, 201, 210, 223, 224, и 225.

Вариант осуществления A122 представляет собой способ по любому из предшествующих пунктов способов или применения, включающий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую SluCas9, где SluCas9 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 712.

Вариант осуществления A123 представляет собой способ по любому из предшествующих пунктов способов или применения, включающий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую SluCas9, где SluCas9 представляет собой вариант аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 712.

Вариант осуществления A124 представляет собой способ по любому из предшествующих пунктов способов или применения, включающий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую SluCas9, где SluCas9 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 718-720.

Вариант осуществления A125 представляет собой способ вырезания части экзона с преждевременным стоп-кодоном у субъекта с мышечной дистрофией Дюшенна (DMD), включающий доставку в клетку одиночной молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей:

i. нуклеиновую кислоту, кодирующую пару направляющих РНК, где первая направляющая РНК связывается с целевой последовательностью в пределах экзона, расположенного выше преждевременного стоп-кодона, и где вторая направляющая РНК связывается с последовательностью, расположенной ниже преждевременного стоп-кодона, и ниже последовательности, связанной первой направляющей РНК; и

ii. нуклеиновую кислоту, кодирующую Cas9 *Staphylococcus aureus* (SaCas9);

где пара направляющих РНК и SaCas9 вырезают часть экзона.

Вариант осуществления A126 представляет собой способ вырезания части экзона с преждевременным стоп-кодоном у субъекта с мышечной дистрофией Дюшенна (DMD), включающий доставку в клетку одиночной молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей:

i. нуклеиновую кислоту, кодирующую пару направляющих РНК, где первая направляющая РНК связывается с целевой последовательностью в пределах экзона, расположенного выше преждевременного стоп-кодона, и где вторая направляющая РНК связывается с последовательностью, расположенной ниже преждевременного стоп-кодона, и ниже последовательности, связанной первой направляющей РНК; и

ii. нуклеиновую кислоту, кодирующую *Staphylococcus lugdunensis* (SluCas9);

где пара направляющих РНК и SaCas9 вырезают часть экзона.

Вариант осуществления A127 представляет собой способ по любому из предшествующих пунктов способов, включающий одиночную молекулу нуклеиновой кислоты, причем одиночную молекулу нуклеиновой кислоты доставляют в клетку в одном векторе.

Вариант осуществления A128 представляет собой способ по любому из предшествующих пунктов способов, где часть гена DMD вырезается и части гена, оставшиеся после вырезания, повторно соединяются с однонуклеотидной вставкой.

Вариант осуществления A129 представляет собой способ по любому из предшествующих пунктов способов, где часть гена DMD вырезается и части экзона, оставшиеся после вырезания, повторно соединяются без нуклеотидной вставки.

Вариант осуществления A130 представляет собой способ по любому из предшествующих пунктов способов, где вырезается часть гена DMD, где вырезаемая часть гена имеет размер 5-250, 5-200, 5-150, 5-100, 5-75, 5-50, 5-25, 5-10, 20-250, 20-200, 20-150, 20-100, 20-75, 20-50, 20-25, 50-250, 50-200, 50-150, 50-100 и 50-75 нуклеотидов.

Вариант осуществления A131 представляет собой способ по любому из предшествующих пунктов способов, где вырезается часть гена DMD, где вырезаемая часть экзона имеет размер 8-167 нуклеотидов.

Вариант осуществления A132 представляет собой способ по любому из предшествующих пунктов способов, где вырезается часть гена DMD, где часть находится в пределах экзона 43, 44, 45, 50, 51, или 53.

Вариант осуществления A133 представляет собой способ по любому из предшествующих пунктов способов, включающий пару направляющих РНК, где пара направляющих РНК содержит первую и вторую спейсерные последовательности, выбранные из любой из SEQ ID NO: 10 и 15; 10 и 16; 12 и 16; 1001 и 1005; 1001 и 15; 1001 и 16; 1003 и 1005; 16 и 1003; 12 и 1010; 12 и 1012; 12 и 1013; 10 и 1016; 1017 и 1005; 1017 и 16; 1018 и 16; 15 и 10; 16 и 10; 16 и 12; 1005 и 1001; 15 и 1001; 16 и 1001; 1005 и 1003; 1003 и 16; 1010 и 12; 1012 и 12; 1013 и 12; 1016 и 10; 1005 и 1017; 16 и 1017; и 16 и 1018.

Вариант осуществления A134 представляет собой способ по любому из предшествующих пунктов способов, включающий пару направляющих РНК, где пара

направляющих РНК содержит первую и вторую спейсерные последовательности, выбранные из любой из SEQ ID NO: 148 и 134; 149 и 135; 150 и 135; 131 и 136; 151 и 136; 139 и 131; 139 и 151; 140 и 131; 140 и 151; 141 и 148; 144 и 149; 144 и 150; 145 и 131; 145 и 151; 146 и 148; 134 и 148; 135 и 149; 135 и 150; 136 и 131; 136 и 151; 131 и 139; 151 и 139; 131 и 140; 151 и 140; 148 и 141; 149 и 144; 150 и 144; 131 и 145; 151 и 145; и 148 и 146.

Вариант осуществления A135 представляет собой способ по любому из предшествующих пунктов способов, включающий SaCas9, где SaCas9 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 715.

Вариант осуществления A136 представляет собой композицию или способ по любому из предшествующих пунктов способов, где одиночная молекула нуклеиновой кислоты представляет собой вектор AAV, где вектор содержит от 5' к 3' плюс-цепи: обратную комплементарную цепь первой каркасной последовательности онРНК, обратную комплементарную цепь нуклеиновой кислоты, кодирующей первую направляющую последовательность онРНК, обратную комплементарную цепь промотора для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей первую онРНК, промотор для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей SaCas9 (например, СК8е), нуклеиновую кислоту, кодирующую SaCas9, последовательность полиаденилирования, промотор для экспрессии второй онРНК в том же направлении, что и промотор для SaCas9, вторую направляющую последовательность онРНК и вторую каркасную последовательность онРНК.

Вариант осуществления A137 представляет собой композицию или способ по п. 136, где промотор для экспрессии первой направляющей последовательности онРНК представляет собой промотор hU6.

Вариант осуществления A138 представляет собой композицию или способ по любому из пп. 136-137, где промотор для экспрессии второй направляющей последовательности онРНК представляет собой промотор hU6.

Вариант осуществления A139 представляет собой композицию или способ по любому из пп. 136-137, где промотор для экспрессии первой направляющей последовательности онРНК представляет собой промотор hU6, а промотор для экспрессии второй направляющей последовательности онРНК представляет собой промотор hU6.

Вариант осуществления A140 представляет собой композицию или способ по любому из пп. 136-137, где промотор для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей первую направляющую последовательность онРНК, представляет собой промотор 7SK.

Вариант осуществления A141 представляет собой композицию или способ по любому из пп. 136-137, где промотор для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей вторую направляющую последовательность онРНК, представляет собой промотор 7SK.

Вариант осуществления A142 представляет собой композицию или способ по любому из пп. 136-137, где промотор для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей вторую направляющую последовательность онРНК, представляет собой промотор H1m.

Вариант осуществления A143 представляет собой композицию или способ по любому из предшествующих пунктов, где последовательность нуклеиновой кислоты,

кодирующая SaCas9 или SluCas9, слита с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей одну или более последовательностей ядерной локализации (NLS).

Вариант осуществления A144 представляет собой композицию или способ по любому из предшествующих пунктов, где последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая SaCas9 или SluCas9, слита с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей последовательность ядерной локализации (NLS).

Вариант осуществления A145 представляет собой композицию или способ по любому из предшествующих пунктов, где последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая SaCas9 или SluCas9, слита с двумя последовательностями нуклеиновой кислоты, каждая из которых кодирует последовательность ядерной локализации (NLS).

Вариант осуществления A146 представляет собой композицию или способ по любому из предшествующих пунктов, где последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая SaCas9 или SluCas9, слита с тремя последовательностями нуклеиновой кислоты, кодирующими одну или более последовательностей ядерной локализации (NLS).

Вариант осуществления A147 представляет собой композицию или способ по любому из пп. 143-146, где один или более NLS включают NLS SV40.

Вариант осуществления A148 представляет собой композицию или способ по любому из пп. 143-147, где один или более NLS включают NLS с-Мус.

Вариант осуществления A149 представляет собой композицию или способ по любому из пп. 143-148, где один или более NLS включают NLS нуклеоплазмينا.

Вариант осуществления A150 представляет собой композицию или способ по любому из предшествующих пунктов, где нуклеиновая кислота, кодирующая направляющую РНК, или нуклеиновая кислота, кодирующая пару направляющих РНК, содержит последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 600, 601 или 900-917, и где композиция или способ содержат нуклеиновую кислоту, кодирующую SluCas9.

Вариант осуществления A151 представляет собой композицию или способ по любому из предшествующих пунктов, где нуклеиновая кислота, кодирующая направляющую РНК, или нуклеиновая кислота, кодирующая пару направляющих РНК, содержат последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 901-917, и где композиция или способ включают нуклеиновую кислоту, кодирующую SluCas9.

Вариант осуществления A152 представляет собой композицию по любому из предшествующих пунктов, где молекула нуклеиновой кислоты кодирует по меньшей мере первую направляющую РНК и вторую направляющую РНК.

Вариант осуществления A153 представляет собой композицию по п. 152, где молекула нуклеиновой кислоты кодирует спейсерную последовательность для первой направляющей РНК, каркасную последовательность для первой направляющей РНК, спейсерную последовательность для второй направляющей РНК и каркасную последовательность для второй направляющей РНК.

Вариант осуществления A154 представляет собой композицию по п. 152, где спейсерная последовательность для первой направляющей РНК и спейсерная

последовательность для второй направляющей РНК являются одинаковыми.

Вариант осуществления A155 представляет собой композицию по п. 152, где спейсерная последовательность для первой направляющей РНК и спейсерная последовательность для второй направляющей РНК отличаются.

Вариант осуществления A156 представляет собой композицию по любому из пп. 153-155, где каркасная последовательность для первой направляющей РНК и каркасная последовательность для второй направляющей РНК являются одинаковыми.

Вариант осуществления A157 представляет собой композицию по любому из пп. 153-154, где каркасная последовательность для первой направляющей РНК и каркасная последовательность для второй направляющей РНК отличаются.

Вариант осуществления A158 представляет собой композицию по п. 157, где каркасная последовательность для первой направляющей РНК содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 901-916, и где каркасная последовательность для второй направляющей РНК содержит другую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 901-916.

ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На Фиг. 1 представлено упрощенное описание нескольких репрезентативных векторных конфигураций. Стрелки из одной линии указывают на направленность экспрессии онРНК, а стрелка из двух линий указывает на направленность экспрессии белка Cas9. Для столбца промоторов указаны репрезентативные промоторы для экспрессии онРНК. В конкретном варианте осуществления промотор Cas9 может представлять собой СК8е.

На Фиг. 2 показана иллюстративная схема профилирования локус-специфических инделей, как описано в Примере 2, включая категории редактирования для вставок и делеций.

На Фиг. 3А-3В показаны частота редактирования и профиль инделей выбранных онРНК SluCas9 и SaCas9, которые нацелены на экзон 45 гена DMD в клетках HEK293FT человека (Фиг. 3А) и клетках Neuro-2а мыши (Фиг. 3В). В качестве эталона была включена высокоэффективная онРНК для SpCas9 (E45Sp52). Каждая полоса представляет собой онРНК, а высота полосы отображает среднюю общую частоту делеций. Профили инделей показаны для каждой онРНК следующим образом: сплошной черный цвет (1-нуклеотидная (нт) вставка, ведущая к изменению рамки считывания, иногда обозначаемая как «RF.+1»); сплошной белый цвет (инделы, отличные от вставки из 1 нуклеотида, приводящие к изменению рамки считывания, иногда обозначаемые как «Другие_RF»); шахматная раскраска (инделы, нарушающие ± 6 = нт окно границ экзон/интрон, обозначаемые как «пропуск экзона»); диагональные линии (другие инделы, иногда обозначаемые «OE»). Данные являются средними из 3 повторов.

На Фиг. 4А-4В показаны частота редактирования и профиль инделей выбранных онРНК SluCas9 и SaCas9, которые нацелены на экзон 51 гена DMD в клетках HEK293FT человека (Фиг. 4А) и клетках Neuro-2а мыши (Фиг. 4В). В качестве эталона была включена

высокоэффективная онРНК для SpCas9 (E51Sp32). Каждая полоса представляет собой онРНК, а высота полосы отображает среднюю общую частоту делеций. Профили инделей показаны для каждой онРНК следующим образом: сплошной черный цвет (1-нуклеотидная (нт) вставка, ведущая к изменению рамки считывания, обозначаемая как «RF.+1»); сплошной белый цвет (инделы, отличные от вставки из 1 нуклеотида, приводящие к изменению рамки считывания, обозначаемые как «Другие_RF»); шахматная раскраска (инделы, нарушающие ± 6 = нт окно границ экзон/интрон, обозначаемые как «пропуск экзона»); диагональные линии (другие инделы, иногда обозначаемые «ОЕ» или «другие инделы»). Данные являются средними из 3 повторов.

На Фиг. 5А-5В показаны частота редактирования и профиль инделей выбранных онРНК SluCas9 и SaCas9 в экзоне 53 гена DMD в клетках HEK293FT человека (Фиг. 5А) и клетках Neuro-2а мыши (Фиг. 5В). В качестве эталона была включена высокоэффективная онРНК для SpCas9 (E53Sp63). Каждая полоса представляет собой онРНК, а высота полосы отображает среднюю общую частоту делеций. Профили инделей показаны для каждой онРНК с использованием следующих цветов: сплошной черный цвет (1-нуклеотидная (нт) вставка, ведущая к изменению рамки считывания, обозначаемая как «RF.+1»); сплошной белый цвет (инделы, отличные от вставки из 1 нуклеотида, приводящие к изменению рамки считывания, обозначаемые как «Другие_RF»); шахматная раскраска (инделы, нарушающие ± 6 = нт окно границ экзон/интрон, обозначаемые как «пропуск экзона»); диагональные линии (другие инделы, обозначаемые «ОЕ» или «другие инделы»). Данные являются средними из 3 повторов.

На Фиг. 6А-Д показана частота редактирования и профиль инделей выбранных пар онРНК SaCas9-KKH и SluCas9 в экзоне 45 в клетках HEK293FT (Фиг. 6В) и клетках Neuro-2а (Фиг. 6Д). На Фиг. 6А показана схема редактирования. Вызывающая одиночный разрыв онРНК для SaCas9 (SaCas9-4) была включена в качестве эталона (Фиг. 6С). Каждая полоса представляет собой онРНК, а высота полосы отображает среднюю общую частоту делеций. Профили инделей показаны для каждой онРНК с использованием различных раскрасок. Планка погрешности = верхний предел СОС для каждой группы инделей.

На Фиг. 7А показан нуклеотидный состав и вторичная структура петля-на-стебле I РНК в различных каркасах одиночной направляющей РНК SluCas9. Показаны ключевые различия в последовательности и вторичной структуре между Slu-VCGT-4.5, Slu-VCGT-4 и Slu-VCGT-5. Квадраты и треугольники демонстрируют разницу во вторичной структуре в верхнем стебле. Формы ромба и пятиугольника демонстрируют изменение одного нуклеотида в нижнем стебле.

На Фиг. 7В представлена гистограмма, демонстрирующую процент различных типов инделей, генерируемых двумя кандидатами в онРНК SluCas9: SluCas9-23 и SluCas9-24. Для каждой направляющей РНК тестировали три каркаса, включая Slu-VCGT-4.5, Slu-VCGT-4 и Slu-VCGT-5. Каждую онРНК тестировали при трех различных дозах РНП. Точные количества протестированного белка SluCas9 и онРНК составляли: 6,75 пмоль:37,5 пмоль для низкой дозы, 12,5 пмоль:75 пмоль для средней дозы и 25 пмоль:150 пмоль для

высокой дозы. Разные цвета столбцов на гистограмме представляют разные типы инделей, генерируемых онРНК. Черный представляет процент вставок из +1 п.н. Белый цвет представляет собой процент других вставок и делеций, которые потенциально могут восстановить рамку считывания конкретных представляющих интерес мутаций пациентов с DMD. Их называют «другие RF», что представляет собой сумму делеций из 2, 5, 8, 11 п.н. в пределах окна выравнивания от -20 п.н. до +20 п.н. около сайта рестрикции Cas9. Остальные инделы, показанные в раскраске, классифицируются как «Другие инделы».

На Фиг. 8 показаны частота редактирования и профиль инделов выбранных пар онРНК SluCas9 в экзоне 45 в первичных миобластах скелетных мышц человека (HsMM). В качестве эталона были включены две вызывающие одиночный разрыв онРНК для SpCas9 (EX-145, E45Sp52) и SluCas9 (SluCas9-24). Каждый столбец представляет собой онРНК или пару онРНК, а высота столбца отображает среднюю общую частоту делеций. Профили инделей показаны с использованием различных раскрасок. Планка погрешности = верхний предел станд. откл. для каждой группы инделей.

На Фиг. 9А и 9В показана частота редактирования и профиль инделей выбранных пар онРНК SaCas9-KKH и SluCas9 в экзоне 51 в клетках HEK293FT. Каждый столбец представляет собой онРНК или пару онРНК, а высота столбца отображает среднюю общую частоту делеций. Профили инделей показаны с использованием различных раскрасок. Планка погрешности = верхний предел станд. откл. для каждой группы инделей.

На Фиг. 10А и 10В показана частота редактирования и профиль инделей выбранных векторов AAV в миотрубочках C2C12. На Фиг. 10А показаны три тестируемые направляющие молекулы, и на Фиг. 10В показаны 4 тестируемые направляющие молекулы. Каждый столбец представляет собой различную конфигурацию AAV, а высота столбца отображает среднюю общую частоту инделей. Профили инделей показаны с использованием различных раскрасок. Планка погрешности = верхний предел станд. откл. для каждой группы инделей.

На Фиг. 11 показан количественный анализ векторного генома выбранных векторов AAV в миотрубочках C2C12. Каждый столбец представляет собой различную конфигурацию AAV, а высота столбца отображает среднее число копий векторного генома на мкг ДНК. Планка погрешности = верхний предел станд. откл.

На Фиг. 12А и 12В показана трансгенная экспрессия выбранных векторов AAV в миотрубочках C2C12. Фиг. 12А: каждый столбец представляет собой различную конфигурацию AAV, а высота столбца отображает среднее количество копий трансгена Cas9 на мкг РНК. Нуклеазы Cas9 показаны с использованием различных раскрасок. Фиг. 12В: каждый столбец представляет собой другую онРНК, а высота столбца отображает среднее количество копий трансгена онРНК на мкг РНК. Комбинации промоторов показаны с использованием различных раскрасок. Планка погрешности = верхний предел стандартного отклонения.

На Фиг. 13 показана локализация Cas9 выбранных векторов AAV в миотрубочках C2C12. На Фиг. 13 и во всей заявке однолинейные стрелки указывают направленность

экспрессии онРНК, тогда как двойная или «жирная» стрелка (со встроенным «X» или без него) указывает направленность экспрессии белка Cas9. Расположение SluCas9 показано на нижней панели каждого; MYOG показан репрезентативными стрелками, DAPI показан репрезентативными жирными стрелками большего размера. Изображение показано в масштабе 20-25 мкм.

На Фиг. 14А и 14В показана частота редактирования и профиль инделей выбранных векторов AAV в сердце (Фиг. 14А) и четырехглавой мышце бедра (Фиг. 14В) мышиной модели dEx44. Каждый столбец представляет собой различную конфигурацию AAV, а высота столбца отображает среднюю общую частоту инделей. Профили инделей показаны с использованием различных раскрасок. Планка погрешности = верхний предел станд. откл. для каждой группы инделей.

На Фиг. 15А и 15В показано восстановление дистрофина выбранных векторов AAV в сердце (Фиг. 15А) и четырехглавой мышце бедра (Фиг. 15В) мышиной модели dEx44. Каждая группа представляет собой различную конфигурацию AAV, а горизонтальная полоса отображает средний уровень общего белка дистрофина.

На Фиг. 16А и 16В показан количественный анализ векторного генома выбранных векторов AAV в сердце (Фиг. 16А) и четырехглавой мышце (Фиг. 16В) мышиной модели dEx44. Каждая группа представляет собой различную конфигурацию AAV, а горизонтальная полоса отображает среднее число копий векторного генома на мкг ДНК.

На Фиг. 17А и 17В показана экспрессия трансгена Cas9 и онРНК выбранных векторов AAV в сердце (Фиг. 17А) и четырехглавой мышце (Фиг. 17В) мышиной модели dEx44. Каждая группа представляет собой различную конфигурацию AAV, а горизонтальная полоса отображает среднее число копий трансгена на мкг РНК. Закрашенные кружки указывают на экспрессию мРНК Cas9, а незакрашенные кружки указывают на экспрессию онРНК.

На Фиг. 18А-18С показаны частота редактирования и профиль инделей выбранных направляющих РНК Cas12i2, используемых с эндонуклеазой Cas12i2 в экзоне 45 в клетках HEK293FT. На Фиг. 18А показана схема эксперимента, на Фиг. 18В показана частота инделей для выбранных пар направляющих РНК, а на Фиг. 18С показана вызывающих одиночный разрыв онРНК для SaCas9 (SaCas9-4) и для SluCas9 (SluCas9-24) для сравнения.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Далее будут подробно рассмотрены некоторые варианты осуществления изобретения, примеры которых проиллюстрированы в прилагаемых графических материалах. Хотя изобретение описано в связи с проиллюстрированными вариантами осуществления, следует понимать, что они не предназначены для ограничения изобретения этими вариантами осуществления. Напротив, изобретение предназначено для охвата всех альтернатив, модификаций и эквивалентов, которые могут быть включены в изобретение, как определено прилагаемой формулой изобретения и включенными вариантами осуществления.

Перед подробным описанием настоящих идей следует понимать, что изобретение не

ограничивается конкретными композициями или стадиями процесса, поскольку они могут варьироваться. Следует отметить, что используемые в описании изобретения и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если в контексте явно не указано иное. Таким образом, например, ссылка на «направляющую молекулу» включает множество направляющих молекул, а ссылка на «клетку» включает в себя множество клеток и т.п.

Числовые диапазоны включают в себя числа, определяющие диапазон. Измеряемые и измеримые значения считаются приблизительными с учетом значащих цифр и ошибки, связанной с измерением. Кроме того, использование слов «включать», «содержит», «содержащий», «содержать», «содержит», «содержащий», «включать», «включает» и «включающий» не предназначено для ограничения. Следует понимать, что как предшествующее общее описание, так и подробное описание являются просто иллюстративными и пояснительными и не ограничивают данное описание.

Если специально не указано в описании, варианты осуществления в описании, в которых указано «содержащие» различные компоненты, также рассматриваются как «состоящие из» или «состоящие по существу из» указанных компонентов; варианты осуществления в описании, в которых упоминается «состоящий из» различных компонентов, также рассматриваются как «содержащие» или «состоящие в основном из» указанных компонентов; и варианты осуществления в описании, в которых упоминается «состоит в основном из» различных компонентов, также рассматриваются как «состоящие из» или «содержащие» указанные компоненты (эта взаимозаменяемость не применяется к использованию этих терминов в формуле изобретения). Термин «или» используется в полном смысле, то есть, эквивалентен «и/или», если в контексте явно не указано иное.

Заголовки разделов, используемые в данном документе, предназначены только для организационных целей и не должны рассматриваться как ограничивающие объект изобретения каким-либо образом. В случае, если какой-либо материал, включенный посредством ссылки, противоречит любому термину, определенному в этом описании, или любой непосредственно включенной информации из этого описания, является превалирующим. Хотя настоящее описание описано в связи с различными вариантами осуществления, не предполагается, что настоящее описание ограничивается такими вариантами осуществления. Напротив, настоящее описание охватывает различные альтернативы, модификации и эквиваленты, как будет понятно специалистам в данной области техники.

I. Определения

Если не указано иное, следующие термины и фразы, используемые в данном документе, имеют следующие значения:

«Полинуклеотид», «нуклеиновая кислота» и «молекула нуклеиновой кислоты» используются в данном документе для обозначения мультимерного соединения, включающего нуклеозиды или аналоги нуклеозидов, которые имеют азотсодержащие гетероциклические основания или аналоги оснований, связанные вместе вдоль остова,

включая обычные РНК, ДНК, смешанную РНК-ДНК и полимеры, являющиеся их аналогами. «Остов» нуклеиновой кислоты может состоять из множества связей, включая одну или более связей сахар-фосфодиэфир, связей пептид-нуклеиновая кислота («пептидные нуклеиновые кислоты» или PNA; РСТ № WO 95/32305), фосфоротиоатных связей, метилфосфонатных связей или их комбинаций. Сахарные фрагменты нуклеиновой кислоты могут представлять собой рибозу, дезоксирибозу или аналогичные соединения с заменами, например, 2'-метокси- или 2'-галогенидными заменами. Азотистые основания могут представлять собой обычные основания (A, G, C, T, U), их аналоги (например, модифицированные уридины, такие как 5-метоксиуридин, псевдоуридин или N1-метилпсевдоуридин или другие); инозин; производные пуринов или пиримидинов (например, N⁴-метилдезоксигуанозин, деаза- или аза-пурины, деаза- или аза-пиримидины, пиримидиновые основания с замещающими группами в положении 5 или 6 (например, 5-метилцитозин), пуриновые основания с замещающими группами в положениях 2, 6 или 8, 2-амино-6-метиламинопурин, O⁶-метилгуанин, 4-тиопиримидины, 4-аминопиримидины, 4-диметилгидразин-пиримидины и O⁴-алкилпиримидины; патент США № 5378825 и РСТ № WO 93/13121). Для общего обсуждения см. *The Biochemistry of the Nucleic Acids* 5-36, Adams et al., ed., 11th ed., 1992). Нуклеиновые кислоты могут включать один или более «абазических» остатков, где остов не включает азотистое основание для положения(-й) полимера (патент США № 5585481). Нуклеиновая кислота может содержать только обычные сахара РНК или ДНК, основания и связи или может включать как обычные компоненты, так и замены (например, обычные основания с 2'-метокси связями или полимеры, содержащие как обычные основания, так и один или более аналогов оснований). Нуклеиновая кислота включает «закрытую нуклеиновую кислоту» (LNA), аналог, содержащий один или более нуклеотидных мономеров LNA с бициклическим фуранозным звеном, запертым в РНК-имитирующей конформации сахара, что повышает аффинность гибридизации в отношении комплементарных последовательностей РНК и ДНК (Vester and Wengel, 2004, *Biochemistry* 43(42):13233-41). РНК и ДНК имеют разные сахарные фрагменты и могут различаться наличием урацила или его аналогов в РНК и тимина или его аналогов в ДНК.

Термины «направляющая РНК», «нРНК» и просто «направляющая молекула» используются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения или sgРНК (также известной как CRISPR РНК), или комбинации sgРНК и trРНК (также известной как tracrРНК). sgРНК и trРНК могут быть связаны в виде одиночной молекулы РНК (одиночная направляющая РНК, онРНК) или в виде двух отдельных молекул РНК (двойная направляющая РНК, днРНК). Термин «направляющая РНК» или «нРНК» относится к каждому типу. trРНК может быть природной последовательностью или последовательностью trРНК с модификациями или вариациями по сравнению с природными последовательностями. Для ясности термины «направляющая РНК» или «направляющая молекула», используемые в данном документе, и если специально не указано иное, могут относиться к молекуле РНК (содержащей нуклеотиды A, C, G и U) или

к молекуле ДНК, кодирующей такую молекулу РНК (содержащую нуклеотиды А, С, G и Т) или ее комплементарные последовательности. Как правило, в случае конструкции нуклеиновой кислоты ДНК, кодирующей направляющую РНК, остатки U в любой из описанных в данном документе последовательностей РНК могут быть заменены остатками Т, а в случае конструкции направляющей РНК, кодируемой любой из описанных в данном документе последовательностей ДНК, остатки Т могут быть заменены остатками U.

В контексте данного документа термин «спейсерная последовательность», иногда также упоминаемая в данном документе и в литературе как «спейсер», «протоспейсер», «направляющая последовательность» или «нацеливающая последовательность», относится к последовательности в направляющей РНК, которая является комплементарной к целевой последовательности и функционирует, направляя направляющую РНК к целевой последовательности для расщепления с помощью Cas9. Направляющая последовательность может иметь длину 24, 23, 22, 21, 20 или менее пар оснований, например, в случае *Staphylococcus lugdunensis* (то есть, SluCas9) или *Staphylococcus aureus* (то есть, SaCas9) и родственных гомологов/ортологов Cas9. В предпочтительных вариантах осуществления направляющая/спейсерная последовательность в случае SluCas9 или SaCas9 имеет длину по меньшей мере 20 пар оснований или, более конкретно, длину в пределах 20-25 пар оснований (см., например, Schmidt et al., 2021, Nature Communications, “Improved CRISPR genome editing using small highly active and specific engineered RNA-guided nucleases”). В качестве ориентиров также можно использовать более короткие или длинные последовательности, например, длиной 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидов. Например, в некоторых вариантах осуществления направляющая последовательность содержит по меньшей мере 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1-35 (для SaCas9), и 100-225 (для SluCas9). В некоторых вариантах осуществления направляющая последовательность содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-35, 100-225, 1000-1078, 2000-2116, 3000-3069 или 4000-4251. В некоторых вариантах осуществления целевая последовательность находится в гене или на хромосоме, например, и является комплементарной направляющей последовательности. В некоторых вариантах степень комплементарности или идентичности между направляющей последовательностью и соответствующей ей целевой последовательностью может составлять около 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%. Например, в некоторых вариантах осуществления направляющая последовательность содержит последовательность с около 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с по меньшей мере 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 смежными нуклеотидами последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1-35, 100-225, 1000-1078, 2000-2116, 3000-3069 или 4000-4251. В некоторых вариантах осуществления направляющая последовательность содержит последовательность с около 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 1-35, 100-225, 1000-1078, 2000-2116, 3000-3069, или 4000-4251. В некоторых вариантах осуществления

направляющая последовательность и целевая область могут быть на 100% комплементарными или идентичными. В других вариантах осуществления направляющая последовательность и целевая область могут содержать по меньшей мере одно несовпадение. Например, направляющая последовательность и целевая последовательность могут содержать 1, 2, 3 или 4 несовпадения, причем общая длина целевой последовательности составляет по меньшей мере 17, 18, 19, 20 или более пар оснований. В некоторых вариантах осуществления направляющая последовательность и целевая область могут содержать 1-4 несовпадения, где направляющая последовательность содержит по меньшей мере 17, 18, 19, 20 или более нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления направляющая последовательность и целевая область могут содержать 1, 2, 3 или 4 несовпадения, причем направляющая последовательность содержит 20 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления направляющая последовательность и целевая область не содержат какие-либо несовпадения.

В некоторых вариантах осуществления направляющая последовательность содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-35, 100-225, 1000-1078, 2000-2116, 3000-3069 или 4000-4251, где, если 5'-концевой нуклеотид не является гуанином, один или более гуанинов (g) добавляют к последовательности в ее 5' конец. 5' g или gg необходимы в некоторых случаях для транскрипции, например, для экспрессии промотором U6, зависимым от РНК-полимеразы III, или промотором Т7. В некоторых вариантах осуществления 5'-гуанин добавлен к любой из направляющих последовательностей или пар направляющих последовательностей, описанных в данном документе.

Целевые последовательности для Cas9s включают как положительные, так и отрицательные цепи геномной ДНК (то есть, заданную последовательность и обратную комплементарную цепь последовательности), поскольку субстрат нуклеиновой кислоты для Cas9 представляет собой двухцепочечную нуклеиновую кислоту. Соответственно, когда говорят, что направляющая последовательность является «комплементарной целевой последовательности», следует понимать, что направляющая последовательность может направлять направляющую РНК для связывания с обратной комплементарной цепью целевой последовательности. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, где направляющая последовательность связывает обратную комплементарную цепь целевой последовательности, целевая последовательность идентична некоторым нуклеотидам целевой последовательности (например, целевой последовательности, не содержащей РАМ), за исключением замены U на Т в направляющей последовательности.

В контексте данного документа термин «рибонуклеопротеин» (РНП) или «РНП комплекс» относится к направляющей РНК вместе с Cas9. В некоторых вариантах осуществления направляющая РНК направляет Cas9, такую как Cas9, к целевой последовательности, и направляющая РНК гибридизуется с целевой последовательностью, и агент связывается с целевой последовательностью, за чем может следовать расщепление или одноцепочечный разрыв (в контексте модифицированной «никазы» Cas9).

Как используется в данном документе, считается, что первая последовательность «содержит последовательность с по меньшей мере X% идентичности» со второй последовательностью, если выравнивание первой последовательности со второй последовательностью демонстрирует, что X% или более из положений во второй последовательности полностью соответствуют первой последовательности. Например, последовательность AAGA содержит последовательность со 100%-ной идентичностью последовательности AAG, поскольку выравнивание даст 100%-ную идентичность в том смысле, что имеются совпадения для всех трех положений второй последовательности. Различия между РНК и ДНК (обычно обмен уридина на тимидин или наоборот) и присутствие нуклеозидных аналогов, таких как модифицированные уридины, не способствуют различиям в идентичности или комплементарности среди полинуклеотидов, поскольку соответствующие нуклеотиды (такие как тимидин, уридин или модифицированный уридин) имеют один и тот же комплемент (например, аденозин для всех из тимидина, уридина или модифицированного уридина; другим примером являются цитозин и 5-метилцитозин, оба из которых содержат в качестве комплементарного основания гуанозин или модифицированный гуанозин). Так, например, последовательность 5'-AXG, где X представляет собой любой модифицированный уридин, такой как псевдоуридин, N1-метилпсевдоуридин или 5-метоксиуридин, считается на 100% идентичным AUG, поскольку оба они полностью комплементарны одной и той же последовательности (5'-CAU). Примерами алгоритмов выравнивания являются алгоритмы Смита-Уотермана и Нидлмана-Вунша, которые хорошо известны в данной области техники. Специалисту в данной области техники будет понятно, какой алгоритм выбрать и какие настройки параметров подходят для данной пары последовательностей, которые должны быть выровнены; для последовательностей в общем одинаковой длины и ожидаемой идентичности >50% для аминокислот или >75% для нуклеотидов, как правило, подходит алгоритм Нидлмана-Вунша со стандартными настройками интерфейса алгоритма Нидлмана-Вунша, предоставляемого EBI на веб-сервере www.ebi.ac.uk.

В контексте данного документа термин «мРНК» относится к полинуклеотиду, который не является ДНК и содержит открытую рамку считывания, которая может транслироваться в полипептид (то есть может служить субстратом для трансляции с помощью рибосомы и аминоацилированной тРНК). мРНК может содержать сахарофосфатный остов, включающий остатки рибозы или их аналоги, например, остатки 2'-метоксирибозы. В некоторых вариантах осуществления сахара сахарофосфатного остова мРНК состоят по существу из остатков рибозы, остатков 2'-метоксирибозы или их комбинации.

Направляющие последовательности, применимые в композициях и способах направляющей РНК, описанных в данном документе, показаны, например, в **таблице 1А**, **таблице 1В** и **таблице 5**, а также во всем описании.

В контексте данного документа термин «целевая последовательность» относится к последовательности нуклеиновой кислоты в целевом гене, которая комплементарна по

меньшей мере части направляющей последовательности направляющей РНК. Взаимодействие целевой последовательности и направляющей последовательности приводит к тому, что Cas9 связывается с целевой последовательностью и потенциально вызывает одноцепочечный разрыв или расщепляет ее (в зависимости от активности агента).

В контексте данного документа термин «лечение» относится к любому введению или применению терапевтического средства для лечения заболевания или нарушения у субъекта и включает ингибирование заболевания или развития заболевания (которое может произойти до или после постановки официального диагноза, например, в случае, когда субъект имеет генотип, который потенциально может или может привести к развитию заболевания), остановку его развития, уменьшение интенсивности одного или более симптомов заболевания, излечение заболевания или предотвращение повторного появления одного или более симптомов заболевания. Например, лечение DMD может включать облегчение симптомов DMD.

В контексте данного документа термин «уменьшение интенсивности» относится к любому благоприятному влиянию на фенотип или симптом, такому как уменьшение его степени тяжести, замедление или задержка его развития, остановка его развития, частичное или полное изменение или устранение его. В случае количественных фенотипов, таких как уровни экспрессии, улучшение включает изменение уровня экспрессии таким образом, чтобы он был ближе к уровню экспрессии, наблюдаемому в здоровых или непораженных клетках или индивидах.

«Фармацевтически приемлемый эксципиент» относится к агенту, включенному в фармацевтический состав, который не является активным ингредиентом. Фармацевтически приемлемые эксципиенты могут, например, способствовать доставке лекарственного средства или поддерживать или повышать стабильность или биодоступность.

Термин «около» или «приблизительно» означает приемлемую ошибку для конкретного значения, как определено специалистом в данной области техники, которая частично зависит от того, как измеряется или определяется значение.

В контексте данного документа термин «Cas9 *Staphylococcus aureus*» также может обозначаться как SaCas9 и включает SaCas9 дикого типа (например, SEQ ID NO: 711) и его варианты. Вариант SaCas9 содержит одну или более аминокислотных замен по сравнению с SEQ ID NO: 711, включая вставку, делецию или замену одной или более аминокислот, или химическую модификацию одной или более аминокислот.

В контексте данного документа термин «Cas9 *Staphylococcus lugdunensis*» также может обозначаться как SluCas9 и включает SluCas9 дикого типа (например, SEQ ID NO: 712) и их варианты. Вариант SluCas9 содержит одну или более аминокислотных замен по сравнению с SEQ ID NO: 712, включая вставку, делецию или замену одной или более аминокислот, или химическую модификацию одной или более аминокислот.

II. Композиции

В данном документе представлены композиции, применимые для лечения мышечной дистрофии Дюшенна (DMD), например, с использованием одной или более

(например, по меньшей мере 2) молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих 1) одну или более направляющих РНК, содержащих одну или более направляющих последовательностей из **таблицы 1А**, **таблицы 1В**, или **таблицы 5**; и 2) SaCas9 (для SEQ ID NO: 1-35, 1000-1078 или 3000-3069) или SluCas9 (для SEQ ID NO: 100-225, 2000-2116 или 4000-4251). Такие композиции можно вводить субъектам, имеющим или подозреваемым в наличии DMD.

В некоторых вариантах осуществления пре композиция, содержащая, состоящая из или по существу состоящая из одиночной молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей: i) нуклеиновую кислоту, кодирующую Cas9 *Staphylococcus aureus* (SaCas9) или *Staphylococcus lugdunensis* (SluCas9), и по меньшей мере один, по меньшей мере два или по меньшей мере три направляющие РНК; или ii) нуклеиновую кислоту, кодирующую Cas9 *Staphylococcus aureus* (SaCas9) или *Staphylococcus lugdunensis* (SluCas9), и от одной до n направляющих РНК, где n не превышает максимальное количество направляющих РНК, которые могут быть экспрессированы из указанной нуклеиновой кислоты; или iii) нуклеиновую кислоту, кодирующую Cas9 *Staphylococcus aureus* (SaCas9) или *Staphylococcus lugdunensis* (SluCas9), и от одной до трех направляющих РНК.

В некоторых вариантах осуществления предложена композиция, содержащая, состоящая из или по существу состоящая из по меньшей мере двух молекул нуклеиновой кислоты, содержащих первую нуклеиновую кислоту, кодирующую Cas9 *Staphylococcus aureus* (SaCas9) или *Staphylococcus lugdunensis* (SluCas9); и вторую нуклеиновую кислоту, которая не кодирует SaCas9 или SluCas9 и кодирует любую из i) по меньшей мере одной, по меньшей мере двух, по меньшей мере трех, по меньшей мере четырех, по меньшей мере пяти или по меньшей мере шести направляющих РНК; или ii) от одной до n направляющих РНК, где n равно максимальному количеству направляющих РНК, которые могут быть экспрессированы из указанной нуклеиновой кислоты; или iii) от одной до шести направляющих РНК.

В некоторых вариантах осуществления предложена композиция, содержащая, состоящая из или по существу состоящая из по меньшей мере двух молекул нуклеиновой кислоты, содержащих первую нуклеиновую кислоту, кодирующую Cas9 *Staphylococcus aureus* (SaCas9) или *Staphylococcus lugdunensis* (SluCas9), и i) по меньшей мере одну, по меньшей мере две или по меньшей мере три направляющие РНК; или ii) от одной до n направляющих РНК, где n равно максимальному количеству направляющих РНК, которые могут быть экспрессированы из указанной нуклеиновой кислоты; или iii) от одной до трех направляющих РНК; и вторую нуклеиновую кислоту, которая не кодирует SaCas9 или SluCas9, где вторая нуклеиновая кислота необязательно содержит любой из i) по меньшей мере одного, по меньшей мере двух, по меньшей мере трех, по меньшей мере четырех, по меньшей мере пяти или по меньшей мере шести направляющих РНК; или ii) от одной до n направляющих РНК, где n равно максимальному количеству направляющих РНК, которые могут быть экспрессированы из указанной нуклеиновой кислоты; или iii) от одной до шести направляющих РНК.

В некоторых вариантах осуществления предложен композиция, содержащая, состоящая из или по существу состоящая из по меньшей мере двух молекул нуклеиновой кислоты, содержащих первую нуклеиновую кислоту, кодирующую Cas9 *Staphylococcus aureus* (SaCas9) или *Staphylococcus lugdunensis* (SluCas9), и по меньшей мере одну, по меньшей мере две, или по меньшей мере три направляющие РНК; и вторую нуклеиновую кислоту, которая не кодирует SaCas9 или SluCas9 и кодирует от одной до шести направляющих РНК.

В некоторых вариантах осуществления предложена композиция, содержащая, состоящая из или по существу состоящая из по меньшей мере двух молекул нуклеиновой кислоты, содержащих первую нуклеиновую кислоту, кодирующую Cas9 *Staphylococcus aureus* (SaCas9) или *Staphylococcus lugdunensis* (SluCas9), и по меньшей мере две направляющие РНК, где по меньшей мере одна направляющая РНК связывается выше вырезаемой последовательности, и по меньшей мере одна направляющая РНК связывается ниже вырезаемой последовательности; и вторую нуклеиновую кислоту, которая не кодирует SaCas9 или SluCas9 и кодирует по меньшей мере одну дополнительную копию направляющих РНК, закодированных в первой нуклеиновой кислоте. В некоторых вариантах осуществления направляющая РНК вырезает часть гена DMD, необязательно экзон, интрон или соединение экзон/интрон.

В некоторых вариантах осуществления предложена композиция, содержащая, состоящая из или по существу состоящая из по меньшей мере двух молекул нуклеиновой кислоты, содержащих первую нуклеиновую кислоту, кодирующую Cas9 *Staphylococcus aureus* (SaCas9) или *Staphylococcus lugdunensis* (SluCas9), и первую и вторую направляющие РНК, которые вырезают часть гена DMD; и вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую по меньшей мере 2 или по меньшей мере 3 копии первой направляющей РНК и по меньшей мере 2 или по меньшей мере 3 копии второй направляющей РНК.

В некоторых вариантах осуществления предложена композиция, содержащая, состоящая из или по существу состоящая из одной или более молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих эндонуклеазу, и пары направляющих РНК, где каждая направляющая РНК нацелена на отличную последовательность в гене DMD, где эндонуклеаза и пара направляющих РНК способна вырезать целевую последовательность в ДНК длиной от 5 до 250 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления эндонуклеаза представляет собой эндонуклеазу Cas класса 2 типа II. В некоторых вариантах осуществления эндонуклеаза Cas класса 2 типа II представляет собой SpCas9, SaCas9 или SluCas9. В некоторых вариантах осуществления эндонуклеаза не является эндонуклеазой Cas класса 2 типа V. В некоторых вариантах осуществления вырезаемая целевая последовательность содержит сайт акцептора сплайсинга или сайт донора сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления вырезаемая целевая последовательность содержит преждевременный стоп-кодон в гене DMD. В некоторых вариантах осуществления вырезаемая целевая последовательность не содержит весь экзон гена DMD. В некоторых вариантах осуществления любой из способов и/или рибонуклеопротеиновых комплексов,

описанных в данном документе, не разрушает/специфически не изменяет последовательность сайта акцептора сплайсинга, сайта донора сплайсинга или сайта преждевременного стоп-кодона.

В некоторых вариантах осуществления направляющая РНК в композиции содержит любое из следующего:

а. когда используется SaCas9, одну или более спейсерных последовательностей, выбранных из любой из SEQ ID NO: 1-35, 1000-1078 и 3000-3069; или

б. когда используется SluCas9a, одна или более спейсерных последовательностей, выбранных из любой из SEQ ID NO: 100-225, 2000-2116 и 4000-4251; или

с. когда используется SaCas9, одна или более спейсерных последовательностей, содержащих по меньшей мере 17, 18, 19, или 20 смежных нуклеотидов спейсерной последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 1-35, 1000-1078 и 3000-3069; или

д. когда используется SluCas9a, одна или более спейсерных последовательностей, содержащих по меньшей мере 17, 18, 19, или 20 смежных нуклеотидов спейсерной последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 100-225, 2000-2116 и 4000-4251; или

е. когда используется SaCas9, одна или более спейсерных последовательностей, которые имеют по меньшей мере 90% идентичности с любой из SEQ ID NO: 1-35, 1000-1078 и 3000-3069; или

ф. когда используется SluCas9a, одна или более спейсерных последовательностей, которые имеют по меньшей мере 90% идентичности с любой из SEQ ID NO: 100-225, 2000-2116 и 4000-4251; или

г. когда SaCas9 используется по меньшей мере с двумя направляющими РНК, первая и вторая спейсерные последовательности выбраны из любой из SEQ ID NO: 10 и 15; 10 и 16; 12 и 16; 1001 и 1005; 1001 и 15; 1001 и 16; 1003 и 1005; 16 и 1003; 12 и 1010; 12 и 1012; 12 и 1013; 10 и 1016; 1017 и 1005; 1017 и 16; 1018 и 16; 15 и 10; 16 и 10; 16 и 12; 1005 и 1001; 15 и 1001; 16 и 1001; 1005 и 1003; 1003 и 16; 1010 и 12; 1012 и 12; 1013 и 12; 1016 и 10; 1005 и 1017; 16 и 1017; и 16 и 1018; или

и. когда SaCas9 используется по меньшей мере с двумя направляющими РНК, по меньшей мере 17, 18, 19, 20 или 21 смежный нуклеотид первой и второй спейсерной последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 10 и 15; 10 и 16; 12 и 16; 1001 и 1005; 1001 и 15; 1001 и 16; 1003 и 1005; 16 и 1003; 12 и 1010; 12 и 1012; 12 и 1013; 10 и 1016; 1017 и 1005; 1017 и 16; 1018 и 16; 15 и 10; 16 и 10; 16 и 12; 1005 и 1001; 15 и 1001; 16 и 1001; 1005 и 1003; 1003 и 16; 1010 и 12; 1012 и 12; 1013 и 12; 1016 и 10; 1005 и 1017; 16 и 1017; и 16 и 1018; или

і. когда SaCas9 используется по меньшей мере с двумя направляющими РНК, по меньшей мере на 90% идентичными первой и второй спейсерной последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 10 и 15; 10 и 16; 12 и 16; 1001 и 1005; 1001 и 15; 1001 и 16; 1003 и 1005; 16 и 1003; 12 и 1010; 12 и 1012; 12 и 1013; 10 и 1016; 1017 и 1005; 1017 и 16; 1018 и 16; 15 и 10; 16 и 10; 16 и 12; 1005 и 1001; 15 и 1001; 16 и 1001; 1005 и 1003; 1003

и 16; 1010 и 12; 1012 и 12; 1013 и 12; 1016 и 10; 1005 и 1017; 16 и 1017; и 16 и 1018; или

j. когда SluCas9 используется по меньшей мере с двумя направляющими РНК, первая и вторая спейсерные последовательности выбраны из любой из SEQ ID NO: 148 и 134; 149 и 135; 150 и 135; 131 и 136; 151 и 136; 139 и 131; 139 и 151; 140 и 131; 140 и 151; 141 и 148; 144 и 149; 144 и 150; 145 и 131; 145 и 151; 146 и 148; 134 и 148; 135 и 149; 135 и 150; 136 и 131; 136 и 151; 131 и 139; 151 и 139; 131 и 140; 151 и 140; 148 и 141; 149 и 144; 150 и 144; 131 и 145; 151 и 145; и 148 и 146; или

k. когда SluCas9 используется по меньшей мере с двумя направляющими РНК, по меньшей мере 17, 18, 19, 20 или 21 смежный нуклеотид первой и второй спейсерной последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 148 и 134; 149 и 135; 150 и 135; 131 и 136; 151 и 136; 139 и 131; 139 и 151; 140 и 131; 140 и 151; 141 и 148; 144 и 149; 144 и 150; 145 и 131; 145 и 151; 146 и 148; 134 и 148; 135 и 149; 135 и 150; 136 и 131; 136 и 151; 131 и 139; 151 и 139; 131 и 140; 151 и 140; 148 и 141; 149 и 144; 150 и 144; 131 и 145; 151 и 145; и 148 и 146; или

l. когда SluCas9 используется по меньшей мере с двумя направляющими РНК, по меньшей мере на 90% идентичными первой и второй спейсерной последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 148 и 134; 149 и 135; 150 и 135; 131 и 136; 151 и 136; 139 и 131; 139 и 151; 140 и 131; 140 и 151; 141 и 148; 144 и 149; 144 и 150; 145 и 131; 145 и 151; 146 и 148; 134 и 148; 135 и 149; 135 и 150; 136 и 131; 136 и 151; 131 и 139; 151 и 139; 131 и 140; 151 и 140; 148 и 141; 149 и 144; 150 и 144; 131 и 145; 151 и 145; и 148 и 146; или

m. когда SluCas9 используется по меньшей мере с двумя направляющими РНК, по меньшей мере на 90% идентичными первой и второй спейсерной последовательности, выбранной из любой из:

- i. SEQ ID NO: 148 и 134,
- ii. SEQ ID NO: 145 и 131,
- iii. SEQ ID NO: 144 и 149;
- iv. SEQ ID NO: 144 и 150; и
- v. SEQ ID NO: 146 и 148; или

n. когда SaCas9 используется по меньшей мере с двумя направляющими РНК, по меньшей мере на 90% идентичными первой и второй спейсерной последовательности, выбранной из любой из:

- i. SEQ ID NO: 12 и 1013; и
- ii. SEQ ID NO: 12 и 1016.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к композиции, содержащей: а) одну или более молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих SluCas9, и б) первую спейсерную последовательность и вторую спейсерную последовательность, выбранные из SEQ ID NO: 148 и 134. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит: а) одну или более молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих SluCas9, и б) первую спейсерную последовательность и вторую спейсерную последовательность, выбранные из SEQ ID NO: 145 и 131. В некоторых вариантах

осуществления композиция содержит: а) одну или более молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих SluCas9, и б) первую спейсерную последовательность и вторую спейсерную последовательность, выбранные из SEQ ID NO: 144 и 149. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит: а) одну или более молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих SluCas9, и б) первую спейсерную последовательность и вторую спейсерную последовательность, выбранные из SEQ ID NO: 144 и 150. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит: а) одну или более молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих SluCas9, и б) первую спейсерную последовательность и вторую спейсерную последовательность, выбранные из SEQ ID NO: 146 и 148. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит: а) одну или более молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих SaCas9 (например, SaCas9-KKH), и б) первую спейсерную последовательность и вторую спейсерную последовательность, выбранные из SEQ ID NO: 12 и 1013. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит: а) одну или более молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих SaCas9 (например, SaCas9-KKH), и б) первую спейсерную последовательность и вторую спейсерную последовательность, выбранные из SEQ ID NO: 12 и 1016.

В некоторых вариантах осуществления одна или более направляющих РНК направляют Cas9 к сайту в любом из экзонов 43, 44, 45, 50, 51 или 53 дистрофина или рядом с ним. Например, Cas9 может быть направлен на разрезание в пределах 10, 20, 30, 40 или 50 нуклеотидов от целевой последовательности.

В данном описании может упоминаться «первый и второй спейсер» или «первая и вторая направляющая РНК, нРНК или онРНК», за которыми следует одна или более пар конкретных последовательностей. Следует отметить, что порядок последовательностей в паре не ограничивается порядком, в котором они представлены. Например, фраза «первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 10 и 15» может означать, что первая онРНК содержит последовательность SEQ ID NO: 10, а вторая последовательность онРНК содержит последовательность SEQ ID NO: 15, или эта фраза может означать, что первая онРНК содержит последовательность SEQ ID NO: 15, а вторая последовательность онРНК содержит последовательность SEQ ID NO: 10.

В некоторых вариантах осуществления предложена композиция, содержащая одиночную молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую одну или более направляющих РНК и Cas9, где одиночная молекула нуклеиновой кислоты содержит:

а. первую нуклеиновую кислоту, кодирующую одну или более спейсерных последовательностей, выбранных из любой из SEQ ID NO: 1-35, 1000-1078 или 3000-3069, и вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую Cas9 *Staphylococcus aureus* (SaCas9);

б. первую нуклеиновую кислоту, кодирующую одну или более спейсерных последовательностей, выбранных из любой из SEQ ID NO: 100-225, 2000-2116 или 4000-4251 и вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую *Staphylococcus lugdunensis* (SluCas9);

с. первую нуклеиновую кислоту, кодирующую одну или более спейсерных последовательностей, содержащих по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных

нуклеотидов спейсерной последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 1-35, 1000-1078 или 3000-3069, и вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую Cas9 *Staphylococcus aureus* (SaCas9);

d. первую нуклеиновую кислоту, кодирующую одну или более спейсерных последовательностей, содержащих по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов спейсерной последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 100-225, 2000-2116 или 4000-4251 и вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую *Staphylococcus lugdunensis* (SluCas9);

e. первую нуклеиновую кислоту, кодирующую одну или более спейсерных последовательностей, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с любой из SEQ ID NO: 1-35, 1000-1078 или 3000-3069, и вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую Cas9 *Staphylococcus aureus* (SaCas9);

f. первую нуклеиновую кислоту, кодирующую одну или более спейсерных последовательностей, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с любой из SEQ ID NO: 100-225, 2000-2116 или 4000-4251 и вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую *Staphylococcus lugdunensis* (SluCas9);

g. первую нуклеиновую кислоту, кодирующую пару направляющих РНК, содержащих первую и вторую спейсерные последовательности, выбранные из любой из SEQ ID NO: 10 и 15; 10 и 16; 12 и 16; 1001 и 1005; 1001 и 15; 1001 и 16; 1003 и 1005; 16 и 1003; 12 и 1010; 12 и 1012; 12 и 1013; 10 и 1016; 1017 и 1005; 1017 и 16; 1018 и 16; 15 и 10; 16 и 10; 16 и 12; 1005 и 1001; 15 и 1001; 16 и 1001; 1005 и 1003; 1003 и 16; 1010 и 12; 1012 и 12; 1013 и 12; 1016 и 10; 1005 и 1017; 16 и 1017; и 16 и 1018; и вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую Cas9 *Staphylococcus aureus* (SaCas9);

h. первую нуклеиновую кислоту, кодирующую пару направляющих РНК, содержащую по меньшей мере 17, 18, 19, 20 или 21 смежных нуклеотид первой и второй спейсерных последовательностей, выбранных из любой из SEQ ID NO: 10 и 15; 10 и 16; 12 и 16; 1001 и 1005; 1001 и 15; 1001 и 16; 1003 и 1005; 16 и 1003; 12 и 1010; 12 и 1012; 12 и 1013; 10 и 1016; 1017 и 1005; 1017 и 16; 1018 и 16; 15 и 10; 16 и 10; 16 и 12; 1005 и 1001; 15 и 1001; 16 и 1001; 1005 и 1003; 1003 и 16; 1010 и 12; 1012 и 12; 1013 и 12; 1016 и 10; 1005 и 1017; 16 и 1017; и 16 и 1018; и вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую Cas9 *Staphylococcus aureus* (SaCas9);

i. первую нуклеиновую кислоту, кодирующую пару направляющих РНК, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с первой и второй спейсерными последовательностями, выбранными из любой из SEQ ID NO: 10 и 15; 10 и 16; 12 и 16; 1001 и 1005; 1001 и 15; 1001 и 16; 1003 и 1005; 16 и 1003; 12 и 1010; 12 и 1012; 12 и 1013; 10 и 1016; 1017 и 1005; 1017 и 16; 1018 и 16; 15 и 10; 16 и 10; 16 и 12; 1005 и 1001; 15 и 1001; 16 и 1001; 1005 и 1003; 1003 и 16; 1010 и 12; 1012 и 12; 1013 и 12; 1016 и 10; 1005 и 1017; 16 и 1017; и 16 и 1018; и вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую Cas9 *Staphylococcus aureus* (SaCas9);

j. первую нуклеиновую кислоту, кодирующую пару направляющих РНК,

содержащих первую и вторую спейсерные последовательности, выбранные из любой из SEQ ID NO: 148 и 134; 149 и 135; 150 и 135; 131 и 136; 151 и 136; 139 и 131; 139 и 151; 140 и 131; 140 и 151; 141 и 148; 144 и 149; 144 и 150; 145 и 131; 145 и 151; 146 и 148; 134 и 148; 135 и 149; 135 и 150; 136 и 131; 136 и 151; 131 и 139; 151 и 139; 131 и 140; 151 и 140; 148 и 141; 149 и 144; 150 и 144; 131 и 145; 151 и 145; и 148 и 146; и вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую *Staphylococcus lugdunensis* (SluCas9);

k. первую нуклеиновую кислоту, кодирующую пару направляющих РНК, содержащую по меньшей мере 17, 18, 19, 20 или 21 смежный нуклеотид первой и второй спейсерных последовательностей, выбранных из любой из SEQ ID NO: 148 и 134; 149 и 135; 150 и 135; 131 и 136; 151 и 136; 139 и 131; 139 и 151; 140 и 131; 140 и 151; 141 и 148; 144 и 149; 144 и 150; 145 и 131; 145 и 151; 146 и 148; 134 и 148; 135 и 149; 135 и 150; 136 и 131; 136 и 151; 131 и 139; 151 и 139; 131 и 140; 151 и 140; 148 и 141; 149 и 144; 150 и 144; 131 и 145; 151 и 145; и 148 и 146; и вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую *Staphylococcus lugdunensis* (SluCas9);

l. первую нуклеиновую кислоту, кодирующую пару направляющих РНК, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с первой и второй спейсерными последовательностями, выбранными из любой из SEQ ID NO: 148 и 134; 149 и 135; 150 и 135; 131 и 136; 151 и 136; 139 и 131; 139 и 151; 140 и 131; 140 и 151; 141 и 148; 144 и 149; 144 и 150; 145 и 131; 145 и 151; 146 и 148; 134 и 148; 135 и 149; 135 и 150; 136 и 131; 136 и 151; 131 и 139; 151 и 139; 131 и 140; 151 и 140; 148 и 141; 149 и 144; 150 и 144; 131 и 145; 151 и 145; и 148 и 146; и вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую *Staphylococcus lugdunensis* (SluCas9);

m. первую нуклеиновую кислоту, кодирующую пару направляющих РНК, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с первой и второй спейсерными последовательностями, выбранными из любой из:

- i. SEQ ID NO: 148 и 134,
- ii. SEQ ID NO: 145 и 131,
- iii. SEQ ID NO: 144 и 149;
- iv. SEQ ID NO: 144 и 150;

v. SEQ ID NO: 146 и 148; и вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую *Staphylococcus lugdunensis* (SluCas9); или

n. первую нуклеиновую кислоту, кодирующую пару направляющих РНК, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с первой и второй спейсерными последовательностями, выбранными из любой из:

- i. SEQ ID NO: 12 и 1013; и
- ii. SEQ ID NO: 12 и 1016; и вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую Cas9 *Staphylococcus aureus* (SaCas9).

В некоторых вариантах осуществления предложена композиция, содержащая, состоящая из или по существу состоящая из одной или более молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих *Staphylococcus lugdunensis* (SluCas9), и по меньшей мере двух

направляющих РНК, где первая и вторая направляющие РНК нацелены на разные последовательности в гене DMD, где первая и вторая направляющая РНК содержат последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с первой и второй спейсерной последовательностями, выбранными из любой из:

- i. SEQ ID NO: 148 и 134,
- ii. SEQ ID NO: 145 и 131,
- iii. SEQ ID NO: 144 и 149;
- iv. SEQ ID NO: 144 и 150;
- v. SEQ ID NO: 146 и 148.

В некоторых вариантах осуществления предложена композиция, содержащая, состоящая из или по существу состоящая из одной или более молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих эндонуклеазу, и по меньшей мере двух направляющих РНК, где каждая направляющая РНК нацелена на другую последовательность в гене DMD, где каждая направляющая РНК содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с первой и второй спейсерной последовательностями, выбранной из любой из:

- i. SEQ ID NO: 12 и 1013; и
- ii. SEQ ID NO: 12 и 1016; и

второй нуклеиновой кислоты, кодирующей Cas9 *Staphylococcus aureus* (SaCas9).

В некоторых вариантах осуществления первая и/или вторая нуклеиновая кислота, если она присутствует, содержит по меньшей мере две направляющие РНК. В некоторых вариантах осуществления первая и/или вторая нуклеиновая кислота, если она присутствует, содержит по меньшей мере три направляющие РНК. В некоторых вариантах осуществления первая и/или вторая нуклеиновая кислота, если она присутствует, содержит по меньшей мере четыре направляющие РНК. В некоторых вариантах осуществления первая и/или вторая нуклеиновая кислота, если она присутствует, содержит по меньшей мере пять направляющих РНК. В некоторых вариантах осуществления первая и/или вторая нуклеиновая кислота, если она присутствует, содержит по меньшей мере шесть направляющих РНК. В некоторых вариантах осуществления первая нуклеиновая кислота содержит эндонуклеазу и по меньшей мере одну, по меньшей мере две или по меньшей мере три направляющие РНК. В некоторых вариантах осуществления первая нуклеиновая кислота содержит эндонуклеазу и от одной до n направляющих РНК, где n не превышает максимальное количество направляющих РНК, которые могут быть экспрессированы из указанной нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления первая нуклеиновая кислота содержит эндонуклеазу и от одной до трех направляющих РНК.

В некоторых вариантах осуществления вторая нуклеиновая кислота, если она присутствует, кодирует по меньшей мере одну, по меньшей мере две, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять или по меньшей мере шесть направляющих РНК. В некоторых вариантах осуществления вторая нуклеиновая кислота, если она присутствует, кодирует от одной до n направляющих РНК, где n равно максимальному

количеству направляющих РНК, которые могут быть экспрессированы из указанной нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления вторая нуклеиновая кислота, если присутствует, кодирует от одной до шести направляющих РНК. В некоторых вариантах осуществления вторая нуклеиновая кислота, если она присутствует, кодирует 2-10, 2-9, 2-8, 2-7, 2-6, 2-5, 2-4 или 2-3 направляющих РНК. В некоторых вариантах осуществления вторая нуклеиновая кислота, если она присутствует, кодирует 2, 3, 4, 5 или 6 направляющих РНК.

В некоторых вариантах осуществления, содержащих по меньшей мере две молекулы нуклеиновой кислоты, направляющая РНК, кодируемая первой нуклеиновой кислотой и второй нуклеиновой кислотой, является одной и той же. В некоторых вариантах осуществления, содержащих по меньшей мере две молекулы нуклеиновой кислоты, направляющие РНК, кодируемые первой нуклеиновой кислотой и второй нуклеиновой кислотой, отличаются друг от друга. В некоторых вариантах осуществления, содержащих по меньшей мере две молекулы нуклеиновой кислоты, по меньшей мере одна направляющая РНК связывается с целевой последовательностью в экзоне гена DMD, который расположен выше преждевременного стоп-кодона, и где по меньшей мере одна направляющая РНК связывается с целевой последовательностью в экзоне гена DMD, который расположен ниже преждевременного стоп-кодона. В некоторых вариантах осуществления, содержащих по меньшей мере две молекулы нуклеиновой кислоты, одна и та же направляющая РНК кодируется нуклеиновой кислотой первой и второй молекулы нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления, содержащих по меньшей мере две молекулы нуклеиновой кислоты, вторая молекула нуклеиновой кислоты кодирует направляющую РНК, которая связывается с той же последовательностью-мишенью, что и направляющая РНК в первой молекуле нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления, содержащих по меньшей мере две молекулы нуклеиновой кислоты, вторая молекула нуклеиновой кислоты кодирует по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5 или по меньшей мере 6 направляющих РНК, где направляющие РНК во второй молекуле нуклеиновой кислоты связываются с той же целевой последовательностью, что и направляющая РНК в первой молекуле нуклеиновой кислоты.

В некоторых вариантах осуществления направляющая РНК связывается с одной или более целевыми последовательностями в гене DMD. В некоторых вариантах осуществления направляющая РНК связывается с одной или более целевыми последовательностями в экзоне гена DMD. В некоторых вариантах осуществления, содержащих две направляющие РНК, i) каждая направляющая РНК нацелена на последовательность в экзоне; ii) одна направляющая РНК нацелена на последовательность в экзоне, а другая нацелена на последовательность в интроне; или iii) каждая направляющая РНК нацелена на последовательность в интроне.

В некоторых вариантах осуществления, включающих по меньшей мере две направляющие РНК, i) каждая направляющая РНК нацелена на одну и ту же геномную

целевую последовательность; ii) каждая направляющая РНК нацелена на другую целевую последовательность; или iii) по меньшей мере одна направляющая РНК нацелена на одну последовательность, а по меньшей мере одна направляющая РНК нацелена на отличную последовательность.

В некоторых вариантах осуществления, включающих направляющую РНК, которая связывается с экзоном гена DMD, экзон выбран из экзонов 43, 44, 45, 50, 51 и 53.

В некоторых вариантах осуществления, включающих по меньшей мере две направляющие РНК, которые связываются с экзоном гена DMD, по меньшей мере одна направляющая РНК связывается с целевой последовательностью в экзоне гена DMD, и по меньшей мере одна направляющая РНК связывается с отличной целевой последовательностью в том же экзоне гена DMD.

В некоторых вариантах осуществления, включающих по меньшей мере две направляющие РНК, по меньшей мере одна направляющая РНК связывается с целевой последовательностью в экзоне, расположенном выше преждевременного стоп-кодона, и по меньшей мере одна направляющая РНК связывается с целевой последовательностью в экзоне, расположенном ниже преждевременного стоп-кодона.

В некоторых вариантах осуществления, содержащих по меньшей мере две направляющие РНК, по меньшей мере одна направляющая РНК связывается с целевой последовательностью в экзоне гена DMD, и по меньшей мере одна направляющая РНК связывается с отличной целевой последовательностью в том же экзоне гена DMD, где при экспрессии *in vivo* или *in vivo* часть экзона вырезается. В некоторых вариантах осуществления, включающих по меньшей мере две направляющие РНК, где после экспрессии *in vivo* или *in vivo* направляющие РНК вырезают часть экзона.

В некоторых вариантах осуществления, включающих по меньшей мере две направляющие РНК, причем после экспрессии *in vivo* или *in vivo* направляющие РНК вырезают часть экзона, и где часть экзона, оставшаяся после вырезания, повторно соединяется с вставкой из одного нуклеотида. В некоторых вариантах осуществления, включающих по меньшей мере две направляющие РНК, где после экспрессии *in vivo* или *in vivo* направляющие РНК вырезают часть экзона, где часть экзона, оставшаяся после вырезания, повторно соединяется без нуклеотидной вставки.

В некоторых вариантах осуществления, включающих по меньшей мере две направляющие РНК, где после экспрессии *in vivo* или *in vivo* направляющие РНК вырезают часть экзона, где вырезаемая часть экзона имеет длину от 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 или 20 до 250 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления, включающих по меньшей мере две направляющие РНК после экспрессии *in vivo* или *in vivo*, направляющие РНК вырезают часть экзона, где вырезаемая часть экзона имеет размер 5-250, 5-200, 5-150, 5-100, 5-75, 5-50, 5-25, 5-10, 20-250, 20-200, 20-150, 20-100, 20-75, 20-50, 20-25, 50-250, 50-200, 50-150, 50-100, и 50-75 нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления, включающих по меньшей мере две направляющие РНК, где после экспрессии *in vivo* или *in vivo* направляющие РНК вырезают

часть экзона, где вырезаемая часть экзона имеет размер 8-167 нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления направляющая РНК и Cas9 представлены в одиночной молекуле нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления одиночная молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую направляющую РНК, и нуклеиновую кислоту, кодирующую SaCas9 или SluCas9. В некоторых вариантах осуществления в одиночной молекуле нуклеиновой кислоты представлены две направляющие РНК и Cas9. В некоторых вариантах осуществления одиночная молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую первую направляющую РНК, нуклеиновую кислоту, кодирующую вторую направляющую РНК, и нуклеиновую кислоту, кодирующую SaCas9 или SluCas9. В некоторых вариантах осуществления спейсерные последовательности первой и второй направляющих РНК идентичны. В некоторых вариантах осуществления спейсерные последовательности первой и второй направляющих РНК не идентичны.

В некоторых вариантах осуществления одиночная молекула нуклеиновой кислоты представляет собой одиночный вектор. В некоторых вариантах осуществления одиночный вектор экспрессирует одну или две направляющие РНК и Cas9 в соответствии со схемами на **Фиг. 1**. В некоторых вариантах осуществления направляющая РНК и Cas9 представлены в одном векторе. В некоторых вариантах осуществления одиночный вектор содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую направляющую РНК, и нуклеиновую кислоту, кодирующую SaCas9 или SluCas9. В некоторых вариантах осуществления две направляющие РНК и Cas9 представлены в одиночном векторе. В некоторых вариантах осуществления одиночный вектор содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую первую направляющую РНК, нуклеиновую кислоту, кодирующую вторую направляющую РНК, и нуклеиновую кислоту, кодирующую SaCas9 или SluCas9. В некоторых вариантах осуществления спейсерные последовательности первой и второй направляющих РНК идентичны. В некоторых вариантах осуществления спейсерные последовательности первой и второй направляющих РНК не идентичны.

Каждая из направляющих последовательностей, показанных в **таблице 1А**, **таблице 1В** и **таблице 5**, может дополнительно содержать дополнительные нуклеотиды для формирования или кодирования sgРНК, например, с использованием любой известной последовательности, подходящей для используемого Cas9. В некоторых вариантах осуществления sgРНК содержит (от 5' к 3') по меньшей мере спейсерную последовательность и первый комплементарный домен. Первый комплементарный домен в достаточной степени комплементарен второму комплементарному домену, который может быть частью той же молекулы в случае онРНК или в tracrРНК в случае двойной или модульной нРНК, для образования дуплекса. См., например, US 2017/0007679 для подробного обсуждения доменов sgРНК и нРНК, включая первый и второй комплементарные домены.

Одномолекулярная направляющая РНК (онРНК) может содержать в направлении от 5' к 3' необязательную последовательность, удлиняющую спейсер, последовательность

спейсера, минимальную последовательность повторов CRISPR, одномолекулярный направляющий линкер, минимальную последовательность tracrPНК, 3'-последовательность tracrPНК и/или необязательную последовательность, удлиняющую tracrPНК. Необязательное удлинение tracrPНК может содержать элементы, которые придают дополнительную функциональность (например, стабильность) направляющей PНК. Одномолекулярный направляющий линкер может связать минимальный повтор CRISPR и минимальную последовательность tracrPНК, чтобы сформировать структуру шпильки. Необязательное удлинение tracrPНК может содержать одну или более шпилек. В конкретных вариантах осуществления изобретение относится к онPНК, содержащей спейсерную последовательность и последовательность tracrPНК.

Иллюстративная каркасная последовательность, подходящая для использования с SaCas9, которая следует за направляющей последовательностью на ее 3'-конце, представляет собой:

GTTTAAGTACTCTGTGCTGGAAACAGCACAGAATCTACTTAAACAAGGCAAA
ATGCCGTGTTTATCTCGTCAACTTGTTGGCGAGA (SEQ ID NO: 500) в ориентации от 5' к 3'. В некоторых вариантах осуществления иллюстративная каркасная последовательность для использования с SaCas9, которая следует за 3'-концом направляющей последовательности собой последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с SEQ ID NO: 500, или последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 500 не более чем на 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 или 25 нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления можно использовать вариант каркасной последовательности SaCas9. В некоторых вариантах осуществления каркас SaCas9, следующий за направляющей последовательностью на ее 3'-конце, называется «SaScaffoldV1» и представляет собой:

GTTTTAGTACTCTGGAAACAGAATCTACTAAAACAAGGCAAAATGCCGTGTT
TATCTCGTCAACTTGTTGGCGAGAT (SEQ ID NO: 501) в ориентации от 5' к 3'. В некоторых вариантах осуществления иллюстративная каркасная последовательность для использования с SaCas9, которая следует за 3'-концом направляющей последовательности, представляет собой последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с SEQ ID NO: 910, или последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 910 не более чем на 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 или 25 нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления можно использовать вариант каркасной последовательности SaCas9. В некоторых вариантах осуществления каркас SaCas9, который следует за направляющей последовательностью на ее 3'-конце, называется «SaScaffoldV2» и представляет собой:

GTTTAAGTACTCTGTGCTGGAAACAGCACAGAATCTACTTAAACAAGGCAAA
ATGCCGTGTTTATCTCGTCAACTTGTTGGCGAGAT (SEQ ID NO: 502) в ориентации от 5' к 3'. В некоторых вариантах осуществления иллюстративная каркасная

последовательность для использования с SaCas9, которая следует за 3'-концом направляющей последовательности, представляет собой последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94% 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с SEQ ID NO: 911, или последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 911 не более чем на 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 или 25 нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления можно использовать вариант каркасной последовательности SaCas9. В некоторых вариантах осуществления каркас SaCas9, следующий за направляющей последовательностью на ее 3'-конце, называется «SaScaffoldV3» и представляет собой:

GTTTAAGTACTCTGGAAACAGAATCTACTTAAACAAGGCAAAATGCCGTGTT
TATCTCGTCAACTTGTTGGCGAGAT (SEQ ID NO: 503) в ориентации от 5' к 3'. В некоторых вариантах осуществления иллюстративная каркасная последовательность для использования с SaCas9, которая следует за 3'-концом направляющей последовательности, представляет собой последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94% 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с SEQ ID NO: 912, или последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 912 не более чем на 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 или 25 нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления можно использовать вариант каркасной последовательности SaCas9. В некоторых вариантах осуществления каркас SaCas9, следующий за направляющей последовательностью на ее 3'-конце, называется «SaScaffoldV5» и представляет собой:

GTTTCAGTACTCTGGAAACAGAATCTACTGAAACAAGGCAAAATGCCGTGTT
TATCTCGTCAACTTGTTGGCGAGAT (SEQ ID NO: 932) в ориентации от 5' к 3'. В некоторых вариантах осуществления иллюстративная каркасная последовательность для использования с SaCas9, которая следует за 3'-концом направляющей последовательности, представляет собой последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94% 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с SEQ ID NO: 932, или последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 932 не более чем на 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 или 25 нуклеотидов.

Две иллюстративные каркасные последовательности, подходящие для использования с SluCas9, которые следуют за направляющей последовательностью на ее 3'-конце:

GTTTTAGTACTCTGGAAACAGAATCTACTGAAACAAGACAATATGTCGTGTTT
ATCCCATCAATTTATTGGTGGGA (SEQ ID NO: 900), и

GTTTAAGTACTCTGTGCTGGAAACAGCACAGAATCTACTGAAACAAGACAAT
ATGTCGTGTTTATCCCATCAATTTATTGGTGGGA (SEQ ID NO: 601) в ориентации от 5' к 3'. В некоторых вариантах осуществления иллюстративная последовательность для использования с SluCas9, которая следует за 3'-концом направляющей последовательности, представляет собой последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94% 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с SEQ ID NO: 900

или SEQ ID NO: 601, или последовательность, которая отличается от SEQ ID NO: 900 или SEQ ID NO: 601 не более чем на 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 или 25 нуклеотидов.

Иллюстративные каркасные последовательности, подходящие для использования с SluCas9, которые следуют за направляющей последовательностью на ее 3'-конце, также показаны ниже в ориентации от 5' к 3':

Каркас, ID	SEQ ID NO	Каркасная последовательность\ (от 5' к 3')	Гомологи я Slu v5	Полоса гомологии Slu v5 (кол-во нуклеотидов)
Дикий тип	900	GTTT TAGTACTCTGGAAACAGAATCTAC TGAAACAAGACAATATGTCGTGTTTATC CCATCAATTTATTGGTGGGAT	Н/Д	Н/Д
Slu- VCGT- 4.5	601	GTTTAAGTACTCTGTGCTGGAAACAGC ACAGAATCTACTGAAACAAGACAATAT GTCGTGTTTATCCCATCAATTTATTGGT GGGA	Н/Д	Н/Д
Slu_v5	901	GTTTCAGTACTCTGGAAACAGAATCTAC TGAAACAAGACAATATGTCGTGTTTATC CCATCAATTTATTGGTGGGAT	100,00%	77
Slu_v5-1	902	GTTTggTaACcTaGGAAACTagATCTTaccA AACAAGACAATATGTCGTGTTTATCCCA TCAATTTATTGGTGGGAT	87,50%	47
Slu_v5-2	903	GTTTCAGTACTCTGGAAACAGAATCTAC TGAAACAAGgCAaATGcCGTGTTTATC CCATCAATTTATTGGTGGGAT	96,10%	37
Slu_v5-3	904	GTTTCAGTACTCTGGAAACAGAATCTAC TGAAACAAGACAATATGTCGcgcccaTCC CATCAATTTATTGGTGGGAT	94,81%	48
Slu_v5-4	905	GTTTCAGTACTCTGGAAACAGAATCTAC TGAAACAAGACAATATGTCGTGTTTATg ggTTgAATTTATTcGaccAT	91,55%	55
Slu_v5-5	906	GTTTggTaACcTaGGAAACTagATCTTaccA AACAAGgCAaATGcCGTGTTTATCCCA TCAATTTATTGGTGGGAT	83,75%	31
Slu_v5-6	907	GTTTggTaACcTaGGAAACTagATCTTaccA AACAAGACAATATGTCGcgcccaTCCCAT CAATTTATTGGTGGGAT	82,50%	23

Slu_v5-7	908	GTTTggTaACcTaGGAAACTagATCTTaccA AACAAGACAATATGTCGTGTTTATgggTT gAATTTATTcGaccAT	78,38%	25
Slu_v5-8	909	GTTTCAGTACTCTGGAAACAGAATCTAC TGAAACAAGgCAaAATGcCGcgcccaTCCC ATCAATTTATTGGTGGGAT	90,91%	37
Slu_v5-9	910	GTTTCAGTACTCTGGAAACAGAATCTAC TGAAACAAGgCAaAATGcCGTGTTTATgg gTTgAATTTATTcGaccAT	87,32%	37
Slu_v5-10	911	GTTTCAGTACTCTGGAAACAGAATCTAC TGAAACAAGACAATATGTCGcgcccaTggg TTgAATTTATTcGaccAT	82,89%	48
Slu_v5-11	912	GTTTggTaACcTaGGAAACTagATCTTaccA AACAAGgCAaAATGcCGcgcccaTCCCATC AATTTATTGGTGGGAT	78,75%	23
Slu_v5-12	913	GTTTggTaACcTaGGAAACTagATCTTaccA AACAAGgCAaAATGcCGTGTTTATgggTTg AATTTATTcGaccAT	74,32%	9
Slu_v5-13	914	GTTTggTaACcTaGGAAACTagATCTTaccA AACAAGACAATATGTCGcgcccaTgggTTg AATTTATTcGaccAT	70,89%	18
Slu_v5-14	915	GTTTCAGTACTCTGGAAACAGAATCTAC TGAAACAAGgCAaAATGcCGcgcccaTgggT TgAATTTATTcGaccAT	78,95%	37
Slu_v5-15	916	GTTTggTaACcTaGGAAACTagATCTTaccA AACAAGgCAaAATGcCGcgcccaTgggTTgA ATTTATTcGaccAT	67,09%	8
Slu_v4	917	GTTTCAGTACTCTGTGCTGGAAACAGCA CAGAATCTACTGAAACAAGACAATATG TCGTGTTTATCCCATCAATTTATTGGTG GGAT	Н/Д	Н/Д

В некоторых вариантах осуществления каркасная последовательность, подходящая для использования с SluCas9, которая следует за направляющей последовательностью на ее 3'-конце, выбрана из любой из SEQ ID NO: 900 или 601, или 901-917 в ориентации от 5' к 3' (см. ниже). В некоторых вариантах осуществления иллюстративная последовательность для использования с SluCas9, которая следует за 3'-концом направляющей последовательности, представляет собой последовательность, которая имеет по меньшей мере 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или

100% идентичности с любой из SEQ ID NO: 900 или 601, или 901-917, или последовательность, которая отличается от любой из SEQ ID NO: 900 или 601, или 901-917 не более чем на 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 или 25 нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления каркасная последовательность, подходящая для использования с SluCas9, которая следует за направляющей последовательностью на ее 3'-конце, выбрана из любой из SEQ ID NO: 901-917 в ориентации от 5' к 3' (см. ниже). В некоторых вариантах осуществления иллюстративная последовательность для использования с SluCas9, которая следует за 3'-концом направляющей последовательности, представляет собой последовательность, которая имеет по меньшей мере 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с любой из SEQ ID NO: 901-917, или последовательность, которая отличается от любой из SEQ ID NO: 901-917 не более чем на 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 или 25 нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая нРНК, или нуклеиновая кислота, кодирующая пару нРНК, содержит последовательность, содержащую SEQ ID NO: 900. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая нРНК, или нуклеиновая кислота, кодирующая пару нРНК, содержит последовательность, содержащую SEQ ID NO: 601. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая нРНК, или нуклеиновая кислота, кодирующая пару нРНК, содержит последовательность, содержащую SEQ ID NO: 900. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая нРНК, или нуклеиновая кислота, кодирующая пару нРНК, содержит последовательность, содержащую SEQ ID NO: 901. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая нРНК, или нуклеиновая кислота, кодирующая пару нРНК, содержит последовательность, содержащую SEQ ID NO: 902. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая нРНК, или нуклеиновая кислота, кодирующая пару нРНК, содержит последовательность, содержащую SEQ ID NO: 903. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая нРНК, или нуклеиновая кислота, кодирующая пару нРНК, содержит последовательность, содержащую SEQ ID NO: 904. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая нРНК, или нуклеиновая кислота, кодирующая пару нРНК, содержит последовательность, содержащую SEQ ID NO: 905. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая нРНК, или нуклеиновая кислота, кодирующая пару нРНК, содержит последовательность, содержащую SEQ ID NO: 906. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая нРНК, или нуклеиновая кислота, кодирующая пару нРНК, содержит последовательность, содержащую SEQ ID NO: 907. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая нРНК, или нуклеиновая кислота, кодирующая пару нРНК, содержит последовательность, содержащую SEQ ID NO: 908. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая нРНК, или нуклеиновая кислота, кодирующая пару нРНК, содержит последовательность, содержащую SEQ ID NO: 909. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая нРНК, или нуклеиновая кислота, кодирующая пару нРНК, содержит последовательность, содержащую SEQ ID NO: 909. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая нРНК, или нуклеиновая кислота, кодирующая пару нРНК, содержит последовательность, содержащую SEQ ID NO: 909.

нРНК, содержит последовательность, содержащую SEQ ID NO: 910. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая нРНК, или нуклеиновая кислота, кодирующая пару нРНК, содержит последовательность, содержащую SEQ ID NO: 911. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая нРНК, или нуклеиновая кислота, кодирующая пару нРНК, содержит последовательность, содержащую SEQ ID NO: 912. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая нРНК, или нуклеиновая кислота, кодирующая пару нРНК, содержит последовательность, содержащую SEQ ID NO: 913. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая нРНК, или нуклеиновая кислота, кодирующая пару нРНК, содержит последовательность, содержащую SEQ ID NO: 914. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая нРНК, или нуклеиновая кислота, кодирующая пару нРНК, содержит последовательность, содержащую SEQ ID NO: 915. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая нРНК, или нуклеиновая кислота, кодирующая пару нРНК, содержит последовательность, содержащую SEQ ID NO: 916. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая нРНК, или нуклеиновая кислота, кодирующая пару нРНК, содержит последовательность, содержащую SEQ ID NO: 917. В некоторых вариантах осуществления, включающих пару нРНК, одна из нРНК содержит последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 900 или 601, или 901-917. В некоторых вариантах осуществления, включающих пару нРНК, обе нРНК содержат последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 900 или 601, или 901-917. В некоторых вариантах осуществления, включающих пару нРНК, нуклеотиды 3' направляющей последовательности из нРНК представляют собой одну и ту же последовательность. В некоторых вариантах осуществления, включающих пару нРНК, нуклеотиды 3' направляющей последовательности из нРНК представляют собой разные последовательности.

В некоторых вариантах осуществления каркасная последовательность содержит одно или более изменений в структуре «петля-на-стебле» 1 по сравнению со структурой «петля-на-стебле» 1 каркасной последовательности SluCas9 дикого типа (например, каркас, содержащий последовательность SEQ ID NO: 900) или эталонной каркасной последовательности SluCas9 (например, каркас, содержащий последовательность SEQ ID NO: 901). В некоторых вариантах осуществления каркасная последовательность содержит одно или более изменений в структуре «петля-на-стебле» 2 по сравнению со структурой «петля-на-стебле» 2 каркасной последовательности SluCas9 дикого типа (например, каркас, содержащий последовательность SEQ ID NO: 900) или эталонной каркасной последовательности SluCas9 (например, каркас, содержащий последовательность SEQ ID NO: 901). В некоторых вариантах осуществления каркасная последовательность содержит одно или более изменений в тетрапетле по сравнению с тетрапетлей каркасной последовательности SluCas9 дикого типа (например, каркас, содержащий последовательность SEQ ID NO: 900) или эталонной каркасной последовательности SluCas9 (например, каркас, содержащий последовательность SEQ ID NO: 901). В некоторых

вариантах осуществления каркасная последовательность содержит одно или более изменений в области повторов по сравнению с областью повторов каркасной последовательности SluCas9 дикого типа (например, каркас, содержащий последовательность SEQ ID NO: 900) или эталонной каркасной последовательности SluCas9 (например, каркас, содержащий последовательность SEQ ID NO: 901). В некоторых вариантах осуществления каркасная последовательность содержит одно или более изменений в области антиповторов по сравнению с областью антиповторов каркасной последовательности SluCas9 дикого типа (например, каркас, содержащий последовательность SEQ ID NO: 900) или эталонной каркасной последовательности SluCas9 (например, каркас, содержащий последовательность SEQ ID NO: 901). В некоторых вариантах осуществления каркасная последовательность содержит одно или более изменений в линкерной области по сравнению с линкерной областью каркасной последовательности SluCas9 дикого типа (например, каркас, содержащий последовательность SEQ ID NO: 900) или эталонной каркасной последовательности SluCas9 (например, каркас, содержащий последовательность SEQ ID NO: 901). См., например, Nishimasu et al., 2015, Cell, 162:1113-1126 для описания областей каркаса.

При использовании tracrRNA в некоторых вариантах осуществления она содержит (от 5' к 3') второй комплементарный домен и проксимальный домен. В случае онRNA направляющие последовательности вместе с дополнительными нуклеотидами (например, SEQ ID NO: 500 или 910-912 (для SaCas9) и 900, или 601, или 901-917 (для SluCas9)) образуют или кодируют онRNA. В некоторых вариантах осуществления онRNA содержит (от 5' к 3') по меньшей мере спейсерную последовательность, первый комплементарный домен, связывающий домен, второй комплементарный домен и проксимальный домен. онRNA или tracrRNA могут дополнительно содержать хвостовой домен. Связывающий домен может быть шпилькообразующим. См., например, US 2017/0007679 для подробного обсуждения и примеров доменов crRNA и нRNA, включая вторые комплементарные домены, связывающие домены, проксимальные домены и хвостовые домены.

Как правило, в случае конструкции нуклеиновой кислоты ДНК, кодирующей направляющую РНК, остатки U в любой из описанных в данном документе последовательностей РНК могут быть заменены остатками Т, а в случае конструкции направляющей РНК, кодируемой ДНК, остатки Т могут быть заменены остатками U.

В данном документе предложены композиции, содержащие одну или более направляющих РНК или одну или более нуклеиновых кислот, кодирующих одну или более направляющих РНК, содержащих направляющую последовательность, описанную в данном документе в **таблице 1А**, **таблице 1В**, и **таблице 5** и во всем описании.

В некоторых вариантах осуществления предложена композиция, содержащая направляющую РНК или нуклеиновую кислоту, кодирующую направляющую РНК, где направляющая РНК содержит 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов любой из направляющих последовательностей, описанных в данном документе в **таблице 1А**, **таблице 1В**, и **таблице 5** и во всем описании.

В некоторых вариантах осуществления предложена композиция, содержащая направляющую РНК или нуклеиновую кислоту, кодирующую направляющую РНК, причем направляющая РНК содержит последовательность, содержащую примерно 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентичности с по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежными нуклеотидами направляющей последовательности, приведенный в **таблице 1А, таблице 1В и таблице 5**, а также во всем описании.

В некоторых вариантах осуществления предложена композиция, содержащая направляющую РНК или нуклеиновую кислоту, кодирующую направляющую РНК, где направляющая РНК содержит последовательность, содержащую около 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с направляющей последовательности, приведенной в **таблице 1А, таблице 1В и таблице 5**, а также во всем описании.

В некоторых вариантах осуществления предложена композиция, содержащая направляющую РНК или нуклеиновую кислоту, кодирующую направляющую РНК, где направляющая РНК содержит спейсерную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 10, 12, 15, 16, 20, 27, 28, 32, 33, 35, 1001, 1003, 1005, 1010, 1012, 1013, 1016, 1017, и 1018 (для SaCas9). В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 27. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 28. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 32. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 33. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 35. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 1001. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 1003. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 1005. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 1010. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 1012. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 1013. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 1016. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 1017. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой

В некоторых вариантах осуществления предложена композиция, содержащая направляющую РНК или нуклеиновую кислоту, кодирующую направляющую РНК, где направляющая РНК содержит спейсерную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 4062, 4063, 4068, 4069, 4070, 4071, 4072, 4073, 4078, 4079, 4088, 4089, 4096, 4097, 4098, 4099, 4100, 4101, 4102, 4103, 4158, 4159, 4168, 4169, 4202, 4203, 4220, 4221, 4246, 4247, 4248, 4249, 4250, 4251 (для SluCas9). В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 4062. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 4063. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 4068. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 4069. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 4070. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 4071. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 4072. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 4073. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 4078. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 4079. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 4088. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 4089. В некоторых вариантах

осуществления спейсерная последовательность представляется собой SEQ ID NO: 4096. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляется собой SEQ ID NO: 4097. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляется собой SEQ ID NO: 4098. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляется собой SEQ ID NO: 4099. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляется собой SEQ ID NO: 4100. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляется собой SEQ ID NO: 4101. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляется собой SEQ ID NO: 4102. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляется собой SEQ ID NO: 4103. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляется собой SEQ ID NO: 4158. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляется собой SEQ ID NO: 4159. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляется собой SEQ ID NO: 4168. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляется собой SEQ ID NO: 4169. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляется собой SEQ ID NO: 4202. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляется собой SEQ ID NO: 4203. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляется собой SEQ ID NO: 4220. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляется собой SEQ ID NO: 4221. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляется собой SEQ ID NO: 4246. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляется собой SEQ ID NO: 4247. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляется собой SEQ ID NO: 4248. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляется собой SEQ ID NO: 4249. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляется собой SEQ ID NO: 4250. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляется собой SEQ ID NO: 4251.

В некоторых вариантах осуществления предложена композиция, содержащая направляющую РНК или нуклеиновую кислоту, кодирующую направляющую РНК, где направляющая РНК дополнительно содержит trРНК. В каждом варианте осуществления композиции и способа, описанных в данном документе, sgРНК (содержащая спейсерную последовательность) и trРНК могут быть связаны как одна РНК (онРНК) или могут находиться на отдельных РНК (днРНК). В контексте онРНК компоненты sgРНК и trРНК могут быть ковалентно связаны, например, посредством фосфодиэфирной связи или другой ковалентной связи.

В одном аспекте предложена композиция, содержащая одиночную кодирующую молекулу нуклеиновой кислоты, или две молекулы нуклеиновой кислоты, где одиночная молекула кодирует: 1) одну или более направляющих РНК, которые содержат направляющую последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 1-35, 1000-1078,

или 3000-3069; и 2) а SaCas9. В одном аспекте предложена композиция, содержащая одиночную кодирующую молекулу нуклеиновой кислоты, или две молекулы нуклеиновой кислоты, где одна молекула кодирует: 1) одну или более направляющих РНК, которые содержат направляющую последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 100-225, 2000-2116, или 4000-4251; и 2) SluCas9.

В одном аспекте предложена композиция, содержащая одиночную кодирующую молекулу нуклеиновой кислоты, или две молекулы нуклеиновой кислоты, где одна молекула кодирует: 1) одну или более направляющих РНК, содержащих направляющую последовательность, имеющую по меньшей мере 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентичности с любой из SEQ ID NO: 1-35, 1000-1078, 3000-3069; и 2) SaCas9. В одном аспекте предложена композиция, содержащая одиночную молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую 1) одну или более направляющих РНК, которая содержит направляющую последовательность, имеющую по меньшей мере 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентичности с любой из SEQ ID NO: 100-225, 2000-2116, или 4000-4251; и 2) SluCas9.

В еще одном аспекте предложена композиция, содержащая одиночную кодирующую молекулу нуклеиновой кислоты или две молекулы нуклеиновой кислоты, где одна молекула кодирует: 1) одну или более направляющих РНК, содержащих направляющую последовательность, содержащую по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов спейсерной последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 1-35, 1000-1078, или 3000-3069; и 2) SaCas9. В еще одном аспекте предложена композиция, содержащая одиночную кодирующую молекулу нуклеиновой кислоты или две молекулы нуклеиновой кислоты, где одна молекула кодирует: 1) одну или более направляющих РНК, содержащих направляющую последовательность, содержащую по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов спейсерной последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 100-225, 2000-2116, или 4000-4251; и 2) SluCas9.

В любом варианте осуществления, включающем молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую направляющую РНК и/или Cas9, молекула нуклеиновой кислоты может представлять собой вектор. В некоторых вариантах осуществления предложена композиция, содержащая одиночную молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую направляющую РНК и Cas9, где молекула нуклеиновой кислоты представляет собой вектор.

Можно использовать любой тип вектора, такой как любой из описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой вирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой неинтегрирующий вирусный вектор (т.е. который не встраивает последовательность из вектора в хромосому хозяина). В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV), лентивирусный вектор, дефицитный по интегразе лентивирусный вектор, аденовирусный вектор, вектор на основе вируса осповакцины, альфавирусный вектор или вектор на основе вируса простого герпеса. В некоторых вариантах осуществления вектор содержит

специфический для мышц промотор. Примеры специфических для мышц промоторов включают промотор мышечной креатинкиназы, промотор десмина, промотор МНСК7 или промотор SPc5-12. См. US 2004/0175727 A1; Wang et al., *Expert Opin Drug Deliv.* (2014) 11, 345-364; Wang et al., *Gene Therapy* (2008) 15, 1489-1499. В некоторых вариантах осуществления специфический для мышц промотор представляет собой промотор СК8. В некоторых вариантах осуществления специфический для мышц промотор представляет собой промотор СК8е. В любом из предыдущих вариантов осуществления вектор может представлять собой вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV).

В некоторых вариантах осуществления специфический для мышц промотор представляет собой промотор СК8. Промотор СК8 имеет следующую последовательность (SEQ ID NO. 700):

```

1   CTAGACTAGC ATGCTGCCCCA TGTAAGGAGG CAAGGCCTGG GGACACCCGA GATGCCTGGT
61  TATAATTAAC CCAGACATGT GGCTGCCCCC CCCCCCCCAA CACCTGCTGC CTCTAAAAAT
121 AACCTGTCAT GCCATGTTCC CGGCGAAGGG CCAGCTGTCC CCCGCCAGCT AGACTCAGCA
181 CTTAGTTTAG GAACCAGTGA GCAAGTCAGC CCTTGGGGCA GCCCATACAA GGCCATGGGG
241 CTGGGCAAGC TGCACGCCTG GGTCCGGGGT GGGCACGGTG CCCGGGCAAC GAGCTGAAAG
301 CTCATCTGCT CTCAGGGGCC CCTCCCTGGG GACAGCCCCT CCTGGCTAGT CACACCCTGT
361 AGGCTCCTCT ATATAACCCA GGGGCACAGG GGCTGCCCTC ATTCTACCAC CACCTCCACA
421 GCACAGACAG ACASTCAGGA GCCAGCCAGC

```

В некоторых вариантах осуществления специфический для мышечных клеток промотор представляет собой вариант промотора СК8, называемый СК8е. В некоторых вариантах осуществления промотор СК8е имеет размер 436 п.н. Промотор СК8е имеет следующую последовательность (SEQ ID NO: 701):

```

1   TGCCCATGTA AGGAGGCAAG GCCTGGGGAC ACCCGAGATG CCTGGTTATA ATTAACCCAG
61  ACATGTGGCT CCCCCCCCCC CCCAACACC TGCTGCCTCT AAAAATAACC CTGCATGCCA
121 TGTTCCCGGC GAAGGGCCAG CTGTCCCCCG CCAGCTAGAC TCAGCACTTA GTTTAGGAAC
181 CAGTGAGCAA GTCAGCCCTT GGGGCAGCCC ATACAAGGCC ATGGGGCTGG GCAAGCTGCA
241 CGCCTGGGTC CGGGGTGGGC ACGGTGCCCC GGCAACGAGC TGAAAGCTCA TCTGCTCTCA
301 GGGGCCCTC CCTGGGGACA GCCCTCCTG GCTAGTCACA CCCTGTAGGC TCCTCTATAT
361 AACCCAGGGG CACAGGGGCT GCCCTCATTC TACCACCACC TCCACAGCAC AGACAGACAC
421 TCAGGAGCCA GCCAGC

```

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит один или более промоторов U6, H1 или 7SK. В некоторых вариантах осуществления промотор U6 представляет собой промотор U6 человека (например, промотор U6L или промотор U6S). В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой промотор U6 мышцы. В некоторых вариантах осуществления промотор 7SK представляет собой промотор 7SK человека. В некоторых вариантах осуществления промотор 7SK представляет собой промотор 7SK1. В некоторых вариантах осуществления промотор 7SK представляет собой промотор 7SK2. В некоторых вариантах осуществления промотор H1 представляет собой промотор H1 человека (например, промотор H1L или промотор В H1S). В некоторых вариантах

осуществления вектор содержит несколько направляющих последовательностей, где каждая направляющая последовательность находится под контролем отдельного промотора. В некоторых вариантах осуществления каждая из множества направляющих последовательностей содержит разные последовательности. В некоторых вариантах осуществления каждая из множества направляющих последовательностей содержит одну и ту же последовательность (например, каждая из множества направляющих последовательностей содержит одну и ту же спейсерную последовательность). В некоторых вариантах осуществления каждая из множества направляющих последовательностей содержит одну и ту же спейсерную последовательность и одну и ту же каркасную последовательность. В некоторых вариантах осуществления каждая из множества направляющих последовательностей содержит разные спейсерные последовательности и разные каркасные последовательности. В некоторых вариантах осуществления каждая из множества направляющих последовательностей содержит одну и ту же спейсерную последовательность, но содержит разные каркасные последовательности. В некоторых вариантах осуществления каждая из множества направляющих последовательностей содержит разные спейсерные последовательности и разные каркасные последовательности. В некоторых вариантах осуществления каждый из отдельных промоторов содержит одну и ту же нуклеотидную последовательность (например, последовательность промотора U6). В некоторых вариантах осуществления каждый из отдельных промоторов содержит отличную нуклеотидную последовательность (например, последовательность промотора U6, H1 и/или 7SK).

В некоторых вариантах осуществления промотор U6 содержит нуклеотидную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 702:

```
cgagtgccaac acccggtggga atcccatggg caccatggcc cctcgctcca aaaatgcttt      60
cgcgtcgcgc agacactgct cggtagtttc ggggatcagc gtttgagtaa gagcccgct      120
ctgaaccctc cgcgcgcgcc cggccccagt ggaaagacgc gcaggcaaaa cgcaccacgt      180
gacggagcgt gaccgcgcgc cgagcgcgcg ccaaggctcg gcaggaagag ggcctatttc      240
ccatgattcc ttcataatttg catatacgat acaaggctgt tagagagata attagaatta      300
atgtgactgt aaacacaaag atattagtagc aaaatacgtg acgtagaaag taataatttc      360
ttgggtagtt tgcagtttta aaattatggt ttaaaatgga ctatcatatg cttaccgtaa      420
cttgaaagta tttcgatttc ttggctttat atatcttggt gaaaggacga aa              472
```

В некоторых вариантах осуществления промотор H1 содержит нуклеотидную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 703:

```
gctcggcgcg cccatatttg catgtcgcta tgtgttctgg gaaatcacca taaacgtgaa      60
atgtcttttg atttgggaat cttataagtt ctgtatgaga ccacggta              108
```

В некоторых вариантах осуществления промотор 7SK содержит нуклеотидную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 704:

```
tgacggcgcg ccctgcagta tttagcatgc cccacccatc tgcaaggcat tctggatagt      60
gtcaaaacag ccggaaatca agtccgttta tctcaactt tagcattttg ggaataaatg      120
atatttgcta tgctgggttaa attagatttt agttaaat tctgctgaag ctctagtacg      180
ataagtaact tgacctaatg gtaaagttga gatttccttc aggtttatat agcttgtgcg      240
ccgcctgggt a                                                              251
```

В некоторых вариантах осуществления промотор U6 представляет собой промотор hU6c и содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 705:

```
GAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAGA
GAGATAATTGGAATTAATTTGACTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAAATACGTG
ACGTAGAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTTAAAT
GGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATATATC
TTGTGGAAAGGACGAAACACC.
```

В некоторых вариантах осуществления промотор U6 представляет собой вариант промотора hU6c. В некоторых вариантах осуществления вариант промотора hU6c содержит альтернативные нуклеотиды по сравнению с последовательностью SEQ ID NO: 705. В некоторых вариантах осуществления вариант промотора hU6c содержит меньше нуклеотидов по сравнению с 249 нуклеотидами SEQ ID NO: 705. В некоторых вариантах осуществления вариант промотора hU6c содержит меньше нуклеотидов в связывающей нуклеосому последовательности промотора hU6c SEQ ID NO: 705. В некоторых вариантах осуществления в варианте промотора hU6c отсутствуют все или по меньшей мере часть (например, по меньшей мере 5, 10, 15, 20, 25 или 30 нуклеотидов) нуклеотидов, соответствующих нуклеотидам 96-125 SEQ ID NO: 705. В некоторых вариантах осуществления в варианте промотора hU6c отсутствуют все или по меньшей мере часть (например, по меньшей мере 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 или 60 нуклеотидов) нуклеотидов, соответствующих нуклеотидам 81-140 SEQ ID NO: 705. В некоторых вариантах осуществления в варианте промотора hU6c отсутствуют все или по меньшей мере часть (например, по меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50, 60, 65, 70, 75, 80, или 85 нуклеотидов) нуклеотидов, соответствующих нуклеотидам 66-150 SEQ ID NO: 705. В некоторых вариантах осуществления в варианте промотора hU6c отсутствуют все или по меньшей мере часть (например, по меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 или 120 нуклеотидов) нуклеотидов, соответствующих нуклеотидам 51-170 SEQ ID NO: 705. В некоторых вариантах осуществления в варианте промотора hU6c отсутствуют нуклеотиды, соответствующие нуклеотидам 96-125 SEQ ID NO: 705. В некоторых вариантах осуществления вариант промотора hU6c содержит 129-219 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления вариант промотора hU6c содержит 219 нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления вариант промотора hU6с содержит 189 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления вариант промотора hU6с содержит 159 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления вариант промотора hU6с содержит 129 нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления промотор U6 представляет собой hU6d30 и содержит нуклеотидную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 9001:

GAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAGA
GAGATAATTGGAATTAATTTGACTGTAAACACAAAGATATAATTTCTTGGGTAGTTT
GCAGTTTTTAAAATTATGTTTTTAAAATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAG
TATTTTCGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACC.

В некоторых вариантах осуществления промотор U6 представляет собой hU6d60 и содержит нуклеотидную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 9002:

GAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAGA
GAGATAATTGGAATTAATTTGACGTTTGCAGTTTTTAAAATTATGTTTTTAAAATGGAC
TATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGT
GGAAAGGACGAAACACC.

В некоторых вариантах осуществления промотор U6 представляет собой hU6d90 и содержит нуклеотидную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 9003:

GAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAGA
GAGATAATATTATGTTTTTAAAATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTAT
TTCGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACC.

В некоторых вариантах осуществления промотор U6 представляет собой hU6d120 и содержит нуклеотидную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 9004:

GAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCGGACTAT
CATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGA
AAGGACGAAACACC.

В некоторых вариантах осуществления промотор 7SK представляет собой промотор 7SK2 и содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 706:

CTGCAGTATTTAGCATGCCCCACCCATCTGCAAGGCATTCTGGATAGTGTCAAAACA
GCCGGAATCAAGTCCGTTTATCTCAAACCTTTAGCATTTTGGGAATAAATGATATTT

GCTATGCTGGTTAAATTAGATTTTAGTTAAATTTCTGCTGAAGCTCTAGTACGATA
AGCAACTTGACCTAAGTGTAAGTTGAGACTTCCTTCAGGTTTATATAGCTTGTGCG
CCGCTTGGGTACCTC.

В некоторых вариантах осуществления промотор 7SK представляет собой вариант промотора 7SK2. В некоторых вариантах осуществления вариант промотора 7SK2 содержит альтернативные нуклеотиды по сравнению с последовательностью SEQ ID NO: 706. В некоторых вариантах осуществления вариант промотора 7SK2, например, содержит меньше нуклеотидов по сравнению с 243 нуклеотидами SEQ ID NO: 706. В некоторых вариантах осуществления вариант промотора 7SK2 имеет меньше нуклеотидов в связывающей нуклеосому последовательности промотора 7SK2 SEQ ID NO: 706. В некоторых вариантах осуществления в варианте промотора 7SK2 отсутствуют все или по меньшей мере часть (например, по меньшей мере 5, 10, 15, 20, 25 или 30 нуклеотидов) нуклеотидов, соответствующих нуклеотидам 95-124 SEQ ID NO: 706. В некоторых вариантах осуществления в варианте промотора 7SK2 отсутствуют все или по меньшей мере часть (например, по меньшей мере 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 или 60 нуклеотидов) нуклеотидов, соответствующих нуклеотидам 81-140 SEQ ID NO: 706. В некоторых вариантах осуществления в варианте промотора 7SK2 отсутствуют все или по меньшей мере часть (например, по меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50, 60, 65, 70, 75, 80, 85 или 90 нуклеотидов) нуклеотидов, соответствующих нуклеотидам 67-156 SEQ ID NO: 706. В некоторых вариантах осуществления в варианте промотора 7SK2 отсутствуют все или по меньшей мере часть (например, по меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 или 120 нуклеотидов) нуклеотидов, соответствующих нуклеотидам 52-171 SEQ ID NO: 706. В некоторых вариантах осуществления вариант промотора 7SK2 содержит 123-213 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления вариант промотора 7SK2 содержит 213 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления вариант промотора 7SK2 содержит 183 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления вариант промотора 7SK2 содержит 153 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления вариант промотора 7SK2 содержит 123 нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления промотор 7SK представляет собой 7SKd30 и содержит нуклеотидную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 9006:

CTGCAGTATTTAGCATGCCCCACCCATCTGCAAGGCATTCTGGATAGTGTCAAAACA
GCCGGAATCAAGTCCGTTTATCTCAAACCTTTAGCATTTAAATTAGATTTTAGTTAA
ATTTCTGCTGAAGCTCTAGTACGATAAGCAACTTGACCTAAGTGTAAGTTGAGAC
TTCCTTCAGGTTTATATAGCTTGTGCGCCGCTTGGGTACCTC.

В некоторых вариантах осуществления промотор 7SK представляет собой 7SKd60 и содержит нуклеотидную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 9007:

CTGCAGTATTTAGCATGCCCCACCCATCTGCAAGGCATTCTGGATAGTGTCAAAACA
GCCGGAATCAAGTCCGTTTATCTTAAATTTCTGCTGAAGCTCTAGTACGATAAGC
AACTTGACCTAAGTGTAAGTTGAGACTTCCTTCAGGTTTATATAGCTTGTGCGCCG
CTTGGGTACCTC.

В некоторых вариантах осуществления промотор 7SK представляет собой 7SKd90 и содержит нуклеотидную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 9008:

CTGCAGTATTTAGCATGCCCCACCCATCTGCAAGGCATTCTGGATAGTGTCAAAACA
GCCGGAATAGCTCTAGTACGATAAGCAACTTGACCTAAGTGTAAGTTGAGACTT
CCTTCAGGTTTATATAGCTTGTGCGCCGCTTGGGTACCTC.

В некоторых вариантах осуществления промотор 7SK представляет собой 7SKd120 и содержит нуклеотидную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 9009:

CTGCAGTATTTAGCATGCCCCACCCATCTGCAAGGCATTCTGGATAGTGTCAAGCAAC
TTGACCTAAGTGTAAGTTGAGACTTCCTTCAGGTTTATATAGCTTGTGCGCCGCTTG
GGTACCTC.

В некоторых вариантах осуществления промотор H1 представляет собой промотор H1m или mH1 и содержит нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 707:

AATATTTGCATGTCGCTATGTGTTCTGGGAAATCACCATAAACGTGAAATGTCTTTG
GATTTGGGAATCTTATAAGTTCTGTATGAGACCACTCTTTCCC.

В некоторых вариантах осуществления промотор Ck8e содержит нуклеотидную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 701

TGCCCATGTAAGGAGGCAAGGCCTGGGGACACCCGAGATGCCTGGTTATAATTAAC
CCAGACATGTGGCTGCCCCCCCCCCCCAACACCTGCTGCCTCTAAAAATAACCCTG
CATGCCATGTTCCCGGCGAAGGGCCAGCTGTCCCCCGCCAGCTAGACTCAGCACTTA
GTTTAGGAACCAAGTGAGCAAGTCAGCCCTTGGGGCAGCCCATACAAGGCCATGGGG
CTGGGCAAGCTGCACGCCTGGGTCCGGGGTGGGCACGGTGCCCGGGCAACGAGCTG
AAAGCTCATCTGCTCTCAGGGGCCCTCCCTGGGGACAGCCCCTCCTGGCTAGTCAC
ACCCTGTAGGCTCCTCTATATAACCCAGGGGCACAGGGGCTGCCCTCATTCTACCAC
CACCTCCACAGCACAGACAGACACTCAGGAGCCAGCCAGC.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит несколько инвертированных концевых повторов (ITR). Эти ITR могут относиться к серотипу AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8 или AAV9. В некоторых вариантах осуществления ITR относятся к серотипу AAV2. В некоторых вариантах осуществления 5'-ITR содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%,

93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%. или на 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 709:

GGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGC
CCGACGCCCCGGGCTTTGCCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGG
GAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTTCCT.

В некоторых вариантах осуществления 3'ITR содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%. или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 710:

AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTG
AGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCCGACGCCCCGGGCTTTGCCCCGGGCGGCCTCAGTG
AGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGA.

В некоторых вариантах осуществления предложен вектор, содержащий одиночную молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую 1) одну или более направляющих РНК, содержащих любую одну или более спейсерных последовательностей SEQ ID NO: 1-35, 100-225, 1000-1078, 2000-2116, 3000-3069 или 4000-4251; и 2) SaCas9 (для SEQ ID NO: 1-35, 1000-1078 и 3000-3069) или SluCas9 (для SEQ ID NO: 100-225, 2000-2116 и 4000-4251). В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой вектор AAV. В некоторых вариантах осуществления вектор AAV вводят субъекту для лечения DMD. В некоторых вариантах осуществления необходим только один вектор из-за использования конкретной направляющей последовательности, которая применима в контексте SaCas9 или SluCas9.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую белок Cas9 (например, белок SaCas9 или SluCas9), и дополнительно содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую одну или более одиночных направляющих РНК. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая белок Cas9, находится под контролем промотора СК8е. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая последовательность направляющей РНК, находится под контролем промотора hU6с. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой AAV9.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит несколько нуклеиновых кислот, кодирующих более одной направляющей РНК. В некоторых вариантах осуществления вектор содержит две нуклеиновые кислоты, кодирующие две направляющие последовательности РНК.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую белок Cas9 (например, белок SaCas9 или белок SluCas9), нуклеиновую кислоту, кодирующую первую направляющую РНК, и нуклеиновую кислоту, кодирующую вторую направляющую РНК. В некоторых вариантах осуществления вектор не содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую более двух направляющих РНК. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая первую направляющую РНК, является такой же, как нуклеиновая кислота, кодирующая вторую направляющую РНК. В

некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая первую направляющую РНК, отличается от нуклеиновой кислоты, кодирующей вторую направляющую РНК. В некоторых вариантах осуществления вектор содержит одиночную молекулу нуклеиновой кислоты, где одиночная молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую белок Cas9, нуклеиновую кислоту, кодирующую первую направляющую РНК, и нуклеиновую кислоту, которая является обратно комплементарной кодирующей последовательности для второй направляющей РНК. В некоторых вариантах осуществления вектор содержит одиночную молекулу нуклеиновой кислоты, причем одиночная молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую белок Cas9, нуклеиновую кислоту, которая является обратно комплементарной кодирующей последовательности для первой направляющей РНК, и нуклеиновую кислоту, которая является обратно комплементарной кодирующей последовательности для второй направляющей РНК. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая белок Cas9 (например, белок SaCas9 или SluCas9), находится под контролем промотора СК8е. В некоторых вариантах осуществления первая направляющая находится под контролем промотора 7SK2, а вторая направляющая находится под контролем промотора H1m. В некоторых вариантах осуществления первая направляющая находится под контролем промотора H1m, а вторая направляющая находится под контролем промотора 7SK2. В некоторых вариантах осуществления первая направляющая находится под контролем промотора hU6с, а вторая направляющая находится под контролем промотора H1m. В некоторых вариантах осуществления первая направляющая находится под контролем промотора H1m, а вторая направляющая находится под контролем промотора hU6с. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая белок Cas9, находится: а) между нуклеиновыми кислотами, кодирующими направляющие РНК, b) между нуклеиновыми кислотами, которые являются обратно комплементарными кодирующим последовательностям для направляющих РНК, c) между нуклеиновой кислотой, кодирующей первую направляющую РНК, и нуклеиновой кислотой, которая является обратно комплементарной кодирующей последовательности для второй направляющей РНК, d) между нуклеиновой кислотой, кодирующей вторую направляющую РНК, и нуклеиновой кислотой, которая является обратно комплементарной кодирующей последовательности для первой направляющей РНК, e) 5' к нуклеиновым кислотам, кодирующим направляющие РНК, f) 5' к нуклеиновым кислотам, которые являются обратно комплементарными кодирующим последовательностям для направляющих РНК, g) 5' к нуклеиновой кислоте, кодирующей одну из направляющих РНК, и 5' к нуклеиновой кислоте, которая является обратно комплементарной кодирующей последовательности другой направляющей РНК, h) 3' к нуклеиновым кислотам, кодирующим направляющие РНК, i) 3' к нуклеиновым кислотам, которые являются обратно комплементарными к кодирующим последовательностям для направляющих РНК, или j) 3' к нуклеиновой кислоте, кодирующей одну из направляющих РНК, и 3' к нуклеиновой кислоте, которая

является обратно комплементарной кодирующей последовательности для другой направляющей РНК. В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе векторов представляет собой AAV9. В предпочтительных вариантах осуществления вектор AAV9 имеет размер менее 5 т.п.н. от ITR до ITR, включая обе ITR. В конкретных вариантах осуществления вектор AAV9 имеет размер менее 4,9 т.п.н. от ITR до ITR, включая оба ITR. В дополнительных вариантах осуществления вектор AAV9 имеет размер менее 4,85 т.п.н. от ITR до ITR, включая обе ITR. В дополнительных вариантах осуществления вектор AAV9 имеет размер менее 4,8 т.п.н. от ITR до ITR, включая обе ITR. В дополнительных вариантах осуществления вектор AAV9 имеет размер менее 4,75 т.п.н. от ITR до ITR, включая оба ITR. В дополнительных вариантах осуществления вектор AAV9 имеет размер менее 4,7 т.п.н. от ITR до ITR, включая обе ITR. В некоторых вариантах осуществления вектор имеет размер 3,9-5 т.п.н., 4-5 т.п.н., 4,2-5 т.п.н., 4,4-5 т.п.н., 4,6-5 т.п.н., 4,7-5 т.п.н., 3,9-4,9 т.п.н., 4,2-4,9 т.п.н., 4,4-4,9 т.п.н., 4,7-4,9 т.п.н., 3,9-4,85 т.п.н., 4,2-4,85 т.п.н., 4,4-4,85 т.п.н., 4,6-4,85 т.п.н., 4,7-4,85 т.п.н., 4,7-4,9 т.п.н., 3,9-4,8 т.п.н., 4,2-4,8 т.п.н., 4,4-4,8 т.п.н. или 4,6-4,8 т.п.н. от ITR до ITR, включая оба ITR. В некоторых вариантах осуществления вектор имеет размер от 4,4 до 4,85 т.п.н. от ITR до ITR, включая оба ITR. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой вектор AAV9.

В некоторых вариантах осуществления любой из описанных в данном документе векторов содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую по меньшей мере первую направляющую РНК и вторую направляющую РНК. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую спейсер, для первой направляющей РНК, последовательность, кодирующую каркас, для первой направляющей РНК, последовательность, кодирующую спейсер, для второй направляющей РНК, и последовательность, кодирующую каркас, для второй направляющей РНК. В некоторых вариантах осуществления кодирующая спейсер последовательность (например, кодирующая любую из последовательностей спейсера, описанных в данном документе) для первой направляющей РНК идентична последовательности, кодирующей спейсер, для второй направляющей РНК. В некоторых вариантах осуществления кодирующая спейсер последовательность (например, кодирующая любую из последовательностей спейсера, описанных в данном документе) для первой направляющей РНК отличается от кодирующей спейсер последовательности для второй направляющей РНК. В некоторых вариантах осуществления последовательность, кодирующая каркас для первой направляющей РНК, идентична кодирующей каркас последовательности для второй направляющей РНК. В некоторых вариантах осуществления кодирующая каркас последовательность для первой направляющей РНК, отличается от кодирующей каркас последовательности для нуклеиновой кислоты, кодирующей вторую направляющую РНК. В некоторых вариантах осуществления кодирующая каркас последовательность для первой направляющей РНК, содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID No: 901-916, а кодирующая каркас последовательность для второй направляющей РНК, содержит другую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 901-916. В

SEQ ID NO: 901, а кодирующая каркас последовательность для второй направляющей РНК содержит последовательность SEQ ID NO: 914. В некоторых вариантах осуществления кодирующая каркас последовательность для первой направляющей РНК содержит последовательность SEQ ID NO: 901, а кодирующая каркас последовательность для второй направляющей РНК содержит последовательность SEQ ID NO: 915. В некоторых вариантах осуществления кодирующая каркас последовательность для первой направляющей РНК содержит последовательность SEQ ID NO: 901, а кодирующая каркас последовательность для второй направляющей РНК содержит последовательность SEQ ID NO: 916. В некоторых вариантах осуществления кодирующая спейсер последовательность для первой направляющей РНК такая же, как кодирующая спейсер последовательность во второй направляющей РНК, а кодирующая каркас последовательность для первой направляющей РНК отличается от кодирующей каркас последовательности в нуклеиновой кислоте, кодирующей вторую направляющую РНК.

Изобретение обеспечивает новые конфигурации вектора AAV. В данном документе представлены некоторые примеры этих новых конфигураций векторов AAV, и порядок элементов в этих иллюстративных векторах указан от 5' к 3' по отношению к плюс-цепи. Для этих конфигураций следует понимать, что перечисленные элементы могут не быть непосредственно смежными, и что между перечисленными элементами могут присутствовать один или более нуклеотидов или один или более дополнительных элементов. Однако в некоторых вариантах осуществления между указанными элементами могут отсутствовать нуклеотиды или дополнительные элементы. Кроме того, если не указано иное, «промотор для экспрессии элемента X» означает, что промотор ориентирован таким образом, чтобы облегчить экспрессию указанного элемента X. Кроме того, если не указано иное, ссылки на «каркасную последовательность онРНК» или «каркасную последовательность направляющей РНК» являются синонимами «нуклеотидной последовательности/нуклеиновой кислоты, кодирующей каркасную последовательность онРНК» или «нуклеотидной последовательности/нуклеиновой кислоты, кодирующей каркасную последовательность направляющей РНК». В некоторых вариантах осуществления данное изобретение относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей SaCas9 (например, SaCas9-KKH) или SluCas9. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует один или более сигналов ядерной локализации (например, NLS SV40 и/или NLS с-Мус) на С-конце кодируемого SaCas9 или SluCas9. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует одну или более NLS (например, NLS SV40 и/или NLS с-Мус) на С-конце кодируемого SaCas9 или SluCas9, и нуклеиновая кислота не кодирует NLS на N-конце кодируемого SaCas9 или SluCas9. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует один или более сигналов ядерной локализации (например, NLS SV40 и/или NLS с-Мус) на N-конце кодируемого SaCas9 или SluCas9. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует одну или более NLS (например, NLS SV40 и/или NLS с-Мус) на N-конце кодируемого SaCas9 или SluCas9, и нуклеиновая кислота не кодирует NLS на С-конце кодируемого SaCas9 или

SluCas9. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует один или более сигналов ядерной локализации (например, NLS SV40 и/или NLS с-Мус) на С-конце кодируемого SaCas9 или SluCas9, а также кодирует один или более сигналов NLS на N-конец кодируемого SaCas9 или SluCas9 (например, SV40 NLS и/или с-Мус NLS). В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует один NLS. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует две NLS. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует три NLS. Один, два или три NLS могут быть С-концевыми, N-концевыми или любой комбинацией С- и N-концевых. NLS может быть слит/присоединен непосредственно к С- или N-концу или к другому NLS, или может быть слит/присоединен опосредованно через линкер. В некоторых вариантах осуществления дополнительный домен может быть: а) слит с N- или С-концом белка Cas (например, белок Cas9), б) слит с N-концом NLS, слитого с N-концом белка Cas, или с) слит с С-концом NLS, слитого с С-концом белка Cas, с линкером или без него. В некоторых вариантах осуществления NLS слит с N- и/или С-концом белка Cas с помощью линкера. В некоторых вариантах осуществления NLS слит с N-концом NLS, слитого с N-концом на белке Cas, с помощью линкера, и/или NLS слит с С-концом слитого с С-конца NLS на белке Cas с помощью линкера. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой GSVD (SEQ ID NO: 550) или GSGS (SEQ ID NO: 551). В некоторых вариантах осуществления белок Cas содержит NLS с-Мус, слитый с N-концом белка Cas (или со слитым с N-конца NLS на белке Cas), необязательно с помощью линкера. В некоторых вариантах осуществления белок Cas содержит NLS SV40, слитый с С-концом белка Cas (или со слитым с С-конца NLS на белке Cas), необязательно с помощью линкера. В некоторых вариантах осуществления белок Cas содержит NLS нуклеоплазмина, слитую с С-концом белка Cas (или со слитой с С-конца NLS на белке Cas), необязательно с помощью линкера. В некоторых вариантах осуществления белок Cas содержит: а) NLS с-Мус, слитый с N-концом белка Cas, необязательно с помощью линкера, б) NLS SV40, слитый с С-концом белка Cas, необязательно с помощью линкера и с) NLS нуклеоплазмина, слитый с С-концом NLS SV40, необязательно с помощью линкера. В некоторых вариантах осуществления белок Cas содержит: а) NLS с-Мус, слитый с N-концом белка Cas, необязательно с помощью линкера, б) NLS нуклеоплазмина слитый с С-концом белка Cas, необязательно с помощью линкера и с) NLS нуклеоплазмина, слитый с С-концом NLS SV40, необязательно с помощью линкера.

В некоторых вариантах осуществления вектор AAV содержит от 5' к 3' по отношению к плюс-цепи: обратную комплементарную цепь первой каркасной последовательности онРНК, обратную комплементарную цепь нуклеиновой кислоты, кодирующей первую направляющую последовательность онРНК, обратную комплементарную цепь промотора для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей первую онРНК, промотор для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей SaCas9 (например, СК8е), нуклеиновую кислоту, кодирующую SaCas9, последовательность полиаденилирования, промотор для экспрессии второй онРНК, вторую направляющую

В некоторых вариантах осуществления промотор для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей вторую онРНК, содержит SEQ ID NO: 9008. В некоторых вариантах осуществления промотор для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей вторую онРНК, содержит SEQ ID NO: 9009. В некоторых вариантах осуществления промотор для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей вторую онРНК, представляет собой любой из промоторов H1m, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления промотор для SaCas9 представляет собой промотор СК8е. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая SaCas9, слита с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей последовательность ядерной локализации (NLS). В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая SaCas9, слита с двумя последовательностями нуклеиновой кислоты, каждая из которых кодирует последовательность ядерной локализации (NLS). В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая SaCas9, слита с тремя последовательностями нуклеиновой кислоты, каждая из которых кодирует последовательность ядерной локализации (NLS). В некоторых вариантах осуществления одна или более NLS представляют собой NLS SV40. В некоторых вариантах осуществления один или более NLS представляют собой NLS с-Мус. В некоторых вариантах осуществления NLS слит с SaCas9 с помощью линкера.

В некоторых вариантах осуществления вектор AAV содержит от 5' к 3' по отношению к плюс-цепи: обратную комплементарную цепь первой каркасной последовательности онРНК, обратную комплементарную цепь нуклеиновой кислоты, кодирующей первую направляющую последовательность онРНК, обратную комплементарную цепь промотора hU6c для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей первую онРНК, промотор для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей SaCas9 (например, СК8е), нуклеиновую кислоту, кодирующую SaCas9, последовательность полиаденилирования, промотор hU6c для экспрессии второй онРНК, вторую направляющую последовательность онРНК и вторую каркасную последовательность онРНК. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 10 и 15. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 10 и 16. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 12 и 16. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 1001 и 1005. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 1001 и 15. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 1001 и 16. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 1003 и 1005. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 16 и 1003. В некоторых вариантах осуществления первая

[illegible]

В некоторых вариантах осуществления вектор AAV содержит от 5' к 3' по отношению к плюс-цепи: обратную комплементарную цепь первой каркасной последовательности онРНК, обратную комплементарную цепь нуклеиновой кислоты, кодирующей первую направляющую последовательность онРНК, обратную комплементарную цепь промотора hU6c для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей первую онРНК, промотор для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей SaCas9 (например, СК8е), нуклеиновую кислоту, кодирующую SaCas9, последовательность полиаденилирования, промотор 7SK для экспрессии второй онРНК, вторую направляющую последовательность онРНК и вторую каркасную последовательность онРНК. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 10 и 15. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 10 и 16. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 12 и 16. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 1001 и 1005. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 1001 и 15. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 1001 и 16. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 1003 и 1005. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 16 и 1003. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 12 и 1010. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 12 и 1012. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 12 и 1013. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 10 и 1016. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 1017 и 16. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 1018 и 16. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 15 и 10. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 16 и 10. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 16 и 12. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 1005 и 1001. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 15 и 1001. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 16 и 1001. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 1005 и 1003. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат

последовательности SEQ ID NO: 1003 и 16. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 1010 и 12. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 1012 и 12. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 1013 и 12. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 1016 и 10. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 16 и 1017. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 16 и 1018. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая SaCas9, слита с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей последовательность ядерной локализации (NLS). В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая SaCas9, слита с двумя последовательностями нуклеиновой кислоты, каждая из которых кодирует последовательность ядерной локализации (NLS). В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая SaCas9, слита с тремя последовательностями нуклеиновой кислоты, каждая из которых кодирует последовательность ядерной локализации (NLS). В некоторых вариантах осуществления одна или более NLS представляют собой NLS SV40. В некоторых вариантах осуществления один или более NLS представляют собой NLS с-Мус. В некоторых вариантах осуществления NLS слит с SaCas9 с помощью линкера.

В некоторых вариантах осуществления вектор AAV содержит от 5' к 3' по отношению к плюс-цепи: обратную комплементарную цепь первой каркасной последовательности онРНК, обратную комплементарную цепь нуклеиновой кислоты, кодирующей первую направляющую последовательность онРНК, обратную комплементарную цепь промотора hU6c для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей первую онРНК, промотор для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей SaCas9 (например, CK8e), нуклеиновую кислоту, кодирующую SaCas9, последовательность полиаденилирования, промотор H1m для экспрессии второй онРНК, вторую направляющую последовательность онРНК и вторую каркасную последовательность онРНК. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 10 и 15. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 10 и 16. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 12 и 16. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 1001 и 1005. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 1001 и 15. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 1001 и 16. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 1003 и 1005. В

[illegible]

представляют собой NLS с-Мус. В некоторых вариантах осуществления NLS слит с SaCas9 с помощью линкера.

В некоторых вариантах осуществления вектор AAV содержит от 5' к 3' по отношению к плюс-цепи: обратную комплементарную цепь первой каркасной последовательности онРНК, обратную комплементарную цепь нуклеиновой кислоты, кодирующей первую направляющую последовательность онРНК, обратную комплементарную цепь промотора 7SK для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей первую онРНК, промотор для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей SaCas9 (например, СК8е), нуклеиновую кислоту, кодирующую SaCas9, последовательность полиаденилирования, промотор H1m для экспрессии второй онРНК, вторую направляющую последовательность онРНК и вторую каркасную последовательность онРНК. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 10 и 15. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 10 и 16. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 12 и 16. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 1001 и 1005. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 1001 и 15. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 1001 и 16. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 1003 и 1005. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 16 и 1003. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 12 и 1010. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 12 и 1012. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 12 и 1013. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 10 и 1016. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 1017 и 16. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 1018 и 16. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 15 и 10. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 16 и 10. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 16 и 12. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 1005 и 1001. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 15 и 1001. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 16 и 1001. В некоторых вариантах осуществления первая

онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 1005 и 1003. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 1003 и 16. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 1010 и 12. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 1012 и 12. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 1013 и 12. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 1016 и 10. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 16 и 1017. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 16 и 1018. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая SaCas9, слита с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей последовательность ядерной локализации (NLS). В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая SaCas9, слита с двумя последовательностями нуклеиновой кислоты, каждая из которых кодирует последовательность ядерной локализации (NLS). В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая SaCas9, слита с тремя последовательностями нуклеиновой кислоты, каждая из которых кодирует последовательность ядерной локализации (NLS). В некоторых вариантах осуществления одна или более NLS представляют собой NLS SV40. В некоторых вариантах осуществления один или более NLS представляют собой NLS с-Мус. В некоторых вариантах осуществления NLS слит с SaCas9 с помощью линкера.

В некоторых вариантах осуществления вектор AAV содержит от 5' к 3' по отношению к плюс-цепи: обратную комплементарную цепь первой каркасной последовательности онРНК, обратную комплементарную цепь нуклеиновой кислоты, кодирующей первую направляющую последовательность онРНК, обратную комплементарную цепь промотора hU6c для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей первую онРНК, промотор для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей SaCas9 (например, CK8e), нуклеиновую кислоту, кодирующую SaCas9-ККН (например, последовательность, которая имеет по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с SEQ ID NO: 715 или их функциональные фрагменты), последовательность полиаденилирования, промотор hU6c для экспрессии второй онРНК, вторую направляющую последовательность онРНК и вторую каркасную последовательность онРНК. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 1001 и 1005. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 1001 и 15. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 1001 и 16. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 1003 и 1005. В

некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 16 и 1003. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 12 и 1010. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 12 и 1012. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 12 и 1013. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 10 и 1016. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 1017 и 16. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 1018 и 16. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 1005 и 1001. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 15 и 1001. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 16 и 1001. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 1005 и 1003. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 1003 и 16. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 1010 и 12. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 1012 и 12. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 1013 и 12. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 1016 и 10. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 16 и 1017. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 16 и 1018. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая SaCas9, слита с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей последовательность ядерной локализации (NLS). В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая SaCas9, слита с двумя последовательностями нуклеиновой кислоты, каждая из которых кодирует последовательность ядерной локализации (NLS). В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая SaCas9, слита с тремя последовательностями нуклеиновой кислоты, каждая из которых кодирует последовательность ядерной локализации (NLS). В некоторых вариантах осуществления одна или более NLS представляют собой NLS SV40. В некоторых вариантах осуществления один или более NLS представляют собой NLS с-Мус. В некоторых вариантах осуществления NLS слит с SaCas9 с помощью линкера.

В некоторых вариантах осуществления вектор AAV содержит от 5' к 3' по отношению к плюс-цепи: обратную комплементарную цепь первой каркасной

последовательности онРНК, обратную комплементарную цепь нуклеиновой кислоты, кодирующей первую направляющую последовательность онРНК, обратную комплементарную цепь промотора hU6c для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей первую онРНК, промотор для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей SaCas9 (например, СК8е), нуклеиновую кислоту, кодирующую SaCas9-ККН (например, последовательность, которая имеет по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с SEQ ID NO: 715 или их функциональные фрагменты), последовательность полиаденилирования, промотор 7SK для экспрессии второй онРНК, вторую направляющую последовательность онРНК и вторую каркасную последовательность онРНК. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 1001 и 1005. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 1001 и 15. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 1001 и 16. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 1003 и 1005. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 16 и 1003. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 12 и 1010. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 12 и 1012. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 12 и 1013. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 10 и 1016. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 1017 и 16. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 1018 и 16. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 1005 и 1001. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 15 и 1001. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 16 и 1001. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 1005 и 1003. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 1003 и 16. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 1010 и 12. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 1012 и 12. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 1013 и 12. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 1016 и 10. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 16 и 1017. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат

последовательности SEQ ID NO: 16 и 1018. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая SaCas9, слита с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей последовательность ядерной локализации (NLS). В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая SaCas9, слита с двумя последовательностями нуклеиновой кислоты, каждая из которых кодирует последовательность ядерной локализации (NLS). В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая SaCas9, слита с тремя последовательностями нуклеиновой кислоты, каждая из которых кодирует последовательность ядерной локализации (NLS). В некоторых вариантах осуществления одна или более NLS представляют собой NLS SV40. В некоторых вариантах осуществления один или более NLS представляют собой NLS с-Мус. В некоторых вариантах осуществления NLS слит с SaCas9 с помощью линкера.

В некоторых вариантах осуществления вектор AAV содержит от 5' к 3' по отношению к плюс-цепи: обратную комплементарную цепь первой каркасной последовательности онРНК, обратную комплементарную цепь нуклеиновой кислоты, кодирующей первую направляющую последовательность онРНК, обратную комплементарную цепь промотора hU6c для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей первую онРНК, промотор для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей SaCas9 (например, СК8е), нуклеиновую кислоту, кодирующую SaCas9-ККН (например, последовательность, которая имеет по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с SEQ ID NO: 715 или их функциональные фрагменты), последовательность полиаденилирования, промотор H1m для экспрессии второй онРНК, вторую направляющую последовательность онРНК и вторую каркасную последовательность онРНК. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 1001 и 1005. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 1001 и 15. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 1001 и 16. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 1003 и 1005. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 16 и 1003. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 12 и 1010. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 12 и 1012. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 12 и 1013. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 10 и 1016. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 1017 и 16. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 1018 и 16. В некоторых

вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 1005 и 1001. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 15 и 1001. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 16 и 1001. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 1005 и 1003. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 1003 и 16. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 1010 и 12. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 1012 и 12. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 1013 и 12. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 1016 и 10. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 16 и 1017. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 16 и 1018. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая SaCas9, слита с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей последовательность ядерной локализации (NLS). В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая SaCas9, слита с двумя последовательностями нуклеиновой кислоты, каждая из которых кодирует последовательность ядерной локализации (NLS). В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая SaCas9, слита с тремя последовательностями нуклеиновой кислоты, каждая из которых кодирует последовательность ядерной локализации (NLS). В некоторых вариантах осуществления одна или более NLS представляют собой NLS SV40. В некоторых вариантах осуществления один или более NLS представляют собой NLS с-Мус. В некоторых вариантах осуществления NLS слит с SaCas9 с помощью линкера.

В некоторых вариантах осуществления вектор AAV содержит от 5' к 3' по отношению к плюс-цепи: обратную комплементарную цепь первой каркасной последовательности онРНК, обратную комплементарную цепь нуклеиновой кислоты, кодирующей первую направляющую последовательность онРНК, обратную комплементарную цепь промотора 7SK для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей первую онРНК, промотор для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей SaCas9 (например, СК8е), нуклеиновую кислоту, кодирующую SaCas9-ККН (например, последовательность, которая имеет по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с SEQ ID NO: 715 или их функциональные фрагменты), последовательность полиаденилирования, промотор H1m для экспрессии второй онРНК, вторую направляющую последовательность онРНК и вторую каркасную последовательность онРНК. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая

представляют собой NLS SV40. В некоторых вариантах осуществления один или более NLS представляют собой NLS с-Мус. В некоторых вариантах осуществления NLS слит с SaCas9 с помощью линкера.

В некоторых вариантах осуществления вектор AAV содержит от 5' к 3' по отношению к плюс-цепи: обратную комплементарную цепь первой каркасной последовательности онРНК, обратную комплементарную цепь нуклеиновой кислоты, кодирующей первую направляющую последовательность онРНК, обратную комплементарную цепь промотора для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей первую онРНК, промотор для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей SluCas9 (например, СК8е), нуклеиновую кислоту, кодирующую SluCas9, последовательность полиаденилирования, промотор для экспрессии второй онРНК, вторую направляющую последовательность онРНК и вторую каркасную последовательность онРНК. В некоторых вариантах осуществления промотор для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей первую онРНК, представляет собой любой из промоторов hU6с, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления промотор для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей первую онРНК, содержит SEQ ID NO: 705. В некоторых вариантах осуществления промотор для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей первую онРНК, содержит SEQ ID NO: 9001. В некоторых вариантах осуществления промотор для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей первую онРНК, содержит SEQ ID NO: 9002. В некоторых вариантах осуществления промотор для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей первую онРНК, содержит SEQ ID NO: 9003. В некоторых вариантах осуществления промотор для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей первую онРНК, содержит SEQ ID NO: 9004. В некоторых вариантах осуществления промотор для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей первую онРНК, представляет собой любой из промоторов 7SK2, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления промотор для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей первую онРНК, содержит SEQ ID NO: 7005. В некоторых вариантах осуществления промотор для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей первую онРНК, содержит SEQ ID NO: 9006. В некоторых вариантах осуществления промотор для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей первую онРНК, содержит SEQ ID NO: 9007. В некоторых вариантах осуществления промотор для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей первую онРНК, содержит SEQ ID NO: 9008. В некоторых вариантах осуществления промотор для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей первую онРНК, содержит SEQ ID NO: 9009. В некоторых вариантах осуществления промотор для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей вторую онРНК, представляет собой любой из промоторов hU6с, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления промотор для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей вторую онРНК, содержит SEQ ID NO: 705. В некоторых вариантах осуществления промотор для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей вторую онРНК, содержит SEQ ID NO: 9001. В некоторых вариантах осуществления промотор для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей вторую онРНК, содержит SEQ ID NO: 9001. В некоторых вариантах осуществления промотор для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей вторую онРНК, содержит SEQ ID NO: 9001.

онРНК, содержит SEQ ID NO: 9002. В некоторых вариантах осуществления промотор для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей вторую онРНК, содержит SEQ ID NO: 9003. В некоторых вариантах осуществления промотор для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей вторую онРНК, содержит SEQ ID NO: 9004. В некоторых вариантах осуществления промотор для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей вторую онРНК, представляет собой любой из промоторов 7SK2, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления промотор для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей вторую онРНК, содержит SEQ ID NO: 705. В некоторых вариантах осуществления промотор для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей вторую онРНК, содержит SEQ ID NO: 9006. В некоторых вариантах осуществления промотор для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей вторую онРНК, содержит SEQ ID NO: 9007. В некоторых вариантах осуществления промотор для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей вторую онРНК, содержит SEQ ID NO: 9008. В некоторых вариантах осуществления промотор для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей вторую онРНК, содержит SEQ ID NO: 9009. В некоторых вариантах осуществления промотор для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей вторую онРНК, представляет собой любой из промоторов H1m, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления промотор для SluCas9 представляет собой промотор CK8e. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая SluCas9, слита с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей последовательность ядерной локализации (NLS). В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая SluCas9, слита с двумя последовательностями нуклеиновой кислоты, каждая из которых кодирует последовательность ядерной локализации (NLS). В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая SluCas9, слита с тремя последовательностями нуклеиновой кислоты, каждая из которых кодирует последовательность ядерной локализации (NLS). В некоторых вариантах осуществления одна или более NLS представляют собой NLS SV40. В некоторых вариантах осуществления один или более NLS представляют собой NLS с-Мус. В некоторых вариантах осуществления NLS слит с SluCas9 с помощью линкера.

В некоторых вариантах осуществления вектор AAV содержит от 5' к 3' по отношению к плюс-цепи: обратную комплементарную цепь первой каркасной последовательности онРНК, обратную комплементарную цепь нуклеиновой кислоты, кодирующей первую направляющую последовательность онРНК, обратную комплементарную цепь промотора hU6c для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей первую онРНК, промотор для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей SluCas9 (например, CK8e), нуклеиновую кислоту, кодирующую SluCas9, последовательность полиаденилирования, промотор hU6c для экспрессии второй онРНК, вторую направляющую последовательность онРНК и вторую каркасную последовательность онРНК. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая

последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей последовательность ядерной локализации (NLS). В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая SluCas9, слита с двумя последовательностями нуклеиновой кислоты, каждая из которых кодирует последовательность ядерной локализации (NLS). В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая SluCas9, слита с тремя последовательностями нуклеиновой кислоты, каждая из которых кодирует последовательность ядерной локализации (NLS). В некоторых вариантах осуществления одна или более NLS представляют собой NLS SV40. В некоторых вариантах осуществления один или более NLS представляют собой NLS с-Мус. В некоторых вариантах осуществления NLS слит с SluCas9 с помощью линкера.

В некоторых вариантах осуществления вектор AAV содержит от 5' к 3' по отношению к плюс-цепи: обратную комплементарную цепь первой каркасной последовательности онРНК, обратную комплементарную цепь нуклеиновой кислоты, кодирующей первую направляющую последовательность онРНК, обратную комплементарную цепь промотора hU6c для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей первую онРНК, промотор для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей SluCas9 (например, CK8e), нуклеиновую кислоту, кодирующую SluCas9, последовательность полиаденилирования, промотор 7SK для экспрессии второй онРНК, вторую направляющую последовательность онРНК и вторую каркасную последовательность онРНК. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 148 и 134. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 149 и 135. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 150 и 135. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 131 и 136. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 151 и 136. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 139 и 131. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 140 и 131. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 140 и 151. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 141 и 148. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 144 и 149. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 144 и 150. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 145 и 131. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 145 и 151. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 146 и 148. В некоторых

вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 134 и 148. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 135 и 149. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 135 и 150. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 136 и 131. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 136 и 151. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 131 и 139. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 131 и 140. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 151 и 140. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 148 и 141. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 149 и 144. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 150 и 144. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 131 и 145. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 151 и 145. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 148 и 146. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая SluCas9, слита с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей последовательность ядерной локализации (NLS). В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая SluCas9, слита с двумя последовательностями нуклеиновой кислоты, каждая из которых кодирует последовательность ядерной локализации (NLS). В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая SluCas9, слита с тремя последовательностями нуклеиновой кислоты, каждая из которых кодирует последовательность ядерной локализации (NLS). В некоторых вариантах осуществления одна или более NLS представляют собой NLS SV40. В некоторых вариантах осуществления один или более NLS представляют собой NLS с-Мус. В некоторых вариантах осуществления NLS слит с SluCas9 с помощью линкера.

В некоторых вариантах осуществления вектор AAV содержит от 5' к 3' по отношению к плюс-цепи: обратную комплементарную цепь первой каркасной последовательности онРНК, обратную комплементарную цепь нуклеиновой кислоты, кодирующей первую направляющую последовательность онРНК, обратную комплементарную цепь промотора hU6c для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей первую онРНК, промотор для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей SluCas9 (например, СК8е), нуклеиновую кислоту, кодирующую SluCas9, последовательность полиаденилирования, промотор H1m для экспрессии второй онРНК,

последовательности SEQ ID NO: 148 и 146. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая SluCas9, слита с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей последовательность ядерной локализации (NLS). В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая SluCas9, слита с двумя последовательностями нуклеиновой кислоты, каждая из которых кодирует последовательность ядерной локализации (NLS). В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая SluCas9, слита с тремя последовательностями нуклеиновой кислоты, каждая из которых кодирует последовательность ядерной локализации (NLS). В некоторых вариантах осуществления одна или более NLS представляют собой NLS SV40. В некоторых вариантах осуществления один или более NLS представляют собой NLS с-Мус. В некоторых вариантах осуществления NLS слит с SluCas9 с помощью линкера.

В некоторых вариантах осуществления вектор AAV содержит от 5' к 3' по отношению к плюс-цепи: обратную комплементарную цепь первой каркасной последовательности онРНК, обратную комплементарную цепь нуклеиновой кислоты, кодирующей первую направляющую последовательность онРНК, обратную комплементарную цепь промотора 7SK для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей первую онРНК, промотор для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей SluCas9 (например, СК8е), нуклеиновую кислоту, кодирующую SluCas9, последовательность полиаденилирования, промотор H1m для экспрессии второй онРНК, вторую направляющую последовательность онРНК и вторую каркасную последовательность онРНК. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 148 и 134. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 149 и 135. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 150 и 135. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 131 и 136. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 151 и 136. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 139 и 131. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 140 и 131. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 140 и 151. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 141 и 148. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 144 и 149. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 144 и 150. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 145 и 131. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности

SEQ ID NO: 145 и 151. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 146 и 148. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 134 и 148. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 135 и 149. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 135 и 150. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 136 и 131. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 136 и 151. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 131 и 139. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 131 и 140. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 151 и 140. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 148 и 141. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 149 и 144. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 150 и 144. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 131 и 145. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 151 и 145. В некоторых вариантах осуществления первая онРНК и вторая онРНК содержат последовательности SEQ ID NO: 148 и 146. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая SluCas9, слита с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей последовательность ядерной локализации (NLS). В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая SluCas9, слита с двумя последовательностями нуклеиновой кислоты, каждая из которых кодирует последовательность ядерной локализации (NLS). В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая SluCas9, слита с тремя последовательностями нуклеиновой кислоты, каждая из которых кодирует последовательность ядерной локализации (NLS). В некоторых вариантах осуществления одна или более NLS представляют собой NLS SV40. В некоторых вариантах осуществления один или более NLS представляют собой NLS с-Мус. В некоторых вариантах осуществления NLS слит с SluCas9 с помощью линкера.

В некоторых вариантах осуществления изобретение обеспечивает композицию, содержащую по меньшей мере две нуклеиновые кислоты. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит по меньшей мере две молекулы нуклеиновой кислоты, где первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, кодирующую любую из эндонуклеаз, описанных в данном документе (например, SaCas9 или SluCas9), где вторая молекула нуклеиновой кислоты кодирует первую направляющую РНК и вторую направляющую РНК, причем первая направляющая РНК и вторая

направляющая РНК не имеют одинаковой последовательности, и где вторая молекула нуклеиновой кислоты не кодирует эндонуклеазу. В некоторых вариантах осуществления первая молекула нуклеиновой кислоты также кодирует копию первой направляющей РНК и копию второй направляющей РНК. В некоторых вариантах осуществления первая молекула нуклеиновой кислоты не кодирует никаких направляющих РНК. В некоторых вариантах осуществления вторая молекула нуклеиновой кислоты кодирует две копии первой направляющей РНК и две копии второй направляющей РНК. В некоторых вариантах осуществления вторая нуклеиновая молекула кодирует две копии первой направляющей РНК и одну копию второй направляющей РНК. В некоторых вариантах осуществления вторая молекула нуклеиновой кислоты кодирует одну копию первой направляющей РНК и две копии второй направляющей РНК. В некоторых вариантах осуществления вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит две копии первой направляющей РНК и три копии второй направляющей РНК. В некоторых вариантах осуществления вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит три копии первой направляющей РНК и две копии второй направляющей РНК. В некоторых вариантах осуществления вторая молекула нуклеиновой кислоты кодирует три копии первой направляющей РНК и три копии второй направляющей РНК. В некоторых вариантах осуществления молекула первой нуклеиновой кислоты содержит от 5' до 3' по отношению к плюс-цепи: обратную комплементарную цепь первой каркасной последовательности направляющей РНК, обратную комплементарную цепь нуклеотидной последовательности, кодирующей последовательность первой направляющей РНК, обратную комплементарную цепь промотора для экспрессии последовательности нуклеотидов, кодирующей последовательность первой направляющей РНК, промотор для экспрессии нуклеотидной последовательности, кодирующей эндонуклеазу, нуклеотидную последовательность, кодирующую эндонуклеазу, последовательность полиаденилирования, промотор для экспрессии второй направляющей РНК в том же направлении, что и промотор для эндонуклеазы, последовательность второй направляющей РНК и вторую каркасную последовательность направляющей РНК. В некоторых вариантах осуществления промотор для экспрессии нуклеотидной последовательности, кодирующей первую последовательность направляющей РНК, в первой молекуле нуклеиновой кислоты представляет собой промотор U6, и промотор для экспрессии нуклеотидной последовательности, кодирующей вторую направляющую РНК, в первой молекуле нуклеиновой кислоты является промотором U6. В некоторых вариантах осуществления первая молекула нуклеиновой кислоты кодирует эндонуклеазу *Cas9 Staphylococcus aureus* (SaCas9), и первая направляющая РНК содержит первую последовательность, а вторая направляющая РНК содержит вторую последовательность из любой из следующих пар последовательностей: SEQ ID NO: 10 и 15; 10 и 16; 12 и 16; 1001 и 1005; 1001 и 15; 1001 и 16; 1003 и 1005; 16 и 1003; 12 и 1010; 12 и 1012; 12 и 1013; 10 и 1016; 1017 и 1005; 1017 и 16; 1018 и 16; 15 и 10; 16 и 10; 16 и 12; 1005 и 1001; 15 и 1001; 16 и 1001; 1005 и 1003; 1003 и 16; 1010 и 12; 1012 и 12; 1013 и 12; 1016 и 10; 1005 и 1017; 16 и 1017; и 16 и 1018. В

некоторых вариантах осуществления первая направляющая РНК содержит последовательность SEQ ID NO: 12, и вторая направляющая РНК содержит последовательность SEQ ID NO: 1013. В некоторых вариантах осуществления первая направляющая РНК содержит последовательность SEQ ID NO: 1013, и вторая направляющая РНК содержит последовательность SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления первая молекула нуклеиновой кислоты кодирует эндонуклеазу *Staphylococcus aureus* (SluCas9), и первая направляющая РНК содержит первую последовательность, а вторая направляющая РНК содержит вторую последовательность из любой из следующих пар последовательностей: SEQ ID NO: 148 и 134; 149 и 135; 150 и 135; 131 и 136; 151 и 136; 139 и 131; 139 и 151; 140 и 131; 140 и 151; 141 и 148; 144 и 149; 144 и 150; 145 и 131; 145 и 151; 146 и 148; 134 и 148; 135 и 149; 135 и 150; 136 и 131; 136 и 151; 131 и 139; 151 и 139; 131 и 140; 151 и 140; 148 и 141; 149 и 144; 150 и 144; 131 и 145; 151 и 145; и 148 и 146. В некоторых вариантах осуществления а) первая направляющая РНК содержит последовательность SEQ ID NO: 148, а вторая направляющая РНК содержит последовательность SEQ ID NO: 134; б) вторая направляющая РНК содержит последовательность SEQ ID NO: 145, а вторая направляющая РНК содержит последовательность SEQ ID NO: 131, с) первая направляющая РНК содержит последовательность SEQ ID NO: 134, а вторая направляющая РНК содержит последовательность SEQ ID NO: 148; д) вторая направляющая РНК содержит последовательность SEQ ID NO: 131, а вторая направляющая РНК содержит последовательность SEQ ID NO: 145.

В некоторых вариантах осуществления первая молекула нуклеиновой кислоты находится в первом векторе (например, AAV9), а вторая нуклеиновая кислота находится в отдельном втором векторе. В некоторых вариантах осуществления первый вектор представляет собой AAV9. В некоторых вариантах осуществления второй вектор представляет собой AAV9. В предпочтительных вариантах осуществления вектор AAV9 имеет размер менее 5 т.п.н. от ITR до ITR, включая обе ITR. В конкретных вариантах осуществления вектор AAV9 имеет размер менее 4,9 т.п.н. от ITR до ITR, включая оба ITR. В дополнительных вариантах осуществления вектор AAV9 имеет размер менее 4,85 т.п.н. от ITR до ITR, включая обе ITR. В дополнительных вариантах осуществления вектор AAV9 имеет размер менее 4,8 т.п.н. от ITR до ITR, включая обе ITR. В дополнительных вариантах осуществления вектор AAV9 имеет размер менее 4,75 т.п.н. от ITR до ITR, включая оба ITR. В дополнительных вариантах осуществления вектор AAV9 имеет размер менее 4,7 т.п.н. от ITR до ITR, включая обе ITR. В некоторых вариантах осуществления второй вектор содержит от 5' к 3' по отношению к плюс-цепи: промотор для экспрессии первой копии первой направляющей РНК (например, промотор U6), первую копию нуклеотидной последовательности, кодирующей первую направляющую РНК, первую копию нуклеотидной последовательности, кодирующей каркас первой направляющей РНК, промотор для экспрессии второй копии первой направляющей РНК (например, промотор H1), вторую копию нуклеотидной последовательности, кодирующей первую

направляющую РНК, вторую копию нуклеотидной последовательности, кодирующей первый каркас направляющей РНК, промотор для экспрессии второй направляющей РНК (например, промотор 7SK), нуклеотидную последовательность, кодирующую вторую направляющую РНК, и нуклеотидную последовательность, кодирующую каркас второй направляющей РНК. В некоторых вариантах осуществления второй вектор содержит от 5' к 3' по отношению к плюс-цепи: промотор для экспрессии первой направляющей РНК (например, промотор U6), нуклеотидную последовательность, кодирующую первую направляющую РНК, нуклеотидную последовательность, кодирующую каркас первой направляющей РНК, промотор для экспрессии второй направляющей РНК (например, промотор 7SK), нуклеотидную последовательность, кодирующую вторую направляющую РНК, и нуклеотидную последовательность, кодирующую каркас второй направляющей РНК. В некоторых вариантах осуществления второй вектор содержит спейсерную последовательность (например, последовательность десмина 3'UTR) между нуклеотидной последовательностью, кодирующей первую направляющую каркасную последовательность, и промотором для экспрессии второй направляющей последовательности. В некоторых вариантах осуществления второй вектор содержит от 5' к 3' по отношению к плюс-цепи: обратную комплементарную цепь нуклеотидной последовательности, кодирующей каркас для первой направляющей РНК, обратную комплементарную цепь нуклеотидной последовательности, кодирующей первую направляющую РНК, обратную комплементарную цепь промотора для экспрессии первой направляющей РНК (например, промотора U6с), промотора для экспрессии второй направляющей РНК (например, промотора U6с), нуклеотидную последовательность, кодирующую вторую направляющую РНК, и нуклеотидную последовательность, кодирующую каркас второй направляющей РНК. В некоторых вариантах осуществления второй вектор содержит буферную последовательность (например, последовательность десмина 3'UTR) между обратной комплементарной цепью промотора для экспрессии первой направляющей РНК и промотора для экспрессии второй направляющей РНК. В некоторых вариантах осуществления второй вектор содержит от 5' к 3' по отношению к плюс-цепи: обратную комплементарную цепь нуклеотидной последовательности, кодирующей первую копию каркаса первой направляющей РНК, обратную комплементарную цепь нуклеотидной последовательности, кодирующей первую копию первой направляющей РНК, обратную комплементарную цепь промотора для экспрессии первой копии первой направляющей РНК (например, промотора 7SK2), обратную комплементарную цепь второй копии нуклеотидной последовательности, кодирующей каркас первой направляющей РНК, обратную комплементарную цепь второй копии нуклеотидной последовательности, кодирующей первую направляющую РНК, обратную комплементарную цепь промотора для экспрессии второй копии нуклеотидной последовательности, кодирующей первую направляющую РНК (например, промотора hU6с), промотор для экспрессии первой копии второй направляющей РНК (например, промотор hU6с), первую копию нуклеотидной последовательности, кодирующей вторую

направляющую РНК, первую копию нуклеотидной последовательности, кодирующей каркас второй направляющей РНК, промотор для экспрессии второй копии второй направляющей РНК (например, промотор 7Sk2), вторую копию нуклеотидной последовательности, кодирующей вторую направляющую РНК, и вторую копию нуклеотидной последовательности, кодирующей каркас второй направляющей РНК. В некоторых вариантах осуществления второй вектор содержит спейсерную последовательность (например, последовательность десмина 3'UTR) между обратной комплементарной цепью промотора для экспрессии второй копии первой направляющей РНК и промотора для экспрессии первой копии второй направляющей РНК. В некоторых вариантах осуществления второй вектор содержит от 5' к 3' по отношению к плюс-цепи: обратную комплементарную цепь нуклеотидной последовательности, кодирующей первую копию каркаса первой направляющей РНК, обратную комплементарную цепь первой копии нуклеотидной последовательности, кодирующей первую направляющую РНК, обратную комплементарную цепь промотора для экспрессии первой копии первой направляющей РНК (например, промотора 7SK2), обратную комплементарную цепь первой копии нуклеотидной последовательности, кодирующей каркас второй направляющей РНК, обратную комплементарную цепь нуклеотидной последовательности, кодирующей первую копию второй направляющей РНК, обратную комплементарную цепь промотора для экспрессии первой копии второй направляющей РНК (например, промотора hU6c), промотор для экспрессии второй копии второй направляющей РНК (например, промотор hU6c), вторую копию нуклеотидной последовательности, кодирующей вторую направляющую РНК, вторую копию нуклеотидной последовательности, кодирующей каркас второй направляющей РНК, промотор для экспрессии второй копии первой направляющей РНК (например, промотор 7SK2), вторую копию нуклеотидной последовательности, кодирующей первую направляющую РНК, и вторую копию нуклеотидной последовательности, кодирующей каркас первой направляющей РНК. В некоторых вариантах осуществления второй вектор содержит спейсерную последовательность (например, последовательность десмина 3'UTR) между обратной комплементарной цепью промотора для экспрессии первой копии второй направляющей РНК и промотором для экспрессии второй копии первой направляющей РНК. В некоторых вариантах осуществления второй вектор содержит от 5' к 3' по отношению к плюс-цепи: обратную комплементарную цепь нуклеотидной последовательности, кодирующей каркас первой направляющей РНК, обратную комплементарную цепь нуклеотидной последовательности, кодирующей первую направляющую РНК, обратную комплементарную цепь промотора для экспрессии первой направляющей РНК (например, промотора hU6c), промотора для экспрессии второй направляющей РНК (например, промотора hU6c), нуклеотидную последовательность, кодирующую вторую направляющую РНК, и нуклеотидную последовательность, кодирующую каркас второй направляющей РНК. В некоторых вариантах осуществления второй вектор содержит буферную последовательность (например, последовательность десмина 3'UTR) между

обратной комплементарной цепью промотора для экспрессии первой направляющей РНК и промотора для экспрессии второй направляющей РНК. В конкретных вариантах осуществления первая направляющая РНК отличается от второй направляющей РНК. В некоторых вариантах осуществления первая направляющая РНК содержит последовательность SEQ ID NO: 12, и вторая направляющая РНК содержит последовательность SEQ ID NO: 1013. В некоторых вариантах осуществления первая направляющая РНК содержит последовательность SEQ ID NO: 1013, и вторая направляющая РНК содержит последовательность SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления а) первая направляющая РНК содержит последовательность SEQ ID NO: 148, и вторая направляющая РНК содержит последовательность SEQ ID NO: 134; б) вторая направляющая РНК содержит последовательность SEQ ID NO: 145, и вторая направляющая РНК содержит последовательность SEQ ID NO: 131; в) первая направляющая РНК содержит последовательность SEQ ID NO: 134, и вторая направляющая РНК содержит последовательность SEQ ID NO: 148; или д) вторая направляющая РНК содержит последовательность SEQ ID NO: 131, и вторая направляющая РНК содержит последовательность SEQ ID NO: 145. В некоторых вариантах осуществления каркас для первой направляющей РНК содержит последовательность SEQ ID NO: 901. В некоторых вариантах осуществления каркас для второй направляющей РНК содержит последовательность SEQ ID NO: 901. В некоторых вариантах осуществления любой из вторых векторов содержит спейсерную последовательность. В некоторых вариантах осуществления спейсерную последовательность представляет собой последовательность 3'UTR. В некоторых вариантах осуществления последовательность десмина 3'UTR содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 99% или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 552 (taattaacagatttgtaaatgaagaggaaatatacaaatattaatgaacaaaatagtgtgttagaacaagac tcacatacaggagacatacacatgttaaaaggaggcattttgaatttggggaaaactacaaattcagtatagggttggagcactttgatagc taagaggtggggtagggggcagagtgaaggctgtctctctttactccttctaaaaatattccagtggatcaaagatgtaggaaacgatggat ccatgtaggcctcagccttcaagtttctctctgagatttcagggattatcctttaaggagtcaggaagagggtagagatcacaaagataata agctcagacagtttgatgttaataaacctcaggagggttttagtcttaaggctcctaattctgacctccaaactgacttttcagaaactccaaa agcctctc) или ее фрагментами.

В некоторых вариантах осуществления, если композиция содержит одну или более нуклеиновых кислот, кодирующих нацеленную на РНК эндонуклеазу, и одну или более направляющих РНК, одна или более нуклеиновых кислот сконструированы таким образом, что они экспрессируют одну или более направляющих РНК на эквивалентном или более высоком уровне (например, большее количество экспрессированных копий трансгена) по сравнению с уровнем экспрессии нацеленной на РНК эндонуклеазы. В некоторых вариантах осуществления одна или более нуклеиновых кислот сконструированы таким образом, что они экспрессируют (например, в среднем в 100 клетках) одну или более направляющих РНК по меньшей мере в 1,1, 1,2, 1,3, 1,4 или 1,5 раза выше уровня (например, большее количество экспрессированных копий трансгена) по сравнению с уровнем

экспрессии РНК-направляемой эндонуклеазы. В некоторых вариантах осуществления одна или более нуклеиновых кислот сконструированы таким образом, что они экспрессируют одну или более направляющих РНК на уровне в 1,01-1,5, 1,01-1,4, 1,01-1,3, 1,01-1,2, 1,01-1,1, 1,1-2,0, 1,1-1,8, 1,1-1,6, 1,1-1,4, 1,1-1,3, 1,2-2,0, 1,2-1,8, 1,2-1,6, 1,2-1,4, 1,4-2,0, 1,4-1,8, 1,4-1,6, 1,6-2,0, 1,6-1,8, или 1,8-2,0 раза выше (например, большее количество экспрессированных копий трансгена) по сравнению с уровнем экспрессии нацеленной на РНК эндонуклеазы. В некоторых вариантах осуществления одна или более направляющих РНК предназначены для экспрессии на более высоком уровне, чем нацеленная на РНК эндонуклеаза путем: а) использования одного или более регуляторных элементов (например, промоторов или энхансеров), которые экспрессируют одну или более направляющих РНК на более высоком уровне по сравнению с регуляторными элементами (например, промоторами или энхансерами) для экспрессии нацеленной на РНК эндонуклеазы; и/или б) экспрессии большего количества копий одной или более направляющих РНК по сравнению с количеством копий нацеленной на РНК эндонуклеазы (например, в 2 или 3 раза больше копий нуклеотидных последовательностей, кодирующих одну или более направляющих РНК, по сравнению с количеством копий нуклеотидных последовательностей, кодирующих нацеленную на РНК эндонуклеазу). Например, в некоторых вариантах осуществления композиция содержит несколько молекул нуклеиновых кислот (например, в нескольких векторах), где на каждую нуклеотидную последовательность, кодирующую РНК-направляемую эндонуклеазу в молекулах нуклеиновой кислоты в композиции, приходится две или три копии нуклеотидной последовательности, кодирующей направляющую РНК в молекулах нуклеиновой кислоты в композиции. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит первую направляющую РНК и вторую направляющую РНК, где первая направляющая РНК и вторая направляющая РНК не являются одними и теми же (например, любая из пар направляющих РНК, описанных в данном документе), и для каждой нуклеотидной последовательности, кодирующей РНК-направляемую эндонуклеазу в молекулах нуклеиновой кислоты в композиции имеет две или три копии нуклеотидной последовательности, кодирующей первую направляющую РНК и/или вторую направляющую РНК.

В некоторых вариантах осуществления любая из нуклеиновых кислот, описанных в данном документе, кодирует нацеленную на РНК эндонуклеазу. В некоторых вариантах осуществления нацеленная на РНК эндонуклеаза обладает расщепляющей активностью, которую также можно назвать активностью двухцепочечной эндонуклеазы. В некоторых вариантах осуществления нацеленная на РНК эндонуклеаза включает нуклеазу Cas. Примеры нуклеаз Cas9 включают в себя системы CRISPR типа II *S. pyogenes*, *S. aureus* и других прокариот (см., например, перечень в следующем параграфе) и их модифицированные (например, сконструированные или мутантные) варианты. См., например, US2016/0312198 A1; US 2016/0312199 A1. В конкретных вариантах осуществления нацеленная на РНК эндонуклеаза представляет собой фермент CRISPR Cas

типа II. Другие примеры нуклеаз Cas включают комплекс Csm или Cmr системы CRISPR типа III или ее субъединицу Cas10, Csm1 или Cmr2; и комплекс Cascade системы CRISPR типа I или ее субъединицу Cas3. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза Cas может происходить из системы типа IIA, типа IIB или типа IIC. Обсуждение различных систем CRISPR и нуклеаз Cas см., например, в Makarova et al., NAT. REV. MICROBIOL. 9:467-477 (2011); Makarova et al., NAT. REV. MICROBIOL. 13: 722-36 (2015); Shmakov et al., MOLECULAR CELL, 60:385-397 (2015).

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

В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая SaCas9, кодирует SaCas9, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 711:

```

KRNYILGLDIGITSVGYGIIDYETRDVIDAGVRLFKEANVENNEGRRSKRGARRLKRRRR
HRIQVRVKKLLFDYNLLTDHSELGINPYEARVKGLSQKLSEEEFSAALLHLAKRRGVHN
VNEVEEDTGNELSTKEQISRNSKALEEKYVAELQLERLKKDGEVRGSINRFKTSYVKE
AKQLLKVKAYHQLDQSFIDTYIDLLETRRTYYEGPGEPSFGWKDIKEWYEMLMGHC
TYFPEELRSVKYAYNADLYNALNDLNNLVITRDENEKLEYEKFQIENVFKQKKKPTL
KQIAKEILVNEEDIKGYRVTSTGKPEFTNLKVYHDIKDITARKEIENAELLDQIAKILTIY
QSSEDIQEELTNLNSLTQEEIEQISNLKGYTGTHNLSLKAINLILDELWHTNDNQIAIFNR

```

LKLVPPKKVDLSQQKEIPTTLVDDFILSPVVKRSFIQSIKVINAIKKYGLPNDIIIELAREKN
 SKDAQKMINEMQKRNRQTNERIEEII RTTGKENAKYLIEKIKLHDMQEGKCLYSLEAIPL
 EDLLNNPFNYEVDHII PRSVSFDNSFNKVLVKQEENSKKGNRTPFQYLSSSDSKISYETF
 KKHILNLA KGKGRISKTKKEYLLEERDINRFSVQKDFINRNLVDTRYATRGLMNLLRSY
 FRVNNLDVKVKSINGGFTSFLRRKWKFKKERNKGYKHHAEDALIIANADFIFKEWKKL
 DKAKKVMENQMFEKQAESMPEIETE QEYKEIFITPHQIKHIKDFKDYKYSHRVDKKPN
 RELINDTLYSTRKDDKGNTLIVNNLNGLYDKDNDKLKKLINKSPEKLLMYHHPQTYQ
 KLKLIMEQYGDEKNPLYKY YEETGNYLTKYSKKDNGPVIKKIKYYGNKLNAHLDITDD
 YPNSRNKVVKLSLKPYRFDVYLDNGVYKFVTVKNLDVIKKENYYEVNSKCYEEAKKL
 KKISNQAEFIASFYNNDLIKINGEL YRVIGVNNDLLNRIEVMIDITYREYLENMNDKRPP
 RIIKTIASKTQSIKKYSTDILGNLYEVKSKKHPQIIKKG.

В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая SaCas9, содержит нуклеиновую кислоту SEQ ID NO: 9014:

AAGCGCAATTACATCCTGGGCCTGGATATCGGCATCACCTCCGTGGGCTACGGCATC
 ATCGACTATGAGACACGGGATGTGATCGACGCCGGCGTGAGACTGTTCAAGGAGGC
 CAACGTGGAGAACAATGAGGGCCGGCGGAGCAAGAGGGGAGCAAGGCGCCTGAAG
 CGGAGAAGGCGCCACAGAATCCAGAGAGTGAAGAAGCTGCTGTTCGATTACAACCT
 GCTGACCGACCACTCCGAGCTGTCTGGCATCAATCCTTATGAGGCCCGGGTGAAGG
 GCCTGTCCCAGAAGCTGTCTGAGGAGGAGTTTTCTGCCGCCCTGCTGCACCTGGCAA
 AGAGGAGAGGCGTGCACAACGTGAATGAGGTGGAGGAGGACACCGGCAACGAGCT
 GAGCACAAGGAGCAGATCAGCCGCAATTCCAAGGCCCTGGAGGAGAAGTATGTG
 GCCGAGCTGCAGCTGGAGCGGCTGAAGAAGGATGGCGAGGTGAGGGGCTCCATCA
 ATCGCTTCAAGACCTCTGACTACGTGAAGGAGGCCAAGCAGCTGCTGAAGGTGCAG
 AAGGCCTACCACCAGCTGGATCAGAGCTTTATCGATACATATATCGACCTGCTGGAG
 ACCAGGCGCACATACTATGAGGGACCAGGAGAGGGCTCCCCCTTCGGCTGGAAGGA
 CATCAAGGAGTGGTACGAGATGCTGATGGGCCACTGCACCTATTTTCCAGAGGAGC
 TGAGATCCGTGAAGTACGCCTATAACGCCGATCTGTACAACGCCCTGAATGACCTGA
 ACAACCTGGTCATCACCAGGGATGAGAACGAGAAGCTGGAGTACTATGAGAAGTTC
 CAGATCATCGAGAACGTGTTCAAGCAGAAGAAGAAGCCTACACTGAAGCAGATCGC
 CAAGGAGATCCTGGTGAACGAGGAGGACATCAAGGGCTACCGCGTGACCAGCACA
 GGCAAGCCAGAGTTCACCAATCTGAAGGTGTATCACGATATCAAGGACATCACAGC
 CCGGAAGGAGATCATCGAGAACGCCGAGCTGCTGGATCAGATCGCCAAGATCCTGA
 CCATCTATCAGAGCTCCGAGGACATCCAGGAGGAGCTGACCAACCTGAATAGCGAG
 CTGACACAGGAGGAGATCGAGCAGATCAGCAATCTGAAGGGCTACACCGGCACACA
 CAACCTGTCCCTGAAGGCCATCAATCTGATCCTGGATGAGCTGTGGCACACAAACG
 ACAATCAGATCGCCATCTTTAACAGGCTGAAGCTGGTGCCAAAGAAGGTGGACCTG
 AGCCAGCAGAAGGAGATCCCAACCACACTGGTGGACGATTTTCATCCTGTCCCCCGT
 GGTGAAGCGGAGCTTCATCCAGAGCATCAAAGTGATCAACGCCATCATCAAGAAGT
 ACGGCCTGCCCAATGATATCATCATCGAGCTGGCCAGGGAGAAGAACTCTAAGGAC
 GCCCAGAAGATGATCAATGAGATGCAGAAGAGGAACCGCCAGACCAATGAGCGGA

TCGAGGAGATCATCAGAACCACAGGCAAGGAGAACGCCAAGTACCTGATCGAGAA
 GATCAAGCTGCACGATATGCAGGAGGGCAAGTGTCTGTATAGCCTGGAGGCCATCC
 CTCTGGAGGACCTGCTGAACAATCCATTCAACTACGAGGTGGATCACATCATCCCCC
 GGAGCGTGAGCTTCGACAATTCTTTAACAATAAGGTGCTGGTGAAGCAGGAGGAG
 AACTCTAAGAAGGGCAATAGGACCCCTTTCCAGTACCTGTCTAGCTCCGATTCTAAG
 ATCAGCTACGAGACCTTCAAGAAGCACATCCTGAATCTGGCCAAGGGCAAGGGCCG
 CATCTCTAAGACCAAGAAGGAGTACCTGCTGGAGGAGCGGGACATCAACAGATTCA
 GCGTGCAGAAGGACTTCATCAACCGGAATCTGGTGGACACCAGATACGCCACACGC
 GGCTGATGAATCTGCTGCGGTCTATTTTCAGAGTGAACAATCTGGATGTGAAGGTG
 AAGAGCATCAACGGCGGCTTCACCTCCTTTCTGCGGAGAAAGTGGAAGTTTAAGAA
 GGAGAGAAACAAGGGCTATAAGCACCCACGCCGAGGATGCCCTGATCATCGCCAATG
 CCGACTTCATCTTTAAGGAGTGGAAGAAGCTGGACAAGGCCAAGAAAGTGATGGAG
 AACCAGATGTTTCGAGGAGAAGCAGGCCGAGAGCATGCCCCGAGATCGAGACCGAGC
 AGGAGTACAAGGAGATTTTCATCACACCTCACCAGATCAAGCACATCAAGGACTTC
 AAGGACTACAAGTATTCCACAGGGTGGATAAGAAGCCCAACCGCGAGCTGATCAA
 TGACACCCTGTATTCTACAAGGAAGGACGATAAGGGCAATACCCTGATCGTGAACA
 ATCTGAACGGCCTGTACGACAAGGATAATGACAAGCTGAAGAAGCTGATCAACAAG
 AGCCCCGAGAAGCTGCTGATGTACCACCACGATCCTCAGACATATCAGAAGCTGAA
 GCTGATCATGGAGCAGTACGGCGACGAGAAGAACCCACTGTATAAGTACTATGAGG
 AGACCGGCAACTACCTGACAAAGTATTCCAAGAAGGATAATGGCCCCGTGATCAAG
 AAGATCAAGTACTATGGCAACAAGCTGAATGCCACCTGGACATCACCGACGATTA
 CCCCAACAGCCGGAATAAGGTGGTGAAGCTGAGCCTGAAGCCATACAGGTTCGACG
 TGTACCTGGACAACGGCGTGTATAAGTTTGTGACAGTGAAGAATCTGGATGTGATCA
 AGAAGGAGAACTACTATGAAGTGAATAGCAAGTGCTACGAGGAGGCCAAGAAGCT
 GAAGAAGATCAGCAACCAGGCCGAGTTCATCGCCTCTTTTTACAACAATGACCTGAT
 CAAGATCAATGGCGAGCTGTATAGAGTGATCGGCGTGAACAATGATCTGCTGAACC
 GCATCGAAGTGAATATGATCGACATCACCTACCGGGAGTATCTGGAGAACATGAAT
 GATAAGAGGCCCCCTCGCATCATCAAGACCATCGCCTCTAAGACACAGAGCATCAA
 GAAGTACTCTACAGACATCCTGGGCAACCTGTATGAGGTGAAGAGCAAGAAGCACC
 CTCAGATCATCAAGAAGGGC.

В некоторых вариантах осуществления, содержащих нуклеиновую кислоту, кодирующую SaCas9, SaCas9 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 711.

В некоторых вариантах осуществления SaCas9 представляет собой вариант аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 711. В некоторых вариантах осуществления SaCas9 содержит аминокислоту, отличную от E, в положении, соответствующем положению 781 SEQ ID NO: 711. В некоторых вариантах осуществления SaCas9 содержит аминокислоту, отличную от N, в положении, соответствующем положению 967 SEQ ID NO: 711. В некоторых вариантах осуществления SaCas9 содержит аминокислоту, отличную от R, в положении, соответствующем положению 1014 SEQ ID

SEQ ID NO: 711; аминокислоту, отличную от N, в положении, соответствующем положению 967 SEQ ID NO: 711; и аминокислоту, отличную от R, в положении, соответствующем положению 1014 SEQ ID NO: 711. В некоторых вариантах осуществления SaCas9 содержит A в положении, соответствующем положению 244 SEQ ID NO: 711; A в положении, соответствующем положению 412 SEQ ID NO: 711; A в положении, соответствующем положению 418 SEQ ID NO: 711; A в положении, соответствующем положению 653 SEQ ID NO: 711; K в положении, соответствующем положению 781 SEQ ID NO: 711; K в положении, соответствующем положению 967 SEQ ID NO: 711; и H в положении, соответствующем положению 1014 SEQ ID NO: 711.

В некоторых вариантах осуществления SaCas9 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 715 (обозначенной в данном документе как SaCas9-KKH или SACAS9KKH):

KRNYILGLDIGITSVGYGIIDYETRDVIDAGVRLFKEANVENNEGRRSKRGARRLKRRRR
HRIQVRVKKLLFDYNLLTDHSELGINPYEARVKGLSQKLSEEEFSAALLHLAKRRGVHN
VNEVEEDTGNELSTKEQISRNSKALEEKYVAELQLERLKKDGEVRGSINRFKTS DYVKE
AKQLLKVKAYHQLDQSFIDTYIDLLETRRTYYEGPGEPSFGWKDIKEWYEMLMGHC
TYFPEELRSVKYAYNADLYNALNDLNNLVITRDENEKLEYEYKFQIENVFKQKKKPTL
KQIAKEILVNEEDIKGYRVTSTGKPEFTNLKVYHDIKDITARKEIENAEELLDQIAKILTIY
QSSEDIQEELTNLNSLTQEEIEQISNLKGYTGTHNLSLKAINLILDELWHTNDNQIAIFNR
LKLVPKKVDLSQQKEIPTTLVDDFILSPVVKRSFIQSIKVINAIIKKYGLPNDIIELAREKN
SKDAQKMINEMQKRNRQTNERIEEII RTTGKENAKYLIEKIKLHDMQEGKCLYSLEAIP
EDLLNPNFNYEVDHIIPRSVSFDNSFNKVLVKQEENSCKGNRTPFQYLSSSDSKISYETF
KKHILNLA KGKGRISKTKKEYLLEERDINRFSVQKDFINRNLVDTRYATRGLMNLLRSY
FRVNNLDVKVKSINGGFTSFLRRKWFKKERNKGYKHHAE DALIIANADFIFKEWKKL
DKAKKVMENQMFE EKQAESMPEIETE QEYKEIFITPHQIKHIKDFKDYKYSHRVDKKN
RKLINDTLYSTRKDDKGNTLIVNNLNGLYDKDNDKLKLINKSPEKLLMYHHDPQTYQ
KLKLIMEQYGDEKNPLYKYEEETGNYLTKYSKKDNGPVIKKIKYYGNKLN AHL DITDD
YPNSRNKVVKLSLKPYRFDVYLDNGVYKFVTVKNLDVIKKENYYEVNSKCYEEAKKL
KKISNQAEFIASFYKNDLIKINGELYRVIGVNNDLLNRIEVNMIDITYREYLENMNDKRPP
HIIKTIASKTQSIKKYSTDILGNLYEVKSKKHPQIIKKG.

В некоторых вариантах осуществления SaCas9 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 716 (обозначенной в данном документе как SaCas9-HF):

KRNYILGLDIGITSVGYGIIDYETRDVIDAGVRLFKEANVENNEGRRSKRGARRLKRRRR
HRIQVRVKKLLFDYNLLTDHSELGINPYEARVKGLSQKLSEEEFSAALLHLAKRRGVHN
VNEVEEDTGNELSTKEQISRNSKALEEKYVAELQLERLKKDGEVRGSINRFKTS DYVKE
AKQLLKVKAYHQLDQSFIDTYIDLLETRRTYYEGPGEPSFGWKDIKEWYEMLMGHC
TYFPEELASVKYAYNADLYNALNDLNNLVITRDENEKLEYEYKFQIENVFKQKKKPTL

KQIAKEILVNEEDIKGYRVTSTGKPEFTNLKVYHDIKDITARKEIENAELLDQIAKILTIY
 QSSEDIQEELTNLNSLTQEEIEQISNLKGYTGTHNLSLKAINLILDELWHTNDAQIAIFAR
 LKLVPKKVDLSQQKEIPTTLVDDFILSPVVKRSFIQSIKVINAIIKKYGLPNDIIELAREKN
 SKDAQKMINEMQKRNRQTNERIEEIIRTTGKENAKYLIEKIKLHDMQEGKCLYSLEAIPL
 EDLLNNPFNYEVDHIIIPRSVSFDNSFNKVLVKQEENSCKGNRTPFQYLSSSSDKISYETF
 KKHILNLA KGKGRISKTKKEYLLEERDINRFSVQKDFINRNLVDTRYATAGLMNLLRSY
 FRVNNLDVKVKSINGGFTSFLRRKWFKKERNKGYKHAEDALIIANADFIFKEWKKL
 DKAKKVMENQMFEKQAESMPEIETE QEYKEIFITPHQIKHIKDFKDYKYSHRVDKKN
 RELINDTL YSTRKDDKGNTLIVNNLNGLYDKDNDKLLINKSPEKLLMYHHPQTYQ
 KLKLIMEQYGDEKNPLYKYEEETGNYLTKYSKKDNGPVIKKIKYYGNKLNAHLDITDD
 YPNSRNKVVKL SLKPYRFDVYLDNGVYKFVTVKNLDVIKKENYYEVNSKCYEEAKKL
 KKISNQAEFIA SFYNNDLIKINGEL YRVIGVNNDLLNRIEVMIDITYREYLENMNDKRPP
 RIIKTIASKTQSIKKYSTDILGNLYEVKSKKHPQIIKKG.

В некоторых вариантах осуществления SaCas9 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 717 (обозначенной в данном документе как SaCas9-KKH-HF):

KRNYILGLDIGITSVGYGIIDYETRDVIDAGVRLFKEANVENNEGRRSKRGARRLKRRRR
 HRIQVRVKKLLFDYNLLTDHSELGINPYEARVKGLSQKLSSEEFSAALLHLAKRRGVHN
 VNEVEEDTGNELSTKEQISRNSKALEEKYVAELQLERLKKDGEVRGSINRFKTS DYVKE
 AKQLLKVKAYHQLDQSFIDTYIDLLETRRTYYEGPGEGSPFGWKDIKEWYEMLMGHC
 TYFPEELASVKYAYNADLYNALNDLNNLVITRDENEKLEYEKFQIENVFKQKKKPTL
 KQIAKEILVNEEDIKGYRVTSTGKPEFTNLKVYHDIKDITARKEIENAELLDQIAKILTIY
 QSSEDIQEELTNLNSLTQEEIEQISNLKGYTGTHNLSLKAINLILDELWHTNDAQIAIFAR
 LKLVPKKVDLSQQKEIPTTLVDDFILSPVVKRSFIQSIKVINAIIKKYGLPNDIIELAREKN
 SKDAQKMINEMQKRNRQTNERIEEIIRTTGKENAKYLIEKIKLHDMQEGKCLYSLEAIPL
 EDLLNNPFNYEVDHIIIPRSVSFDNSFNKVLVKQEENSCKGNRTPFQYLSSSSDKISYETF
 KKHILNLA KGKGRISKTKKEYLLEERDINRFSVQKDFINRNLVDTRYATAGLMNLLRSY
 FRVNNLDVKVKSINGGFTSFLRRKWFKKERNKGYKHAEDALIIANADFIFKEWKKL
 DKAKKVMENQMFEKQAESMPEIETE QEYKEIFITPHQIKHIKDFKDYKYSHRVDKKN
 RKLINDTL YSTRKDDKGNTLIVNNLNGLYDKDNDKLLINKSPEKLLMYHHPQTYQ
 KLKLIMEQYGDEKNPLYKYEEETGNYLTKYSKKDNGPVIKKIKYYGNKLNAHLDITDD
 YPNSRNKVVKL SLKPYRFDVYLDNGVYKFVTVKNLDVIKKENYYEVNSKCYEEAKKL
 KKISNQAEFIA SFYKNDLIKINGEL YRVIGVNNDLLNRIEVMIDITYREYLENMNDKRPP
 HIIKTIASKTQSIKKYSTDILGNLYEVKSKKHPQIIKKG.

В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая SluCas9, кодирует SluCas9, содержащую аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 712:

NQKFILGLDIGITSVGYGLIDYETKNIIDAGVRLFPEANVENNEGRRSKRGSRRLKRRRIH

RLERVKKLLEDYNLLDQSQIPQSTNPYAIRVKGLSEALSKDELVIALHIAKRRGIHKIDV
 IDSNDVVGNELSTKEQLNKNKSKLLKDKFVCQIQQLERMNEGQVRGEKNRFTADIKEIIQ
 LLNVQKNFHQLDENFINKYIELVEMRREYFEGPGKGSYPGWEGDPKAWYETLMGHCT
 YFPDELRSVKYAYSADLFNALNDLNNLVIQRDGLSKLEYHEKYHIIENVFKQKKKPTLK
 QIANEINVNPEDIKGYRITKSGKPQFTEFKLYHDLKSVLFDQSILENEVDLDQIAEILTIYQ
 DKDSIKSKLTELDILLNEEDKENIAQLTGYTGTHRLSLKCIRLVLEEQWYSSRNQMEIFTH
 LNIKPKKINLTAANKIPKAMIDEFILSPVVKRTFGQAINLINKIIEKYGVPEDIHIELARENNS
 KDKQKFINEMQKKNENTRKRINEIIGKYGNQNAKRLVEKIRLHDEQEGKCLYSLESIPLE
 DLLNNPNHYEVDHIIPRSVSFDNSYHNKVLVKQSENSKKSNTLPYQYFNSGKSKLSYNQ
 FKQHILNLSKSQDRISKKKKEYLLEERDINKFEVQKEFINRNLDTRYATRELTNYLKAY
 FSANNMNVKVKTINGSFDTYLRKVWKFKKERNHGYKHHAEDALIANADFLFKENKKL
 KAVNSVLEKPEIETKQLDIQVDSEDNYSEMFIIPKQVQDIKDFRNFKYSHRVDKKPNRQL
 INDTLYSTRKKDNSTYIVQTIKDIYAKDNTTLKKQFDKSPEKFLMYQHDPRTFEKLEVIM
 KQYANEKNPLAKYHEETGEYLTKEYSKKNNGPIVKSLKYIGNKLGSHLDVTHQFKSSTK
 KLVKLSIKPYRFDVYLTDKGYKFITISYLDVLKKDNYYYIPEQKYDKLKLKGKAIDKNAK
 FIASFYKNDLIKLDGEIYKIIGVNSDTRNMIELDLPDIRYKEYCELNNIKGEPRIKKTIGKK
 VNSIEKLTTDVLGNVFTNTQYTKPQLLFKRGN.

В некоторых вариантах осуществления SluCas9 представляет собой вариант аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 712. В некоторых вариантах осуществления SluCas9 содержит аминокислоту, отличную от Q, в положении, соответствующем положению 781 SEQ ID NO: 712. В некоторых вариантах осуществления SluCas9 содержит аминокислоту, отличную от R, в положении, соответствующем положению 1013 SEQ ID NO: 712. В некоторых вариантах осуществления SluCas9 содержит K в положении, соответствующем положению 781 SEQ ID NO: 712. В некоторых вариантах осуществления SluCas9 содержит K в положении, соответствующем положению 966 SEQ ID NO: 712. В некоторых вариантах осуществления SluCas9 содержит H в положении, соответствующем положению 1013 SEQ ID NO: 712. В некоторых вариантах осуществления SluCas9 содержит аминокислоту, отличную от Q, в положении, соответствующем положению 781 SEQ ID NO: 712; и аминокислоту, отличную от R, в положении, соответствующем положению 1013 SEQ ID NO: 712. В некоторых вариантах осуществления SluCas9 содержит K в положении, соответствующем положению 781 SEQ ID NO: 712; K в положении, соответствующем положению 966 SEQ ID NO: 712; и H в положении, соответствующем положению 1013 SEQ ID NO: 712.

В некоторых вариантах осуществления SluCas9 содержит аминокислоту, отличную от R, в положении, соответствующем положению 246 SEQ ID NO: 712. В некоторых вариантах осуществления SluCas9 содержит аминокислоту, отличную от N, в положении, соответствующем положению 414 SEQ ID NO: 712. В некоторых вариантах осуществления SluCas9 содержит аминокислоту, отличную от T, в положении, соответствующем положению 420 SEQ ID NO: 712. В некоторых вариантах осуществления SluCas9 содержит аминокислоту, отличную от R, в положении, соответствующем положению 655 SEQ ID NO:

712. В некоторых вариантах осуществления SluCas9 содержит аминокислоту, отличную от R, в положении, соответствующем положению 246 SEQ ID NO: 712; аминокислоту, отличную от N, в положении, соответствующем положению 414 SEQ ID NO: 712; аминокислоту, отличную от T, в положении, соответствующем положению 420 SEQ ID NO: 712; и аминокислоту, отличную от R, в положении, соответствующем положению 655 SEQ ID NO: 712. В некоторых вариантах осуществления SluCas9 содержит A в положении, соответствующем положению 246 SEQ ID NO: 712. В некоторых вариантах осуществления SluCas9 содержит A в положении, соответствующем положению 414 SEQ ID NO: 712. В некоторых вариантах осуществления SluCas9 содержит A в положении, соответствующем положению 420 SEQ ID NO: 712. В некоторых вариантах осуществления SluCas9 содержит A в положении, соответствующем положению 655 SEQ ID NO: 712. В некоторых вариантах осуществления SluCas9 содержит A в положении, соответствующем положению 246 SEQ ID NO: 712; A в положении, соответствующем положению 414 SEQ ID NO: 712; A в положении, соответствующем положению 420 SEQ ID NO: 712; и A в положении, соответствующем положению 655 SEQ ID NO: 712.

В некоторых вариантах осуществления SluCas9 содержит аминокислоту, отличную от R, в положении, соответствующем положению 246 SEQ ID NO: 712; аминокислоту, отличную от N, в положении, соответствующем положению 414 SEQ ID NO: 712; аминокислоту, отличную от T, в положении, соответствующем положению 420 SEQ ID NO: 712; аминокислоту, отличную от R, в положении, соответствующем положению 655 SEQ ID NO: 712; аминокислоту, отличную от Q, в положении, соответствующем положению 781 SEQ ID NO: 712; K в положении, соответствующем положению 966 SEQ ID NO: 712; и аминокислоту, отличную от R, в положении, соответствующем положению 1013 SEQ ID NO: 712. В некоторых вариантах осуществления SluCas9 содержит A в положении, соответствующем положению 246 SEQ ID NO: 712; A в положении, соответствующем положению 414 SEQ ID NO: 712; A в положении, соответствующем положению 420 SEQ ID NO: 712; A в положении, соответствующем положению 655 SEQ ID NO: 712; K в положении, соответствующем положению 781 SEQ ID NO: 712; K в положении, соответствующем положению 966 SEQ ID NO: 712; и H в положении, соответствующем положению 1013 SEQ ID NO: 712.

В некоторых вариантах осуществления SluCas9 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 718 (обозначенной в данном документе как SluCas9-KH или SLUCAS9KH):

NQKFILGLDIGITSVGYGLIDYETKNIIDAGVRLFPEANVENNEGRRSKRGSRRLLKRRRIH
RLERVKKLLEDYNLLDQSQIPQSTNPYAIRVKGLSEALSKDELVIALHIAKRRGIHKIDV
IDSNDDVGNELSTKEQLNKNKLLKDKFVCQIQLERMNEGQVRGEKNRFTADIIKEIIQ
LLNVQKNFHLQDENFINKYIELVEMRREYFEGPGKGSPYGWEGDPKAWYETLMGHCT
YFPDELRVSKYAYSADLFNALNDLNNLVIQRDGLSKLEYHEKYHIIENVFKQKKKPTLK
QIANEINVNPEDIKGYRITKSGKPQFTEFKLYHDLKSVLFDQSILENEDVLDQIAEILTIYQ

DKDSIKSKLTELDILLNEEDKENIAQLTGYTGTHRLSLKCIRLVLEEQWYSSRNQMEIFTH
 LNIKPKKINLTAANKIPKAMIDEFILSPVVKRTFGQAINLINKIIEKYGVPEDIIEELARENN
 KDKQKFINEMQKKNENTRKRINEIIGKYGNQNAKRLVEKIRLHDEQEGKCLYSLESIPLE
 DLLNNPNHYEVDHIIPRSVSFDNSYHNKVLVKQSENSKKSNTLPYQYFNSGKSKLSYNQ
 FKQHILNLSKSQDRISKKKKEYLLEERDINKFEVQKEFINRNLDTRYATRELTNYLKAY
 FSANNMNVKVKTINGSFTDYLRKVWKFKKERNHGYKHHAEADALIANADFLFKENKKL
 KAVNSVLEKPEIETKQLDIQVDSEDNYSEMFIIPKQVQDIKDFRNFKYSHRVDKKPNRKL
 INDTLYSTRKKDNSTYIVQTIKDIYAKDNTTLKKQFDKSPEKFLMYQHDPRTFEKLEVIM
 KQYANEKNPLAKYHEETGEYLTKYSKKNNGPIVKSLKYIGNKLGSHLDVTHQFKSSTK
 KLVKLSIKPYRFDVYLTDKGYKFITISYLDVLKKDNYYYIPEQKYDKLKLGAIDKNAK
 FIASFYKNDLIKLDGEIYKIIGVNSDTRNMIELDLPDIRYKEYCELNNIKGEPHIKKTIGKK
 VNSIEKLTTDVLGNVFTNTQYTKPQLLFKRG.

В некоторых вариантах осуществления SluCas9 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 719 (обозначенной в данном документе как SluCas9-HF):

NQKFILGLDIGITSVGYGLIDYETKNIIDAGVRLFPEANVENNEGRRSKRGSRRLKRRRIH
 RLERVKKLLEDYNLLDQSQIPQSTNPYAIRVKGLSEALSKDELVIALHIAKRRGIHKIDV
 IDSNDVGNELSTKEQLNKNKSKLLKDKFVCQIQLERMNEGQVRGEKNRFTADIKEIQ
 LLNVQKNFHQLDENFINKYIELVEMRREYFEGPGKGSPIGWEGDPKAWYETLMGHCT
 YFPDELASVKYAYSADLFNALNDLNNLVIQRDGLSKLEYHEKYHIIENVFKQKKKPTLK
 QIANEINVNPEDIKGYRITKSGKPQFTEFKLYHDLKSVLFDQSILENEDVLDQIAEILTIYQ
 DKDSIKSKLTELDILLNEEDKENIAQLTGYTGTHRLSLKCIRLVLEEQWYSSRAQMEIFA
 HLNIKPKKINLTAANKIPKAMIDEFILSPVVKRTFGQAINLINKIIEKYGVPEDIIEELAREN
 NSKDKQKFINEMQKKNENTRKRINEIIGKYGNQNAKRLVEKIRLHDEQEGKCLYSLESIP
 LEDLLNNPNHYEVDHIIPRSVSFDNSYHNKVLVKQSENSKKSNTLPYQYFNSGKSKLSY
 NQFKQHILNLSKSQDRISKKKKEYLLEERDINKFEVQKEFINRNLDTRYATAELTNYLK
 AYFSANNMNVKVKTINGSFTDYLRKVWKFKKERNHGYKHHAEADALIANADFLFKENK
 KLKAVNSVLEKPEIETKQLDIQVDSEDNYSEMFIIPKQVQDIKDFRNFKYSHRVDKKPNR
 QLINDTLYSTRKKDNSTYIVQTIKDIYAKDNTTLKKQFDKSPEKFLMYQHDPRTFEKLEV
 IMKQYANEKNPLAKYHEETGEYLTKYSKKNNGPIVKSLKYIGNKLGSHLDVTHQFKSST
 KKLKLVKLSIKPYRFDVYLTDKGYKFITISYLDVLKKDNYYYIPEQKYDKLKLGAIDKNA
 KFIASFYKNDLIKLDGEIYKIIGVNSDTRNMIELDLPDIRYKEYCELNNIKGEPRIKKTIGK
 KVNSIEKLTTDVLGNVFTNTQYTKPQLLFKRG.

В некоторых вариантах осуществления SluCas9 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 720 (обозначенной в данном документе как SluCas9-HF-KH):

NQKFILGLDIGITSVGYGLIDYETKNIIDAGVRLFPEANVENNEGRRSKRGSRRLKRRRIH
 RLERVKKLLEDYNLLDQSQIPQSTNPYAIRVKGLSEALSKDELVIALHIAKRRGIHKIDV

IDSNDDVGNELSTKEQLNKNKSKLLKDKFVCQIQLERMNEGQVRGEKNRFTADIKEIIQ
 LLNVQKNFHQLDENFINKYIELVEMRREYFEGPGKGSPYGWEGDPKAWYETLMGHCT
 YFPDELASVKYAYSADLFNALNDLNNLVIQRDGLSKLEYHEKYHIIENVFKQKKKPTLK
 QIANEINVNPEDIKGYRITKSGKPQFTEFKLYHDLKSVLFDQSILENEDVLDQIAEILTIYQ
 DKDSIKSKLTELDILLNEEDKENIAQLTGYTGTHRLSLKCIRLVLEEQWYSSRAQMEIFA
 HLNIPKKINLTAANKIPKAMIDEFILSPVVKRTFGQAINLINKIIEKYGVPEDIIEELAREN
 NSKDKQKFINEMQKKNENTRKRINEIIGKYGNQNAKRLVEKIRLHDEQEGKCLYSLESIP
 LEDLLNPNHYEVDHIIIPRSVSFDNSYHNKVLVKQSENSKKSNTPTYQYFNSGKSKLSY
 NQFKQHILNLSKSQDRISKKKKEYLLEERDINKFEVQKEFINRNLVDTRYATAELTNYLK
 AYFSANNMNVKVKTINGSFTDYLRKVWKFKKERNHGYKHHHAEDALIIANADFLFKENK
 KLKAVNSVLEKPEIETKQLDIQVDSEDNYSEMFIIPKQVQDIKDFRNFKYSHRVDKKPNR
 KLINDTLYSTRKKDNSTYIVQTIKDIYAKDNTTLKKQFDKSPEKFLMYQHDPRTFEKLEV
 IMKQYANEKNPLAKYHEETGEYLTKYSKKNNGPIVKSILKYIGNKLGSHLDVTHQFKSST
 KKLVKLSIKPYRFDVYLTDKGYKFITISYLDVLKKDNYYYIPEQKYDKLKLKGKAIDKNA
 KFIASFYKNDLIKLDGEIYKIIGVNSDTRNMIELDLPDIRYKEYCELNNIKGEPHIKKTIGK
 KVNSIEKLTTDVLGNVFTNTQYTKPQLLFKRGN.

В некоторых вариантах осуществления белок Cas представляет собой любой из сконструированных белков Cas, описанных в Schmidt et al., 2021, Nature Communications, “Improved CRISPR genome editing using small highly active and specific engineered RNA-guided nucleases.”

В некоторых вариантах осуществления Cas9 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 7021 (обозначенной в данном документе как sRGN1):

MNQKFILGLDIGITSVGYGLIDYETKNIIDAGVRLFPEANVENNEGRRSKRGSRRLKRRRI
 HRLDRVKHLLAEYDLLDLTNIPKSTNPYQTRVKGLNEKLSKDELVIALHIAKRRGIHNV
 DVAADKEETASDSLSTKDQINKNAKFLESRYVCELQKERLENEGHRGVENRFLTKDIV
 REAKKIIDTQMQYYPEIDETFKEKYISLVETRREYFEGPGKGSPFGWEGNIKKWFEQMM
 GHCTYFPEELRSVKYSYSAELFNALNDLNNLVITRDEDAKLNHYGEKFQIIEENVFKQKKTP
 NLKQIAIEIGVHETEIKGYRVNKSQTPEFTEFKLYHDLKSIVFDKSILENEAILDQIAEILTI
 YQDEQSIKEELNKLPEILNEQDKAEIAKLIGYNGTHRLSLKCIHLINELWQTSRNQMEIF
 NYLNIKPNKVDLSEQNKIPKDMVNDFILSPVVKRTFIQSINVINKVIEKYGIPEDIIEELARE
 NNSDDRKKFINNLQKKNEATRKRINEIIGQTGNQNAKRIVEKIRLHDQQEGKCLYSLKDI
 PLEDLLRNPNNYDIDHIIIPRSVSFDDSMHNKVLVRREQNAKKNNQTPYQYLTSGYADIK
 YSVFKQHVLNLAENKDRMTKKKREYLLLEERDINKFEVQKEFINRNLVDTRYATRELTN
 YLKAYFSANNMNVKVKTINGSFTDYLRKVWKFKKERNHGYKHHHAEDALIIANADFLFK
 ENKKLKAVNSVLEKPEIETKQLDIQVDSEDNYSEMFIIPKQVQDIKDFRNFKYSHRVDKK
 PNRQLINDTLYSTRKKDNSTYIVQTIKDIYAKDNTTLKKQFDKSPEKFLMYQHDPRTFEK
 LEVIMKQYANEKNPLAKYHEETGEYLTKYSKKNNGPIVKSILKYIGNKLGSHLDVTHQF
 KSSTKKLVKLSIKPYRFDVYLTDKGYKFITISYLDVLKKDNYYYIPEQKYDKLKLKGKAID

KNAKFIA SFYKNDLIKLDGEIYKIIGVNSDTRNMIELDLPDIRYKEYCELNNIKGEPRIKKTIGKKVNSIEKLTTDVLGNVFTNTQYTKPQLLFKRGN.

В некоторых вариантах осуществления Cas9 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 7022 (обозначенной в данном документе как sRGN2):

MNQKFILGLDIGITSVGYGLIDYETKNIIDAGVRLFPEANVENNEGRRSKRGSRRLKRRRI
HRLERVKSLLSEYKIISGLAPTNNQPYNIRVKGLTEQLTKDELA VALLHIAKRRGIHKIDV
IDSNDDVGNELSTKEQLNKNSKLLKDKFVCQIQLERMNEGQVRGEKNRFTADIIKEIIQ
LLNVQKNFHQLDENFINKYIELVEMRREYFEGPGQGSPFGWNGDLKKWYEMLMGHCT
YFPQELRSVKYAYSADLFNALNDLNNLIQRDNSEKLEYHEKYHIIENVFKQKKKPTLKQ
IAKEIGVNPEDIKGYRITKSGTPEFTEFKLYHDLKSVLFDQSILENEVDVLDQIAEILTIYQD
KDSIKSKLTELDILLNEEDKENIAQLTGYNGTHRLSLKCIRLVLEEQWYSSRNQMEIFTHL
NIKPKKINLTAANKIPKAMIDEFILSPVVKRTFIQSINVINKVIEKYGIPEDIIIELARENNSD
DRKKFINNLQKKNEATRKRINEIIGQTGNQNAKRIVEKIRLHDQQEGKCLYSLESIALMD
LLNNPQNYEVDHIIPRSVAFDNSIHNKVLVKQIENSKKGNRTPYQYLNSSDAKLSYNQFK
QHILNLSKSKDRISKKKKDYLLEERDINKFEVQKEFINRNLVDTRYATRELTSYLKAYFS
ANNMDVKVKTINGSFTNHLRKVWRFDKYRNHGYKHHAEDALIIANADFLFKENKKLK
AVNSVLEKPEIETKQLDIQVDSEDNYSEMFIIPKQVQDIKDFRNFKYSHRVDKKPNRQLI
NDTLYSTRKKDNSTYIVQTIKDIYAKDNTTLKKQFDKSPEKFLMYQHDPRTFEKLEVIM
KQYANEKNPLAKYHEETGEYLTKYSKKNNGPIVKSLKYIGNKLGSHLDVTHQFKSSTK
KLVKLSIKPYRFDVYLTDKGYKFITISYLDVLKKDNYYYIPEQKYDKLKLGAIDKNAK
FIASFYKNDLIKLDGEIYKIIGVNSDTRNMIELDLPDIRYKEYCELNNIKGEPRIKKTIGKK
VNSIEKLTTDVLGNVFTNTQYTKPQLLFKRGN.

В некоторых вариантах осуществления Cas9 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 7023 (обозначенной в данном документе как sRGN3):

MNQKFILGLDIGITSVGYGLIDYETKNIIDAGVRLFPEANVENNEGRRSKRGSRRLKRRRI
HRLERVKLLLTEYDLINKEIPTSNPNPYQIRVKGLSEILSKDELA IALLHLAKRRGIHNVD
VAADKEETASDSLSTKDQINKNAKFLESRYVCELQKERLENEGHRGVRGVENRFLTKDIVR
EAKKIIDTQMQYYPEIDETFKEKYISLVETRREYFEGPGQGSPFGWNGDLKKWYEMLM
GHCTYFPQELRSVKYAYSADLFNALNDLNNLIQRDNSEKLEYHEKYHIIENVFKQKKKP
TLKQIAKEIGVNPEDIKGYRITKSGTPEFTSFKLFDLKKVVKDHAILDDIDLLNQIAEILT
IYQDKDSIVAELGQLEYLMSEADKQSISELTGYTGTHSLSLKCMNMIIDELWHSSMNQM
EVFTYLNMRPKKYELKGYQRIPTDMIDDAILSPVVKRTFIQSINVINKVIEKYGIPEDIIIEL
ARENNSDDRKKFINNLQKKNEATRKRINEIIGQTGNQNAKRIVEKIRLHDQQEGKCLYSL
ESIPLEDLLNNPNHYEVDHIIPRSVSFDNSYHNKVLVKQSENSKKSNTPTYQYFNSGKSK
LSYNQFKQHILNLSKSQDRISKKKKKEYLLEERDINKFEVQKEFINRNLVDTRYATRELTN
YLKAYFSANNMNVKVKTINGSFTDYLRKVWKFKKERNHGYKHHAEDALIIANADFLFK

ENKKLKAVNSVLEKPEIETKQLDIQVSEDNYSEMFIIPKQVQDIKDFRNFKYSHRVDKK
 PNRQLINDTLYSTRKKDNSTYIVQTIKDIYAKDNTTLKKQFDKSPEKFLMYQHDPRTFEK
 LEVIMKQYANEKNPLAKYHEETGEYLTKYSKKNNGPIVKS LKYIGNKLGSHLDVTHQF
 KSSTKKLVKLSIKPYRFDVYLTDKGYKFITISYLDVLKKDNYYYIPEQKYDKLKLGAID
 KNAKFIA SFYKNDLIKLDGEIYKIIGVNSDTRNMIELDLPDIRYKEYCELNNIKGEPRIKKT
 IGKKVNSIEKLT TDVLGNVFTNTQYTKPQLLFKRG N.

В некоторых вариантах осуществления Cas9 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 7024 (обозначенной в данном документе как sRGN3.1):

MNQKFILGLDIGITSVGYGLIDYETKNIIDAGVRLFPEANVENNEGRRSKRGSRRLKRRRI
 HRLERVKLLL TEYDLINKEIPTSNPNPYQIRVKGLSEILSKDELAIALHLAKRRGIHNVD
 VAADKEETASDSLSTKDQINKNAKFLESRYVCELQKERLENEGHVRGVENRFLTKDIVR
 EAKKIIDTQM QYYPEIDETFKEKYISLVETRREYFEGPGQGSPFGWNGDLKKWYEMLM
 GHCTYFPQELRSVKYAYSADLFNALNDLNNLIQQRDNSEKLEYHEKYHIIENVFKQKKKP
 TLKQIAKEIGVNPEDIKGYRITKSGTPEFTSFKLFHDLKKVVKDHAILDDIDLLNQIAEILT
 IYQDKDSIVAELGQLEYLMSEADKQSISELTGYTGTHSLSLKCMNMIIDELWHSSMNQM
 EVFTYLNMRPKKYELKGYQRIPTDMIDDAILSPVVKRTFIQSINVINKVIEKYGIPEDIHEL
 ARENNSDDRKKFINNLQKKNEATRKRINEIIGQTGNQNAKRIVEKIRLHDQQEGKCLYSL
 ESIPLEDLLNNPNHYEVDHIIPRSVSFDNSYHNKVLVKQSENSKKS NLTPYQYFNSGKSK
 LSYNQFKQHILNLSKSQDRISKKKKEYLLEERDINKFEVQKEFINRNLVDTRYATRELTN
 YLKAYFSANNMNVKVKTINGSFTDYLRKVWKFKKERNHGYKHHAE DALIIANADFLFK
 ENKKLKAVNSVLEKPEIETKQLDIQVSEDNYSEMFIIPKQVQDIKDFRNFKYSHRVDKK
 PNRQLINDTLYSTRKKDNSTYIVQTIKDIYAKDNTTLKKQFDKSPEKFLMYQHDPRTFEK
 LEVIMKQYANEKNPLAKYHEETGEYLTKYSKKNNGPIVKS LKYIGNKLGSHLDVTHQF
 KSSTKKLVKLSIKNYRFDVYLTTEKGYKFVTIA YLNVFKKDNYYYIPKDKYQELKEKKKI
 KDTDQFIASFYKNDLIKLNGLDYKIIGVNSDDRNIIELDYYDIKYKDYCEINNIKGEPRIK
 KTIGKKTESIEKFTTDVLGNLYLHSTEKAPQLIFKRG L.

В некоторых вариантах осуществления Cas9 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 7025 (обозначенной в данном документе как sRGN3.2):

MNQKFILGLDIGITSVGYGLIDYETKNIIDAGVRLFPEANVENNEGRRSKRGSRRLKRRRI
 HRLERVKLLL TEYDLINKEIPTSNPNPYQIRVKGLSEILSKDELAIALHLAKRRGIHNVD
 VAADKEETASDSLSTKDQINKNAKFLESRYVCELQKERLENEGHVRGVENRFLTKDIVR
 EAKKIIDTQM QYYPEIDETFKEKYISLVETRREYFEGPGQGSPFGWNGDLKKWYEMLM
 GHCTYFPQELRSVKYAYSADLFNALNDLNNLIQQRDNSEKLEYHEKYHIIENVFKQKKKP
 TLKQIAKEIGVNPEDIKGYRITKSGTPEFTSFKLFHDLKKVVKDHAILDDIDLLNQIAEILT
 IYQDKDSIVAELGQLEYLMSEADKQSISELTGYTGTHSLSLKCMNMIIDELWHSSMNQM
 EVFTYLNMRPKKYELKGYQRIPTDMIDDAILSPVVKRTFIQSINVINKVIEKYGIPEDIHEL

ARENNSDDRKKFINNLQKKNEATRKRINEIIGQTGNQNAKRIVEKIRLHDQQEGKCLYSL
 ESIPLDLLNNPNHYEVDHIIPRSVSFDNSYHNKVLVKQSENSKKSNTLPYQYFNSGKSK
 LSYNQFKQHILNLSKSQDRISKKKKEYLLEERDINKFEVQKEFINRNLDTRYATRELTN
 YLKAYFSANNMNVKVKTINGSFTDYLKRVWKFKKERNHGYKHHAEDALIINANADFLFK
 ENKKLKAVNSVLEKPEIETKQLDIQVDSEDNYSEMFIIPKQVQDIKDFRNFKFSHRVDKK
 PNRQLINDTLYSTRMKDEHDYIVQTITDIYGKDNTNLKKQFNKNPEKFLMYQNDPKTFE
 KLSIIMKQYSDEKNPLAKYYEETGEYLTKYSSKKNNGPIVKKIKLLGNKVGHNHLDVTNKY
 ENSTKKLVKLSIKNYRFDVYLTEKGYKFVTIAYLNVFKKDNYYYIPKDKYQELKEKKKI
 KDTDQFIASFYKNDLIKLNGLDYKIIIGVNSDDRNIIELDYYDIKYKDYCEINNIKGEPIK
 KTIGKKTESIEKFTTDVLGNLYLHSTEKAPQLIFKRGL.

В некоторых вариантах осуществления Cas9 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 7026 (обозначенной в данном документе как sRGN3.3):

MNQKFILGLDIGITSVGYGLIDYETKNIIDAGVRLFPEANVENNEGRRSKRGSRRLKRRRI
 HRLERVKLLLTEYDLINKEQIPTSNPNPYQIRVKGLSEILSKDELAIALHAKRRGIHNVD
 VAADKEETASDSLSTKDQINKNAKFLESRYVCELQKERLENEGHVRGVENRFLTKDIVR
 EAKKIIDTQMQYYPEIDETFKEKYISLVETRREYFEGPGQGSPFGWNGDLKKWYEMLM
 GHCTYFPQELRSVKYAYSADLFNALNDLNNLIQRDNSEKLEYHEKYHIIENVFKQKKKP
 TLKQIAKEIGVNPEDIKGYRITKSGTPEFTSFKLFDLKKVVKDHAILDDIDLLNQIAEILT
 IYQDKDSIVAELGQLEYLMSEADKQSISELTGYTGTHSLSLKCMNMIIDELWHSSMNQM
 EVFTYLNMRPKKYELKGYQRIPTDMIDDAILSPVVKRTFIQSINVINKVIEKYGIPEDIHEL
 ARENNSDDRKKFINNLQKKNEATRKRINEIIGQTGNQNAKRIVEKIRLHDQQEGKCLYSL
 ESIPLDLLNNPNHYEVDHIIPRSVSFDNSYHNKVLVKQSENSKKSNTLPYQYFNSGKSK
 LSYNQFKQHILNLSKSQDRISKKKKEYLLEERDINKFEVQKEFINRNLDTRYATRELTS
 YLKAYFSANNMDVKVKTINGSFTNHLRKVWRFDKYRNHGYKHHAEDALIINANADFLF
 KENKKLQNTNKILEKPTIENNTKKVTVEKEEDYNNVFETPKLVEDIKQYRDYKFSHRVD
 KKPNRQLINDTLYSTRMKDEHDYIVQTITDIYGKDNTNLKKQFNKNPEKFLMYQNDPKT
 FEKLSIIMKQYSDEKNPLAKYYEETGEYLTKYSSKKNNGPIVKKIKLLGNKVGHNHLDVTN
 KYENSTKKLVKLSIKNYRFDVYLTEKGYKFVTIAYLNVFKKDNYYYIPKDKYQELKEK
 KKIKDQFIASFYKNDLIKLNGLDYKIIIGVNSDDRNIIELDYYDIKYKDYCEINNIKGE
 RIKKTIGKKTESIEKFTTDVLGNLYLHSTEKAPQLIFKRGL.

В некоторых вариантах осуществления Cas9 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 7027 (обозначенной в данном документе как sRGN4):

MNQKFILGLDIGITSVGYGLIDYETKNIIDAGVRLFPEANVENNEGRRSKRGSRRLKRRRI
 HRLERVKKLLEDYNLLDQSQIPQSTNPYAIRVKGLSEALSKDELVIALHIAKRRGIHNIN
 VSSEDEDASNELSTKEQINRNKLLKDKYVCEVQLQRLKEGQIRGEKNRFTTDLKEID
 QLLKVQKDYHNLDIDFINQYKEIVETRREYFEGPGKGSPYGWEGDPKAWYETLMGHCT

YFPDELRSVKYAYSADLFNALNDLNNLVIQRDGLSKLEYHEKYHIIENVFKQKKKPTLK
 QIANEINVNPEDIKGYRITKSGKPEFTSFKLFDLKKVVKDHAILDDIDLLNQIAEILTIYQ
 DKDSIVAELGQLEYLMSEADKQSISELTGYTGTHSLSLKCMNMIIDELWHSSMNQMEVF
 TYLNMRPKKYELKGYQRIPTDMIDDAILSPVVKRTFIQSINVINKVIEKYGIPEDIIELARE
 NNSDDRKKFINNLQKKNEATRKRINEIIGQTGNQNAKRIVEKIRLHDQQEGKCLYSLESIP
 LEDLLNPNHYEVDHIIPRSVSFDNSYHNKVLVKQSENSKKSNLTPYQYFNSGKSKLSY
 NQFKQHILNLSKSQDRISKKKKEYLLEERDINKFEVQKEFINRNLVDTRYATREL TNYLK
 AYFSANNMNVKVKTINGSFTDYLRKVWKFKKERNHGYKHHAEADALIANADFLFKENK
 KLKAVNSVLEKPEIETKQLDIQVDSEDNYSEMFIIPKQVQDIKDFRNFKYSHRVDKKPNR
 QLINDTL YSTRKKDNSTYIVQTIKDIYAKDNTTLKKQFDKSPEKFLMYQHDPRTFEKLEV
 IMKQYANEKNPLAKYHEETGEYLT KYSKKNNGPIVKS LKYIGNKLGSHLDVTHQFKSST
 KKL VKLSIKPYRFDVYLTDKGYKFITISYLDVLKKDNYYYIPEQKYDKLKLGAIDKNA
 KFIASFYKNDLIKLDGEIYKIIGVNSDTRNMIELDLPDIRYKEYCELNNIKGEPRIKKTIGK
 KVNSIEKLTTDVLGNVFTNTQYTKPQLLFKRGN.

В некоторых вариантах осуществления Cas9 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 7028 (обозначенной в данном документе как Cas9 *Staphylococcus hyicus* или ShyCas9):

MNNYILGLDIGITSVGYGIVDSDTREIKDAGVRLFPEANVDNNEGRRSKRGARRLKRRRI
 HRLDRVKHLLAEYDLLDLTNIPKSTNPYQTRVKGLNEKLSKDELVIALHIAKRRGIHNV
 NVMMDDNDSGNELSTKDQLKKNAKALSDKYVCELQLERFEQDYKVRGEKNRFKTEDF
 VREARKLLETQSKFFEIDQTFIMRYIELIETRREYFEGPGKGSPFGWEGNIKKWFEQMMG
 HCTYFPEELRSVKYSYSAELFNALNDLNNLVITRDEDAKLNYGEKFQIENVFKQKKTPN
 LKQIAIEIGVHETEIKGYRVNKS GKPEFTQFKLYHDLKNIFKDPKYLN DIQLMDNIAEITI
 YQDAESI K E L N Q L P E L L S E R E K E K I S A L S G Y S G T H R L S L K C I N L L L D D L W E S S L N Q M E L F
 TKLNLKPKKIDLSQQHKIPSKLVDDFILSPVVKRAFIQSIQVVNAIIDKYGLPEDIIELARE
 NNSDDRKFLNQLQKQNEETR K Q V E K V L R E Y G N D N A K R I V Q K I K L H N M Q E G K C L Y S L
 KDIPLEDLLRNPHHYEVDHIIPRSVAFDNSMHNKVLVRADENSKKGNRTPYQYLNSSSES
 LSYNEFKQHILNLSKTKDRITKKKREYLLEERDINKFDVQKEFINRNLVDTRYATREL T
 SLLKAYFSANNLDVKVKTINGSFTNYLRKVWKFDKDRNKG Y K H H A E A D A L I A N A D F L F
 KHNKLRNINKVLDAPSKEVDKKRVTVQSEDEYNQIFEDTQKAQA I K K F E I R K F S H R V D
 K K P N R Q L I N D T L Y S T R N I D G I E Y V V E S I K D I Y S V N N D K V K T K F K K D P H R L L M Y R N D P Q T F
 EKFEKVFKQYSEKNPFAKYEEETGEKIRKFSKTGQGPYINKIKYL R E R L G R H C D V T N K
 YINSRNKIVQLKIYSYRFDIYQYGNNYKMITISYIDLEQKSNNYYISREKYEQKKKDKQID
 DSYKFIGSFYKNDIINYNGEMYRVIGVNDSEKNKIQLDMIDISIKDYMELNNIKKTGVYIK
 TIGKSTTHIEKYTTDILGNLYKAAPPKKPQLIFK.

В некоторых вариантах осуществления Cas9 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 7029 (обозначенной в данном документе как Cas9 *Staphylococcus microti* или Smi Cas9):

MEKDYLGLDIGISVGYGLIDYDTKSIIDAGVRLFPEANADNNLGRRAKRGARRLKRR
 RIHRLERVKSLLSEYKIISGLAPTNNQPYNIRVKGLTEQLTKDELAVALHIAKRRGIHNV
 DVAADKEETASDSLSTKDQINKNAKFLESRYVCELQKERLENEGHRGVENRFLTKDIV
 REAKKIIDTQMQYYPEIDETFKEKYISLVETRREYYEGPGKGSPYGWDADVKKWYQLM
 MGHCTYFPVEFRSVKYAYTADLYNALNDLNNLTIARDDNPKLEYHEKYHIIENVFKQK
 RNPTLKQIAKEIGVNDINISGYRVTKSGKPQFTSFKLFHDLKKVVKDHAILDDIDLLNQIA
 EILTIYQDKDSIVAELGQLEYLMSEADKQSISELTGYTGTHSLSLKCMNMIIDELWHSSM
 NQMEVFTYLNMRPKKYELKGYQRIPTDMIDDAILSPVVKRSFKQAIGVVNAIHKKYGLP
 KDIIELARESNSAEKSRYLRAIQKKNEKTRERIEAIIKEYGNENAKGLVQKIKLHDAQEG
 KCLYSLKDIPLEDLLRNPNNYDIDHIIPRSVSFDDSMHNKVLVRREQNAKKNNQTPYQY
 LTSGYADIKYSVFKQHVLNLAENKDRMTKKKREYLLEERNINKYDVQKEFINRNLVDT
 RYTTRELTTLLKTYFTINNLDVKVKTINGSFTDFLRKRWGFKKNRDEGYKHHAEALII
 ANADYLFKEHKLLKEIKDVS DLAGDERNSNVKDEDQYEEVFGGYFKIEDIKKYIKKFS
 HRVDKKPNRQLINDTIYSTRVKDDKRYLINTLKNLYDKSNGDLKERMQKDPESELLMYH
 HDPQTFEKLKIVMSQYENENKPLAKYFEETGQYLTKYAKHDNGPAIHKIKYYGNKLVE
 HLDITKNYHNPQNKVVQLSQKSFRFDVYQTDKGYKFISIAYLTLKNEKNYYAISQEKYD
 QLKSEKKISNNAVFISFYTSDIIEINNEKFRVIGVNSDKNNLIEVDRIDIRQKEFIELEEEK
 KNNRIKVTIGRKT TNIEKFHTDILGNMYKSKRPAKQLVFKKG.

В некоторых вариантах осуществления Cas9 содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 7030 (обозначенной в данном документе как Cas9 *Staphylococcus pasteurii* или Spa Cas9):

MKEYIILGLDLGITSVGYGIIINFETKKIIDAGVRLFPEANVDNNEGRRSKRGSRRRLKRRRI
 HRLERVKLLL TEYDLINKEQIPTSNPNYQIRVKGLSEILSKDELAIALHIAKRRGIHNINV
 SSEDEDASNELSTKEQINRNNKLLKDKYVCEVQLQRLKEGQIRGEKNRFTT DILKEIDQ
 LLKVQKDYHNLDIDFINQYKEIVETRREYFEGPGQSPFGWNGDLKKWYEMLMGHCT
 YFPQELRSVKYAYSADLFNALNDLNNLIIQRDNSEKLEYHEKYHIIENVFKQKKKPTLKQ
 IAKEIGVNPEDIKGYRITKSGTPQFTEFKLYHDLKSIVFDKSIENEAILDQIAEILTIYQDE
 QSIKEELNKLPEILNEQDKAEIAKLIGYNGTHRLSLKCIHLINEELWQTSRNQMEIFNYLNI
 KPNKVDLSEQNKIPKDMVNDFILSPVVKRTFIQSINVINKVIEKYGIPEDIIELARENNSD
 DRKKFINNLQKKNEATRKRINEIIGQTGNQNAKRIVEKIRLHDQQEGKCLYSLESIALMD
 LLNPNQNYEVDHIIPRSVAFDNSIHNVKLVKQIENSKKGNRTPYQYLNSSDAKLSYNQFK
 QHILNLSKSKDRISKKKKDYLLLEERDINKFEVQKEFINRNLVDTRYATRELTSYLKAYFS
 ANNMDVKVKTINGSFTNHLRKVWRFDKYRNHGYKHHAEALIIANADFLFKENKKLQ
 NTNKILEKPTIENNTKKVTVEKEEDYNNVFETPKLVEDIKQYRDYKFSHRVDKKPNRQLI
 NDTLYSTRMKDEHDYIVQTITDIYGKDNTNLKKQFNKNPEKFLMYQNDPKTFEKL SIIM
 KQYSDEKNPLAKYEEETGEYLTKYSKKNNGPIVKKIKLLGNKVG NHLDV TNKYENSTK
 KLVKLSIKNYRFDVYLTEKGYKFVTIAYLNVFKKDNYYYIPKDKYQELKEKKKIKD TDQ
 FIASFYKNDLIKLNGLDYKIIIGVNSDDRNIIELDYDIKYKDYCEINNIKGEPRIKKTIGKK
 TESIEKFTTDVLGNLYLHSTEKAPQLIFKRGL.

В некоторых вариантах осуществления белок Cas содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 7031 (обозначенной в данном документе как Cas12i1):

MSNKEKNASETRKAYTTKMIPRSHDRMKLLGNFMDYLMGDTPIFFELWNQFGGGIDRD
IISGTANKDKISDDLAVNWFKVMPIKSPQGVSPSNLANLFQQYSGSEPDIQAQYFA
SNFDTEKHQWKDMRVEYERLLAELQLSRSDMHDLKLMYKEKICGLSLSTAHYITSVM
FGTGAKNNRQTKHQFYKVIQLLEESTQINSVEQLASIILKAGDCDSYRKLIRCSRKGA
TPSILKIVQDYELGTNHDDEVNVPISLIANLKEKLGREFEYECWKCEKIKAFASKVGP
YYLGSYSAMLENALSPIKGMTTKNCKFVLKQIDAKNDIKYENEPFGKIVEGFFDSPYFES
DTNVKWVLPHPHIGESNIKTWEDLNAIHSKYEEDIASLSEDKKEKRIKVYQGDVCQTI
NTYCEEVGKEAKTPLVQLRLYLSRKDDIAVDKIIDGITFLSKKHKVEKQKINPVIQKYP
SFNFGNNSKLLGKIISPKDKLKHNLKCNRNQVDNYIWIEIKVLNTKTMRWEKHHYALSS
TRFLEEYYPATSENPPDALAARFRTKTNGYEGKPALSAEQIEQIRSAPVGLRKVKKRQ
MRLEAARQQNLLPRYTGWKDFNINICKRGNNFEVTLATKVKKKKEKNYKVVLGYDAN
IVRKNTYAAIEAHANGDGVIDYNDLPVKPIESGFVTVESQVRDKSYDQLSYNGVKLLYC
KPHVESRRSFLEKYRNGTMKDNRGNINQIDFMKDFEAIADDETSLYYFNMKYCKLLQSS
IRNHSSQAKEYREEIFELLRDGKLSVLKLSLNLNLSFVMFKVAKSLIGTYFGHLLKKPKNS
KSDVKAPPITDEKQKADPEMFALRLALEEKRLNKVKSKEVIANKIVAKALELRDKY
GPVLIKGENISDTTKGKKSTNSFLMDWLARGVANKVKEMVMMHQGLEFVEVNPNF
TSHQDPFVHKNPENTFRARYSRCTPSELTEKNRKEILSFLSDKPSKRPTNAYYNEGAMAF
LATYGLKKNDVLGVSLEKFKQIMANILHQRSEDQLLFPSRGGMFYLATYKLDADATSV
NWNKGQFWVCNADLVAAYNVGLVDIQKDFKKK.

В некоторых вариантах осуществления белок Cas содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 7032 (обозначенной в данном документе как Cas12i2):

MSSAIKSYKSVLRPNERKNQLLKSTIQCLEDGSAFFFKMLQGLFGGITPEIVRFSTEQEKQ
QQDIALWCAVNWFRPVSQDSLTHTIASDNLVEKFEEYYGGTASDAIKQYFSASIGESYY
WNDCRQQYYDLCRELGVEVSDLTHDLEILCREKCLAVATESNQNNHSVLFGTGEKED
RSVKLRITKKILEAISNLKEIPKNVAPIQEILNVAKATKETFRQVYAGNLGAPSTLEKFIA
KDGQKEFDLKKLQTDLKKVIRGKSKERDWCCQEELRSYVEQNTIQYDLWAWGEMFNK
AHTALKIKSTRNYNFAKQRLEQFKEIQSLNNLLVVKKLNDFFDSEFFSGEETYTICVHHL
GGKDL SKLYKAWEDDPADPENAIIVLCDDLKNNFKKEPIRNILRYIFTIRQECSAQDILA
AAKYNQQLDRYKSQKANPSVLGNQGFTWTNAVILPEKAQRNDRPNSLDLRIWL YLKL R
HPDGRWKKHHIPFYDTRFFQEIYAAGNSPVDTCQFRTPRFGYHLPKLTQTAIRVNKKH
VKA AKTEARIRLAIQQGTLPVSNLKITEISATINSKGQVRIPVKFDVGRQKGT LQIGDRFC
GYDQNQTASHAYSLWEVVKEGQYHKELGCFVRFISSGDIVSITENRGNQFDQLSYEGLA
YPQYADWRKKASKFVSLWQITKKNKKKEIVTVEAKEKFDAICKYQPRLYKFNKEYAYL
LRDIVRGKSLVELQQIRQEIFRFIEQDCGVTRLGSLSLSTLETVKAVKGHIYSYFSTALNAS

KNNPISDEQRKEFDPELFFALLEKLELIRTRKKKQKVERIANSLIQTCLENNIKFIRGEGDLS
TTNNATKKKANSRSMDWLARGVFNKIRQLAPMHNITLFGCGSLYTSHQDPLVHRNPDK
AMKCRWAAIPVKDIGDWVLRKLSQNLRAKNIGTGEYYHQGVKEFLSHYELQDLEEELL
KWRSDRKSNI PCWVLQNRLAEKLG NKEAVVYIPVRGGRIYFATHKVATGAVSIVFDQK
QVWVCNADHVAAANIALTVKGIGEQQSSDEENPDGSRIKLQLTS.

В некоторых вариантах осуществления белок Cas содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности с последовательностью SEQ ID NO: 7033 (обозначенной в данном документе как SpCas9):

MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVP SKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETA
EATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFS NEMAKVDDSFHRLEESFLVEEDKKHERHPIF
GNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLV DSTDKADLR LIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNS
DVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNGLFG
NLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSD
AILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNG
YAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGE
LHAILRRQEDFYFPFLKDNREKIEKILTRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFE
EVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKP
AFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDL
LKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKT YAHLFDDKVMKQLKRRRYT
GWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKS DGFANRNFQMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQ
GDSLHEHIANLAGSPAIIKKGILQTVKVVD ELVKVMGRHKPENIVIAMARENQTTQKGQK
NSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLS
DYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLI
TQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIR
EVKVITLKS KLVSDFRKDFQFYK VREINNYHHAHDAYLNAVVG TALIKKYPKLESEFVY
GDYKVYDVRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETG
EIVWDKGRDFATVRKVL SMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPK
KYGGFDSPTVAYSVLVVAKEVGKSKKLKSVKELLGITIMERSSEFKNPIDFLEAKGYK
EVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLKG
SPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIEQISEFSKRVLADANLDKVL SAYNKH RDKPIREQAE
NIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQ SITGLYETRIDLSQLGGD.

Модифицированные направляющие РНК

В некоторых вариантах осуществления направляющая РНК является химически модифицированной. Направляющая РНК, содержащая один или более модифицированных нуклеозидов или нуклеотидов, называется «модифицированной» направляющей РНК или «химически модифицированной» направляющей РНК для описания присутствия одного или более неприродных и/или природных компонентов или конфигураций, которые используются вместо или в дополнение к каноническим остаткам А, G, C и U. В некоторых вариантах осуществления модифицированная направляющая РНК синтезируется с

неканоническим нуклеозидом или нуклеотидом и называется в данном документе «модифицированной». Модифицированные нуклеозиды и нуклеотиды могут включать один или более из следующего: (i) изменение, например, замена одного или обоих несвязывающих фосфатных атомов кислорода и/или одного или более связывающих фосфатных атомов кислорода в фосфодиэфирной связи основной цепи (иллюстративная модификация основной цепи); (ii) изменение, например, замена компонента рибозного сахара, например, 2'-гидроксила на рибозном сахаре (иллюстративная модификация сахара); (iii) полная замена фосфатного фрагмента «дефосфо» линкерами (иллюстративная модификация основной цепи); (iv) модификация или замена природного нуклеинового основания, в том числе неканоническим нуклеиновым основанием (иллюстративная модификация основания); (v) замена или модификация рибозофосфатного остова (иллюстративная модификация основной цепи); (vi) модификация 3'-конца или 5'-конца олигонуклеотида, например, удаление, модификация или замена концевой фосфатной группы или конъюгация фрагмента, кэпа или линкера (такие модификации 3' - или 5'-кэпа могут включать в себя модификацию сахара и/или основной цепи); и (vii) модификация или замена сахара (иллюстративная модификация сахара).

Химические модификации, такие как перечисленные выше, могут быть объединены для получения модифицированных направляющих РНК, содержащих нуклеозиды и нуклеотиды (все вместе именуемые «остатки»), которые могут иметь две, три, четыре или более модификаций. Например, модифицированный остаток может содержать модифицированный сахар и модифицированное азотистое основание или модифицированный сахар и модифицированный фосфодиэфир. В некоторых вариантах осуществления каждое основание направляющей РНК модифицировано, например, все основания имеют модифицированную фосфатную группу, такую как фосфоротиоатная группа. В определенных вариантах осуществления все или по существу все фосфатные группы молекулы направляющей РНК заменены фосфоротиоатными группами. В некоторых вариантах осуществления модифицированные направляющие РНК содержат по меньшей мере один модифицированный остаток на 5'-конце РНК или вблизи него. В некоторых вариантах осуществления модифицированные направляющие РНК содержат по меньшей мере один модифицированный остаток на 3'-конце РНК или вблизи него.

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

Немодифицированные нуклеиновые кислоты могут быть подвержены деградации,

например, внутриклеточными нуклеазами или нуклеазами, обнаруженными в сыворотке. Например, нуклеазы могут гидролизовать фосфодиэфирные связи нуклеиновых кислот. Соответственно, в одном аспекте направляющие РНК, описанные в данном документе, могут содержать один или более модифицированных нуклеозидов или нуклеотидов, например, для придания стабильности внутриклеточным или сывороточным нуклеазам. В некоторых вариантах осуществления молекулы модифицированных направляющих РНК, описанные в данном документе, могут вызывать пониженный врожденный иммунный ответ при введении в популяцию клеток как *in vivo* так и *ex vivo*. Термин «врожденный иммунный ответ» включает клеточный ответ на экзогенные нуклеиновые кислоты, включая одноцепочечные нуклеиновые кислоты, который включает индукцию экспрессии и высвобождения цитокинов, особенно интерферонов, и гибель клеток.

В некоторых вариантах осуществления модификации основной цепи фосфатная группа модифицированного остатка может быть модифицирована путем замены одного или более атомов кислорода другим заместителем. Кроме того, модифицированный остаток, *например*, модифицированный остаток, присутствующий в модифицированной нуклеиновой кислоте, может включать полную замену немодифицированной фосфатной группы модифицированной фосфатной группой, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления модификация фосфатного остова может включать изменения, которые приводят или к незаряженному линкеру, или к заряженному линкеру с несимметричным распределением заряда.

Примеры модифицированных фосфатных групп включают фосфоротиоат, фосфороселенаты, боранофосфаты, сложные фосфатные эфиры борана, гидрофосфонаты, фосфороамидаты, алкильные или арильные фосфонаты и сложные фосфотриэфиры. Атом фосфора в немодифицированной фосфатной группе является ахиральным. Однако замена одного из мостиковых атомов кислорода одним из вышеуказанных атомов или групп атомов может сделать атом фосфора хиральным. Стереогенный атом фосфора может иметь конфигурацию «R» (в данном случае Rp) или конфигурацию «S» (в данном случае Sp). Основную цепь также можно модифицировать путем замены мостикового кислорода (*то есть*, кислорода, который связывает фосфат с нуклеозидом) азотом (мостиковые фосфороамидаты), серой (мостиковые фосфоротиоаты) и углеродом (мостиковые метиленфосфонаты). Замена может происходить или в линкерном кислороде, или в обоих линкерных кислородах.

В некоторых модификациях основной цепи фосфатная группа может быть заменена линкерами, не содержащими фосфор. В некоторых вариантах осуществления заряженная фосфатная группа может быть заменена нейтральным фрагментом. Примеры фрагментов, которые могут заменить фосфатную группу, могут включать, без ограничения, *например*, метилфосфонат, гидроксиламино, силоксан, карбонат, карбоксиметил, карбамат, амид, тиоэфир, этиленоксидный линкер, сульфонат, сульфонамид, тиоформацеталь, формацеталь, оксим, метиленимино, метиленметилямино, метиленигидразо, метилендиметилгидразо и метиленоксиметилямино.

Также могут быть сконструированы каркасы, которые могут имитировать нуклеиновые кислоты, в которых фосфатный линкер и рибозный сахар заменены устойчивыми к нуклеазе заменителями нуклеозидами или нуклеотидами. Такие модификации могут включать модификации остова и сахара. В некоторых вариантах осуществления азотистые основания могут быть связаны суррогатным остовом. Примеры могут включать, без ограничения, заменители нуклеозидов морфолино, циклобутил, пирролидин и пептидную нуклеиновую кислоту (PNA).

Модифицированные нуклеозиды и модифицированные нуклеотиды могут включать одну или более модификаций сахарной группы, т.е. модификацию сахаров. Например, 2'-гидроксильная группа (ОН) может быть модифицирована, т.е. заменены рядом различных «окси» или «дезоксид» заместителей. В некоторых вариантах осуществления модификации 2'-гидроксильной группы могут повышать стабильность нуклеиновой кислоты, поскольку гидроксил больше не может депротонироваться с образованием 2'-алкоксид-иона.

Примеры модификаций 2'-гидроксильной группы могут включать алкокси или арилокси (OR, где «R» может быть, например, алкилом, циклоалкилом, арилом, аралкилом, гетероарилом или сахаром); полиэтиленгликоли (ПЭГ), $O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OR$, где R может быть, например, H или необязательно замещенным алкилом, а n может быть целым числом от 0 до 20 (например, от 0 до 4, от 0 до 8, от 0 до 10, от 0 до 16, от 1 до 4, от 1 до 8, от 1 до 10, от 1 до 16, от 1 до 20, от 2 до 4, от 2 до 8, от 2 до 10, от 2 до 16, от 2 до 20, от 4 до 8, от 4 до 10, от 4 до 16 и от 4 до 20). В некоторых вариантах осуществления модификация 2'-гидроксильной группы может представлять собой 2'-O-Me. В некоторых вариантах осуществления модификация 2'-гидроксильной группы может представлять собой модификацию 2'-фтора, которая заменяет 2'-гидроксильную группу фторидом. В некоторых вариантах осуществления модификация 2'-гидроксильной группы может включать «закрытые» нуклеиновые кислоты (LNA), в которых 2'-гидроксил может быть соединен, например, с помощью C_{1-6} -алкиленового или C_{1-6} -гетероалкиленового мостика с 4'-углеродом того же сахара рибозы, где иллюстративные мостики могут включать метиленовые, пропиленовые, эфирные или аминные мостики; O-амино (где амино может быть, например, NH_2 ; алкиламино, диалкиламино, гетероциклил, ариламино, диариламино, гетероариламино или дигетероариламино, этилендиамин или полиамино) и аминоксиды, $O(CH_2)_n$ -амино, (где амино может быть, например, NH_2 , алкиламино, диалкиламино, гетероциклил, ариламино, диариламино, гетероариламино или дигетероариламино, этилендиамин или полиамино). В некоторых вариантах осуществления модификация 2'-гидроксильной группы может включать «незакрытые» нуклеиновые кислоты (UNA), в которых в кольце рибозы отсутствует связь C2'-C3'. В некоторых вариантах осуществления модификация 2'-гидроксильной группы может включать метоксиэтильную группу (MOE), $(OCH_2CH_2OCH_3)$, например, производное ПЭГ).

Модификации «дезоксид» 2' могут включать водород (то есть, дезоксирибозного сахара, например, в липких концах частично дцРНК); галоген (например, бром, хлор, фтор или йод); амино (где амино может представлять собой, например, NH_2 ; алкиламино,

диалкиламино, гетероциклил, ариламино, диариламино, гетероариламино, дигетероариламино или аминокислоту); $\text{NH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH})_n\text{CH}_2\text{CH}_2$ -амино (где амино может быть, например, таким, как описано в данном документе), $-\text{NHC}(\text{O})\text{R}$ (где R может быть, например, алкилом, циклоалкилом, арилом, аралкилом, гетероарилом или сахаром), циано; меркапто; алкилтиоалкил; тиоалкокси; и алкил, циклоалкил, арил, алкенил и алкинил, которые могут быть необязательно замещены, например, амино, как описано в данном документе.

Модификация сахара может включать сахарную группу, которая также может содержать один или более атомов углерода, обладающих стереохимической конфигурацией, противоположной конфигурации соответствующего углерода в рибозе. Таким образом, модифицированная нуклеиновая кислота может включать нуклеотиды, содержащие, например, арабинозу в качестве сахара. Модифицированные нуклеиновые кислоты могут также включать абазические сахара. Эти абазические сахара также могут быть дополнительно модифицированы по одному или более из входящих в их состав атомов сахара. Модифицированные нуклеиновые кислоты могут также включать один или более сахаров в L-форме, например, L- нуклеозидов.

Описанные в данном документе модифицированные нуклеозиды и модифицированные нуклеотиды, которые могут быть включены в модифицированную нуклеиновую кислоту, могут включать модифицированное основание, также называемое азотистым основанием. Примеры азотистых оснований включают, но не ограничиваются ими, аденин (A), гуанин (G), цитозин (C) и урацил (U). Эти азотистые основания могут быть модифицированы или полностью заменены для получения модифицированных остатков, которые могут быть включены в модифицированные нуклеиновые кислоты. Азотистое основание нуклеотида может быть независимо выбрано из пурина, пиримидина, аналога пурина или аналога пиримидина. В некоторых вариантах осуществления азотистое основание может включать, например, встречающиеся в природе и синтетические производные основания.

В вариантах осуществления, использующих двойную направляющую РНК, каждая из *cr*РНК и *tracr*РНК может содержать модификации. Такие модификации могут быть на одном или обоих концах *cr*РНК и/или *tracr*РНК. В вариантах осуществления, включающих онРНК, один или более остатков на одном или обоих концах онРНК могут быть химически модифицированы, и/или внутренние нуклеозиды могут быть модифицированы, и/или вся онРНК может быть химически модифицирована. Некоторые варианты осуществления включают модификацию 5'-конца. Некоторые варианты осуществления включают модификацию 3'-конца.

Охватываются модификации 2'-О-метила.

Другой химической модификацией, которая, как было показано, влияет на нуклеотидные сахарные кольца, является замена галогеном. Например, замена 2'-фтор (2'-F) в нуклеотидных сахарных кольцах может повысить аффинность связывания олигонуклеотидов и стабильность нуклеаз. Предусмотрены модификации 2'-фтор (2'-F).

Фосфоротиоатная (PS) связь или связь относится к связи, в которой сера замещена одним немостиковым кислородом фосфата в фосфодиэфирной связи, например, в связях между нуклеотидными основаниями. Когда фосфоротиоаты используются для получения олигонуклеотидов, модифицированные олигонуклеотиды также могут называться S-олигонуклеотидами.

Абазические нуклеотиды относятся к нуклеотидам, в которых отсутствуют азотистые основания.

Инвертированные основания относятся к основаниям со связями, которые инвертированы по сравнению с нормальной связью 5' на 3' (то есть, либо связь 5'-5', либо связь 3'-3').

Абазический нуклеотид может быть присоединен инвертированной связью. Например, абазический нуклеотид может быть присоединен к концевому 5'-нуклеотиду посредством связи 5'-5', или абазический нуклеотид может быть присоединен к концевому 3'-нуклеотиду посредством связи 3'-3'. Инвертированный абазический нуклеотид либо на концевом 5'-, либо на 3'-нуклеотиде также можно назвать инвертированным абазическим концевым кэпом.

В некоторых вариантах осуществления модифицированы один или более из первых трех, четырех или пяти нуклеотидов на 5'-конце и один или более из последних трех, четырех или пяти нуклеотидов на 3'-конце. В некоторых вариантах осуществления модификация представляет собой 2'-О-Ме, 2'-F, инвертированный абазический нуклеотид, PS связь или другую модификацию нуклеотида, хорошо известную в данной области техники, для повышения стабильности и/или эффективности.

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

В некоторых вариантах осуществления первые три нуклеотида на 5'-конце и последние три нуклеотида на 3'-конце содержат модифицированный 2'-О-метил (2'-О-Ме) нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления первые три нуклеотида на 5'-конце и последние три нуклеотида на 3'-конце содержат модифицированный 2'-фтор (2'-F) нуклеотид.

Рибонуклеопротеиновый комплекс

В некоторых вариантах осуществления охватывается композиция, содержащая: а) одну или более направляющих РНК, содержащих одну или более направляющих последовательностей из **таблицы 1А**, **таблицы 1В**, или **таблицы 5**, и b) saCas9 (в сочетании с нРНК, содержащей любой из или комбинацию из SEQ ID NO: 1-35, 1000-1078 и 3000-3069) или sluCas9 (в сочетании с нРНК, содержащей любую из или комбинацию SEQ ID NO: 100-225, 2000-2116 и 4000-4251), или любой из описанных в данном документе мутантных белков Cas9. В некоторых вариантах осуществления направляющая РНК вместе с Cas9 называется рибонуклеопротеиновым комплексом (РНП).

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к РНП комплексу, в котором направляющая РНК (например, любая из направляющих РНК,

описанных в настоящем документе) связывается или способна связываться с целевой последовательностью в гене дистрофина (например, сайтом акцептора сплайсинга или сайтом донора сплайсинга для экзона 45, 51 или 53, включая, например, соединение интрон-экзон экзона 51, имеющее последовательность ccagagtaacagtgctgagtaggagctaaaatattttgggttttgcaa (SEQ ID NO: 721), или с целевой последовательностью, связанной любой из последовательностей, описанных в **таблице 1А**, **таблице 1В** и **5**), где ген дистрофина содержит положение последовательности распознавания РАМ выше целевой последовательности, и где РНП разрезается в положении, которое находится на 3 нуклеотида выше (-3) РАМ в гене дистрофина. В некоторых вариантах осуществления РНП также разрезается в положении, которое находится на 2 нуклеотида выше (-2), на 4 нуклеотида выше (-4), на 5 нуклеотидов выше (-5) или на 6 нуклеотидов выше (-6) РАМ в гене дистрофина. В некоторых вариантах осуществления РНП разрезается в положении, которое находится на 3 нуклеотида выше (-3) и на 4 нуклеотида выше (-4) РАМ в гене дистрофина.

В некоторых вариантах осуществления используются химерные нуклеазы Cas9 (SaCas9 или SluCas9), в которых один домен или область белка заменены частью другого белка. В некоторых вариантах осуществления домен нуклеазы Cas9 может быть заменен доменом из другой нуклеазы, такой как FokI. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза Cas9 может быть модифицированной нуклеазой.

В некоторых вариантах осуществления Cas9 модифицирован так, чтобы он содержал только один функциональный домен нуклеазы. Например, белок-агент может быть модифицирован таким образом, что один из доменов нуклеазы мутирует, или полностью, или частично удаляется, чтобы снизить его активность по расщеплению нуклеиновых кислот.

В некоторых вариантах осуществления консервативную аминокислоту в домене белка-нуклеазы Cas9 замещают для снижения или изменения нуклеазной активности. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза Cas9 может содержать аминокислотную замену в RuvC или RuvC-подобном нуклеазном домене. Иллюстративные аминокислотные замены в RuvC или RuvC-подобном нуклеазном домене включают D10A (на основе белка Cas9 *S. pyogenes*). См., например, Zetsche et al. (2015) *Cell* Oct 22:163(3): 759-771. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза Cas9 может содержать аминокислотную замену в HNH или HNH-подобном нуклеазном домене. Иллюстративные аминокислотные замены в HNH или HNH-подобном нуклеазном домене включают E762A, H840A, N863A, H983A и D986A (на основе белка Cas9 *S. pyogenes*). См., например, Zetsche et al. (2015). Другие иллюстративные аминокислотные замены включают D917A, E1006A и D1255A (на основе последовательности Cpf1 *Francisella novicida* U112 (FnCpf1) (UniProtKB - A0Q7Q2 (CPF1_FRATN)). Другие иллюстративные аминокислотные замены включают D10A и N580A (на основе белка Cas9 *S. aureus*). См., например, Friedland et al., 2015, *Genome Biol.*, 16:257.

В некоторых вариантах осуществления Cas9 лишен расщепляющей активности. В

некоторых вариантах осуществления Cas9 содержит ДНК-связывающий полипептид dCas. Полипептид dCas обладает ДНК-связывающей активностью, где по существу не обладает каталитической (клевазной/никазной) активностью. В некоторых вариантах осуществления полипептид dCas представляет собой полипептид dCas9. В некоторых вариантах осуществления Cas9, не обладающий расщепляющей активностью, или ДНК-связывающий полипептид dCas представляет собой версию нуклеазы Cas (например, нуклеазы Cas9, обсуждавшейся выше), в которой ее эндонуклеолитические активные сайты инактивированы, например, одним или более изменениями (например, точечных мутаций) в ее каталитических доменах. См., например, US 2014/0186958 A1; US 2015/0166980 A1.

В некоторых вариантах осуществления Cas9 содержит один или более гетерологичных функциональных доменов (например, представляет собой слитый полипептид или содержит его).

В некоторых вариантах осуществления гетерологичный функциональный домен может способствовать транспорту Cas9 в ядро клетки. Например, гетерологичный функциональный домен может представлять собой сигнал ядерной локализации (NLS). В некоторых вариантах осуществления Cas9 может быть слит с 1-10 NLS. В некоторых вариантах осуществления Cas9 может быть слит с 1-5 NLS. В некоторых вариантах осуществления Cas9 может быть слит с 1-3 NLS. В некоторых вариантах осуществления Cas9 может быть слит с одним NLS. Когда используется один NLS, NLS может быть присоединен к N-концу или C-концу последовательности Cas9 и может быть непосредственно слит/присоединен или слит/присоединен через линкер. Он также может быть вставлен в последовательность Cas9. В других вариантах осуществления Cas9 может быть слит с более чем одним NLS. В некоторых вариантах осуществления Cas9 может быть слит с 2, 3, 4 или 5 NLS. В некоторых вариантах осуществления Cas9 может быть слит с двумя NLS. В определенных обстоятельствах два NLS могут быть одинаковыми (например, два NLS SV40) или разными. В некоторых вариантах осуществления белок Cas9 слит с одним или более NLS SV40. В некоторых вариантах осуществления SV40 NLS содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 713 (PKKKRKV). В некоторых вариантах осуществления белок Cas9 (например, белок SaCas9 или SluCas9) слит с одним или более NLS нуклеоплазмина. В некоторых вариантах осуществления белок Cas слит с одним или более NLS с-мус. В некоторых вариантах осуществления белок Cas слит с одним или более NLS E1A. В некоторых вариантах осуществления белок Cas слит с одним или более NLS BP (двудольных). В некоторых вариантах осуществления NLS нуклеоплазмина содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 714 (KRPAATKKAGQAKKKK). В некоторых вариантах осуществления белок Cas9 слит с NLS с-Мус. В некоторых вариантах осуществления NLS с-Мус кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 722 (CCGGCAGCTAAGAAAAAGAACTGGAT). В некоторых вариантах осуществления Cas9 слит с двумя последовательностями NLS SV40, связанными на C-конце. В некоторых вариантах осуществления Cas9 может быть слит с двумя NLS, один из которых связан на

N-конце, а другой - на C-конце. В некоторых вариантах осуществления Cas9 может быть слит с 3 NLS. В некоторых вариантах осуществления Cas9 может быть слит с 3 NLS, две из которых связаны на N-конце, а один связан на C-конце. В некоторых вариантах осуществления Cas9 может быть слит с 3 NLS, один из которых связан на N-конце, а две связаны на C-конце. В некоторых вариантах осуществления Cas9 может быть слит без NLS. В некоторых вариантах осуществления Cas9 может быть слит с одним NLS. В некоторых вариантах осуществления Cas9 может быть слит с NLS на C-конце и не содержит NLS, слитый на N-конце. В некоторых вариантах осуществления Cas9 может быть слит с NLS на N-конце и не содержит NLS, слитый на C-конце. В некоторых вариантах осуществления белок Cas9 слит с NLS SV40 и с NLS нуклеоплазмينا. В некоторых вариантах осуществления белок Cas9 слит с NLS SV40 и с NLS с-Мус. В некоторых вариантах осуществления NLS SV40 слит с C-концом белка Cas9, тогда как NLS нуклеоплазмينا слит с N-концом белка Cas9. В некоторых вариантах осуществления NLS SV40 слит с C-концом белка Cas9, тогда как NLS с-Мус слит с N-концом белка Cas9. В некоторых вариантах осуществления NLS SV40 слит с N-концом белка Cas9, тогда как NLS нуклеоплазмينا слит с C-концом белка Cas9. В некоторых вариантах осуществления NLS SV40 слит с N-концом белка Cas9, тогда как NLS с-Мус слит с C-концом белка Cas9. В некоторых вариантах осуществления NLS SV40 слит с белком Cas9 с помощью линкера. В некоторых вариантах осуществления NLS и линкер SV40 кодируются последовательностью нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 723 (ATGATGGCCCCAAAGAAGAAGCGGAAGGTCGGTATCCACGGAGTCCCAGCAGCC). В некоторых вариантах осуществления NLS нуклеоплазмينا слит с белком Cas9 с помощью линкера. В некоторых вариантах осуществления с-Мус NLS слит с белком Cas9 с помощью линкера. В некоторых вариантах осуществления дополнительный домен может быть: а) слит с N- или C-концом белка Cas (например, белок Cas9), б) слит с N-концом NLS, слитого с N-концом белка Cas, или с) слит с C-концом NLS, слитого с C-концом белка Cas. В некоторых вариантах осуществления NLS слит с N- и/или C-концом белка Cas с помощью линкера. В некоторых вариантах осуществления NLS слит с N-концом NLS, слитого с N-концом на белке Cas, с помощью линкера, и/или NLS слит с C-концом слитого с C-конца NLS на белке Cas с помощью линкера. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой GSVD (SEQ ID NO: 550) или GSGS (SEQ ID NO: 551). В некоторых вариантах осуществления белок Cas содержит NLS с-Мус, слитый с N-концом белка Cas (или со слитым с N-конца NLS на белке Cas), необязательно с помощью линкера. В некоторых вариантах осуществления белок Cas содержит NLS SV40, слитый с C-концом белка Cas (или со слитым с C-конца NLS на белке Cas), необязательно с помощью линкера. В некоторых вариантах осуществления белок Cas содержит NLS нуклеоплазмينا, слитую с C-концом белка Cas (или со слитой с C-конца NLS на белке Cas), необязательно с помощью линкера. В некоторых вариантах осуществления белок Cas содержит: а) NLS с-Мус, слитый с N-концом белка Cas, необязательно с помощью линкера, б) NLS SV40, слитый с C-концом белка Cas, необязательно с помощью линкера и с) NLS нуклеоплазмينا, слитый с C-концом NLS SV40, необязательно с помощью линкера. В некоторых вариантах

осуществления белок Cas содержит: а) NLS с-Мус, слитый с N-концом белка Cas, необязательно с помощью линкера, б) NLS нуклеоплазмина слитый с С-концом белка Cas, необязательно с помощью линкера и в) NLS нуклеоплазмина, слитый с С-концом NLS SV40, необязательно с помощью линкера.

В некоторых вариантах осуществления гетерологичный функциональный домен может модифицировать внутриклеточный период полужизни Cas9. В некоторых вариантах осуществления время полужизни Cas9 может быть увеличено. В некоторых вариантах осуществления время полужизни Cas9 может быть уменьшено. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный функциональный домен может повышать стабильность Cas9. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный функциональный домен может снижать стабильность Cas9. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный функциональный домен может действовать как сигнальный пептид для деградации белка. В некоторых вариантах осуществления деградация белка может быть опосредована протеолитическими ферментами, такими как, например, протеасомы, лизосомальные протеазы или кальпаин-протеазы. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный функциональный домен может содержать последовательность PEST. В некоторых вариантах осуществления Cas9 можно модифицировать путем добавления убиквитина или полиубиквитиновой цепи. В некоторых вариантах осуществления убиквитин может представлять собой убиквитин-подобный белок (UBL). Неограничивающие примеры убиквитин-подобных белков включают малый убиквитин-подобный модификатор (SUMO), убиквитиновый перекрестно-реактивный белок (UCRP, также известный как стимулируемый интерфероном ген-15 (ISG15)), связанный с убиквитином модификатор-1 (URM1), белок 8, подавляющий экспрессию набора генов в предшественниках нервных клеток в процессе развития (NEDD8, также называемый Rub1 в *S. cerevisiae*), белок, ассоциированный с антигеном F лейкоцитов человека (FAT10), белок аутофагии-8 (ATG8) и 12 (ATG12), убиквитин-подобный белок Fau (FUB1), закрепленный на мембране UBL (MUB), убиквитин-свернутый модификатор 1 (UFM1) и убиквитин-подобный белок-5 (UBL5).

В некоторых вариантах осуществления гетерологичный функциональный домен может представлять собой маркерный домен. Неограничивающие примеры маркерных доменов включают в себя флуоресцентные белки, метки для очистки, эпитопные метки и последовательности репортерных генов. В некоторых вариантах осуществления маркерный домен может представлять собой флуоресцентный белок. Неограничивающие примеры подходящих флуоресцентных белков включают зеленые флуоресцентные белки (например, GFP, GFP-2, tagGFP, turboGFP, sfGFP, EGFP, Emerald, Azami Green, мономерный Azami Green, CopGFP, AceGFP, ZsGreen1), желтые флуоресцентные белки (например, YFP, EYFP, Citrine, Venus, YPet, PhiYFP, ZsYellow1), синие флуоресцентные белки (например, EBFP, EBFP2, Azurite, mKalamal, GFPuv, Sapphire, T-sapphire), голубые флуоресцентные белки (например, ECFP, Cerulean, CyPet, AmCyan1, Midoriishi-Cyan), красные флуоресцентные белки (например, mKate, mKate2, mPlum, мономер DsRed, mCherry, mRFP1, DsRed-Express,

DsRed2, DsRed-Monomer, HcRed-Tandem, HcRed1, AsRed1, AsRed2, eqFP611, mRaspberry, mStrawberry, Jred) и оранжевые флуоресцентные белки (mOrange, mKO, Kusabira-Orange, мономерный Kusabira-Orange, mTangerine, tdTomato) или любой другой подходящий флуоресцентный белок. В других вариантах осуществления маркерный домен может представлять собой метку для очистки и/или эпитопную метку. Неограничивающие иллюстративные метки включают глутатион-S-трансферазу (GST), хитин-связывающий белок (CBP), мальтозосвязывающий белок (MBP), тиоредоксин (TRX), поли(NANP), метку для тандемной аффинной очистки (TAP), мус, AcV5, AU1, AU5, E, ECS, E2, FLAG, HA, nus, Softag 1, Softag 3, Strep, SBP, Glu-Glu, HSV, KT3, S, S1, T7, V5, VSV-G, 6xHis, 8xHis, белок-носитель биотин-карбоксила (BCCP), поли-His и кальмодулин. Неограничивающие иллюстративные репортерные гены включают глутатион-S-трансферазу (GST), пероксидазу хрена (HRP), хлорамфеникол-ацетилтрансферазу (CAT), бета-галактозидазу, бета-глюкуронидазу, люциферазу или флуоресцентные белки.

В дополнительных вариантах осуществления гетерологичный функциональный домен может нацеливать Cas9 на конкретную органеллу, тип клетки, ткань или орган. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный функциональный домен может нацеливать Cas9 на мышцу.

В дополнительных вариантах осуществления гетерологичный функциональный домен может представлять собой эффекторный домен. Когда Cas9 направлен на свою целевую последовательность, например, когда Cas9 направлен на целевую последовательность с помощью направляющей РНК, эффекторный домен может модифицировать целевую последовательность или воздействовать на нее. В некоторых вариантах осуществления эффекторный домен может быть выбран из связывающего нуклеиновую кислоту домена или домена нуклеазы (например, домена, отличного от нуклеазы Cas). В некоторых вариантах осуществления гетерологичный функциональный домен представляет собой нуклеазу, такую как нуклеаза FokI. См., например, патент США № 9023649.

В некоторых вариантах осуществления любая из описанных в данном документе композиций, содержащих любую из направляющих молекул и/или эндонуклеаз, описанных в данном документе, является стерильной и/или по существу апиrogenной. В конкретных вариантах осуществления любая из описанных в данном документе композиций содержит фармацевтически приемлемый носитель. Фраза «фармацевтически или фармакологически приемлемый» относится к соединениям и композициям, которые не вызывают побочных, аллергических или других неблагоприятных реакций при введении животному или человеку. В контексте данного документа термин «фармацевтически приемлемый носитель» включает любые и все растворители (например, воду), дисперсионные среды, покрывающие вещества, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические агенты и замедляющие абсорбцию агенты и т.п., которые являются физиологически совместимыми, включая фармацевтически приемлемые среды для культивирования клеток. Фармацевтически приемлемые носители включают стерильные водные растворы или

дисперсии и стерильные порошки для предусмотренного для немедленного приема приготовления стерильных растворов или дисперсий для инъекций. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит консервант для предотвращения роста микроорганизмов.

Определение эффективности направляющих РНК

В некоторых вариантах осуществления эффективность направляющей РНК определяют при доставке или экспрессии вместе с другими компонентами, образующими РНП. В некоторых вариантах осуществления направляющая РНК экспрессируется вместе с SaCas9 или SluCas9. В некоторых вариантах осуществления направляющая РНК доставляется или экспрессируется в линии клеток, которая уже стабильно экспрессирует SaCas9 или SluCas9. В некоторых вариантах осуществления направляющая РНК доставляется в клетку как часть РНП. В некоторых вариантах осуществления направляющую РНК доставляют в клетку вместе с нуклеиновой кислотой (например, мРНК), кодирующей SaCas9 или SluCas9.

В некоторых вариантах осуществления эффективность конкретных направляющих РНК определяют на основе моделей *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления модель *in vitro* представляет собой линию клеток.

В некоторых вариантах осуществления эффективность конкретных направляющих РНК определяют на множестве клеточных моделей *in vitro* в процессе выбора направляющих РНК. В некоторых вариантах осуществления проводят сравнение данных линии клеток с выбранными направляющими РНК. В некоторых вариантах осуществления выполняется перекрестный скрининг в нескольких клеточных моделях.

В некоторых вариантах осуществления эффективность конкретных направляющих РНК определяют на основе моделей *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления модель *in vivo* представляет собой модель на основе грызуна. В некоторых вариантах осуществления моделью на основе грызуна является мышь, которая экспрессирует мутированный ген дистрофина, например, мышь *mdx*. В некоторых вариантах осуществления модель *in vivo* представляет собой отличного от человека примата, например, яванского макака.

III. Способы редактирования генов и лечения DMD

В данном описании предложены способы редактирования генов и лечения мышечной дистрофии Дюшенна (DMD). В некоторых вариантах осуществления любая из композиций, описанных в данном документе, может быть введена субъекту, нуждающемуся в этом, для использования в создании двух- или одноцепочечного разрыва в любом одном или более экзонах 43, 44, 45, 50, 51 или 53 гена дистрофина (DMD). В некоторых вариантах осуществления пары направляющих РНК, описанных в данном документе, в любой из конфигураций вектора, описанных в данном документе, можно вводить субъекту, нуждающемуся в этом, для вырезания части DMD, тем самым излечивая DMD. В некоторых вариантах осуществления любая из описанных в данном документе композиций может быть введена субъекту, нуждающемуся в этом, для лечения DMD. В

некоторых вариантах осуществления субъекту вводят молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую первую нуклеиновую кислоту, кодирующую одну или более направляющих РНК из **таблицы 1А**, **таблицы 1В**, или **таблицы 5**, и вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую либо SaCas9, либо SluCas9 (в зависимости от направляющей молекулы) для лечения DMD. В некоторых вариантах осуществления одиночная молекула нуклеиновой кислоты (которая может представлять собой вектор, включая вектор AAV), содержащая первую нуклеиновую кислоту, кодирующую одну или более направляющих РНК из **таблицы 1А**, **таблицы 1В** или **таблицы 5**, и вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую SaCas9 или SluCas9 (в зависимости от направляющей молекулы) вводят субъекту для лечения DMD.

В некоторых вариантах осуществления любую из композиций, описанных в данном документе, вводят субъекту, нуждающемуся в этом, для лечения мышечной дистрофии Дюшенна (DMD).

В некоторых вариантах осуществления любую из композиций, описанных в данном документе, вводят субъекту, нуждающемуся в этом, для индуцирования двухцепочечного разрыва в любом одном или более экзонах 43, 44, 45, 50, 51 или 53 гена дистрофина.

В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения мышечной дистрофии Дюшенна (DMD), включающий доставку в клетку любой из композиций, описанных в данном документе, где клетка содержит мутацию в гене дистрофина, которая, как известно, ассоциирована с DMD.

В частности, в некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения мышечной дистрофии Дюшенна (DMD), включающий доставку в клетку: 1) молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей: нуклеиновую кислоту, кодирующую одну или более спейсерных последовательностей, выбранных из SEQ ID NO: 1-35, 1000-1078 и 3000-3069; нуклеиновую кислоту, кодирующую одну или более спейсерных последовательностей, содержащих по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов спейсерной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1-35, 1000-1078 и 3000-3069; или нуклеиновую кислоту, кодирующую одну или более спейсерных последовательностей, которые имеют по меньшей мере 90% идентичности с любой из SEQ ID NO: 1-35, 1000-1078, 3000-3069; и 2) Cas9 *Staphylococcus aureus* (SaCas9) или кодирующую нуклеиновую кислоту (SaCas9).

В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения мышечной дистрофии Дюшенна (DMD), включающий доставку в клетку: 1) молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей: нуклеиновую кислоту, кодирующую одну или более спейсерных последовательностей, выбранных из SEQ ID NO: 1-35, 1000-1078 и 3000-3069; нуклеиновую кислоту, кодирующую одну или более спейсерных последовательностей, содержащих по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов спейсерной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1-35, 1000-1078 и 3000-3069; или нуклеиновую кислоту, кодирующую одну или более спейсерных последовательностей, которые имеют по меньшей мере 90% идентичности с любой из SEQ ID NO: 1-35, 1000-1078, 3000-3069; и 2)

Cas9 Staphylococcus aureus (SaCas9) или кодирующей нуклеиновой кислоты (SaCas9); где клетка содержит мутацию в гене дистрофина, которая, как известно, связана с DMD.

В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения мышечной дистрофии Дюшенна (DMD), включающий доставку в клетку: одиночной молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей: 1) нуклеиновую кислоту, кодирующую одну или более спейсерных последовательностей, выбранных из SEQ ID NO: 1-35, 1000-1078 и 3000-3069; нуклеиновую кислоту, кодирующую одну или более спейсерных последовательностей, содержащих по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов спейсерной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1-35, 1000-1078 и 3000-3069; или нуклеиновую кислоту, кодирующую одну или более спейсерных последовательностей, которые имеют по меньшей мере 90% идентичности с любой из SEQ ID NO: 1-35, 1000-1078 и 3000-3069; и 2) нуклеиновую кислоту, кодирующую SaCas9.

В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения мышечной дистрофии Дюшенна (DMD), включающий доставку в клетку одиночной молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей: 1) нуклеиновую кислоту, кодирующую одну или более спейсерных последовательностей, выбранных из SEQ ID NO: 10, 12, 15, 16, 20, 27, 28, 32, 33, 35, 1001, 1003, 1005, 1010, 1012, 1013, 1016, 1017 и 1018; нуклеиновую кислоту, кодирующую одну или более спейсерных последовательностей, содержащих по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов спейсерной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 10, 12, 15, 16, 20, 27, 28, 32, 33, 35, 1001, 1003, 1005, 1010, 1012, 1013, 1016, 1017 и 1018; или нуклеиновую кислоту, кодирующую одну или более спейсерных последовательностей, которые имеют по меньшей мере 90% идентичности с любой из SEQ ID NO: 10, 12, 15, 16, 20, 27, 28, 32, 33, 35, 1001, 1003, 1005, 1010, 1012, 1013, 1016, 1017, и 1018; и 2) нуклеиновую кислоту, кодирующую *Cas9 Staphylococcus aureus* (SaCas9). В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения мышечной дистрофии Дюшенна (DMD), включающий доставку в клетку: одиночной молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей: 1) нуклеиновую кислоту, кодирующую одну или более спейсерных последовательностей, выбранных из SEQ ID NO: 10, 12, 15, 16, 20, 27, 28, 32, 33, 35, 1001, 1003, 1005, 1010, 1012, 1013, 1016, 1017, и 1018; нуклеиновую кислоту, кодирующую одну или более спейсерных последовательностей, содержащих по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов одной или более спейсерных последовательностей, выбранных из SEQ ID NO: 10, 12, 15, 16, 20, 27, 28, 32, 33, 35, 1001, 1003, 1005, 1010, 1012, 1013, 1016, 1017, и 1018; или нуклеиновую кислоту, кодирующую одну или более спейсерных последовательностей, которые имеют по меньшей мере 90% идентичности с любой из SEQ ID NO: 10, 12, 15, 16, 20, 27, 28, 32, 33, 35, 1001, 1003, 1005, 1010, 1012, 1013, 1016, 1017, и 1018; и 2) нуклеиновую кислоту, кодирующую SaCas9. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах осуществления спейсерная

последовательность представляет собой SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 27. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 28. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 32. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 33. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 35. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 1001. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 1003. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 1005. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 1010. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 1012. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 1013. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 1016. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 1017. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 1018.

В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения мышечной дистрофии Дюшенна (DMD), включающий доставку в клетку одиночной молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей: 1) нуклеиновую кислоту, кодирующую одну или более спейсерных последовательностей, выбранных из SEQ ID NO: 3022, 3023, 3028, 3029, 3030, 3031, 3038, 3039, 3052, 3053, 3054, 3055, 3062, 3063, 3064, 3065, 3068, и 3069; нуклеиновую кислоту, кодирующую одну или более спейсерных последовательностей, содержащих по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов спейсерной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 3022, 3023, 3028, 3029, 3030, 3031, 3038, 3039, 3052, 3053, 3054, 3055, 3062, 3063, 3064, 3065, 3068, и 3069; или нуклеиновую кислоту, кодирующую одну или более спейсерных последовательностей, которые имеют по меньшей мере 90% идентичности с любой из SEQ ID NO: 3022, 3023, 3028, 3029, 3030, 3031, 3038, 3039, 3052, 3053, 3054, 3055, 3062, 3063, 3064, 3065, 3068, и 3069; и 2) нуклеиновую кислоту, кодирующую Cas9 *Staphylococcus aureus* (SaCas9). В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения мышечной дистрофии Дюшенна (DMD), включающий доставку в клетку: одиночной молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей: 1) нуклеиновую кислоту, кодирующую одну или более спейсерных последовательностей, выбранных из SEQ ID NO: 3022, 3023, 3028, 3029, 3030, 3031, 3038, 3039, 3052, 3053, 3054, 3055, 3062, 3063, 3064, 3065, 3068, и 3069; нуклеиновую кислоту, кодирующую одну или более спейсерных последовательностей, содержащих по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов одной или более спейсерных последовательностей, выбранных из SEQ ID NO:

3022, 3023, 3028, 3029, 3030, 3031, 3038, 3039, 3052, 3053, 3054, 3055, 3062, 3063, 3064, 3065, 3068, и 3069; или нуклеиновую кислоту, кодирующую одну или более спейсерных последовательностей, которые имеют по меньшей мере 90% идентичности с любой из SEQ ID NO: 3022, 3023, 3028, 3029, 3030, 3031, 3038, 3039, 3052, 3053, 3054, 3055, 3062, 3063, 3064, 3065, 3068, и 3069; и 2) нуклеиновую кислоту, кодирующую SaCas9. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 3022. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 3023. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 3028. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 3029. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 3030. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 3031. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 3038. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 3039. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 3052. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 3053. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 3054. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 3055. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 3062. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 3063. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 3064. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 3065. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 3068. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 3069.

В частности, в некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения мышечной дистрофии Дюшенна (DMD), включающий доставку в клетку: 1) молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей: нуклеиновую кислоту, кодирующую одну или более спейсерных последовательностей, выбранных из SEQ ID NO: 100-225, 2000-2116 и 4000-4251; нуклеиновую кислоту, кодирующую одну или более спейсерных последовательностей, содержащих по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов спейсерной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 100-225, 2000-2116 и 4000-4251; или нуклеиновую кислоту, кодирующую одну или более спейсерных последовательностей, которые имеют по меньшей мере 90% идентичности с любой из SEQ ID NO: 100-225, 2000-2116, and 4000-4251; и 2) *Staphylococcus lugdunensis* (SluCas9) или молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей SluCas9.

В частности, в некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения

мышечной дистрофии Дюшенна (DMD), включающий доставку в клетку: 1) молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей: нуклеиновую кислоту, кодирующую одну или более спейсерных последовательностей, выбранных из SEQ ID NO: 100-225, 2000-2116 и 4000-4251; нуклеиновую кислоту, кодирующую одну или более спейсерных последовательностей, содержащих по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов спейсерной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 100-225, 2000-2116 и 4000-4251; или нуклеиновую кислоту, кодирующую одну или более спейсерных последовательностей, которые имеют по меньшей мере 90% идентичности с любой из SEQ ID NO: 100-225, 2000-2116 и 4000-4251; и 2) *Staphylococcus lugdunensis* (SluCas9) или молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей SluCas9; где клетка содержит мутацию в гене дистрофина, которая, как известно, ассоциирована с DMD.

В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения мышечной дистрофии Дюшенна (DMD), включающий доставку в клетку: одиночной молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей: 1) нуклеиновую кислоту, кодирующую одну или более спейсерных последовательностей, выбранных из SEQ ID NO: 100-225, 2000-2116 и 4000-4251; нуклеиновую кислоту, кодирующую одну или более спейсерных последовательностей, содержащих по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов спейсерной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 100-225, 2000-2116 и 4000-4251; или нуклеиновую кислоту, кодирующую одну или более спейсерных последовательностей, которые имеют по меньшей мере 90% идентичности с любой из SEQ ID NO: 100-225, 2000-2116 и 4000-4251; и 2) нуклеиновой кислоты, кодирующей *Staphylococcus lugdunensis* (SluCas9).

В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения мышечной дистрофии Дюшенна (DMD), включающий доставку в клетку: 1) молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей: нуклеиновую кислоту, кодирующую одну или более спейсерных последовательностей, выбранных из SEQ ID NO: 131, 134, 135, 136, 139, 140, 141, 144, 145, 146, 148, 149, 150, 151, 179, 184, 201, 210, 223, 224, 225; нуклеиновую кислоту, кодирующую спейсерную последовательность, содержащую по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов одной или более спейсерных последовательностей, выбранных из SEQ ID NO: 131, 134, 135, 136, 139, 140, 141, 144, 145, 146, 148, 149, 150, 151, 179, 184, 201, 210, 223, 224, 225; или нуклеиновую кислоту, кодирующую одну или более спейсерных последовательностей, которые имеют по меньшей мере 90% идентичности с любой из SEQ ID NO: 131, 134, 135, 136, 139, 140, 141, 144, 145, 146, 148, 149, 150, 151, 179, 184, 201, 210, 223, 224, 225; и 2) *Staphylococcus lugdunensis* (SluCas9) или молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей SluCas9. В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения мышечной дистрофии Дюшенна (DMD), включающий доставку в клетку: одиночной молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей: 1) нуклеиновую кислоту, кодирующую одну или более спейсерных последовательностей, выбранных из SEQ ID NO: 131, 134, 135, 136, 139, 140, 141, 144, 145, 146, 148, 149, 150, 151, 179, 184, 201, 210, 223, 224, 225; нуклеиновую кислоту, кодирующую одну или более спейсерных последовательностей, содержащих по

меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов одной или более спейсерных последовательностей, выбранных из SEQ ID NO: 131, 134, 135, 136, 139, 140, 141, 144, 145, 146, 148, 149, 150, 151, 179, 184, 201, 210, 223, 224, 225; или нуклеиновую кислоту, кодирующую одну или более спейсерных последовательностей, которые имеют по меньшей мере 90% идентичности с любой из SEQ ID NO: 131, 134, 135, 136, 139, 144, 148, 149, 150, 151, 179, 184, 201, 210, 223, 224, 225; и 2) нуклеиновую кислоту, кодирующую *Staphylococcus lugdunensis* (SluCas9). В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 131. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 134. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 135. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 136. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 139. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 140. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 141. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 144. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 145. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 146. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 148. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 149. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 150. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 151. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 179. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 184. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 201. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 223. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 224. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 225.

В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения мышечной дистрофии Дюшенна (DMD), включающий доставку в клетку: 1) молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей: нуклеиновую кислоту, кодирующую одну или более спейсерных последовательностей, выбранных из SEQ ID NO: 4062, 4063, 4068, 4069, 4070, 4071, 4072, 4073, 4078, 4079, 4088, 4089, 4096, 4097, 4098, 4099, 4100, 4101, 4102, 4103, 4158, 4159, 4168, 4169, 4202, 4203, 4220, 4221, 4246, 4247, 4248, 4249, 4250, 4251; нуклеиновую кислоту, кодирующую спейсерную последовательность, содержащую по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов одной или более спейсерных последовательностей,

выбранных из SEQ ID NO: 4062, 4063, 4068, 4069, 4070, 4071, 4072, 4073, 4078, 4079, 4088, 4089, 4096, 4097, 4098, 4099, 4100, 4101, 4102, 4103, 4158, 4159, 4168, 4169, 4202, 4203, 4220, 4221, 4246, 4247, 4248, 4249, 4250, 4251; или нуклеиновую кислоту, кодирующую одну или более спейсерных последовательностей, которые имеют по меньшей мере 90% идентичности с любой из SEQ ID NO: 4062, 4063, 4068, 4069, 4070, 4071, 4072, 4073, 4078, 4079, 4088, 4089, 4096, 4097, 4098, 4099, 4100, 4101, 4102, 4103, 4158, 4159, 4168, 4169, 4202, 4203, 4220, 4221, 4246, 4247, 4248, 4249, 4250, 4251; и 2) *Staphylococcus lugdunensis* (SluCas9) или молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей SluCas9. В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения мышечной дистрофии Дюшенна (DMD), включающий доставку в клетку: одиночной молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей: 1) нуклеиновую кислоту, кодирующую одну или более спейсерных последовательностей, выбранных из SEQ ID NO: 4062, 4063, 4068, 4069, 4070, 4071, 4072, 4073, 4078, 4079, 4088, 4089, 4096, 4097, 4098, 4099, 4100, 4101, 4102, 4103, 4158, 4159, 4168, 4169, 4202, 4203, 4220, 4221, 4246, 4247, 4248, 4249, 4250, 4251; нуклеиновую кислоту, кодирующую одну или более спейсерных последовательностей, содержащих по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов одной или более спейсерных последовательностей, выбранных из SEQ ID NO: 4062, 4063, 4068, 4069, 4070, 4071, 4072, 4073, 4078, 4079, 4088, 4089, 4096, 4097, 4098, 4099, 4100, 4101, 4102, 4103, 4158, 4159, 4168, 4169, 4202, 4203, 4220, 4221, 4246, 4247, 4248, 4249, 4250, 4251; или нуклеиновую кислоту, кодирующую одну или более спейсерных последовательностей, которые имеют по меньшей мере 90% идентичности с любой из SEQ ID NO: 4062, 4063, 4068, 4069, 4070, 4071, 4072, 4073, 4078, 4079, 4088, 4089, 4096, 4097, 4098, 4099, 4100, 4101, 4102, 4103, 4158, 4159, 4168, 4169, 4202, 4203, 4220, 4221, 4246, 4247, 4248, 4249, 4250, 4251; и 2) нуклеиновую кислоту, кодирующую *Staphylococcus lugdunensis* (SluCas9). В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 4062. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 4063. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 4068. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 4069. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 4070. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 4071. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 4072. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 4073. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 4078. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 4079. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 4088. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 4089. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 4096. В

[illegible]

В некоторых вариантах осуществления способы включают доставку в клетку молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей SaCas9, где SaCas9 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 711. В некоторых вариантах осуществления способы включают доставку в клетку молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей SaCas9, где SaCas9 представляет собой вариант аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 711. В некоторых вариантах осуществления способы включают доставку в клетку молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей SaCas9, где SaCas9 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 715-717. В некоторых вариантах осуществления способы включают доставку в клетку молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей SaCas9, где SaCas9 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 715.

В некоторых вариантах осуществления способы включают доставку в клетку молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей SluCas9, где SluCas9 содержит

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 712. В некоторых вариантах осуществления способы включают доставку в клетку молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей SluCas9, где SaCas9 представляет собой вариант аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 712. В некоторых вариантах осуществления способы включают доставку в клетку молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей SluCas9, где SluCas9 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 718-720.

В некоторых вариантах осуществления предложены способы лечения мышечной дистрофии Дюшенна (DMD), включающие доставку в клетку одиночной молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей: нуклеиновую кислоту, кодирующую пару направляющих РНК, включающую: первую и вторую спейсерные последовательности, выбранные из любой из SEQ ID NO: 10 и 15; 10 и 16; 12 и 16; 1001 и 1005; 1001 и 15; 1001 и 16; 1003 и 1005; 16 и 1003; 12 и 1010; 12 и 1012; 12 и 1013; 10 и 1016; 1017 и 1005; 1017 и 16; и 1018 и 16; и нуклеиновую кислоту, кодирующую Cas9 *Staphylococcus aureus* (SaCas9). В некоторых вариантах осуществления первая и вторая спейсерные последовательности выбраны из SEQ ID NO: 10 и 15. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая спейсерные последовательности выбраны из SEQ ID NO: 10 и 16. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая спейсерные последовательности выбраны из SEQ ID NO: 12 и 16. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая спейсерные последовательности выбраны из SEQ ID NO: 1001 и 1005. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая спейсерные последовательности выбраны из SEQ ID NO: 1001 и 15. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая спейсерные последовательности выбраны из SEQ ID NO: 1001 и 16. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая спейсерные последовательности выбраны из SEQ ID NO: 1003 и 1005. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая спейсерные последовательности выбраны из SEQ ID NO: 16 и 1003. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая спейсерные последовательности выбраны из SEQ ID NO: 12 и 1010. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая спейсерные последовательности выбраны из SEQ ID NO: 12 и 1012. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая спейсерные последовательности выбраны из SEQ ID NO: 12 и 1013. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая спейсерные последовательности выбраны из SEQ ID NO: 10 и 1016. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая спейсерные последовательности выбраны из SEQ ID NO: 1017 и 16. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая спейсерные последовательности выбраны из SEQ ID NO: 1018 и 16.

В некоторых вариантах осуществления предложены способы лечения мышечной дистрофии Дюшенна (DMD), включающие доставку в клетку одиночной молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей: нуклеиновую кислоту, кодирующую пару направляющих РНК, содержащую: первую и вторую спейсерные последовательности, содержащие по меньшей мере 17, 18, 19, 20 или 21 смежных нуклеотидов любой из SEQ ID

NO: 10 и 15; 10 и 16; 12 и 16; 1001 и 1005; 1001 и 15; 1001 и 16; 1003 и 1005; 16 и 1003; 12 и 1010; 12 и 1012; 12 и 1013; 10 и 1016; 1017 и 1005; 1017 и 16; и 1018 и 16; и нуклеиновую кислоту, кодирующую Cas9 *Staphylococcus aureus* (SaCas9).

В некоторых вариантах осуществления предложены способы лечения мышечной дистрофии Дюшенна (DMD), включающие доставку в клетку одиночной молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей: нуклеиновую кислоту, кодирующую пару направляющих РНК, включающую: первую и вторую спейсерные последовательности, выбранные из спейсерных последовательностей, которые имеют по меньшей мере 90% идентичности с любой из SEQ ID NO: 10 и 15; 10 и 16; 12 и 16; 1001 и 1005; 1001 и 15; 1001 и 16; 1003 и 1005; 16 и 1003; 12 и 1010; 12 и 1012; 12 и 1013; 10 и 1016; 1017 и 1005; 1017 и 16; и 1018 и 16; и нуклеиновую кислоту, кодирующую Cas9 *Staphylococcus aureus* (SaCas9).

В некоторых вариантах осуществления предложены способы лечения мышечной дистрофии Дюшенна (DMD), включающие доставку в клетку одиночной молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей: нуклеиновую кислоту, кодирующую пару направляющих РНК, включающую: первую и вторую спейсерные последовательности, выбранные из любой из SEQ ID NO: 1001 и 1005; 1001 и 15; 1001 и 16; 1003 и 1005; 16 и 1003; 12 и 1010; 12 и 1012; 12 и 1013; 10 и 1016; 1017 и 1005; 1017 и 16; и 1018 и 16; и нуклеиновую кислоту, кодирующую Cas9 *Staphylococcus aureus* (SaCas9), где нуклеиновая кислота, кодирующая SaCas9, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 715. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая спейсерные последовательности выбраны из SEQ ID NO: 1001 и 1005. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая спейсерные последовательности выбраны из SEQ ID NO: 1001 и 15. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая спейсерные последовательности выбраны из SEQ ID NO: 1001 и 16. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая спейсерные последовательности выбраны из SEQ ID NO: 1003 и 1005. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая спейсерные последовательности выбраны из SEQ ID NO: 16 и 1003. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая спейсерные последовательности выбраны из SEQ ID NO: 12 и 1010. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая спейсерные последовательности выбраны из SEQ ID NO: 12 и 1012. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая спейсерные последовательности выбраны из SEQ ID NO: 12 и 1013. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая спейсерные последовательности выбраны из SEQ ID NO: 10 и 1016. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая спейсерные последовательности выбраны из SEQ ID NO: 1017 и 16. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая спейсерные последовательности выбраны из SEQ ID NO: 1018 и 16.

В некоторых вариантах осуществления предложены способы лечения мышечной дистрофии Дюшенна (DMD), включающие доставку в клетку одиночной молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей: нуклеиновую кислоту, кодирующую пару направляющих РНК, содержащую: первую и вторую спейсерные последовательности,

содержащие по меньшей мере 17, 18, 19, 20 или 21 смежный нуклеотид любой из SEQ ID NO: 1001 и 1005; 1001 и 15; 1001 и 16; 1003 и 1005; 16 и 1003; 12 и 1010; 12 и 1012; 12 и 1013; 10 и 1016; 1017 и 1005; 1017 и 16; и 1018 и 16; и нуклеиновую кислоту, кодирующую Cas9 *Staphylococcus aureus* (SaCas9), где нуклеиновая кислота, кодирующая SaCas9, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 715.

В некоторых вариантах осуществления предложены способы лечения мышечной дистрофии Дюшенна (DMD), включающие доставку в клетку одиночной молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей: нуклеиновую кислоту, кодирующую пару направляющих РНК, содержащую: первую и вторую спейсерные последовательности, которые имеют по меньшей мере 90% идентичности с любой из SEQ ID NO: 1001 и 1005; 1001 и 15; 1001 и 16; 1003 и 1005; 16 и 1003; 12 и 1010; 12 и 1012; 12 и 1013; 10 и 1016; 1017 и 1005; 1017 и 16; и 1018 и 16; и нуклеиновую кислоту, кодирующую Cas9 *Staphylococcus aureus* (SaCas9), где нуклеиновая кислота, кодирующая SaCas9, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 715.

В некоторых вариантах осуществления предложены способы лечения мышечной дистрофии Дюшенна (DMD), включающие доставку в клетку одиночной молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей: нуклеиновую кислоту, кодирующую пару направляющих РНК, включающую: первую и вторую спейсерные последовательности, выбранные из любой из SEQ ID NO: 148 и 134; 149 и 135; 150 и 135; 131 и 136; 151 и 136; 139 и 131; 139 и 151; 140 и 131; 140 и 151; 141 и 148; 144 и 149; 144 и 150; 145 и 131; 145 и 151; и 146 и 148; и нуклеиновую кислоту, кодирующую *Staphylococcus lugdunensis* (SluCas9). В некоторых вариантах осуществления первая и вторая спейсерные последовательности выбраны из SEQ ID NO: 148 и 134. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая спейсерные последовательности выбраны из SEQ ID NO: 149 и 135. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая спейсерные последовательности выбраны из SEQ ID NO: 150 и 135. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая спейсерные последовательности выбраны из SEQ ID NO: 131 и 136. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая спейсерные последовательности выбраны из SEQ ID NO: 151 и 136. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая спейсерные последовательности выбраны из SEQ ID NO: 139 и 131. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая спейсерные последовательности выбраны из SEQ ID NO: 139 и 151. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая спейсерные последовательности выбраны из SEQ ID NO: 140 и 131. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая спейсерные последовательности выбраны из SEQ ID NO: 140 и 151. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая спейсерные последовательности выбраны из SEQ ID NO: 141 и 148. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая спейсерные последовательности выбраны из SEQ ID NO: 144 и 149. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая спейсерные последовательности выбраны из SEQ ID NO: 144 и 150. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая спейсерные

последовательности выбраны из SEQ ID NO: 145 и 131. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая спейсерные последовательности выбраны из SEQ ID NO: 145 и 151. В некоторых вариантах осуществления первая и вторая спейсерные последовательности выбраны из SEQ ID NO: 146 и 148.

В некоторых вариантах осуществления предложены способы лечения мышечной дистрофии Дюшенна (DMD), включающие доставку в клетку одиночной молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей: нуклеиновую кислоту, кодирующую пару направляющих РНК, содержащую: первую и вторую спейсерные последовательности, содержащие по меньшей мере 17, 18, 19, 20 или 21 смежных нуклеотидов любой из SEQ ID NO: 148 и 134; 149 и 135; 150 и 135; 131 и 136; 151 и 136; 139 и 131; 139 и 151; 140 и 131; 140 и 151; 141 и 148; 144 и 149; 144 и 150; 145 и 131; 145 и 151; и 146 и 148; и нуклеиновую кислоту, кодирующую *Staphylococcus lugdunensis* (SluCas9).

В некоторых вариантах осуществления предложены способы лечения мышечной дистрофии Дюшенна (DMD), включающие доставку в клетку одиночной молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей: нуклеиновую кислоту, кодирующую пару направляющих РНК, включающую: первую и вторую спейсерные последовательности, выбранные из спейсерных последовательностей, которые имеют по меньшей мере 90% идентичности с любой из SEQ ID NO: 148 и 134; 149 и 135; 150 и 135; 131 и 136; 151 и 136; 139 и 131; 139 и 151; 140 и 131; 140 и 151; 141 и 148; 144 и 149; 144 и 150; 145 и 131; 145 и 151; и 146 и 148; и нуклеиновую кислоту, кодирующую *Staphylococcus lugdunensis* (SluCas9).

В некоторых вариантах осуществления предложены способы вырезания части экзона с преждевременным стоп-кодоном у субъекта с мышечной дистрофией Дюшенна (DMD), причем способ включает доставку в клетку одиночной молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей: (i) нуклеиновую кислоту, кодирующую пару направляющих РНК, где первая направляющая РНК связывается с целевой последовательностью в экзоне, расположенном выше преждевременного стоп-кодона, и где вторая направляющая РНК связывается с последовательностью, расположенной ниже преждевременного стоп-кодона и ниже последовательности, связанной первой направляющей РНК; и (ii) нуклеиновую кислоту, кодирующую Cas9 *Staphylococcus aureus* (SaCas9); где пара направляющих РНК и SaCas9 вырезают часть экзона. В некоторых вариантах осуществления одиночная молекула нуклеиновой кислоты доставляется в клетку с помощью одиночного вектора. В некоторых вариантах осуществления части экзона, оставшиеся после вырезания, повторно соединяются с одонуклеотидной вставкой. В некоторых вариантах осуществления части экзона, оставшиеся после вырезания, повторно соединяются без нуклеотидной вставки. Точная делеция сегментов означает, что процесс двойного вырезания обеспечивает конкретную делецию. Эта точная делеция может привести к изменению рамки считывания экзона (см., например, Фиг. 6). В некоторых вариантах вырезаемая часть имеет размер имеет от 5 до 250, от 5 до 225, от 5 до 200, от 5 до 190, от 5 до 180, от 5 до 170, от 5 до 160, от 5 до 150, от 5 до 125, от 5 до 120, 5 и 115, 5 и 110, 5 и 100, 5 и 95, 5 и 90, 5 и 85, 5 и 80, 5

и 75, 5 и 70, 5 и 65, 5 и 60, 5 и 55, 5 и 50, 5 и 45, 5 и 40, 5 и 35, 5 и 30, 5 и 25, 5 и 20, 5 и 15 и 5-10 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления вырезаемая часть имеет размер 20-250, 20-225, 20-200, 20-190, 20-180, 20-170, 20-160, 20-150, 20-125, 20-120, 20-115, 20-110, 20-100, 20-95, 20-90, 20-85, 20-80, 20-75, 20-70, 20-65, 20-60, 20-55, 20-50, 20-45, 20-40, 20-35, 20-30, и 20-25 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления вырезаемая часть имеет размер 50-250, 50-225, 50-200, 50-190, 50-180, 50-170, 50-160, 50-150, 50-125, 50-120, 50-115, 50-110, и 50-100 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления вырезаемая часть экзон имеет размер 8-167 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления экзон представляет собой экзон 45 гена дистрофина. В некоторых вариантах осуществления пара направляющих РНК содержит первую и вторую спейсерные последовательности SEQ ID NO: 10 и 15 (или SEQ ID NO: 15 и 10). В некоторых вариантах осуществления пара направляющих РНК содержит первую и вторую спейсерные последовательности SEQ ID NO: 10 и 16 (или SEQ ID No: 16 и 10). В некоторых вариантах осуществления пара направляющих РНК содержит первую и вторую спейсерные последовательности SEQ ID NO: 12 и 16 (или SEQ ID No: 16 и 12). В некоторых вариантах осуществления пара направляющих РНК содержит первую и вторую спейсерные последовательности SEQ ID NO: 1001 и 1005 (или SEQ ID No: 1005 и 1001). В некоторых вариантах осуществления пара направляющих РНК содержит первую и вторую спейсерные последовательности SEQ ID NO: 1001 и 15 (или SEQ ID No: 15 и 1001). В некоторых вариантах осуществления пара направляющих РНК содержит первую и вторую спейсерные последовательности SEQ ID NO: 1001 и 16 (или SEQ ID No: 16 и 1001). В некоторых вариантах осуществления пара направляющих РНК содержит первую и вторую спейсерные последовательности SEQ ID NO: 1003 и 1005 (или SEQ ID No: 1005 и 1003). В некоторых вариантах осуществления пара направляющих РНК содержит первую и вторую спейсерные последовательности SEQ ID NO: 16 и 1003 (или SEQ ID No: 1003 и 16). В некоторых вариантах осуществления пара направляющих РНК содержит первую и вторую спейсерные последовательности SEQ ID NO: 12 и 1010 (или SEQ ID No: 1010 и 12). В некоторых вариантах осуществления пара направляющих РНК содержит первую и вторую спейсерные последовательности SEQ ID NO: 12 и 1012 (или SEQ ID No: 1012 и 12). В некоторых вариантах осуществления пара направляющих РНК содержит первую и вторую спейсерные последовательности SEQ ID NO: 12 и 1013 (или SEQ ID No: 1013 и 12). В некоторых вариантах осуществления пара направляющих РНК содержит первую и вторую спейсерные последовательности SEQ ID NO: 10 и 1016 (или SEQ ID No: 1016 и 10). В некоторых вариантах осуществления пара направляющих РНК содержит первую и вторую спейсерные последовательности SEQ ID NO: 1017 и 16 (или SEQ ID No: 16 и 1017). В некоторых вариантах осуществления пара направляющих РНК содержит первую и вторую спейсерные последовательности SEQ ID NO: 1018 и 16 (или SEQ ID No: 16 и 1018). В некоторых вариантах осуществления SaCas9 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 715.

В некоторых вариантах осуществления предложены способы вырезания части экзона с преждевременным стоп-кодоном у субъекта с мышечной дистрофией Дюшенна

(DMD), причем способ включает доставку в клетку одиночной молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей: (i) нуклеиновую кислоту, кодирующую пару направляющих РНК, где первая направляющая РНК связывается с целевой последовательностью в экзоне, расположенном выше преждевременного стоп-кодона, и где вторая направляющая РНК связывается с последовательностью, расположенной ниже преждевременного стоп-кодона и ниже последовательности, связанной первой направляющей РНК; и (ii) нуклеиновую кислоту, кодирующую *Staphylococcus lugdunensis* (SluCas9); где пара направляющих РНК и SluCas9 вырезают часть экзона. В некоторых вариантах осуществления одиночная молекула нуклеиновой кислоты доставляется в клетку с помощью одиночного вектора. В некоторых вариантах осуществления части экзона, оставшиеся после вырезания, повторно соединяются с однонуклеотидной вставкой. В некоторых вариантах осуществления части экзона, оставшиеся после вырезания, повторно соединяются без нуклеотидной вставки. В некоторых вариантах осуществления вырезаемая часть экзона имеет размер 8-167 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления экзон представляет собой экзон 45 гена дистрофина. В некоторых вариантах осуществления пара направляющих РНК содержит первую и вторую спейсерные последовательности SEQ ID NO: 148 и 134 (или SEQ ID No: 134 и 148). В некоторых вариантах осуществления пара направляющих РНК содержит первую и вторую спейсерные последовательности SEQ ID NO: 149 и 135 (или SEQ ID No: 135 и 149). В некоторых вариантах осуществления пара направляющих РНК содержит первую и вторую спейсерные последовательности SEQ ID NO: 150 и 135 (или SEQ ID No: 135 и 150). В некоторых вариантах осуществления пара направляющих РНК содержит первую и вторую спейсерные последовательности SEQ ID NO: 131 и 136 (или SEQ ID No: 136 и 131). В некоторых вариантах осуществления пара направляющих РНК содержит первую и вторую спейсерные последовательности SEQ ID NO: 151 и 136 (или SEQ ID No: 136 и 151). В некоторых вариантах осуществления пара направляющих РНК содержит первую и вторую спейсерные последовательности SEQ ID NO: 139 и 131 (или SEQ ID No: 131 и 139). В некоторых вариантах осуществления пара направляющих РНК содержит первую и вторую спейсерные последовательности SEQ ID NO: 139 и 151 (или SEQ ID No: 151 и 139). В некоторых вариантах осуществления пара направляющих РНК содержит первую и вторую спейсерные последовательности SEQ ID NO: 140 и 131 (или SEQ ID No: 131 и 140). В некоторых вариантах осуществления пара направляющих РНК содержит первую и вторую спейсерные последовательности SEQ ID NO: 140 и 151 (или SEQ ID No: 151 и 140). В некоторых вариантах осуществления пара направляющих РНК содержит первую и вторую спейсерные последовательности SEQ ID NO: 141 и 148 (или SEQ ID No: 148 и 141). В некоторых вариантах осуществления пара направляющих РНК содержит первую и вторую спейсерные последовательности SEQ ID NO: 144 и 149 (или SEQ ID No: 149 и 144). В некоторых вариантах осуществления пара направляющих РНК содержит первую и вторую спейсерные последовательности SEQ ID NO: 144 и 150 (или SEQ ID No: 150 и 144). В некоторых вариантах осуществления пара направляющих РНК содержит первую и вторую спейсерные последовательности SEQ ID NO: 145 и 131 (или

SEQ ID No: 131 и 145). В некоторых вариантах осуществления пара направляющих РНК содержит первую и вторую спейсерные последовательности SEQ ID NO: 145 и 151 (или SEQ ID No: 151 и 145). В некоторых вариантах осуществления пара направляющих РНК содержит первую и вторую спейсерные последовательности SEQ ID NO: 146 и 148 (или SEQ ID No: 148 и 146).

В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой млекопитающее. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой человека.

Для лечения субъекта (например, человека) любую из описанных в данном документе композиций можно вводить способом, совместимым с дозированной лекарственной формой, и в таком количестве, которое является терапевтически эффективным. Композиции можно легко вводить в различных дозированных формах, таких как растворы для инъекций. Для парентерального введения, например, в водном растворе, раствор обычно должным образом забуферен, а жидкий разбавитель сначала делается изотоническим, например, с помощью достаточного количества солевого раствора или глюкозы. Такие водные растворы можно использовать, например, для внутривенного, внутримышечного, подкожного и/или внутрибрюшинного введения.

Комбинированная терапия

В некоторых вариантах осуществления изобретение включает комбинированную терапию, включающую любой из способов или применений, описанных в данном документе, вместе с дополнительной терапией, подходящей для облегчения DMD.

Доставка композиций направляющей РНК

Способы и применения, описанные в данном документе, могут использовать любой подходящий подход для доставки направляющих РНК и композиций, описанных в данном документе. Иллюстративные подходы к доставке включают векторы, такие как вирусные векторы; липидные наночастицы; трансфекция; и электропорация. В некоторых вариантах осуществления векторы или ЛНЧ, связанные с одновекторными направляющими РНК/Cas9, описанными в данном документе, предназначены для применения при приготовлении лекарственного препарата для лечения DMD.

Когда используется вектор, это может быть вирусный вектор, такой как неинтегрирующий вирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на основе аденоассоциированного вируса, лентивирусный вектор, дефицитный по интегразе лентивирусный вектор, аденовирусный вектор, вектор на основе вируса осповакцины, альфавирусный вектор или вектор на основе вируса простого герпеса. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV). В некоторых вариантах осуществления вектор AAV представляет собой AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh10 (см., например, SEQ ID NO: 81 из US 9790472, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки), AAVrh74 (см., например, SEQ ID NO: 1 в US 2015/0111955, которая полностью включена в данный документ посредством ссылки) или вектор AAV9, где число, следующее за AAV, указывает

на серотип AAV. В некоторых вариантах осуществления вектор AAV представляет собой одноцепочечный AAV (ssAAV). В некоторых вариантах осуществления вектор AAV представляет собой двухцепочечный AAV (dsAAV). Любой вариант вектора AAV или его серотипа, такой как вектор на основе самокомплементарного AAV (scAAV), охватывается общими терминами вектор AAV, вектор AAV1 и т. д. См., например, McCarty et al., *Gene Ther.* 2001;8:1248-54, Naso et al., *BioDrugs* 2017; 31:317-334, и цитируемые там ссылки для подробного обсуждения различных векторов AAV. В некоторых вариантах осуществления размер вектора AAV измеряется длиной нуклеотидов от ITR до ITR, включая обе ITR. В некоторых вариантах осуществления вектор AAV имеет размер менее 5 т.п.н. от ITR до ITR, включая обе ITR. В конкретных вариантах осуществления вектор AAV имеет размер менее 4,9 т.п.н. от ITR до ITR, включая оба ITR. В дополнительных вариантах осуществления вектор AAV имеет размер менее 4,85 т.п.н. от ITR до ITR, включая оба ITR. В дополнительных вариантах осуществления вектор AAV имеет размер менее 4,8 т.п.н. от ITR до ITR, включая оба ITR. В дополнительных вариантах осуществления вектор AAV имеет размер менее 4,75 т.п.н. от ITR до ITR, включая оба ITR. В дополнительных вариантах осуществления вектор AAV имеет размер менее 4,7 т.п.н. от ITR до ITR, включая оба ITR. В некоторых вариантах осуществления вектор имеет размер 3,9-5 т.п.н., 4-5 т.п.н., 4,2-5 т.п.н., 4,4-5 т.п.н., 4,6-5 т.п.н., 4,7-5 т.п.н., 3,9-4,9 т.п.н., 4,2-4,9 т.п.н., 4,4-4,9 т.п.н., 4,7-4,9 т.п.н., 3,9-4,85 т.п.н., 4,2-4,85 т.п.н., 4,4-4,85 т.п.н., 4,6-4,85 т.п.н., 4,7-4,85 т.п.н., 4,7-4,9 т.п.н., 3,9-4,8 т.п.н., 4,2-4,8 т.п.н., 4,4-4,8 т.п.н. или 4,6-4,8 т.п.н. от ITR до ITR, включая оба ITR. В некоторых вариантах осуществления вектор имеет размер от 4,4 до 4,85 т.п.н. от ITR до ITR, включая оба ITR. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой вектор AAV9.

В некоторых вариантах осуществления вектор (например, вирусный вектор, такой как вектор на основе аденоассоциированного вируса) содержит тканеспецифический (например, специфический для мышц) промотор, например, который функционально связан с последовательностью, кодирующей направляющую РНК. В некоторых вариантах осуществления специфический для мышц промотор представляет собой промотор мышечной креатинкиназы, промотор десмина, промотор МНСК7 или промотор SPc5-12. В некоторых вариантах осуществления специфический для мышц промотор представляет собой промотор СК8. В некоторых вариантах осуществления специфический для мышц промотор представляет собой промотор СК8е. Специфичные для мышц промоторы подробно описаны, например, в US2004/0175727 A1; Wang et al., *Expert Opin Drug Deliv.* (2014) 11, 345-364; Wang et al., *Gene Therapy* (2008) 15, 1489-1499. В некоторых вариантах осуществления тканеспецифический промотор представляет собой специфический для нейронов промотор, такой как промотор енолазы. См., например, Naso et al., *BioDrugs* 2017; 31:317-334; Dashkoff et al., *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2016;3:16081, и ссылки, цитируемые там для подробного обсуждения тканеспецифических промоторов, включая специфические для нейронов промоторы.

В некоторых вариантах осуществления в дополнение к последовательностям

направляющей РНК и Cas9 векторы дополнительно содержат нуклеиновые кислоты, которые не кодируют направляющие РНК. Нуклеиновые кислоты, которые не кодируют направляющую РНК и Cas9, включают, но не ограничиваются ими, промоторы, энхансеры и регуляторные последовательности. В некоторых вариантах осуществления вектор содержит одну или более нуклеотидных последовательностей, кодирующих scРНК, trРНК или crРНК и trРНК.

Липидные наночастицы (ЛНЧ) являются известными средствами доставки нуклеотидного и белкового карго и могут быть использованы для доставки направляющих РНК, композиций или фармацевтических составов, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ доставляют нуклеиновую кислоту, белок или нуклеиновую кислоту вместе с белком.

Электропорация является хорошо известным средством доставки карго, и любая методология электропорации может быть использована для доставки отдельных векторов, описанных в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления включает способ доставки любого из описанных в данном документе одиночных векторов в клетку *ex vivo*, где направляющая РНК кодируется вектором, ассоциированным с ЛНЧ, или в водном растворе. В некоторых вариантах осуществления направляющая РНК/LNP или направляющая РНК также связана с Cas9 или последовательностью, кодирующей Cas9 (например, в том же векторе, ЛНЧ или растворе).

В некоторых вариантах осуществления в описании предложены способы использования любых направляющих молекул, эндонуклеаз, клеток или композиций, описанных в данном документе, в методах исследования. Например, любой из направляющих молекул или эндонуклеаз, описанных в данном документе, можно использовать отдельно или в комбинации в экспериментах при различных параметрах (например, температуре, pH, типах клеток) или в направляющих молекул с другими реагентами для оценки активности направляющих молекул и/или эндонуклеаз.

Дополнительные варианты осуществления, охватываемые изобретение, являются следующими.

Вариант осуществления В 1 представляет собой композицию, содержащая одиночную молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую одну или более направляющих РНК и Cas9, где одиночная молекула нуклеиновой кислоты содержит:

а. первую нуклеиновую кислоту, кодирующую одну или более спейсерных последовательностей, выбранных из любой из SEQ ID NO: 1-35, 1000-1078 или 3000-3069, и вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую Cas9 *Staphylococcus aureus* (SaCas9);

б. первую нуклеиновую кислоту, кодирующую одну или более спейсерных последовательностей, выбранных из любой из SEQ ID NO: 100-225, 2000-2116 или 4000-4251 и вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую *Staphylococcus lugdunensis* (SluCas9);

с. первую нуклеиновую кислоту, кодирующую одну или более спейсерных последовательностей, содержащих по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных

нуклеотидов спейсерной последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 1-35, 1000-1078 или 3000-3069, и вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую Cas9 *Staphylococcus aureus* (SaCas9);

d. первую нуклеиновую кислоту, кодирующую одну или более спейсерных последовательностей, содержащих по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов спейсерной последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 100-225, 2000-2116 или 4000-4251 и вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую *Staphylococcus lugdunensis* (SluCas9);

e. первую нуклеиновую кислоту, кодирующую одну или более спейсерных последовательностей, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с любой из SEQ ID NO: 1-35, 1000-1078 или 3000-3069, и вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую Cas9 *Staphylococcus aureus* (SaCas9);

f. первую нуклеиновую кислоту, кодирующую одну или более спейсерных последовательностей, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с любой из SEQ ID NO: 100-225, 2000-2116 или 4000-4251 и вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую *Staphylococcus lugdunensis* (SluCas9);

g. первую нуклеиновую кислоту, кодирующую пару направляющих РНК, содержащих первую и вторую спейсерные последовательности, выбранные из любой из SEQ ID NO: 10 и 15; 10 и 16; 12 и 16; 1001 и 1005; 1001 и 15; 1001 и 16; 1003 и 1005; 16 и 1003; 12 и 1010; 12 и 1012; 12 и 1013; 10 и 1016; 1017 и 1005; 1017 и 16; 1018 и 16; 15 и 10; 16 и 10; 16 и 12; 1005 и 1001; 15 и 1001; 16 и 1001; 1005 и 1003; 1003 и 16; 1010 и 12; 1012 и 12; 1013 и 12; 1016 и 10; 1005 и 1017; 16 и 1017; и 16 и 1018; и вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую Cas9 *Staphylococcus aureus* (SaCas9).

h. первую нуклеиновую кислоту, кодирующую пару направляющих РНК, содержащую по меньшей мере 17, 18, 19, 20 или 21 смежных нуклеотид первой и второй спейсерных последовательностей, выбранных из любой из SEQ ID NO: 10 и 15; 10 и 16; 12 и 16; 1001 и 1005; 1001 и 15; 1001 и 16; 1003 и 1005; 16 и 1003; 12 и 1010; 12 и 1012; 12 и 1013; 10 и 1016; 1017 и 1005; 1017 и 16; 1018 и 16; 15 и 10; 16 и 10; 16 и 12; 1005 и 1001; 15 и 1001; 16 и 1001; 1005 и 1003; 1003 и 16; 1010 и 12; 1012 и 12; 1013 и 12; 1016 и 10; 1005 и 1017; 16 и 1017; и 16 и 1018; и вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую Cas9 *Staphylococcus aureus* (SaCas9);

i. первую нуклеиновую кислоту, кодирующую пару направляющих РНК, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с первой и второй спейсерными последовательностями, выбранными из любой из SEQ ID NO: 10 и 15; 10 и 16; 12 и 16; 1001 и 1005; 1001 и 15; 1001 и 16; 1003 и 1005; 16 и 1003; 12 и 1010; 12 и 1012; 12 и 1013; 10 и 1016; 1017 и 1005; 1017 и 16; 1018 и 16; 15 и 10; 16 и 10; 16 и 12; 1005 и 1001; 15 и 1001; 16 и 1001; 1005 и 1003; 1003 и 16; 1010 и 12; 1012 и 12; 1013 и 12; 1016 и 10; 1005 и 1017; 16 и 1017; и 16 и 1018; и вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую Cas9 *Staphylococcus aureus* (SaCas9);

j. первую нуклеиновую кислоту, кодирующую пару направляющих РНК,

содержащих первую и вторую спейсерные последовательности, выбранные из любой из SEQ ID NO: 148 и 134; 149 и 135; 150 и 135; 131 и 136; 151 и 136; 139 и 131; 139 и 151; 140 и 131; 140 и 151; 141 и 148; 144 и 149; 144 и 150; 145 и 131; 145 и 151; 146 и 148; 134 и 148; 135 и 149; 135 и 150; 136 и 131; 136 и 151; 131 и 139; 151 и 139; 131 и 140; 151 и 140; 148 и 141; 149 и 144; 150 и 144; 131 и 145; 151 и 145; и 148 и 146; и вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую *Staphylococcus lugdunensis* (SluCas9);

к. первую нуклеиновую кислоту, кодирующую пару направляющих РНК, содержащую по меньшей мере 17, 18, 19, 20 или 21 смежный нуклеотид первой и второй спейсерных последовательностей, выбранных из любой из SEQ ID NO: 148 и 134; 149 и 135; 150 и 135; 131 и 136; 151 и 136; 139 и 131; 139 и 151; 140 и 131; 140 и 151; 141 и 148; 144 и 149; 144 и 150; 145 и 131; 145 и 151; 146 и 148; 134 и 148; 135 и 149; 135 и 150; 136 и 131; 136 и 151; 131 и 139; 151 и 139; 131 и 140; 151 и 140; 148 и 141; 149 и 144; 150 и 144; 131 и 145; 151 и 145; и 148 и 146; и вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую *Staphylococcus lugdunensis* (SluCas9); или

л. первую нуклеиновую кислоту, кодирующую пару направляющих РНК, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с первой и второй спейсерными последовательностями, выбранными из любой из SEQ ID NO: 148-134; 149-135; 150-135; 131-136; 151-136; 139-131; 139-151; 140-131; 140-151; 141-148; 144-149; 144-150; 145-131; 145-151; 146-148; 134-148; 135-149; 135-150; 136-131; 136-151; 131-139; 151-139; 131-140; 151-140; 148-141; 149-144; 150-144; 131-145; 151-145; и 148-146; и вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую *Staphylococcus lugdunensis* (SluCas9).

Вариант осуществления В 2 представляет собой композицию по п. 1, где направляющая РНК представляет собой онРНК.

Вариант осуществления В 3 представляет собой композицию по п. 1, где направляющая РНК модифицирована.

Вариант осуществления В 4 представляет собой композицию по п. 3, где модификация изменяет одно или более положений 2' и/или фосфодиэфирных связей.

Вариант осуществления В 5 представляет собой композицию по любому из пп. 3-4, где модификация изменяет один или более или все первые три нуклеотида направляющей РНК.

Вариант осуществления В 6 представляет собой композицию по любому из пп. 3-5, где модификация изменяет один или более или все последние три нуклеотида направляющей РНК.

Вариант осуществления В 7 представляет собой композицию по любому из пп. 3-6, где модификация включает одну или более из фосфоротиоатной модификации, 2'-ОМе модификации, 2'-О-МОЕ модификации, 2'-F модификации, 2'-О-метин-4' мостиковой модификации, 3'-тиофосфоацетатной модификации или 2'-дезоксид модификации.

Вариант осуществления В 8 представляет собой композицию по любому из предшествующих пунктов, где дополнительно содержит фармацевтически приемлемый эксципиент.

Вариант осуществления В 9 представляет собой композицию по любому из предшествующих пунктов, где одиночная молекула нуклеиновой кислоты связана с липидной наночастицей (ЛНЧ).

Вариант осуществления В 10 представляет собой композицию по любому из пп. 1-8, где одиночная молекула нуклеиновой кислоты представляет собой вирусный вектор.

Вариант осуществления В 11 представляет собой композицию по п. 10, где вирусный вектор представляет собой вектор на основе аденоассоциированного вируса, лентивирусный вектор, дефицитный по интегразе лентивирусный вектор, аденовирусный вектор, вектор на основе вируса осповакцины, альфавирусный вектор или вектор на основе вируса простого герпеса.

Вариант осуществления В 12 представляет собой композицию по п. 10, где вирусный вектор представляет собой вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV).

Вариант осуществления В 13 представляет собой композицию по п. 12, где вектор AAV представляет собой вектор AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh10, AAVrh74 или AAV9, где число, следующее за AAV, указывает на серотип AAV.

Вариант осуществления В 14 представляет собой композицию по п. 13, где вектор AAV представляет собой вектор AAV серотипа 9.

Вариант осуществления В 15 представляет собой композицию по п. 13, где вектор AAV представляет собой вектор AAVrh10.

Вариант осуществления В 16 представляет собой композицию по п. 13, где вектор AAV представляет собой вектор AAVrh74.

Вариант осуществления В 17 представляет собой композицию по любому из пп. 10-16, содержащая вирусный вектор, где вирусный вектор содержит тканеспецифический промотор.

Вариант осуществления В 18 представляет собой композицию по любому из пп. 10-16, содержащая вирусный вектор, где вирусный вектор содержит специфический для мышц промотор, необязательно где специфический для мышц промотор представляет собой промотор мышечной креатинкиназы, промотор десмина, промотор МНСК7, промотор SPc5-12 или промотор СК8е.

Вариант осуществления В 19 представляет собой композицию по любому из пп. 10-16, содержащая вирусный вектор, где вирусный вектор содержит промотор U6, H1 или 7SK.

Вариант осуществления В 20 представляет собой композицию по любому из пп. 1-19, содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую SaCas9, где спейсерная последовательность выбрана из любой из SEQ ID NO: 12, 15, 16, 20, 27, 28, 32, 33 и 35.

Вариант осуществления В 21 представляет собой композицию по любому из пп. 1-20, содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую SaCas9, где SaCas9 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 711.

Вариант осуществления В 22 представляет собой композицию по любому из пп. 1-20, содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую SaCas9, где SaCas9 представляет собой вариант аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 711.

Вариант осуществления В 23 представляет собой композицию по любому из пп. 1-20, содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую SaCas9, где SaCas9 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 715-717.

Вариант осуществления В 24 представляет собой композицию по любому из пп. 1-19, содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую SluCas9, где спейсерная последовательность выбрана из любой из SEQ ID NO: 131, 134, 135, 136, 139, 144, 148, 149, 150, 151, 179, 184, 201, 210, 223, 224, 225.

Вариант осуществления В 25 представляет собой композицию по любому из пп. 1-19 или 24, содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую SluCas9, где SluCas9 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 712.

Вариант осуществления В 26 представляет собой композицию по любому из пп. 1-19, или 24, содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую SluCas9, где SluCas9 представляет собой вариант аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 712.

Вариант осуществления В 27 представляет собой композицию по любому из пп. 1-19 или 24, содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую SluCas9, где SluCas9 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 718-720.

Вариант осуществления В 28 представляет собой композицию по любому из пп. 1-27 и фармацевтически приемлемый эксципиент.

Вариант осуществления В 29 представляет собой композицию, содержащая направляющую РНК, содержащую любую из SEQ ID NO: 1-35, 1000-1078, или 3000-3069.

Вариант осуществления В 30 представляет собой композицию, содержащая направляющую РНК, содержащую любую из SEQ ID NO: 100-225, 2000-2116, или 4000-4251.

Вариант осуществления В 31 представляет собой композицию по любому из пп. 1-30 для применения при лечении мышечной дистрофии Дюшенна (DMD).

Вариант осуществления В 32 представляет собой композицию по любому из пп. 1-30 для применения для создания двухцепочечного разрыва в любом одном или более экзонах 43, 44, 45, 50, 51 или 53 гена дистрофина.

Вариант осуществления В 33 представляет собой способ лечения мышечной дистрофии Дюшенна (DMD), включающий доставку в клетку композиции по любому из пп. 1-30.

Вариант осуществления В 34 представляет собой способ лечения мышечной дистрофии Дюшенна (DMD), включающий доставку в клетку одиночной молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей:

i) нуклеиновую кислоту, кодирующую одну или более направляющих РНК, где одна или более направляющих РНК содержат:

а. спейсерную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-35, 1000-1078 или 3000-3069;

б. спейсерную последовательность, содержащую по меньшей мере 17, 18, 19, или 20 смежных нуклеотидов спейсерной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1-35,

1000-1078, или 3000-3069; или

с. спейсерную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с любой из SEQ ID NO: 1-35, 1000-1078, 3000-3069; и

ii) нуклеиновую кислоту, кодирующую Cas9 *Staphylococcus aureus* (SaCas9).

Вариант осуществления В 35 представляет собой способ лечения мышечной дистрофии Дюшенна (DMD), включающий доставку в клетку одиночной молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей:

i) молекулу нуклеиновую кислоту, кодирующую одну или более направляющих РНК, где одна или более направляющих РНК содержат:

а. спейсерную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 100-225, 2000-2116, или 4000-4251;

б. спейсерную последовательность, содержащую по меньшей мере 17, 18, 19, или 20 смежных нуклеотидов спейсерной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 100-225, 2000-2116, или 4000-4251; или

с. спейсерную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с любой из SEQ ID NO: 100-225, 2000-2116, или 4000-4251; и

ii) молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую *Staphylococcus lugdunensis* (SluCas9).

Вариант осуществления В 36 представляет собой способ лечения мышечной дистрофии Дюшенна (DMD), включающий доставку в клетку одиночной молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей:

i) нуклеиновую кислоту, кодирующую пару направляющих РНК, содержащую:

m. первую и вторую спейсерные последовательности, выбранные из любой из SEQ ID NO: 10 и 15; 10 и 16; 12 и 16; 1001 и 1005; 1001 и 15; 1001 и 16; 1003 и 1005; 16 и 1003; 12 и 1010; 12 и 1012; 12 и 1013; 10 и 1016; 1017 и 1005; 1017 и 16; 1018 и 16; 15 и 10; 16 и 10; 16 и 12; 1005 и 1001; 15 и 1001; 16 и 1001; 1005 и 1003; 1003 и 16; 1010 и 12; 1012 и 12; 1013 и 12; 1016 и 10; 1005 и 1017; 16 и 1017; и 16 и 1018;

n. первую и вторую спейсерные последовательности, содержащие по меньшей мере 17, 18, 19, 20 или 21 смежных нуклеотид любой из SEQ ID NO: 10 и 15; 10 и 16; 12 и 16; 1001 и 1005; 1001 и 15; 1001 и 16; 1003 и 1005; 16 и 1003; 12 и 1010; 12 и 1012; 12 и 1013; 10 и 1016; 1017 и 1005; 1017 и 16; 1018 и 16; 15 и 10; 16 и 10; 16 и 12; 1005 и 1001; 15 и 1001; 16 и 1001; 1005 и 1003; 1003 и 16; 1010 и 12; 1012 и 12; 1013 и 12; 1016 и 10; 1005 и 1017; 16 и 1017; и 16 и 1018; или

о. первую и вторую спейсерные последовательности, которые имеют по меньшей мере 90% идентичности с любой из SEQ ID NO: 10 и 15; 10 и 16; 12 и 16; 1001 и 1005; 1001 и 15; 1001 и 16; 1003 и 1005; 16 и 1003; 12 и 1010; 12 и 1012; 12 и 1013; 10 и 1016; 1017 и 1005; 1017 и 16; 1018 и 16; 15 и 10; 16 и 10; 16 и 12; 1005 и 1001; 15 и 1001; 16 и 1001; 1005 и 1003; 1003 и 16; 1010 и 12; 1012 и 12; 1013 и 12; 1016 и 10; 1005 и 1017; 16 и 1017; и 16 и 1018; и

ii) нуклеиновую кислоту, кодирующую Cas9 *Staphylococcus aureus* (SaCas9).

Вариант осуществления В 37 представляет собой способ лечения мышечной дистрофии Дюшенна (DMD), включающий доставку в клетку одиночной молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей:

i) нуклеиновую кислоту, кодирующую пару направляющих РНК, содержащую:

р. первую и вторую спейсерные последовательности, выбранные из любой из SEQ ID NO: 148 и 134; 149 и 135; 150 и 135; 131 и 136; 151 и 136; 139 и 131; 139 и 151; 140 и 131; 140 и 151; 141 и 148; 144 и 149; 144 и 150; 145 и 131; 145 и 151; и 146 и 148;

q. первую и вторую спейсерные последовательности, содержащие по меньшей мере 17, 18, 19, 20 или 21 смежных нуклеотидов любой из SEQ ID NO: 148 и 134; 149 и 135; 150 и 135; 131 и 136; 151 и 136; 139 и 131; 139 и 151; 140 и 131; 140 и 151; 141 и 148; 144 и 149; 144 и 150; 145 и 131; 145 и 151; 146 и 148; 134 и 148; 135 и 149; 135 и 150; 136 и 131; 136 и 151; 131 и 139; 151 и 139; 131 и 140; 151 и 140; 148 и 141; 149 и 144; 150 и 144; 131 и 145; 151 и 145; и 148 и 146; или

г. первую и вторую спейсерные последовательности, которые имеют по меньшей мере 90% идентичности с любой из SEQ ID NO: 148 и 134; 149 и 135; 150 и 135; 131 и 136; 151 и 136; 139 и 131; 139 и 151; 140 и 131; 140 и 151; 141 и 148; 144 и 149; 144 и 150; 145 и 131; 145 и 151; 146 и 148; 134 и 148; 135 и 149; 135 и 150; 136 и 131; 136 и 151; 131 и 139; 151 и 139; 131 и 140; 151 и 140; 148 и 141; 149 и 144; 150 и 144; 131 и 145; 151 и 145; и 148 и 146; и

ii) нуклеиновую кислоту, кодирующую *Staphylococcus lugdunensis* (SluCas9).

Вариант осуществления В 38 представляет собой способ по любому из пп. 34-37, где одиночную молекулу нуклеиновой кислоты доставляют в клетку с помощью одиночного вектора.

Вариант осуществления В 39 представляет собой способ по любому из пп. 34-38, включающий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую SaCas9, где спейсерная последовательность выбрана из любой из SEQ ID NO: 12, 15, 16, 20, 27, 28, 32, 33 и 35.

Вариант осуществления В 40 представляет собой способ по любому из пп. 34-39, включающий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую SaCas9, где SaCas9 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 711.

Вариант осуществления В 41 представляет собой способ по любому из пп. 34-39, включающий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую SaCas9, где SaCas9 представляет собой вариант аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 711.

Вариант осуществления В 42 представляет собой способ по любому из пп. 34-39, включающий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую SaCas9, где SaCas9 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 715-717.

Вариант осуществления В 43 представляет собой способ по любому из пп. 34-38, включающий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую SluCas9, где спейсерная последовательность выбрана из любой из SEQ ID NO: 131, 134, 135, 136, 139, 144, 148, 149, 150, 151, 179, 184, 201, 210, 223, 224, 225.

Вариант осуществления В 44 представляет собой способ по любому из пп. 34-38 или

43, включающий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую SluCas9, где SluCas9 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 712.

Вариант осуществления В 45 представляет собой способ по любому из пп. 34-38 или 43, включающий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую SluCas9, где SluCas9 представляет собой вариант аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 712.

Вариант осуществления В 46 представляет собой способ по любому из пп. 34-38, или 43, включающий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую SluCas9, где SluCas9 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 718-720.

Вариант осуществления В 47 представляет собой способ вырезания части экзона с преждевременным стоп-кодоном у субъекта с мышечной дистрофией Дюшенна (DMD), включающий доставку в клетку одиночной молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей:

i) нуклеиновую кислоту, кодирующую пару направляющих РНК, где первая направляющая РНК связывается с целевой последовательностью в пределах экзона, расположенного выше преждевременного стоп-кодона, и где вторая направляющая РНК связывается с последовательностью, расположенной ниже преждевременного стоп-кодона, и ниже последовательности, связанной первой направляющей РНК; и

ii) нуклеиновую кислоту, кодирующую Cas9 *Staphylococcus aureus* (SaCas9);
где пара направляющих РНК и SaCas9 вырезают часть экзона.

Вариант осуществления В 48 представляет собой способ вырезания части экзона с преждевременным стоп-кодоном у субъекта с мышечной дистрофией Дюшенна (DMD), включающий доставку в клетку одиночной молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей:

i) нуклеиновую кислоту, кодирующую пару направляющих РНК, где первая направляющая РНК связывается с целевой последовательностью в пределах экзона, расположенного выше преждевременного стоп-кодона, и где вторая направляющая РНК связывается с последовательностью, расположенной ниже преждевременного стоп-кодона, и ниже последовательности, связанной первой направляющей РНК; и

ii) нуклеиновую кислоту, кодирующую *Staphylococcus lugdunensis* (SluCas9);
где пара направляющих РНК и SaCas9 вырезают часть экзона.

Вариант осуществления В 49 представляет собой способ по любому из пп. 47-48, где одиночную молекулу нуклеиновой кислоты доставляют в клетку с помощью одиночного вектора.

Вариант осуществления В 50 представляет собой способ по любому из пп. 47-49, где части экзона, оставшиеся после вырезания, повторно соединяются с одонуклеотидной вставкой.

Вариант осуществления В 51 представляет собой способ по любому из пп. 47-49, где части экзона, оставшиеся после вырезания, повторно соединяются без нуклеотидной вставки.

Вариант осуществления В 52 представляет собой способ по п. 51, где вырезаемая часть экзона имеет размер 8-167 нуклеотидов.

Вариант осуществления В 53 представляет собой способ по любому из пп. 47-52, где экзон представляет собой экзон 45.

Вариант осуществления В 54 представляет собой способ по любому из пп. 47 и 49-53, где пара направляющих РНК содержит первую и вторую спейсерные последовательности, выбранные из любой из SEQ ID NO: 10 и 15; 10 и 16; 12 и 16; 1001 и 1005; 1001 и 15; 1001 и 16; 1003 и 1005; 16 и 1003; 12 и 1010; 12 и 1012; 12 и 1013; 10 и 1016; 1017 и 1005; 1017 и 16; 1018 и 16; 15 и 10; 16 и 10; 16 и 12; 1005 и 1001; 15 и 1001; 16 и 1001; 1005 и 1003; 1003 и 16; 1010 и 12; 1012 и 12; 1013 и 12; 1016 и 10; 1005 и 1017; 16 и 1017; и 16 и 1018.

Вариант осуществления В 55 представляет собой способ по любому из пп. 48-53, где пара направляющих РНК содержит первую и вторую спейсерные последовательности, выбранные из любой из SEQ ID NO: 148 и 134; 149 и 135; 150 и 135; 131 и 136; 151 и 136; 139 и 131; 139 и 151; 140 и 131; 140 и 151; 141 и 148; 144 и 149; 144 и 150; 145 и 131; 145 и 151; 146 и 148; 134 и 148; 135 и 149; 135 и 150; 136 и 131; 136 и 151; 131 и 139; 151 и 139; 131 и 140; 151 и 140; 148 и 141; 149 и 144; 150 и 144; 131 и 145; 151 и 145; и 148 и 146.

Вариант осуществления В 56 представляет собой способ по любому из пп. 34, 36, 38-39, 47 и 49-54, где SaCas9 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 715.

Вариант осуществления В 57 представляет собой композицию или способ по любому из предшествующих пунктов, где одиночная молекула нуклеиновой кислоты представляет собой вектор AAV, где вектор содержит от 5' до 3' по отношению к плюс-цепи: обратную комплементарную цепь первой каркасной последовательности онРНК, обратную комплементарную цепь нуклеиновой кислоты, кодирующей первую направляющую последовательность онРНК, обратную комплементарную цепь промотора для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей первую онРНК, промотор для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей SaCas9 (например, СК8е), нуклеиновую кислоту, кодирующую SaCas9, последовательность полиаденилирования, промотор для экспрессии второй онРНК в том же направлении, что и промотор для SaCas9, вторую направляющую последовательность онРНК и вторую каркасную последовательность онРНК.

Вариант осуществления В 58 представляет собой композицию или способ по п. 57, где промотор для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей первую направляющую последовательность онРНК, представляет собой промотор hU6.

Вариант осуществления В 59 представляет собой композицию или способ по любому из пп. 57-58, где промотор для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей вторую направляющую последовательность онРНК, представляет собой промотор hU6.

Вариант осуществления В 60 представляет собой композицию или способ по п. 57, где промотор для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей первую направляющую последовательность онРНК, представляет собой промотор 7SK.

Вариант осуществления В 61 представляет собой композицию или способ по любому из пп. 57-58 или 60, где промотор для экспрессии нуклеиновой кислоты,

кодирующей вторую направляющую последовательность онРНК, представляет собой промотор 7SK.

Вариант осуществления В 62 представляет собой композицию или способ по любому из пп. 57-58 или 60, где промотор для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей вторую направляющую последовательность онРНК, представляет собой промотор H1m.

Вариант осуществления В 63 представляет собой композицию или способ по любому из предшествующих пунктов, где последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая SaCas9 или SluCas9, слита с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей одну или более последовательностей ядерной локализации (NLS).

Вариант осуществления В 64 представляет собой композицию или способ по любому из предшествующих пунктов, где последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая SaCas9 или SluCas9, слита с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей последовательность ядерной локализации (NLS).

Вариант осуществления В 65 представляет собой композицию или способ по любому из предшествующих пунктов, где последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая SaCas9 или SluCas9, слита с двумя последовательностями нуклеиновой кислоты, каждая из которых кодирует последовательность ядерной локализации (NLS).

Вариант осуществления В 66 представляет собой композицию или способ по любому из предшествующих пунктов, где последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая SaCas9 или SluCas9, слита с тремя последовательностями нуклеиновой кислоты, кодирующими одну или более последовательностей ядерной локализации (NLS).

Вариант осуществления В 67 представляет собой композицию или способ по любому из пп. 64-66, где одну или более NLS представляют собой NLS SV40.

Вариант осуществления В 68 представляет собой композицию или способ по любому из пп. 64-66, где одна или более NLS представляют собой NLS с-Мус.

ПРИМЕРЫ

Следующие примеры представлены для иллюстрации некоторых описанных вариантов осуществления и не должны рассматриваться как ограничивающие каким-либо образом объем настоящего изобретения.

Пример 1: Иллюстративные онРНК DMD

Направляющую РНК, содержащую направляющие последовательности, приведенные в **таблице 1А** и **таблице 1В** ниже, получают в соответствии со стандартными методами в формате одиночной направляющей молекулы (онРНК). Получают один вектор AAV, который экспрессирует одну или более направляющих РНК и SaCas9 (для направляющих последовательностей, имеющих SEQ ID NO: 1-35 или SEQ ID NO: 3000-3069) или SluCas9 (для направляющих последовательностей, имеющих SEQ ID NO: 100-225 или SEQ ID NO: 4000-4251). См., **таблицу 1А** и **таблицу 1В**. Вектор AAV вводят в клетки *in vitro* и мышам (например, мышам *mdx*) *in vivo* для оценки способности AAV экспрессировать направляющую РНК и Cas9, редактировать целевой экзон (см. **таблицу 1А**

и таблицу 1В) и тем самым лечить DMD.

В частности, проверяется способность *in vivo* опосредованной одиночной AAV доставки компонентов для редактирования генов успешно удалять мутантную геномную последовательность путем пропуска экзона в клетках сердечной и скелетной мышц мышей *mdx*.

Таблица 1А: Примеры направляющих последовательностей DMD (human-hg38.p12)

Идентификационный номер последовательности направляющей последовательности	ЭКЗОН	CAS9	цепь	Направляющая последовательность	PAM
1	EXON43	SACAS9	+	GCAATGCTGCTGTCTTCTTGCT	ATGAAT
2	EXON43	SACAS9	-	AACAAAATGTACAAGGACCGAC	AAGGGT
3	EXON43	SACAS9	-	TGCAAAGTGCAACGCC TGTGGA	AAGGGT
4	EXON43	SACAS9	-	ATAGTCTACAACAAAGCTCAGG	TCGGAT
5	EXON43	SACAS9	-	CTGTTTTAAAAATTTTATATTA	CAGAAT
6	EXON44	SACAS9	+	ATTTAGCATGTTCCCAATTCTC	AGGAAT
7	EXON44	SACAS9	+	AATCGCCTGCAGGTAA AAGCAT	ATGGAT
8	EXON44	SACAS9	-	TCTCAGAAAGACACAAATTCCT	GAGAAT
9	EXON45	SACAS9	+	TCAGGCTTCCCAATTTTTCCTG	TAGAAT
10	EXON45	SACAS9	+	TAGAATACTGGCATCTGTTTTT	GAGGAT
11	EXON45	SACAS9	+	TGGCATCTGTTTTTTGAGGATTG	CTGAAT
12	EXON45	SACAS9	+	TTGCCGCTGCCCAATGCCATCC	TGGAGT
13	EXON45	SACAS9	-	GAGGTAGGGCGACAGATCTAAT	AGGAAT
14	EXON45	SACAS9	-	TCTACAGGAAAAATTGGGAAGC	CTGAAT
15	EXON45	SACAS9	-	GCGGCAAACTGTTGTCAGAACA	TTGAAT
16	EXON45	SACAS9	-	TTTTGGTATCTTACAGGAATC	CAGGAT
17	EXON50	SACAS9	-	ACTATTGGAGCCTGTAGTATA	CTGGAT
18	EXON50	SACAS9	-	AGGAAGTTAGAAGATCTGAGCT	CTGAGT

19	EXON51	SACAS9	+	TAGTAACCACAGGTTG TGTCAC	CAGAGT
20	EXON51	SACAS9	+	GTTGTGTCACCAGAGT AACAGT	CTGAGT
21	EXON51	SACAS9	+	TCTGAGTAGGAGCTAA AATATT	TTGGGT
22	EXON51	SACAS9	-	GAGGGTGATGGTGGGT GACCTT	GAGGAT
23	EXON51	SACAS9	-	TATAAAATCACAGAGG GTGATG	GTGGGT
24	EXON51	SACAS9	-	TTGATCAAGTTATAAA ATCACA	GAGGGT
25	EXON53	SACAS9	+	CCTTGGTTTCTGTGATT TTCTT	TTGGAT
26	EXON53	SACAS9	+	TCCTTAGCTTCCAGCC ATTGTG	TTGAAT
27	EXON53	SACAS9	+	CTTGTACTTCATCCCA CTGATT	CTGAAT
28	EXON53	SACAS9	+	ACTGATTCTGAATTCT TTCAAC	TAGAAT
29	EXON53	SACAS9	-	AGCCAAGCTTGAGTCA TGGAAG	GAGGGT
30	EXON53	SACAS9	-	TTAGGACAGGCCAGA GCCAAGC	TTGAGT
31	EXON53	SACAS9	-	GCAACAGTTGAATGAA ATGTTA	AAGGAT
32	EXON53	SACAS9	-	CCTTCAGAACCGGAGG CAACAG	TTGAAT
33	EXON53	SACAS9	-	AGTTGAAAGAATTCAG AATCAG	TGGGAT
34	EXON53	SACAS9	-	TTTTATTCTAGTTGAA AGAATT	CAGAAT
35	EXON53	SACAS9	-	TTTTTCCTTTTATTCTA GTTGA	AAGAAT
100	EXON43	SLUCAS9	+	ATATATGTGTTACCTA CCCTTG	TCGG
101	EXON43	SLUCAS9	+	ACATTTTGTTAACTTT TCCCA	TTGG
102	EXON43	SLUCAS9	+	CTTTTTCCCATTGGAA ATCAAG	CTGG
103	EXON43	SLUCAS9	+	TTTTTCCCATTGGAAA TCAAGC	TGGG
104	EXON43	SLUCAS9	+	TCCTGTAGCTTCACCC TTCCA	CAGG
105	EXON43	SLUCAS9	-	AATGTACAAGGACCG ACAAGGG	TAGG
106	EXON43	SLUCAS9	-	ACAAAATGTACAAGG ACCGACA	AGGG

107	EXON43	SLUCAS9	-	AACAAAATGTACAAG GACCGAC	AAGG
108	EXON43	SLUCAS9	-	GGAAAAAGTTAACAA AATGTAC	AAGG
109	EXON43	SLUCAS9	-	TCTCTCCCAGCTTGAT TTCCAA	TGGG
110	EXON43	SLUCAS9	-	CTCTCTCCCAGCTTGA TTTCCA	ATGG
111	EXON43	SLUCAS9	-	GCCTGTGGAAAGGGTG AAGCTA	CAGG
112	EXON43	SLUCAS9	-	GCAAAGTGCAACGCCT GTGGAA	AGGG
113	EXON43	SLUCAS9	-	TGCAAAGTGCAACGCC TGTGGA	AAGG
114	EXON43	SLUCAS9	-	AGCATTGCAAAGTGCA ACGCCT	GTGG
115	EXON43	SLUCAS9	-	ATAGTCTACAACAAAG CTCAGG	TCGG
116	EXON43	SLUCAS9	-	AAAGATAGTCTACAAC AAAGCT	CAGG
117	EXON44	SLUCAS9	+	TATTTAGCATGTTCCC AATTCT	CAGG
118	EXON44	SLUCAS9	+	AACAGATCTGTCAAAT CGCCTG	CAGG
119	EXON44	SLUCAS9	+	AATCGCCTGCAGGTAA AAGCAT	ATGG
120	EXON44	SLUCAS9	-	TGCTAAATACAAATGG TATCTT	AAGG
121	EXON44	SLUCAS9	-	ATTGGGAACATGCTAA ATACAA	ATGG
122	EXON44	SLUCAS9	-	AAAGACACAAATTCCT GAGAAT	TGGG
123	EXON44	SLUCAS9	-	GAAAGACACAAATTCC TGAGAA	TTGG
124	EXON44	SLUCAS9	-	ATGATATAAAGATATT TAATCA	GTGG
125	EXON44	SLUCAS9	-	TTGACAGATCTGTTGA GAAATG	GCGG
126	EXON44	SLUCAS9	-	GATTTGACAGATCTGT TGAGAA	ATGG
127	EXON44	SLUCAS9	-	TTGATCCATATGCTTTT ACCTG	CAGG
128	EXON45	SLUCAS9	+	AGACCTCCTGCCACCG CAGATT	CAGG
129	EXON45	SLUCAS9	+	TCCCAATTTTTCCTGTA GAATA	CTGG
130	EXON45	SLUCAS9	+	TAGAATACTGGCATCT GTTTTT	GAGG
131	EXON45	SLUCAS9	+	TTTGCCGCTGCCCAAT	CTGG

				GCCATC	
132	EXON45	SLUCAS9	+	GGAGTTCCTGTAAGAT ACCAAA	AAGG
133	EXON45	SLUCAS9	-	AGAGGTAGGGCGACA GATCTAA	TAGG
134	EXON45	SLUCAS9	-	CTGTCAGACAGAAAA AAGAGGT	AGGG
135	EXON45	SLUCAS9	-	GCTGTCAGACAGAAA AAAGAGG	TAGG
136	EXON45	SLUCAS9	-	AACAGCTGTCAGACAG AAAAAA	GAGG
137	EXON45	SLUCAS9	-	AAGCCTGAATCTGCGG TGGCAG	GAGG
138	EXON45	SLUCAS9	-	GGGAAGCCTGAATCTG CGGTGG	CAGG
139	EXON45	SLUCAS9	-	AATTGGGAAGCCTGAA TCTGCG	GTGG
140	EXON45	SLUCAS9	-	AAAAATTGGGAAGCCT GAATCT	GCGG
141	EXON45	SLUCAS9	-	GCCAGTATTCTACAGG AAAAAT	TGGG
142	EXON45	SLUCAS9	-	TGCCAGTATTCTACAG GAAAAA	TTGG
143	EXON45	SLUCAS9	-	AAAAACAGATGCCAG TATTCTA	CAGG
144	EXON45	SLUCAS9	-	TGTCAGAACATTGAAT GCAACT	GGGG
145	EXON45	SLUCAS9	-	TTGTCAGAACATTGAA TGCAAC	TGGG
146	EXON45	SLUCAS9	-	GTTGTCAGAACATTGA ATGCAA	CTGG
147	EXON45	SLUCAS9	-	AACTCCAGGATGGCAT TGGGCA	GCGG
148	EXON45	SLUCAS9	-	TACAGGAACTCCAGGA TGGCAT	TGGG
149	EXON45	SLUCAS9	-	TTACAGGAACTCCAGG ATGGCA	TTGG
150	EXON45	SLUCAS9	-	GGTATCTTACAGGAAC TCCAGG	ATGG
151	EXON45	SLUCAS9	-	TTTTGGTATCTTACAG GAACTC	CAGG
152	EXON45	SLUCAS9	-	GTTTTGCCTTTTGGTA TCTTA	CAGG
153	EXON45	SLUCAS9	-	TCTTTTCTCAAATAAA AAGACA	TGGG
154	EXON50	SLUCAS9	+	AGAATGGGATCCAGTA TACTTA	CAGG
155	EXON50	SLUCAS9	+	AGTATACTTACAGGCT CCAATA	GTGG

156	EXON50	SLUCAS9	+	CAGGCTCCAATAGTGG TCAGTC	CAGG
157	EXON50	SLUCAS9	+	CAATAGTGGTCAGTCC AGGAGC	TAGG
158	EXON50	SLUCAS9	+	GTGGTCAGTCCAGGAG CTAGGT	CAGG
159	EXON50	SLUCAS9	+	TTGCCCTCAGCTCTTG AAGTAA	ACGG
160	EXON50	SLUCAS9	-	AGTATACTGGATCCCA TTCTCT	TTGG
161	EXON50	SLUCAS9	-	ACTATTGGAGCCTGTA AGTATA	CTGG
162	EXON50	SLUCAS9	-	CTAGCTCCTGGACTGA CCACTA	TTGG
163	EXON50	SLUCAS9	-	GCAAAGCAGCCTGACC TAGCTC	CTGG
164	EXON50	SLUCAS9	-	AAACCGTTTACTTCAA GAGCTG	AGGG
165	EXON50	SLUCAS9	-	TAAACCGTTTACTTCA AGAGCT	GAGG
166	EXON50	SLUCAS9	-	AGATCTGAGCTCTGAG TGAAG	GCGG
167	EXON50	SLUCAS9	-	AGAAGATCTGAGCTCT GAGTGG	AAGG
168	EXON50	SLUCAS9	-	AGTTAGAAGATCTGAG CTCTGA	GTGG
169	EXON50	SLUCAS9	-	ATGTGTATGCTTTTCT GTAAA	GAGG
170	EXON51	SLUCAS9	+	TGATCATCTCGTTGAT ATCCTC	AAGG
171	EXON51	SLUCAS9	+	TTGATCAAGCAGAGAA AGCCAG	TCGG
172	EXON51	SLUCAS9	+	AGTCGGTAAGTTCTGT CCAAGC	CCGG
173	EXON51	SLUCAS9	+	GCCCGGTTGAAATCTG CCAGAG	CAGG
174	EXON51	SLUCAS9	+	CAGAGCAGGTACCTCC AACATC	AAGG
175	EXON51	SLUCAS9	+	GGTACCTCCAACATCA AGGAAG	ATGG
176	EXON51	SLUCAS9	+	CAAGGAAGATGGCATT TCTAGT	TTGG
177	EXON51	SLUCAS9	+	AGATGGCATTCTAGT TTGGAG	ATGG
178	EXON51	SLUCAS9	+	ATGGCAGTTTCCTTAG TAACCA	CAGG
179	EXON51	SLUCAS9	+	GTCACCAGAGTAACAG TCTGAG	TAGG
180	EXON51	SLUCAS9	+	TCTGAGTAGGAGCTAA	TTGG

				AATATT	
181	EXON51	SLUCAS9	+	CTGAGTAGGAGCTAAA ATATTT	TGGG
182	EXON51	SLUCAS9	+	AAATATTTTGGGTTTT TGCAA	AAGG
183	EXON51	SLUCAS9	-	GTATGAGAAAAAATG ATAAAAG	TTGG
184	EXON51	SLUCAS9	-	CAACGAGATGATCATC AAGCAG	AAGG
185	EXON51	SLUCAS9	-	GAGGGTGATGGTGGGT GACCTT	GAGG
186	EXON51	SLUCAS9	-	ATAAAATCACAGAGG GTGATGG	TGGG
187	EXON51	SLUCAS9	-	TATAAAATCACAGAGG GTGATG	GTGG
188	EXON51	SLUCAS9	-	AGTTATAAAATCACAG AGGGTG	ATGG
189	EXON51	SLUCAS9	-	TGATCAAGTTATAAAA TCACAG	AGGG
190	EXON51	SLUCAS9	-	TTGATCAAGTTATAAA ATCACA	GAGG
191	EXON51	SLUCAS9	-	GGGCTTGGACAGAACT TACCGA	CTGG
192	EXON51	SLUCAS9	-	CTCTGGCAGATTTCAA CCGGGC	TTGG
193	EXON51	SLUCAS9	-	ACCTGCTCTGGCAGAT TTCAAC	CGGG
194	EXON51	SLUCAS9	-	TACCTGCTCTGGCAGA TTTCAA	CCGG
195	EXON51	SLUCAS9	-	CTTGATGTTGGAGGTA CCTGCT	CTGG
196	EXON51	SLUCAS9	-	AATGCCATCTTCCTTG ATGTTG	GAGG
197	EXON51	SLUCAS9	-	AGAAATGCCATCTTCC TTGATG	TTGG
198	EXON51	SLUCAS9	-	GGTGACACAACCTGTG GTTACT	AAGG
199	EXON51	SLUCAS9	-	TGTTACTCTGGTGACA CAACCT	GTGG
200	EXON51	SLUCAS9	-	AGCTCCTACTCAGACT GTTACT	CTGG
201	EXON53	SLUCAS9	+	AAAGGTATCTTTGATA CTAACC	TTGG
202	EXON53	SLUCAS9	+	CCTTGGTTTCTGTGATT TTCTT	TTGG
203	EXON53	SLUCAS9	+	CTTTTGGATTGCATCT ACTGTA	TAGG
204	EXON53	SLUCAS9	+	TTTTGGATTGCATCTA CTGTAT	AGGG

205	EXON53	SLUCAS9	+	ACCCTCCTTCCATGAC TCAAGC	TTGG
206	EXON53	SLUCAS9	+	CTTCCATGACTCAAGC TTGGCT	CTGG
207	EXON53	SLUCAS9	+	ACATTTCAATTCAACTG TTGCCT	CCGG
208	EXON53	SLUCAS9	+	TCAACTGTTGCCTCCG GTTCTG	AAGG
209	EXON53	SLUCAS9	+	TGAATTCTTTCAACTA GAATAA	AAGG
210	EXON53	SLUCAS9	-	CCAAAAGAAAATCAC AGAAACC	AAGG
211	EXON53	SLUCAS9	-	GCCAAGCTTGAGTCAT GGAAGG	AGGG
212	EXON53	SLUCAS9	-	AGCCAAGCTTGAGTCA TGGAAG	GAGG
213	EXON53	SLUCAS9	-	CAGAGCCAAGCTTGAG TCATGG	AAGG
214	EXON53	SLUCAS9	-	AGGCCAGAGCCAAGC TTGAGTC	ATGG
215	EXON53	SLUCAS9	-	AGAAGCTGAGCAGGT CTTAGGA	CAGG
216	EXON53	SLUCAS9	-	AAGGAAGAAGCTGAG CAGGTCT	TAGG
217	EXON53	SLUCAS9	-	GGAAGCTAAGGAAGA AGCTGAG	CAGG
218	EXON53	SLUCAS9	-	TTCAACACAATGGCTG GAAGCT	AAGG
219	EXON53	SLUCAS9	-	GTAAAGGATTCAACA CAATGG	CTGG
220	EXON53	SLUCAS9	-	AAATGTTAAAGGATTC AACACA	ATGG
221	EXON53	SLUCAS9	-	GCAACAGTTGAATGAA ATGTTA	AAGG
222	EXON53	SLUCAS9	-	TACAAGAACACCTTCA GAACCG	GAGG
223	EXON53	SLUCAS9	-	AAGTACAAGAACACCT TCAGAA	CCGG
224	EXON53	SLUCAS9	-	AGTTGAAAGAATTCAG AATCAG	TGGG
225	EXON53	SLUCAS9	-	TAGTTGAAAGAATTCA GAATCA	GTGG

Таблица 1В: Иллюстративные направляющие последовательности DMD (20-нуклеотидные и 21-нуклеотидные)

Идентификационный номер последовательности направляющей	ЭКЗОН	CAS9	Цепь	Направляющая последовательность
--	-------	------	------	---------------------------------

последовательности				
3000	EXON43	SACAS9	+	AATGCTGCTGTCTTCTTGCT
3001	EXON43	SACAS9	+	CAATGCTGCTGTCTTCTTGCT
1	EXON43	SACAS9	+	GCAATGCTGCTGTCTTCTTGCT
3002	EXON43	SACAS9	-	AACAAAATGTACAAGGACCG
3003	EXON43	SACAS9	-	AACAAAATGTACAAGGACCGA
2	EXON43	SACAS9	-	AACAAAATGTACAAGGACCGAC
3004	EXON43	SACAS9	-	TGCAAAGTGCAACGCCTGTG
3005	EXON43	SACAS9	-	TGCAAAGTGCAACGCCTGTGG
3	EXON43	SACAS9	-	TGCAAAGTGCAACGCCTGTGGA
3006	EXON43	SACAS9	-	ATAGTCTACAACAAAGCTCA
3007	EXON43	SACAS9	-	ATAGTCTACAACAAAGCTCAG
4	EXON43	SACAS9	-	ATAGTCTACAACAAAGCTCAGG
3008	EXON43	SACAS9	-	CTGTTTTAAAATTTTTATAT
3009	EXON43	SACAS9	-	CTGTTTTAAAATTTTTATATT
5	EXON43	SACAS9	-	CTGTTTTAAAATTTTTATATTA
3010	EXON44	SACAS9	+	TTAGCATGTTCCCAATTCTC
3011	EXON44	SACAS9	+	TTAGCATGTTCCCAATTCTC
6	EXON44	SACAS9	+	ATTTAGCATGTTCCCAATTCTC
3012	EXON44	SACAS9	+	TCGCCTGCAGGTAAAAGCAT
3013	EXON44	SACAS9	+	ATCGCCTGCAGGTAAAAGCAT
7	EXON44	SACAS9	+	AATCGCCTGCAGGTAAAAGCAT
3014	EXON44	SACAS9	-	TCTCAGAAAGACACAAATTC
3015	EXON44	SACAS9	-	TCTCAGAAAGACACAAATTC
8	EXON44	SACAS9	-	TCTCAGAAAGACACAAATTCCT
3016	EXON45	SACAS9	+	AGGCTTCCCAATTTTTCTG
3017	EXON45	SACAS9	+	CAGGCTTCCCAATTTTTCTG
9	EXON45	SACAS9	+	TCAGGCTTCCCAATTTTTCTG
3018	EXON45	SACAS9	+	GAATACTGGCATCTGTTTTT
3019	EXON45	SACAS9	+	AGAATACTGGCATCTGTTTTT
10	EXON45	SACAS9	+	TAGAATACTGGCATCTGTTTTT
3020	EXON45	SACAS9	+	GCATCTGTTTTTGAGGATTG
3021	EXON45	SACAS9	+	GGCATCTGTTTTTGAGGATTG
11	EXON45	SACAS9	+	TGGCATCTGTTTTTGAGGATTG
3022	EXON45	SACAS9	+	GCCGCTGCCCAATGCCATCC
3023	EXON45	SACAS9	+	TGCCGCTGCCCAATGCCATCC
12	EXON45	SACAS9	+	TTGCCGCTGCCCAATGCCATCC
3024	EXON45	SACAS9	-	GAGGTAGGGCGACAGATCTA
3025	EXON45	SACAS9	-	GAGGTAGGGCGACAGATCTAA
13	EXON45	SACAS9	-	GAGGTAGGGCGACAGATCTAAT
3026	EXON45	SACAS9	-	TCTACAGGAAAAATTGGGAA
3027	EXON45	SACAS9	-	TCTACAGGAAAAATTGGGAAG
14	EXON45	SACAS9	-	TCTACAGGAAAAATTGGGAAGC
3028	EXON45	SACAS9	-	GCGGCAAACCTGTTGTCAGAA
3029	EXON45	SACAS9	-	GCGGCAAACCTGTTGTCAGAAC
15	EXON45	SACAS9	-	GCGGCAAACCTGTTGTCAGAACA

3030	EXON45	SACAS9	-	TTTTGGTATCTTACAGGAAC
3031	EXON45	SACAS9	-	TTTTGGTATCTTACAGGAACT
16	EXON45	SACAS9	-	TTTTGGTATCTTACAGGAACTC
3032	EXON50	SACAS9	-	ACTATTGGAGCCTGTAAGTA
3033	EXON50	SACAS9	-	ACTATTGGAGCCTGTAAGTAT
17	EXON50	SACAS9	-	ACTATTGGAGCCTGTAAGTATA
3034	EXON50	SACAS9	-	AGGAAGTTAGAAGATCTGAG
3035	EXON50	SACAS9	-	AGGAAGTTAGAAGATCTGAGC
18	EXON50	SACAS9	-	AGGAAGTTAGAAGATCTGAGCT
3036	EXON51	SACAS9	+	GTAACCACAGGTTGTGTCAC
3037	EXON51	SACAS9	+	AGTAACCACAGGTTGTGTCAC
19	EXON51	SACAS9	+	TAGTAACCACAGGTTGTGTCAC
3038	EXON51	SACAS9	+	TGTGTCACCAGAGTAACAGT
3039	EXON51	SACAS9	+	TTGTGTCACCAGAGTAACAGT
20	EXON51	SACAS9	+	GTTGTGTCACCAGAGTAACAGT
3040	EXON51	SACAS9	+	TGAGTAGGAGCTAAAATATT
3041	EXON51	SACAS9	+	CTGAGTAGGAGCTAAAATATT
21	EXON51	SACAS9	+	TCTGAGTAGGAGCTAAAATATT
3042	EXON51	SACAS9	-	GAGGGTGATGGTGGGTGACC
3043	EXON51	SACAS9	-	GAGGGTGATGGTGGGTGACCT
22	EXON51	SACAS9	-	GAGGGTGATGGTGGGTGACCTT
3044	EXON51	SACAS9	-	TATAAAATCACAGAGGGTGA
3045	EXON51	SACAS9	-	TATAAAATCACAGAGGGTGAT
23	EXON51	SACAS9	-	TATAAAATCACAGAGGGTGATG
3046	EXON51	SACAS9	-	TTGATCAAGTTATAAAATCA
3047	EXON51	SACAS9	-	TTGATCAAGTTATAAAATCAC
24	EXON51	SACAS9	-	TTGATCAAGTTATAAAATCACA
3048	EXON53	SACAS9	+	TTGGTTTCTGTGATTTTCTT
3049	EXON53	SACAS9	+	CTTGGTTTCTGTGATTTTCTT
25	EXON53	SACAS9	+	CCTTGGTTTCTGTGATTTTCTT
3050	EXON53	SACAS9	+	CTTAGCTTCCAGCCATTGTG
3051	EXON53	SACAS9	+	CCTTAGCTTCCAGCCATTGTG
26	EXON53	SACAS9	+	TCCTTAGCTTCCAGCCATTGTG
3052	EXON53	SACAS9	+	TGTACTTCATCCCAGTATT
3053	EXON53	SACAS9	+	TTGTACTTCATCCCAGTATT
27	EXON53	SACAS9	+	CTTGTACTTCATCCCAGTATT
3054	EXON53	SACAS9	+	TGATTCTGAATTCTTTCAAC
3055	EXON53	SACAS9	+	CTGATTCTGAATTCTTTCAAC
28	EXON53	SACAS9	+	ACTGATTCTGAATTCTTTCAAC
3056	EXON53	SACAS9	-	AGCCAAGCTTGAGTCATGGA
3057	EXON53	SACAS9	-	AGCCAAGCTTGAGTCATGGAA
29	EXON53	SACAS9	-	AGCCAAGCTTGAGTCATGGAAG
3058	EXON53	SACAS9	-	TTAGGACAGGCCAGAGCCAA
3059	EXON53	SACAS9	-	TTAGGACAGGCCAGAGCCAAG
30	EXON53	SACAS9	-	TTAGGACAGGCCAGAGCCAAGC
3060	EXON53	SACAS9	-	GCAACAGTTGAATGAAATGT

3061	EXON53	SACAS9	-	GCAACAGTTGAATGAAATGTT
31	EXON53	SACAS9	-	GCAACAGTTGAATGAAATGTTA
3062	EXON53	SACAS9	-	CCTTCAGAACCGGAGGCAAC
3063	EXON53	SACAS9	-	CCTTCAGAACCGGAGGCAACA
32	EXON53	SACAS9	-	CCTTCAGAACCGGAGGCAACAG
3064	EXON53	SACAS9	-	AGTTGAAAGAATTCAGAATC
3065	EXON53	SACAS9	-	AGTTGAAAGAATTCAGAATCA
33	EXON53	SACAS9	-	AGTTGAAAGAATTCAGAATCAG
3066	EXON53	SACAS9	-	TTTTATTCTAGTTGAAAGAA
3067	EXON53	SACAS9	-	TTTTATTCTAGTTGAAAGAAT
34	EXON53	SACAS9	-	TTTTATTCTAGTTGAAAGAATT
3068	EXON53	SACAS9	-	TTTTTCCTTTTATTCTAGTT
3069	EXON53	SACAS9	-	TTTTTCCTTTTATTCTAGTTG
35	EXON53	SACAS9	-	TTTTTCCTTTTATTCTAGTTGA
4000	EXON43	SLUCAS9	+	ATATGTGTTACCTACCCTTG
4001	EXON43	SLUCAS9	+	TATATGTGTTACCTACCCTTG
100	EXON43	SLUCAS9	+	ATATATGTGTTACCTACCCTTG
4002	EXON43	SLUCAS9	+	ATTTTGTTAACTTTTTCCCA
4003	EXON43	SLUCAS9	+	CATTTTGTTAACTTTTTCCCA
101	EXON43	SLUCAS9	+	ACATTTTGTTAACTTTTTCCCA
4004	EXON43	SLUCAS9	+	TTTTCCCATTGGAAATCAAG
4005	EXON43	SLUCAS9	+	TTTTTCCCATTGGAAATCAAG
102	EXON43	SLUCAS9	+	CTTTTTCCCATTGGAAATCAAG
4006	EXON43	SLUCAS9	+	TTTCCCATTGGAAATCAAGC
4007	EXON43	SLUCAS9	+	TTTTCCCATTGGAAATCAAGC
103	EXON43	SLUCAS9	+	TTTTTCCCATTGGAAATCAAGC
4008	EXON43	SLUCAS9	+	CTGTAGCTTCACCCTTTCCA
4009	EXON43	SLUCAS9	+	CCTGTAGCTTCACCCTTTCCA
104	EXON43	SLUCAS9	+	TCCTGTAGCTTCACCCTTTCCA
4010	EXON43	SLUCAS9	-	AATGTACAAGGACCGACAAG
4011	EXON43	SLUCAS9	-	AATGTACAAGGACCGACAAGG
105	EXON43	SLUCAS9	-	AATGTACAAGGACCGACAAGGG
4012	EXON43	SLUCAS9	-	ACAAAATGTACAAGGACCGA
4013	EXON43	SLUCAS9	-	ACAAAATGTACAAGGACCGAC
106	EXON43	SLUCAS9	-	ACAAAATGTACAAGGACCGACA
4014	EXON43	SLUCAS9	-	AACAAAATGTACAAGGACCG
4015	EXON43	SLUCAS9	-	AACAAAATGTACAAGGACCGA
107	EXON43	SLUCAS9	-	AACAAAATGTACAAGGACCGAC
4016	EXON43	SLUCAS9	-	GGAAAAAGTTAACAAAATGT
4017	EXON43	SLUCAS9	-	GGAAAAAGTTAACAAAATGTGA
108	EXON43	SLUCAS9	-	GGAAAAAGTTAACAAAATGTAC
4018	EXON43	SLUCAS9	-	TCTCTCCCAGCTTGATTTC
4019	EXON43	SLUCAS9	-	TCTCTCCCAGCTTGATTTC
109	EXON43	SLUCAS9	-	TCTCTCCCAGCTTGATTTC
4020	EXON43	SLUCAS9	-	CTCTCTCCCAGCTTGATTTC
4021	EXON43	SLUCAS9	-	CTCTCTCCCAGCTTGATTTC

110	EXON43	SLUCAS9	-	CTCTCTCCCAGCTTGATTTCCA
4022	EXON43	SLUCAS9	-	GCCTGTGGAAAGGGTGAAGC
4023	EXON43	SLUCAS9	-	GCCTGTGGAAAGGGTGAAGCT
111	EXON43	SLUCAS9	-	GCCTGTGGAAAGGGTGAAGCTA
4024	EXON43	SLUCAS9	-	GCAAAGTGCAACGCCTGTGG
4025	EXON43	SLUCAS9	-	GCAAAGTGCAACGCCTGTGGA
112	EXON43	SLUCAS9	-	GCAAAGTGCAACGCCTGTGGAA
4026	EXON43	SLUCAS9	-	TGCAAAGTGCAACGCCTGTG
4027	EXON43	SLUCAS9	-	TGCAAAGTGCAACGCCTGTGG
113	EXON43	SLUCAS9	-	TGCAAAGTGCAACGCCTGTGGA
4028	EXON43	SLUCAS9	-	AGCATTGCAAAGTGCAACGC
4029	EXON43	SLUCAS9	-	AGCATTGCAAAGTGCAACGCC
114	EXON43	SLUCAS9	-	AGCATTGCAAAGTGCAACGCCT
4030	EXON43	SLUCAS9	-	ATAGTCTACAACAAAGCTCA
4031	EXON43	SLUCAS9	-	ATAGTCTACAACAAAGCTCAG
115	EXON43	SLUCAS9	-	ATAGTCTACAACAAAGCTCAGG
4032	EXON43	SLUCAS9	-	AAAGATAGTCTACAACAAAG
4033	EXON43	SLUCAS9	-	AAAGATAGTCTACAACAAAGC
116	EXON43	SLUCAS9	-	AAAGATAGTCTACAACAAAGCT
4034	EXON44	SLUCAS9	+	TTTAGCATGTTCCCAATTCT
4035	EXON44	SLUCAS9	+	ATTTAGCATGTTCCCAATTCT
117	EXON44	SLUCAS9	+	TATTTAGCATGTTCCCAATTCT
4036	EXON44	SLUCAS9	+	CAGATCTGTCAAATCGCCTG
4037	EXON44	SLUCAS9	+	ACAGATCTGTCAAATCGCCTG
118	EXON44	SLUCAS9	+	AACAGATCTGTCAAATCGCCTG
4038	EXON44	SLUCAS9	+	TCGCCTGCAGGTAAAAGCAT
4039	EXON44	SLUCAS9	+	ATCGCCTGCAGGTAAAAGCAT
119	EXON44	SLUCAS9	+	AATCGCCTGCAGGTAAAAGCAT
4040	EXON44	SLUCAS9	-	TGCTAAATACAAATGGTATC
4041	EXON44	SLUCAS9	-	TGCTAAATACAAATGGTATCT
120	EXON44	SLUCAS9	-	TGCTAAATACAAATGGTATCTT
4042	EXON44	SLUCAS9	-	ATTGGAACATGCTAAATAC
4043	EXON44	SLUCAS9	-	ATTGGAACATGCTAAATACA
121	EXON44	SLUCAS9	-	ATTGGAACATGCTAAATACAA
4044	EXON44	SLUCAS9	-	AAAGACACAAATTCCTGAGA
4045	EXON44	SLUCAS9	-	AAAGACACAAATTCCTGAGAA
122	EXON44	SLUCAS9	-	AAAGACACAAATTCCTGAGAAT
4046	EXON44	SLUCAS9	-	GAAAGACACAAATTCCTGAG
4047	EXON44	SLUCAS9	-	GAAAGACACAAATTCCTGAGA
123	EXON44	SLUCAS9	-	GAAAGACACAAATTCCTGAGAA
4048	EXON44	SLUCAS9	-	ATGATATAAAGATATTTAAT
4049	EXON44	SLUCAS9	-	ATGATATAAAGATATTTAATC
124	EXON44	SLUCAS9	-	ATGATATAAAGATATTTAATCA
4050	EXON44	SLUCAS9	-	TTGACAGATCTGTTGAGAAA
4051	EXON44	SLUCAS9	-	TTGACAGATCTGTTGAGAAAT
125	EXON44	SLUCAS9	-	TTGACAGATCTGTTGAGAAATG

4052	EXON44	SLUCAS9	-	GATTTGACAGATCTGTTGAG
4053	EXON44	SLUCAS9	-	GATTTGACAGATCTGTTGAGA
126	EXON44	SLUCAS9	-	GATTTGACAGATCTGTTGAGAA
4054	EXON44	SLUCAS9	-	TTGATCCATATGCTTTTACC
4055	EXON44	SLUCAS9	-	TTGATCCATATGCTTTTACCT
127	EXON44	SLUCAS9	-	TTGATCCATATGCTTTTACCTG
4056	EXON45	SLUCAS9	+	ACCTCCTGCCACCGCAGATT
4057	EXON45	SLUCAS9	+	GACCTCCTGCCACCGCAGATT
128	EXON45	SLUCAS9	+	AGACCTCCTGCCACCGCAGATT
4058	EXON45	SLUCAS9	+	CCAATTTTTCTGTAGAATA
4059	EXON45	SLUCAS9	+	CCCAATTTTTCTGTAGAATA
129	EXON45	SLUCAS9	+	TCCAATTTTTCTGTAGAATA
4060	EXON45	SLUCAS9	+	GAATACTGGCATCTGTTTTT
4061	EXON45	SLUCAS9	+	AGAATACTGGCATCTGTTTTT
130	EXON45	SLUCAS9	+	TAGAATACTGGCATCTGTTTTT
4062	EXON45	SLUCAS9	+	TGCCGCTGCCCAATGCCATC
4063	EXON45	SLUCAS9	+	TTGCCGCTGCCCAATGCCATC
131	EXON45	SLUCAS9	+	TTTGCCGCTGCCCAATGCCATC
4064	EXON45	SLUCAS9	+	AGTTCCTGTAAGATACCAAA
4065	EXON45	SLUCAS9	+	GAGTTCCTGTAAGATACCAAA
132	EXON45	SLUCAS9	+	GGAGTTCCTGTAAGATACCAAA
4066	EXON45	SLUCAS9	-	AGAGGTAGGGCGACAGATCT
4067	EXON45	SLUCAS9	-	AGAGGTAGGGCGACAGATCTA
133	EXON45	SLUCAS9	-	AGAGGTAGGGCGACAGATCTAA
4068	EXON45	SLUCAS9	-	CTGTCAGACAGAAAAAAGAG
4069	EXON45	SLUCAS9	-	CTGTCAGACAGAAAAAAGAGG
134	EXON45	SLUCAS9	-	CTGTCAGACAGAAAAAAGAGGT
4070	EXON45	SLUCAS9	-	GCTGTCAGACAGAAAAAAGA
4071	EXON45	SLUCAS9	-	GCTGTCAGACAGAAAAAAGAG
135	EXON45	SLUCAS9	-	GCTGTCAGACAGAAAAAAGAGG
4072	EXON45	SLUCAS9	-	AACAGCTGTCAGACAGAAAA
4073	EXON45	SLUCAS9	-	AACAGCTGTCAGACAGAAAA
136	EXON45	SLUCAS9	-	AACAGCTGTCAGACAGAAAA
4074	EXON45	SLUCAS9	-	AAGCCTGAATCTGCGGTGGC
4075	EXON45	SLUCAS9	-	AAGCCTGAATCTGCGGTGGCA
137	EXON45	SLUCAS9	-	AAGCCTGAATCTGCGGTGGCAG
4076	EXON45	SLUCAS9	-	GGGAAGCCTGAATCTGCGGT
4077	EXON45	SLUCAS9	-	GGGAAGCCTGAATCTGCGGTG
138	EXON45	SLUCAS9	-	GGGAAGCCTGAATCTGCGGTGG
4078	EXON45	SLUCAS9	-	AATTGGGAAGCCTGAATCTG
4079	EXON45	SLUCAS9	-	AATTGGGAAGCCTGAATCTGC
139	EXON45	SLUCAS9	-	AATTGGGAAGCCTGAATCTGCG
4080	EXON45	SLUCAS9	-	AAAAATTGGGAAGCCTGAAT
4081	EXON45	SLUCAS9	-	AAAAATTGGGAAGCCTGAATC
140	EXON45	SLUCAS9	-	AAAAATTGGGAAGCCTGAATCT
4082	EXON45	SLUCAS9	-	GCCAGTATTCTACAGGAAAA

4083	EXON45	SLUCAS9	-	GCCAGTATTCTACAGGAAAAA
141	EXON45	SLUCAS9	-	GCCAGTATTCTACAGGAAAAAT
4084	EXON45	SLUCAS9	-	TGCCAGTATTCTACAGGAAA
4085	EXON45	SLUCAS9	-	TGCCAGTATTCTACAGGAAAA
142	EXON45	SLUCAS9	-	TGCCAGTATTCTACAGGAAAAA
4086	EXON45	SLUCAS9	-	AAAAACAGATGCCAGTATTC
4087	EXON45	SLUCAS9	-	AAAAACAGATGCCAGTATTCT
143	EXON45	SLUCAS9	-	AAAAACAGATGCCAGTATTCTA
4088	EXON45	SLUCAS9	-	TGTCAGAACATTGAATGCAA
4089	EXON45	SLUCAS9	-	TGTCAGAACATTGAATGCAAC
144	EXON45	SLUCAS9	-	TGTCAGAACATTGAATGCAACT
4090	EXON45	SLUCAS9	-	TTGTCAGAACATTGAATGCA
4091	EXON45	SLUCAS9	-	TTGTCAGAACATTGAATGCAA
145	EXON45	SLUCAS9	-	TTGTCAGAACATTGAATGCAAC
4092	EXON45	SLUCAS9	-	GTTGTCAGAACATTGAATGC
4093	EXON45	SLUCAS9	-	GTTGTCAGAACATTGAATGCA
146	EXON45	SLUCAS9	-	GTTGTCAGAACATTGAATGCAA
4094	EXON45	SLUCAS9	-	AACTCCAGGATGGCATTGGG
4095	EXON45	SLUCAS9	-	AACTCCAGGATGGCATTGGGC
147	EXON45	SLUCAS9	-	AACTCCAGGATGGCATTGGGCA
4096	EXON45	SLUCAS9	-	TACAGGAACTCCAGGATGGC
4097	EXON45	SLUCAS9	-	TACAGGAACTCCAGGATGGCA
148	EXON45	SLUCAS9	-	TACAGGAACTCCAGGATGGCAT
4098	EXON45	SLUCAS9	-	TTACAGGAACTCCAGGATGG
4099	EXON45	SLUCAS9	-	TTACAGGAACTCCAGGATGGC
149	EXON45	SLUCAS9	-	TTACAGGAACTCCAGGATGGCA
4100	EXON45	SLUCAS9	-	GGTATCTTACAGGAACTCCA
4101	EXON45	SLUCAS9	-	GGTATCTTACAGGAACTCCAG
150	EXON45	SLUCAS9	-	GGTATCTTACAGGAACTCCAGG
4102	EXON45	SLUCAS9	-	TTTTGGTATCTTACAGGAAC
4103	EXON45	SLUCAS9	-	TTTTGGTATCTTACAGGAACT
151	EXON45	SLUCAS9	-	TTTTGGTATCTTACAGGAACTC
4104	EXON45	SLUCAS9	-	GTTTTGCCTTTTTGGTATCT
4105	EXON45	SLUCAS9	-	GTTTTGCCTTTTTGGTATCTT
152	EXON45	SLUCAS9	-	GTTTTGCCTTTTTGGTATCTTA
4106	EXON45	SLUCAS9	-	TCTTTTCTCAAATAAAAAGA
4107	EXON45	SLUCAS9	-	TCTTTTCTCAAATAAAAAGAC
153	EXON45	SLUCAS9	-	TCTTTTCTCAAATAAAAAGACA
4108	EXON50	SLUCAS9	+	AATGGGATCCAGTATACTTA
4109	EXON50	SLUCAS9	+	GAATGGGATCCAGTATACTTA
154	EXON50	SLUCAS9	+	AGAATGGGATCCAGTATACTTA
4110	EXON50	SLUCAS9	+	TATACTTACAGGCTCCAATA
4111	EXON50	SLUCAS9	+	GTATACTTACAGGCTCCAATA
155	EXON50	SLUCAS9	+	AGTATACTTACAGGCTCCAATA
4112	EXON50	SLUCAS9	+	GGCTCCAATAGTGGTCAGTC
4113	EXON50	SLUCAS9	+	AGGCTCCAATAGTGGTCAGTC

156	EXON50	SLUCAS9	+	CAGGCTCCAATAGTGGTCAGTC
4114	EXON50	SLUCAS9	+	ATAGTGGTCAGTCCAGGAGC
4115	EXON50	SLUCAS9	+	AATAGTGGTCAGTCCAGGAGC
157	EXON50	SLUCAS9	+	CAATAGTGGTCAGTCCAGGAGC
4116	EXON50	SLUCAS9	+	GGTCAGTCCAGGAGCTAGGT
4117	EXON50	SLUCAS9	+	TGGTCAGTCCAGGAGCTAGGT
158	EXON50	SLUCAS9	+	GTGGTCAGTCCAGGAGCTAGGT
4118	EXON50	SLUCAS9	+	GCCCTCAGCTCTTGAAGTAA
4119	EXON50	SLUCAS9	+	TGCCCTCAGCTCTTGAAGTAA
159	EXON50	SLUCAS9	+	TTGCCCTCAGCTCTTGAAGTAA
4120	EXON50	SLUCAS9	-	AGTATACTGGATCCCATTCT
4121	EXON50	SLUCAS9	-	AGTATACTGGATCCCATTCTC
160	EXON50	SLUCAS9	-	AGTATACTGGATCCCATTCTCT
4122	EXON50	SLUCAS9	-	ACTATTGGAGCCTGTAAGTA
4123	EXON50	SLUCAS9	-	ACTATTGGAGCCTGTAAGTAT
161	EXON50	SLUCAS9	-	ACTATTGGAGCCTGTAAGTATA
4124	EXON50	SLUCAS9	-	CTAGCTCCTGGACTGACCAC
4125	EXON50	SLUCAS9	-	CTAGCTCCTGGACTGACCACT
162	EXON50	SLUCAS9	-	CTAGCTCCTGGACTGACCACTA
4126	EXON50	SLUCAS9	-	GCAAAGCAGCCTGACCTAGC
4127	EXON50	SLUCAS9	-	GCAAAGCAGCCTGACCTAGCT
163	EXON50	SLUCAS9	-	GCAAAGCAGCCTGACCTAGCTC
4128	EXON50	SLUCAS9	-	AAACCGTTTACTTCAAGAGC
4129	EXON50	SLUCAS9	-	AAACCGTTTACTTCAAGAGCT
164	EXON50	SLUCAS9	-	AAACCGTTTACTTCAAGAGCTG
4130	EXON50	SLUCAS9	-	TAAACCGTTTACTTCAAGAG
4131	EXON50	SLUCAS9	-	TAAACCGTTTACTTCAAGAGC
165	EXON50	SLUCAS9	-	TAAACCGTTTACTTCAAGAGCT
4132	EXON50	SLUCAS9	-	AGATCTGAGCTCTGAGTGGA
4133	EXON50	SLUCAS9	-	AGATCTGAGCTCTGAGTGGA
166	EXON50	SLUCAS9	-	AGATCTGAGCTCTGAGTGGAAG
4134	EXON50	SLUCAS9	-	AGAAGATCTGAGCTCTGAGT
4135	EXON50	SLUCAS9	-	AGAAGATCTGAGCTCTGAGTG
167	EXON50	SLUCAS9	-	AGAAGATCTGAGCTCTGAGTGG
4135	EXON50	SLUCAS9	-	AGTTAGAAGATCTGAGCTCT
4137	EXON50	SLUCAS9	-	AGTTAGAAGATCTGAGCTCTG
168	EXON50	SLUCAS9	-	AGTTAGAAGATCTGAGCTCTGA
4138	EXON50	SLUCAS9	-	ATGTGTATGCTTTTCTGTTA
4139	EXON50	SLUCAS9	-	ATGTGTATGCTTTTCTGTTAA
169	EXON50	SLUCAS9	-	ATGTGTATGCTTTTCTGTTAAA
4140	EXON51	SLUCAS9	+	ATCATCTCGTTGATATCCTC
4141	EXON51	SLUCAS9	+	GATCATCTCGTTGATATCCTC
170	EXON51	SLUCAS9	+	TGATCATCTCGTTGATATCCTC
4142	EXON51	SLUCAS9	+	GATCAAGCAGAGAAAGCCAG
4143	EXON51	SLUCAS9	+	TGATCAAGCAGAGAAAGCCAG
171	EXON51	SLUCAS9	+	TTGATCAAGCAGAGAAAGCCAG

4144	EXON51	SLUCAS9	+	TCGGTAAGTTCTGTCCAAGC
4145	EXON51	SLUCAS9	+	GTCGGTAAGTTCTGTCCAAGC
172	EXON51	SLUCAS9	+	AGTCGGTAAGTTCTGTCCAAGC
4146	EXON51	SLUCAS9	+	CCGGTTGAAATCTGCCAGAG
4147	EXON51	SLUCAS9	+	CCCGGTTGAAATCTGCCAGAG
173	EXON51	SLUCAS9	+	GCCCGGTTGAAATCTGCCAGAG
4148	EXON51	SLUCAS9	+	GAGCAGGTACCTCCAACATC
4149	EXON51	SLUCAS9	+	AGAGCAGGTACCTCCAACATC
174	EXON51	SLUCAS9	+	CAGAGCAGGTACCTCCAACATC
4150	EXON51	SLUCAS9	+	TACCTCCAACATCAAGGAAG
4151	EXON51	SLUCAS9	+	GTACCTCCAACATCAAGGAAG
175	EXON51	SLUCAS9	+	GGTACCTCCAACATCAAGGAAG
4152	EXON51	SLUCAS9	+	AGGAAGATGGCATTCTAGT
4153	EXON51	SLUCAS9	+	AAGGAAGATGGCATTCTAGT
176	EXON51	SLUCAS9	+	CAAGGAAGATGGCATTCTAGT
4154	EXON51	SLUCAS9	+	ATGGCATTCTAGTTTGGAG
4155	EXON51	SLUCAS9	+	GATGGCATTCTAGTTTGGAG
177	EXON51	SLUCAS9	+	AGATGGCATTCTAGTTTGGAG
4156	EXON51	SLUCAS9	+	GGCAGTTTCCTTAGTAACCA
4157	EXON51	SLUCAS9	+	TGGCAGTTTCCTTAGTAACCA
178	EXON51	SLUCAS9	+	ATGGCAGTTTCCTTAGTAACCA
4158	EXON51	SLUCAS9	+	CACCAGAGTAACAGTCTGAG
4159	EXON51	SLUCAS9	+	TCACCAGAGTAACAGTCTGAG
179	EXON51	SLUCAS9	+	GTCACCAGAGTAACAGTCTGAG
4160	EXON51	SLUCAS9	+	TGAGTAGGAGCTAAAATATT
4161	EXON51	SLUCAS9	+	CTGAGTAGGAGCTAAAATATT
180	EXON51	SLUCAS9	+	TCTGAGTAGGAGCTAAAATATT
4162	EXON51	SLUCAS9	+	GAGTAGGAGCTAAAATATTT
4163	EXON51	SLUCAS9	+	TGAGTAGGAGCTAAAATATTT
181	EXON51	SLUCAS9	+	CTGAGTAGGAGCTAAAATATTT
4164	EXON51	SLUCAS9	+	ATATTTTGGGTTTTTGCAA
4165	EXON51	SLUCAS9	+	AATATTTTGGGTTTTTGCAA
182	EXON51	SLUCAS9	+	AAATATTTTGGGTTTTTGCAA
4166	EXON51	SLUCAS9	-	GTATGAGAAAAAATGATAAA
4167	EXON51	SLUCAS9	-	GTATGAGAAAAAATGATAAAA
183	EXON51	SLUCAS9	-	GTATGAGAAAAAATGATAAAAG
4168	EXON51	SLUCAS9	-	CAACGAGATGATCATCAAGC
4169	EXON51	SLUCAS9	-	CAACGAGATGATCATCAAGCA
184	EXON51	SLUCAS9	-	CAACGAGATGATCATCAAGCAG
4170	EXON51	SLUCAS9	-	GAGGGTGATGGTGGGTGACC
4171	EXON51	SLUCAS9	-	GAGGGTGATGGTGGGTGACCT
185	EXON51	SLUCAS9	-	GAGGGTGATGGTGGGTGACCTT
4172	EXON51	SLUCAS9	-	ATAAAATCACAGAGGGTGAT
4173	EXON51	SLUCAS9	-	ATAAAATCACAGAGGGTGATG
186	EXON51	SLUCAS9	-	ATAAAATCACAGAGGGTGATGG
4174	EXON51	SLUCAS9	-	TATAAAATCACAGAGGGTGA

4175	EXON51	SLUCAS9	-	TATAAAATCACAGAGGGTGAT
187	EXON51	SLUCAS9	-	TATAAAATCACAGAGGGTGATG
4176	EXON51	SLUCAS9	-	AGTTATAAAATCACAGAGGG
4177	EXON51	SLUCAS9	-	AGTTATAAAATCACAGAGGGT
188	EXON51	SLUCAS9	-	AGTTATAAAATCACAGAGGGTG
4178	EXON51	SLUCAS9	-	TGATCAAGTTATAAAATCAC
4179	EXON51	SLUCAS9	-	TGATCAAGTTATAAAATCACA
189	EXON51	SLUCAS9	-	TGATCAAGTTATAAAATCACAG
4180	EXON51	SLUCAS9	-	TTGATCAAGTTATAAAATCA
4181	EXON51	SLUCAS9	-	TTGATCAAGTTATAAAATCAC
190	EXON51	SLUCAS9	-	TTGATCAAGTTATAAAATCACA
4182	EXON51	SLUCAS9	-	GGGCTTGGACAGAACTTACC
4183	EXON51	SLUCAS9	-	GGGCTTGGACAGAACTTACCG
191	EXON51	SLUCAS9	-	GGGCTTGGACAGAACTTACCGA
4184	EXON51	SLUCAS9	-	CTCTGGCAGATTTCAACCGG
4185	EXON51	SLUCAS9	-	CTCTGGCAGATTTCAACCGGG
192	EXON51	SLUCAS9	-	CTCTGGCAGATTTCAACCGGGC
4186	EXON51	SLUCAS9	-	ACCTGCTCTGGCAGATTTCA
4187	EXON51	SLUCAS9	-	ACCTGCTCTGGCAGATTTCAA
193	EXON51	SLUCAS9	-	ACCTGCTCTGGCAGATTTCAAC
4188	EXON51	SLUCAS9	-	TACCTGCTCTGGCAGATTTCT
4189	EXON51	SLUCAS9	-	TACCTGCTCTGGCAGATTTCA
194	EXON51	SLUCAS9	-	TACCTGCTCTGGCAGATTTCAA
4190	EXON51	SLUCAS9	-	CTTGATGTTGGAGGTACCTG
4191	EXON51	SLUCAS9	-	CTTGATGTTGGAGGTACCTGC
195	EXON51	SLUCAS9	-	CTTGATGTTGGAGGTACCTGCT
4192	EXON51	SLUCAS9	-	AATGCCATCTTCCTTGATGT
4193	EXON51	SLUCAS9	-	AATGCCATCTTCCTTGATGTT
196	EXON51	SLUCAS9	-	AATGCCATCTTCCTTGATGTTG
4194	EXON51	SLUCAS9	-	AGAAATGCCATCTTCCTTGA
4195	EXON51	SLUCAS9	-	AGAAATGCCATCTTCCTTGAT
197	EXON51	SLUCAS9	-	AGAAATGCCATCTTCCTTGATG
4196	EXON51	SLUCAS9	-	GGTGACACAACCTGTGGTTA
4197	EXON51	SLUCAS9	-	GGTGACACAACCTGTGGTTAC
198	EXON51	SLUCAS9	-	GGTGACACAACCTGTGGTTACT
4198	EXON51	SLUCAS9	-	TGTTACTCTGGTGACACAAC
4199	EXON51	SLUCAS9	-	TGTTACTCTGGTGACACAACC
199	EXON51	SLUCAS9	-	TGTTACTCTGGTGACACAACCT
4200	EXON51	SLUCAS9	-	AGCTCCTACTCAGACTGTTA
4201	EXON51	SLUCAS9	-	AGCTCCTACTCAGACTGTTAC
200	EXON51	SLUCAS9	-	AGCTCCTACTCAGACTGTTACT
4202	EXON53	SLUCAS9	+	AGGTATCTTTGATACTAACC
4203	EXON53	SLUCAS9	+	AAGGTATCTTTGATACTAACC
201	EXON53	SLUCAS9	+	AAAGGTATCTTTGATACTAACC
4204	EXON53	SLUCAS9	+	TTGGTTTCTGTGATTTTCTT
4205	EXON53	SLUCAS9	+	CTTGGTTTCTGTGATTTTCTT

202	EXON53	SLUCAS9	+	CCTTGGTTTCTGTGATTTTCTT
4206	EXON53	SLUCAS9	+	TTTGGATTGCATCTACTGTA
4207	EXON53	SLUCAS9	+	TTTTGGATTGCATCTACTGTA
203	EXON53	SLUCAS9	+	CTTTTGGATTGCATCTACTGTA
4208	EXON53	SLUCAS9	+	TTGGATTGCATCTACTGTAT
4209	EXON53	SLUCAS9	+	TTTGGATTGCATCTACTGTAT
204	EXON53	SLUCAS9	+	TTTTGGATTGCATCTACTGTAT
4210	EXON53	SLUCAS9	+	CCTCCTTCCATGACTCAAGC
4211	EXON53	SLUCAS9	+	CCCTCCTTCCATGACTCAAGC
205	EXON53	SLUCAS9	+	ACCCTCCTTCCATGACTCAAGC
4212	EXON53	SLUCAS9	+	TCCATGACTCAAGCTTGGCT
4213	EXON53	SLUCAS9	+	TTCCATGACTCAAGCTTGGCT
206	EXON53	SLUCAS9	+	CTTCCATGACTCAAGCTTGGCT
4214	EXON53	SLUCAS9	+	ATTTCAATTCAACTGTTGCCT
4215	EXON53	SLUCAS9	+	CATTTCAATTCAACTGTTGCCT
207	EXON53	SLUCAS9	+	ACATTTCAATTCAACTGTTGCCT
4216	EXON53	SLUCAS9	+	AACTGTTGCCTCCGGTTCTG
4217	EXON53	SLUCAS9	+	CAACTGTTGCCTCCGGTTCTG
208	EXON53	SLUCAS9	+	TCAACTGTTGCCTCCGGTTCTG
4218	EXON53	SLUCAS9	+	AATTCTTTCAACTAGAATAA
4219	EXON53	SLUCAS9	+	GAATTCTTTCAACTAGAATAA
209	EXON53	SLUCAS9	+	TGAATTCTTTCAACTAGAATAA
4220	EXON53	SLUCAS9	-	CCAAAAGAAAATCACAGAAA
4221	EXON53	SLUCAS9	-	CCAAAAGAAAATCACAGAAAC
210	EXON53	SLUCAS9	-	CCAAAAGAAAATCACAGAAACC
4222	EXON53	SLUCAS9	-	GCCAAGCTTGAGTCATGGAA
4223	EXON53	SLUCAS9	-	GCCAAGCTTGAGTCATGGAAG
211	EXON53	SLUCAS9	-	GCCAAGCTTGAGTCATGGAAGG
4224	EXON53	SLUCAS9	-	AGCCAAGCTTGAGTCATGGA
4225	EXON53	SLUCAS9	-	AGCCAAGCTTGAGTCATGGAA
212	EXON53	SLUCAS9	-	AGCCAAGCTTGAGTCATGGAAG
4226	EXON53	SLUCAS9	-	CAGAGCCAAGCTTGAGTCAT
4227	EXON53	SLUCAS9	-	CAGAGCCAAGCTTGAGTCATG
213	EXON53	SLUCAS9	-	CAGAGCCAAGCTTGAGTCATGG
4228	EXON53	SLUCAS9	-	AGGCCAGAGCCAAGCTTGAG
4229	EXON53	SLUCAS9	-	AGGCCAGAGCCAAGCTTGAGT
214	EXON53	SLUCAS9	-	AGGCCAGAGCCAAGCTTGAGTC
4230	EXON53	SLUCAS9	-	AGAAGCTGAGCAGGTCTTAG
4231	EXON53	SLUCAS9	-	AGAAGCTGAGCAGGTCTTAGG
215	EXON53	SLUCAS9	-	AGAAGCTGAGCAGGTCTTAGGA
4232	EXON53	SLUCAS9	-	AAGGAAGAAGCTGAGCAGGT
4233	EXON53	SLUCAS9	-	AAGGAAGAAGCTGAGCAGGTC
216	EXON53	SLUCAS9	-	AAGGAAGAAGCTGAGCAGGTCT
4234	EXON53	SLUCAS9	-	GGAAGCTAAGGAAGAAGCTG
4235	EXON53	SLUCAS9	-	GGAAGCTAAGGAAGAAGCTGA
217	EXON53	SLUCAS9	-	GGAAGCTAAGGAAGAAGCTGAG

4236	EXON53	SLUCAS9	-	TTCAACACAATGGCTGGAAG
4237	EXON53	SLUCAS9	-	TTCAACACAATGGCTGGAAGC
218	EXON53	SLUCAS9	-	TTCAACACAATGGCTGGAAGCT
4238	EXON53	SLUCAS9	-	GTAAAGGATTCAACACAAT
4239	EXON53	SLUCAS9	-	GTAAAGGATTCAACACAATG
219	EXON53	SLUCAS9	-	GTAAAGGATTCAACACAATGG
4240	EXON53	SLUCAS9	-	AAATGTTAAAGGATTCAACA
4241	EXON53	SLUCAS9	-	AAATGTTAAAGGATTCAACAC
220	EXON53	SLUCAS9	-	AAATGTTAAAGGATTCAACACA
4242	EXON53	SLUCAS9	-	GCAACAGTTGAATGAAATGT
4243	EXON53	SLUCAS9	-	GCAACAGTTGAATGAAATGTT
221	EXON53	SLUCAS9	-	GCAACAGTTGAATGAAATGTTA
4244	EXON53	SLUCAS9	-	TACAAGAACACCTTCAGAAC
4245	EXON53	SLUCAS9	-	TACAAGAACACCTTCAGAAC
222	EXON53	SLUCAS9	-	TACAAGAACACCTTCAGAACCG
4246	EXON53	SLUCAS9	-	AAGTACAAGAACACCTTCAG
4247	EXON53	SLUCAS9	-	AAGTACAAGAACACCTTCAGA
223	EXON53	SLUCAS9	-	AAGTACAAGAACACCTTCAGAA
4248	EXON53	SLUCAS9	-	AGTTGAAAGAATTCAGAATC
4249	EXON53	SLUCAS9	-	AGTTGAAAGAATTCAGAATCA
224	EXON53	SLUCAS9	-	AGTTGAAAGAATTCAGAATCAG
4250	EXON53	SLUCAS9	-	TAGTTGAAAGAATTCAGAAT
4251	EXON53	SLUCAS9	-	TAGTTGAAAGAATTCAGAATC
225	EXON53	SLUCAS9	-	TAGTTGAAAGAATTCAGAATCA

Пример 2: Оценка онРНК DMD

А. Материалы и методы

1. Селекция онРНК

Подмножество онРНК, нацеленных на ген *DMD*, было выбрано для оценки частоты и профиля инделей. Выбранные онРНК показаны в **таблице 2** и были получены в соответствии со стандартными методами. Критерии, использованные для выбора этих онРНК, включали их способность индуцировать изменение рамки считывания и/или пропуск экзона, в дополнение к существованию гомологичного аналога из мыши, собаки и примата, отличного от человека (NHP). Эта селекция включала 13 онРНК, расположенных в экзоне 45, три онРНК, расположенных в экзоне 51, и десять онРНК, расположенных в экзоне 53. Количество спрогнозированных нецелевых сайтов определяли для каждой онРНК.

Таблица 2. Иллюстративные онРНК

Экзон	Cas9	Тип направляющей молекулы	Цепь	Идентификатор человеческой направляющей молекулы	SEQ ID NO человеческой направляющей молекулы	Человеческая направляющая последовательность	PAM человека	Идентификатор мышинной направляющей молекулы	SEQ ID NO мышинной направляющей молекулы	Мышинная направляющая молекула	PAM мыши	Несовпадения
EXON45	SluCas9	Изменение рамки считывания	–	E45SL4	131	TTTGCCGCTGCCCAATGCCATC	CTGG	mE45SL4	300	cTTGcCGCTGCCAATGCCATC	CTGG	2
EXON45	SluCas9	Сплайсинг	-	E45SL7	134	CTGTCAGACAGAA AAAAGAGGT	AGGG	mE45SL7	301	CTGgCAGAAAGgAgAAAGAGGT	AGGG	4
EXON45	SluCas9	Сплайсинг	-	E45SL8	135	GCTGTGTCAGACAGAAAAAGAGG	TAGG	mE45SL8	302	GCTGgCAGAAAGgAgAAAGAGG	TAGG	4
EXON45	SluCas9	Сплайсинг	-	E45SL9	136	AACAGCTGTGTCAGACAGAAAAAA	GAGG	mE45SL9	303	AAgAGCTGgCAGAAAGgAgAA	GAGG	5
EXON45	SluCas9	Альтернативное изменение рамки считывания	-	E45SL12	139	AATTGGGAAGCCTGAATCTGCG	GTGG	mE45SL12	304	AATTaGGAAGCTTGAgTCTGCG	GTGG	3
EXON45	SluCas9	Альтернативное изменение рамки считывания	-	E45SL17	144	TGTCAGAACATTGAATGCAACT	GGGG	mE45SL17	305	TGTCAGAAcTGAATGCAACT	GGGG	1
EXON45	SluCas9	Изменение рамки считывания	-	E45SL21	148	TACAGGAACTCCAGGATGGCAT	TGGG	mE45SL21	306	TACAGGAACTCCAGGATGGCAT	TGGG	0
EXON45	SluCas9	Изменение рамки считывания	-	E45SL22	149	TTACAGGAACTCCAGGATGGCA	TTGG	mE45SL22	307	TTACAGGAATCCAGGATGGCA	TTGG	0
EXON45	SluCas9	Изменение рамки считывания; сплайсинг	-	E45SL23	150	GGTATCTTACAGGAACCTCCAGG	ATGG	mE45SL23	308	GaTggCTTACAGGAACTCCAGG	ATGG	3
EXON45	SluCas9	Изменение рамки считывания; сплайсинг	-	E45SL24	151	TTTTGGTATCTTACAGGAACTC	CAGG	mE45SL24	309	TTcTGaTggCTTACAGGAACTC	CAGG	4

EXON51	SluCas9	Изменение рамки считывания	—	E51SL10	179	GTCACCAGAGTAA CAGTCTGAG	TAGG	mE51SL10	310	Н/Д	Н/Д	Н/Д
EXON51	SluCas9	Сплайсинг	-	E51SL15	184	CAACGAGATGATC ATCAAGCAG	AAGG	mE51SL15	311	CAATGAaATGA TCATCAaCA G	AAGG	3
EXON53	SluCas9	Сплайсинг	—	E53SL1	201	AAAGGTATCTTTG ATACTAACC	TTGG	mE53SL1	312	AAAGaTATgcT TGAcACTAAC C	TTGG	4
EXON53	SluCas9	Сплайсинг	-	E53SL10	210	CCAAAAGAAAATC ACAGAAACC	AAGG	mE53SL10	313	CCAAAAGAAg ATCACAGAAA CC	AAGG	1
EXON53	SluCas9	Изменение рамки считывания	-	E53SL23	223	AAGTACAAGAACA CCTTCAGAA	CCGG	mE53SL23	314	AgGTCAAGAA CAgCTgCAGA A	CAGG	4
EXON53	SluCas9	Изменение рамки считывания	-	E53SL24	224	AGTTGAAAGAATT CAGAATCAG	TGGG	mE53SL24	315	AGTTGAAAGA ATTGAGATCA G	TGGG	1
EXON53	SluCas9	Изменение рамки считывания	-	E53SL25	225	TAGTTGAAAGAAT TCAGAATCA	GTGG	mE53SL25	316	cAGTTGAAAG AATTGAGATC A	GTGG	2
EXON45	SaCas9	Изменение рамки считывания	—	E45Sa4	12	TTGCCGCTGCCCAA TGCCATCC	TGGAGT	mE45Sa4	317	TTGaCGCTGCC CAATGCCATC C	TGGAG T	1
EXON45	SaCas9	Изменение рамки считывания	-	E45Sa7	15	GCGGCAACTGTT GTCAGAACA	TTGAAT	mE45Sa7	318	GCGcCAAgCTG TTGTcAGAAC A	CTGAA T	2
EXON45	SaCas9	Изменение рамки считывания; сплайсинг	-	E45Sa8	16	TTTTGGTATCTTAC AGGAACTC	CAGGAT	mE45Sa8	319	TTcTGaTggCTT ACAGGAACTC	CAGGA T	4
EXON51	SaCas9	Изменение рамки считывания	—	E51Sa2	20	GTTGTGTCACCAG AGTAACAGT	CTGAGT	mE51Sa2	320	Н/Д	Н/Д	Н/Д
EXON53	SaCas9	Изменение рамки считывания	—	E53Sa3	27	CTTGTACTTCATCC CACTGATT	CTGAAT	mE53Sa3	321	CTTGaAcTCA TCCCCACTGAaT	CTGAA T	3
EXON53	SaCas9	Изменение рамки	—	E53Sa4	28	ACTGATTCTGAATT CTTTCAAC	TAGAAT	mE53Sa4	322	ACTGAaTCTG AATTCTTTCA AC	TGGAA T	1

		считывания; сплайсинг										
EXON53	SaCas9	Изменение рамки считывания	-	E53Sa8	32	CCTTCAGAACCGG AGGCAACAG	TTGAAT	mE53Sa8	323	gCTgCAGAACa GGAGaCAACA G	TTGAA T	4
EXON53	SaCas9	Изменение рамки считывания	-	E53Sa9	33	AGTTGAAAGAATT CAGAATCAG	TGGGAT	mE53Sa9	324	AGTTGAAAGA ATTCAGATCA G	TGGGA T	1
EXON53	SaCas9	Изменение рамки считывания; сплайсинг	-	E53Sa11	35	TTTTTCCTTTTATTC TAGTTGA	AAGAAT	mE53Sa11	325	TTcTTatTTTta TTCcAGTTGA	AAGAA T	4
EXON45	SpCas9	Изменение рамки считывания	-	E45Sp52	400	ATCTTACAGGAAC TCCAGGA	TGG	mE45Sp52	403	ggCTTACAGGA ACTCCAGGA	TGG	2
EXON51	SpCas9	Изменение рамки считывания	-	E51Sp32	401	CACCAGAGTAACA GTCTGAG	TAG	mE51Sp32	404	CACtAGAGTA ACAGTCTGAc	TGG	2
EXON53	SpCas9	Изменение рамки считывания	-	E53Sp63	402	TTGAAAGAATTCA GAATCAG	TGG	mE53Sp63	405	TTGAAAGAAT TCAGATCAG	TGG	1

2. Трансфекция клеток HEK293FT и Neuro-2a

Для оценки частоты и профиля инделей использовали линии клеток HEK293FT человека и Neuro-2a мыши. Клетки HEK293FT и Neuro-2a трансфицировали в 12-луночные планшеты 750 нг плазмиды+2,25 мкл липофектамина 2000. Через три дня после трансфекции клетки обрабатывали трипсином и сортировали по зеленому флуоресцентному белку (GFP). GFP-положительные клетки сортировали непосредственно в буфере для лизиса, и экстракцию ДНК проводили с использованием набора для очистки геномной ДНК GeneJet. Затем на ДНК проводили ПЦР с использованием экзон-специфических праймеров, нацеленных на соответствующий сайт рестрикции.

3. Глубокое секвенирование ампликонов, подготовка библиотеки и анализ данных

Соответствующие локусы для каждого экзона амплифицировали с помощью ПЦР, и продукты использовали для приготовления библиотек секвенирования с использованием набора реагентов MiSeq V3. Анализ инделей был выполнен с использованием ± 10 -нт окна количественного определения CRISPResso2. (См., например, Clement et al., Nat Biotechnol. 2019 Mar; 37(3):224-226). Профилирование инделей состояло из 5 взаимоисключающих категорий инделей, изображенных на **Фиг. 2** и представленных ниже:

- a) NE: неотредактированный;
- b) RF.+1: 1-нуклеотидная (нт) вставка, ведущая к изменению рамки считывания;
- c) Другие RF: инделы, отличные от 1-нт вставки, приводящие к изменению рамки считывания:
 - Делеция: не выходит за пределы окна изменения рамки считывания
 - Вставка: < 17 -нт (т.е. < 6 аминокислот);
- d) Пропуск экзона: инделы, которые нарушают ± 6 -нт окно границ экзона/интрона, что приводит к потенциальному пропуску экзона (результат требует подтверждения):
 - Индел имеет $> = 9$ -нт перекрытие с окном сплайсинга (для нарушения сайтов сплайсинга GT/AG); или
- 3) OE: Другие инделы.

Следующие последовательности выбранных праймеров использовали для амплификации специфического локуса человека, содержащего сайты нацеливания онРНК (таблицы 3А-3В), и специфического локуса мыши, содержащего сайты нацеливания онРНК (таблицы 4А-4В).

Таблица 3А. Праймеры для амплификации (человек)

Целевой экзон	Праймер, ID	Последовательность
45	hE45-T7E1-F2	GTCTTTCTGTCTTGTATCCTTTGG (SEQ ID NO: 800)
	hE45-T7E1-R2	AATGTTAGTGCCTTTCACCC (SEQ ID NO: 801)
51	Ex51_MiSeq_R	CATGAATAAGAGTTTGGCTCAAATTG (SEQ ID NO: 802)
	Ex51_MiSeq_F	GAGAGTAAAGTGATTGGTGGAAAATC (SEQ ID NO: 803)
53	hEX53_F1	AAATGTGAGATAACGTTTGGGAAG (SEQ ID NO: 804)

	hEX53_R1	TTTCAGCTTTAACGTGATTTTCTG (SEQ ID NO: 805)
--	----------	---

Таблица 3В. Праймер+адаптерная последовательность MiSeq (человек)

Экзон	ID	Последовательность
45	MiSeq_hE4 5-T7E1-F2	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGTCTTTCT GTCTTGTATCCTTTGG (SEQ ID NO: 806)
	MiSeq_hE4 5-T7E1-R2	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGAATGTT AGTGCCTTTCACCC (SEQ ID NO: 807)
51	MiSeq_Ex5 1_MiSeq_R	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCATGAAT AAGAGTTTGGCTCAAATTG (SEQ ID NO: 808)
	MiSeq_Ex5 1_MiSeq_F	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGAGAGT AAAGTGATTGGTGGAAAATC (SEQ ID NO: 809)
53	MiSeq_hEX 53_F1	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGAAATGTG AGATAACGTTTGGGAAG (SEQ ID NO: 810)
	MiSeq_hEX 53_R1	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTTTCAG CTTTAACGTGATTTTCTG (SEQ ID NO: 811)

Таблица 4А. Праймеры для амплификации (мышь)

Целевой экзон	Праймер, ID	Последовательность
45	mEx45_F3	TTTTCAGTGTAAGTGCACATAAGAG (SEQ ID NO: 812)
	mEx45_R3	GCAAAAGTTGTCAATTGTTGCT (SEQ ID NO: 813)
51	mEx51_F3	AAAATTGGCTCTTTTGCTTG (SEQ ID NO: 814)
	mEx51_R3	CACAGAGAAAAGGTAGCCTAAAAA (SEQ ID NO: 815)
53	mEx53_F3	GCACCTTGGATATATTTAATGAGAA (SEQ ID NO: 816)
	mEx53_R3	CAAGAATTCCACTTTTCACTTCC (SEQ ID NO: 817)

Таблица 4В. Праймер+адаптерная последовательность MiSeq (мышь)

Экзон	ID	Последовательность
45	mEx45_F3	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTTTTTCAGT GTAAGTGCACATAAGAG (SEQ ID NO: 818)
	mEx45_R3	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGCAAAA GTTGTCAATTGTTGCT (SEQ ID NO: 819)
51	mEx51_F3	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGAAAATTG GCTCTTTTGCTTG (SEQ ID NO: 820)
	mEx51_R3	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCACAGA GAAAAGGTAGCCTAAAAA (SEQ ID NO: 821)
53	mEx53_F3	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGCACCTT

		GGATATATTTAATGAGAA (SEQ ID NO: 822)
	mEx53_R3	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCAAGAA TTCCAATTTTCACTTCC (SEQ ID NO: 823)

В. Результаты

Набор иллюстративных онРНК DMD оценивали на частоту делеций и профиль редактирования либо с SaCas9, либо с SluCas9 (как указано в **таблице 2**). Среди этой выборки 13 онРНК были расположены в экзоне 45, 3 онРНК были расположены в экзоне 51 и 10 онРНК были расположены в экзоне 53. Для оценки частоты и профиля инделей трансфекцию плазмидами проводили на линиях клеток HEK293FT и Neuro-2a.

Средняя частота инделей онРНК, нацеленных на экзон 45, была определена в клетках HEK293FT (**Фиг. 3А**) и в клетках Neuro-2a (**Фиг. 3В**) с высокоэффективной онРНК SpCas9 (E45Sp52), включенной в качестве эталона. Из оцененных онРНК, нацеленных на экзон 45, 11 онРНК показали среднюю общую частоту инделей выше 50% в клетках HEK293FT, и аналогичный результат был обнаружен для 10 онРНК, протестированных на линии клеток Neuro-2a. Что касается профиля инделей, было обнаружено, что E45Sa4 и E45SL24 имеют самый высокий процент комбинированных инделей, которые могут привести к потенциальному изменению рамки считывания/пропуску экзонов в клетках HEK293FT. В клетках Neuro-2a mE45Sa4 и mE45SL23 показали самый высокий ранг в отношении этих потенциальных результатов. онРНК E45SL17 и E45SL12 не применимы к мутации Δ44.

Средняя частота инделей онРНК, нацеленных на экзон 51, была определена в клетках HEK293FT (**Фиг. 4А**) и в клетках Neuro-2a (**Фиг. 4В**) с высокоэффективной онРНК SpCas9 (E51Sp32), включенной в качестве эталона. На **Фиг. 4А** показана частота инделей выше 50% и комбинированный профиль инделей, который может привести к потенциальному изменению рамки считывания/пропуску выше 25% для E51Sa2 и E51SL10 в клетках HEK293FT. Из-за пониженного уровня гомологии последовательностей этих онРНК в мышинном локусе эти онРНК не могли быть оценены в линии клеток Neuro-2a (например, онРНК E51Sa2 и E51SL10 не имеют мышинного гомолога и см. **Фиг. 4В**).

Средняя частота инделей онРНК, нацеленных на экзон 53, была определена в клетках HEK293FT (**Фиг. 5А**) и в клетках Neuro-2a (**Фиг. 5В**) с высокоэффективной онРНК SpCas9 (E53Sp63), включенной в качестве эталона. На **Фиг. 5А** показана частота инделей выше 50% для 4 онРНК в экзоне 53 в клетках HEK293FT, а на **Фиг. 5В** показан сопоставимый результат для 2 онРНК в клетках Neuro-2a. Из оцененных онРНК, нацеленных на экзон 53, E53Sa3 и mE53SL23 демонстрируют самый высокий процент комбинированных инделей с потенциалом для изменения рамки считывания/пропуска в обеих линиях клеток.

Пример 3: Иллюстративные направляющие РНК DMD для вариантов SaCas9 и SluCas9

Были разработаны дополнительные иллюстративные направляющие РНК DMD,

которые можно использовать с SaCas9 и вариантами SaCas9 (например, направляющие последовательности, имеющие SEQ ID NO: 1000-1078) и SluCas9 и вариантами SluCas9 (например, направляющие последовательности, имеющие SEQ ID NO: 2000-2116) в **таблице 5** ниже. В частности, направляющие РНК были сконструированы на основе SaCas9-ККН (для направляющих последовательностей, имеющих SEQ ID NO: 1000-1078) с последовательностью PAM NNNRRT (N представляет собой любой нуклеотид, R представляет собой пурин) и SluCas9-КН (для направляющих последовательностей, имеющих SEQ ID NO: 2000-2116) с последовательностью PAM NNRG.

Направляющие РНК были разработаны с ориентацией на геномные координатные области в экзонах 45, 51 и 53. Для экзона 45 конструируемая область имела геномные координаты chrX: 31968307-31968546. Для экзона 51 конструируемая область имела геномные координаты chrX: 31773928-31774224. Для экзона 53 конструируемая область имела геномные координаты chrX: 31679343-31679618.

Предсказание нецелевого сайта было выполнено с помощью вычислений для двух наборов несовпадений: (1) 3 несовпадения+ 0 выступов; и (2) 2 несовпадения+1 выступ. Результаты представлены в **таблице 5**.

Направляющую РНК, содержащую направляющие последовательности, приведенные в **таблице 5** ниже, получают в соответствии со стандартными методами в формате одиночной направляющей молекулы (онРНК). Получают один вектор AAV, который экспрессирует направляющую РНК и вариант SaCas9 (для направляющих последовательностей, имеющих SEQ ID NO: 1000-1078) или направляющую РНК и вариант SluCas9 (для направляющих последовательностей, имеющих SEQ ID NO: 2000-2116). См., **таблицу 5**. Вектор AAV вводят в клетки *in vitro* и мышам (например, мышам *mdx*) *in vivo* для оценки способности AAV экспрессировать направляющую РНК и Cas9, редактировать целевой экзон (см. **таблицу 5**) и тем самым лечить DMD.

В частности, проверяется способность *in vivo* опосредованной одиночной AAV доставки компонентов для редактирования генов успешно удалять мутантную геномную последовательность путем пропуска экзона в клетках сердечной и скелетной мышц мышей *mdx*.

Таблица 5: Дополнительные направляющие последовательности DMD (human-hg38.p12)

ЭКЗОН	CAS9	ID	Геномные координаты chrX_старт	Геномные координаты chrX_стоп (включают координаты PAM)	Цепь	SEQ ID NO направляющей последовательности	Направляющая последовательность	PAM	Нецелевые_сгруппированные
45	SACAS9KKH	E45SaCas9KKH1	31968339	31968387	+	1000	TGTTTGACAGCCTCCTGCCACC	GCAGAT	20
45	SACAS9KKH	E45SaCas9KKH2	31968373	31968401	+	1001	CTGCCACCGCAGATTCAGGCTT	CCCAAT	9
45	SACAS9KKH	E45SaCas9KKH3	31968387	31968415	+	9	TCAGGCTTCCCAATTTTTCCTG	TAGAAT	37
45	SACAS9KKH	E45SaCas9KKH4	31968409	31968437	+	10	TAGAATACTGGCATCTGTTTTT	GAGGAT	63
45	SACAS9KKH	E45SaCas9KKH5	31968417	31968445	+	11	TGGCATCTGTTTTTGAGGATTG	CTGAAT	35
45	SACAS9KKH	E45SaCas9KKH6	31968432	31968460	+	1002	AGGATTGCTGAATTATTCTTC	CCCAGT	42
45	SACAS9KKH	E45SaCas9KKH7	31968442	31968470	+	1003	AATTATTTCTTCCCCAGTTGCA	TTCAAT	68
45	SACAS9KKH	E45SaCas9KKH8	31968456	31968484	+	1004	CAGTTGCATTCAATGTTCTGAC	AACAGT	17
45	SACAS9KKH	E45SaCas9KKH9	31968471	31968499	+	1005	TTCTGACAACAGTTTGCCGCTG	CCCAAT	6
45	SACAS9KKH	E45SaCas9KKH10	31968484	31968512	+	12	TTGCCGCTGCCCAATGCCATCC	TGGAGT	5
45	SACAS9KKH	E45SaCas9KKH11	31968495	31968523	+	1006	CAATGCCATCCTGGAGTTCCTG	TAAGAT	27
45	SACAS9KKH	E45SaCas9KKH12	31968517	31968545	+	1007	TAAGATACCAAAAAGGCAAAAC	AAAAAT	96
45	SACAS9KKH	E45SaCas9KKH13	31968313	31968341	-	13	GAGGTAGGGCGACAGATCTAAT	AGGAAT	10
45	SACAS9KKH	E45SaCas9KKH14	31968319	31968347	-	1008	AAAAAAGAGGTAGGGCGACAGA	TCTAAT	75
45	SACAS9KKH	E45SaCas9KKH15	31968324	31968352	-	1009	GACAGAAAAAAGAGGTAGGGCG	ACAGAT	51
45	SACAS9KKH	E45SaCas9KKH16	31968336	31968364	-	1010	AAACAGCTGTCAGACAGAAAAA	AGAGGT	123
45	SACAS9KKH	E45SaCas9KKH17	31968368	31968396	-	1011	GAAGCCTGAATCTGCGGTGGCA	GGAGGT	19
45	SACAS9KKH	E45SaCas9KKH18	31968378	31968406	-	1012	GAAAAATTGGGAAGCCTGAATC	TGCGGT	29
45	SACAS9KKH	E45SaCas9KKH19	31968385	31968413	-	14	TCTACAGGAAAAATTGGGAAGC	CTGAAT	64
45	SACAS9KKH	E45SaCas9KKH20	31968399	31968427	-	1013	ACAGATGCCAGTATTCTACAGG	AAAAAT	22
45	SACAS9KKH	E45SaCas9KKH21	31968415	31968443	-	1014	TCAGCAATCCTCAAAAACAGAT	GCCAGT	50
45	SACAS9KKH	E45SaCas9KKH22	31968421	31968449	-	1015	AATAATTCAGCAATCCTCAAAA	ACAGAT	99
45	SACAS9KKH	E45SaCas9KKH23	31968435	31968463	-	1016	GCAACTGGGGAAGAAATAATTC	AGCAAT	43
45	SACAS9KKH	E45SaCas9KKH24	31968443	31968471	-	1017	CATTGAATGCAACTGGGGAAGA	AATAAT	54

45	SACAS9KKH	E45SaCas9KKH25	31968446	31968474	-	1018	GAACATTGAATGCAACTGGGGA	AGAAAT	23
45	SACAS9KKH	E45SaCas9KKH26	31968463	31968491	-	15	GCGGCAAACTGTTGTCAGAACA	TTGAAT	5
45	SACAS9KKH	E45SaCas9KKH27	31968502	31968530	-	16	TTTTGGTATCTTACAGGAACTC	CAGGAT	52
45	SLUCAS9KH	E45SLCas9KH1	31968332	31968358	+	2000	CCCTACCTCTTTTCTGTCTG	ACAG	23
45	SLUCAS9KH	E45SLCas9KH2	31968342	31968368	+	2001	TTTTCTGTCTGACAGCTGTTT	GCAG	22
45	SLUCAS9KH	E45SLCas9KH3	31968339	31968385	+	2002	TGTTTGCAGACCTCCTGCCACC	GCAG	9
45	SLUCAS9KH	E45SLCas9KH4	31968365	31968391	+	2003	CAGACCTCCTGCCACCCGAGAT	TCAG	9
45	SLUCAS9KH	E45SLCas9KH5	31968366	31968392	+	128	AGACCTCCTGCCACCCGAGATT	CAGG	10
45	SLUCAS9KH	E45SLCas9KH6	31968386	31968412	+	2004	TTCAGGCTTCCCAATTTTCTCT	GTAG	11
45	SLUCAS9KH	E45SLCas9KH7	31968394	31968420	+	129	TCCCAATTTTCTCTGTAGAATA	CTGG	19
45	SLUCAS9KH	E45SLCas9KH8	31968408	31968434	+	2005	GTAGAATACTGGCATCTGTTTT	TGAG	16
45	SLUCAS9KH	E45SLCas9KH9	31968409	31968435	+	130	TAGAATACTGGCATCTGTTTTT	GAGG	19
45	SLUCAS9KH	E45SLCas9KH10	31968433	31968459	+	2006	GGATTGCTGAATTATTTCTTCC	CCAG	18
45	SLUCAS9KH	E45SLCas9KH11	31968457	31968483	+	2007	AGTTGCATTCAATGTTCTGACA	ACAG	10
45	SLUCAS9KH	E45SLCas9KH12	31968483	31968509	+	131	TTTGCCGCTGCCCAATGCCATC	CTGG	2
45	SLUCAS9KH	E45SLCas9KH13	31968485	31968511	+	2008	TGCCGCTGCCCAATGCCATCCT	GGAG	7
45	SLUCAS9KH	E45SLCas9KH14	31968495	31968521	+	2009	CAATGCCATCCTGGAGTTCCTG	TAAG	14
45	SLUCAS9KH	E45SLCas9KH15	31968506	31968532	+	2010	TGGAGTTCCTGTAAGATACCAA	AAAG	10
45	SLUCAS9KH	E45SLCas9KH16	31968507	31968533	+	132	GGAGTTCCTGTAAGATACCAAA	AAGG	9
45	SLUCAS9KH	E45SLCas9KH17	31968316	31968342	-	133	AGAGGTAGGGCGACAGATCTAA	TAGG	6
45	SLUCAS9KH	E45SLCas9KH18	31968317	31968343	-	2011	AAGAGGTAGGGCGACAGATCTA	ATAG	5
45	SLUCAS9KH	E45SLCas9KH19	31968326	31968352	-	2012	GACAGAAAAAAGAGGTAGGGCG	ACAG	31
45	SLUCAS9KH	E45SLCas9KH20	31968332	31968358	-	134	CTGTCAGACAGAAAAAAGAGGT	AGGG	28
45	SLUCAS9KH	E45SLCas9KH21	31968333	31968359	-	135	GCTGTCAGACAGAAAAAAGAGG	TAGG	43
45	SLUCAS9KH	E45SLCas9KH22	31968334	31968360	-	2013	AGCTGTCAGACAGAAAAAAGAG	GTAG	67
45	SLUCAS9KH	E45SLCas9KH23	31968337	31968363	-	136	AACAGCTGTCAGACAGAAAAAA	GAGG	55
45	SLUCAS9KH	E45SLCas9KH24	31968338	31968364	-	2014	AAACAGCTGTCAGACAGAAAAAA	AGAG	37

45	SLUCAS9KH	E45SLCas9KH25	31968340	31968366	-	2015	GCAAACAGCTGTCTCAGACAGAAA	AAAG	27
45	SLUCAS9KH	E45SLCas9KH26	31968347	31968373	-	2016	GAGGTCTGCAAACAGCTGTCTCAG	ACAG	23
45	SLUCAS9KH	E45SLCas9KH27	31968351	31968377	-	2017	GCAGGAGGTCTGCAAACAGCTG	TCAG	16
45	SLUCAS9KH	E45SLCas9KH28	31968358	31968384	-	2018	TGCGGTGGCAGGAGGTCTGCAA	ACAG	14
45	SLUCAS9KH	E45SLCas9KH29	31968369	31968395	-	137	AAGCCTGAATCTGCGGTGGCAG	GAGG	11
45	SLUCAS9KH	E45SLCas9KH30	31968370	31968396	-	2019	GAAGCCTGAATCTGCGGTGGCA	GGAG	15
45	SLUCAS9KH	E45SLCas9KH31	31968372	31968398	-	138	GGGAAGCCTGAATCTGCGGTGG	CAGG	8
45	SLUCAS9KH	E45SLCas9KH32	31968373	31968399	-	2020	TGGGAAGCCTGAATCTGCGGTG	GCAG	6
45	SLUCAS9KH	E45SLCas9KH33	31968376	31968402	-	139	AATTGGGAAGCCTGAATCTGCG	GTGG	7
45	SLUCAS9KH	E45SLCas9KH34	31968379	31968405	-	140	AAAAATTGGGAAGCCTGAATCT	GCGG	26
45	SLUCAS9KH	E45SLCas9KH35	31968392	31968418	-	2021	AGTATTCTACAGGAAAAATTGG	GAAG	28
45	SLUCAS9KH	E45SLCas9KH36	31968395	31968421	-	141	GCCAGTATTCTACAGGAAAAAT	TGGG	16
45	SLUCAS9KH	E45SLCas9KH37	31968396	31968422	-	142	TGCCAGTATTCTACAGGAAAAA	TTGG	17
45	SLUCAS9KH	E45SLCas9KH38	31968405	31968431	-	143	AAAAACAGATGCCAGTATTCTA	CAGG	21
45	SLUCAS9KH	E45SLCas9KH39	31968406	31968432	-	2022	CAAAAACAGATGCCAGTATTCT	ACAG	28
45	SLUCAS9KH	E45SLCas9KH40	31968416	31968442	-	2023	CAGCAATCCTCAAAAACAGATG	CCAG	23
45	SLUCAS9KH	E45SLCas9KH41	31968423	31968449	-	2024	AATAATTCAGCAATCCTCAAAA	ACAG	31
45	SLUCAS9KH	E45SLCas9KH42	31968439	31968465	-	2025	ATGCAACTGGGAAGAAATAAT	TCAG	33
45	SLUCAS9KH	E45SLCas9KH43	31968450	31968476	-	2026	CAGAACATTGAATGCAACTGGG	GAAG	11
45	SLUCAS9KH	E45SLCas9KH44	31968453	31968479	-	144	TGTCAGAACATTGAATGCAACT	GGGG	12
45	SLUCAS9KH	E45SLCas9KH45	31968454	31968480	-	145	TTGTGAGAACATTGAATGCAAC	TGGG	30
45	SLUCAS9KH	E45SLCas9KH46	31968455	31968481	-	146	GTTGTGAGAACATTGAATGCAA	CTGG	12
45	SLUCAS9KH	E45SLCas9KH47	31968473	31968499	-	2027	ATTGGGCAGCGGCAAACTGTTG	TCAG	3
45	SLUCAS9KH	E45SLCas9KH48	31968487	31968513	-	147	AACTCCAGGATGGCATTGGGCA	GCGG	9
45	SLUCAS9KH	E45SLCas9KH49	31968490	31968516	-	2028	AGGAACTCCAGGATGGCATTGG	GCAG	16
45	SLUCAS9KH	E45SLCas9KH50	31968493	31968519	-	148	TACAGGAACTCCAGGATGGCAT	TGGG	10
45	SLUCAS9KH	E45SLCas9KH51	31968494	31968520	-	149	TTACAGGAACTCCAGGATGGCA	TTGG	13

45	SLUCAS9KH	E45SLCas9KH52	31968500	31968526	-	150	GGTATCTTACAGGAACTCCAGG	ATGG	7
45	SLUCAS9KH	E45SLCas9KH53	31968504	31968530	-	151	TTTGGTATCTTACAGGAACTC	CAGG	35
45	SLUCAS9KH	E45SLCas9KH54	31968505	31968531	-	2029	TTTTGGTATCTTACAGGAACT	CCAG	21
45	SLUCAS9KH	E45SLCas9KH55	31968513	31968539	-	152	GTTTTCGCTTTTGGTATCTTA	CAGG	32
45	SLUCAS9KH	E45SLCas9KH56	31968514	31968540	-	2030	TGTTTTGCCTTTTGGTATCTT	ACAG	58
51	SACAS9KKH	E51SaCas9KKH1	31773943	31773971	+	1019	TCATTTTTCTCATACCTTCTG	CTTGAT	91
51	SACAS9KKH	E51SaCas9KKH2	31773946	31773974	+	1020	TTTTTCTCATACCTTCTGCTT	GATGAT	132
51	SACAS9KKH	E51SaCas9KKH3	31773958	31773986	+	1021	CCTTCTGCTTGATGATCATCTC	GTTGAT	23
51	SACAS9KKH	E51SaCas9KKH4	31773969	31773997	+	1022	ATGATCATCTCGTTGATATCCT	CAAGGT	15
51	SACAS9KKH	E51SaCas9KKH5	31773992	31774020	+	1023	AAGGTCACCCACCATCACCCCTC	TGTGAT	33
51	SACAS9KKH	E51SaCas9KKH6	31774005	31774033	+	1024	ATCACCTCTGTGATTTTATAA	CTTGAT	45
51	SACAS9KKH	E51SaCas9KKH7	31774023	31774051	+	1025	ATAACTTGATCAAGCAGAGAAA	GCCAGT	101
51	SACAS9KKH	E51SaCas9KKH8	31774027	31774055	+	1026	CTTGATCAAGCAGAGAAAGCCA	GTCGGT	55
51	SACAS9KKH	E51SaCas9KKH9	31774031	31774059	+	1027	ATCAAGCAGAGAAAAGCCAGTCG	GTAAGT	16
51	SACAS9KKH	E51SaCas9KKH10	31774047	31774075	+	1028	CAGTCGGTAAGTTCTGTCCAAG	CCCGGT	7
51	SACAS9KKH	E51SaCas9KKH11	31774053	31774081	+	1029	GTAAGTTCTGTCCAAGCCCGGT	TGAAAT	4
51	SACAS9KKH	E51SaCas9KKH12	31774067	31774095	+	1030	AGCCCGGTTGAAATCTGCCAGA	GCAGGT	7
51	SACAS9KKH	E51SaCas9KKH13	31774088	31774116	+	1031	AGCAGGTACCTCCAACATCAAG	GAAGAT	23
51	SACAS9KKH	E51SaCas9KKH14	31774100	31774128	+	1032	CAACATCAAGGAAGATGGCATT	TCTAGT	54
51	SACAS9KKH	E51SaCas9KKH15	31774108	31774136	+	1033	AGGAAGATGCGATTCTAGTTT	GGAGAT	62
51	SACAS9KKH	E51SaCas9KKH16	31774114	31774142	+	1034	ATGGCATTCTAGTTTGGAGAT	GGCAGT	56
51	SACAS9KKH	E51SaCas9KKH17	31774123	31774151	+	1035	CTAGTTTGGAGATGGCAGTTTC	CTTAGT	32
51	SACAS9KKH	E51SaCas9KKH18	31774133	31774161	+	1036	GATGGCAGTTTCCTTAGTAACC	ACAGGT	24
51	SACAS9KKH	E51SaCas9KKH19	31774147	31774175	+	19	TAGTAACCACAGGTTGTGTAC	CAGAGT	18
51	SACAS9KKH	E51SaCas9KKH20	31774153	31774181	+	1037	CCACAGGTTGTGTCAACAGAGT	AACAGT	20
51	SACAS9KKH	E51SaCas9KKH21	31774159	31774187	+	20	GTTGTGTCAACAGAGTAACAGT	CTGAGT	21
51	SACAS9KKH	E51SaCas9KKH22	31774171	31774199	+	1038	GAGTAACAGTCTGAGTAGGAGC	TAAAAT	18

51	SACAS9KKH	E51SaCas9KKH23	31774180	31774208	+	21	TCTGAGTAGGAGCTAAAAATATT	TTGGGT	38
51	SACAS9KKH	E51SaCas9KKH24	31773936	31773964	-	1039	AGAAGGTATGAGAAAAATGAT	AAAAGT	236
51	SACAS9KKH	E51SaCas9KKH25	31773942	31773970	-	1040	TCAAGCAGAAGGTATGAGAAAA	AATGAT	99
51	SACAS9KKH	E51SaCas9KKH26	31773945	31773973	-	1041	TCATCAAGCAGAAGGTATGAGA	AAAAAT	43
51	SACAS9KKH	E51SaCas9KKH27	31773957	31773985	-	1042	TCAACGAGATGATCATCAAGCA	GAAGGT	10
51	SACAS9KKH	E51SaCas9KKH28	31773972	31774000	-	1043	GTGACCTTGAGGATATCAACGA	GATGAT	7
51	SACAS9KKH	E51SaCas9KKH29	31773975	31774003	-	1044	TGGGTGACCTTGAGGATATCAA	CGAGAT	68
51	SACAS9KKH	E51SaCas9KKH30	31773986	31774014	-	22	GAGGGTGATGGTGGGTGACCTT	GAGGAT	46
51	SACAS9KKH	E51SaCas9KKH31	31773998	31774026	-	23	TATAAAATCACAGAGGGTGATG	GTGGGT	42
51	SACAS9KKH	E51SaCas9KKH32	31774002	31774030	-	1045	AAGTTATAAAATCACAGAGGGT	GATGGT	77
51	SACAS9KKH	E51SaCas9KKH33	31774005	31774033	-	1046	ATCAAGTTATAAAATCACAGAG	GGTGAT	90
51	SACAS9KKH	E51SaCas9KKH34	31774008	31774036	-	24	TTGATCAAGTTATAAAATCACA	GAGGGT	86
51	SACAS9KKH	E51SaCas9KKH35	31774018	31774046	-	1047	CTTTCTCTGCTTGATCAAGTTA	TAAAAT	45
51	SACAS9KKH	E51SaCas9KKH36	31774026	31774054	-	1048	CCGACTGGCTTTCTCTGCTTGA	TCAAGT	18
51	SACAS9KKH	E51SaCas9KKH37	31774031	31774059	-	1049	ACTTACCGACTGGCTTTCTCTG	CTTGAT	11
51	SACAS9KKH	E51SaCas9KKH38	31774079	31774107	-	1050	GATGTTGGAGGTACCTGCTCTG	GCAGAT	22
51	SACAS9KKH	E51SaCas9KKH39	31774095	31774123	-	1051	AAATGCCATCTTCTTGATGTT	GGAGGT	57
51	SACAS9KKH	E51SaCas9KKH40	31774104	31774132	-	1052	CCAAACTAGAAATGCCATCTTC	CTTGAT	46
51	SACAS9KKH	E51SaCas9KKH41	31774119	31774147	-	1053	AGGAAACTGCCATCTCCAAACT	AGAAAT	63
51	SACAS9KKH	E51SaCas9KKH42	31774152	31774180	-	1054	CTGTTACTCTGGTGACACAACC	TGTGGT	27
51	SACAS9KKH	E51SaCas9KKH43	31774167	31774195	-	1055	TAGCTCCTACTCAGACTGTTAC	TCTGGT	13
51	SLUCAS9KH	E51SLCas9KH1	31773969	31773995	+	2031	ATGATCATCTCGTTGATATCCT	CAAG	6
51	SLUCAS9KH	E51SLCas9KH2	31773970	31773996	+	170	TGATCATCTCGTTGATATCCTC	AAGG	6
51	SLUCAS9KH	E51SLCas9KH3	31774011	31774037	+	2032	CTCTGTGATTTATAACTTGAT	CAAG	18
51	SLUCAS9KH	E51SLCas9KH4	31774014	31774040	+	2033	TGTGATTTATAACTTGATCAA	GCAG	29
51	SLUCAS9KH	E51SLCas9KH5	31774016	31774042	+	2034	TGATTTTATAACTTGATCAAGC	AGAG	15
51	SLUCAS9KH	E51SLCas9KH6	31774020	31774046	+	2035	TTTATAACTTGATCAAGCAGAG	AAAG	7

51	SLUCAS9KH	E51SLCas9KH7	31774024	31774050	+	2036	TAACTTGATCAAGCAGAGAAAAG	CCAG	24
51	SLUCAS9KH	E51SLCas9KH8	31774028	31774054	+	171	TTGATCAAGCAGAGAAAGCCAG	TCGG	23
51	SLUCAS9KH	E51SLCas9KH9	31774032	31774058	+	2037	TCAAGCAGAGAAAGCCAGTCGG	TAAG	7
51	SLUCAS9KH	E51SLCas9KH10	31774043	31774069	+	2038	AAGCCAGTCGGTAAGTTCTGTC	CAAG	7
51	SLUCAS9KH	E51SLCas9KH11	31774048	31774074	+	172	AGTCGGTAAGTTCTGTCCAAGC	CCGG	2
51	SLUCAS9KH	E51SLCas9KH12	31774062	31774088	+	2039	GTCCAAGCCCGTTGAAATCTG	CCAG	1
51	SLUCAS9KH	E51SLCas9KH13	31774064	31774090	+	2040	CCAAGCCCGTTGAAATCTGCC	AGAG	2
51	SLUCAS9KH	E51SLCas9KH14	31774067	31774093	+	2041	AGCCCGGTTGAAATCTGCCAGA	GCAG	4
51	SLUCAS9KH	E51SLCas9KH15	31774068	31774094	+	173	GCCCGGTTGAAATCTGCCAGAG	CAGG	5
51	SLUCAS9KH	E51SLCas9KH16	31774084	31774110	+	2042	CCAGAGCAGGTACCTCCAACAT	CAAG	14
51	SLUCAS9KH	E51SLCas9KH17	31774085	31774111	+	174	CAGAGCAGGTACCTCCAACATC	AAGG	13
51	SLUCAS9KH	E51SLCas9KH18	31774088	31774114	+	2043	AGCAGGTACCTCCAACATCAAG	GAAG	12
51	SLUCAS9KH	E51SLCas9KH19	31774092	31774118	+	175	GGTACCTCCAACATCAAGGAAAG	ATGG	6
51	SLUCAS9KH	E51SLCas9KH20	31774101	31774127	+	2044	AACATCAAGGAAGATGGCATT	CTAG	32
51	SLUCAS9KH	E51SLCas9KH21	31774106	31774132	+	176	CAAGGAAGATGGCATTCTAGT	TTGG	21
51	SLUCAS9KH	E51SLCas9KH22	31774108	31774134	+	2045	AGGAAGATGGCATTCTAGITT	GGAG	50
51	SLUCAS9KH	E51SLCas9KH23	31774112	31774138	+	177	AGATGGCATTCTAGTTGGAG	ATGG	10
51	SLUCAS9KH	E51SLCas9KH24	31774115	31774141	+	2046	TGGCATTCTAGTTTGGAGATG	GCAG	22
51	SLUCAS9KH	E51SLCas9KH25	31774124	31774150	+	2047	TAGTTTGGAGATGGCAGTTTCC	TTAG	20
51	SLUCAS9KH	E51SLCas9KH26	31774133	31774159	+	2048	GATGGCAGTTTCCTTAGTAACC	ACAG	11
51	SLUCAS9KH	E51SLCas9KH27	31774134	31774160	+	178	ATGGCAGTTTCCTTAGTAACCA	CAGG	14
51	SLUCAS9KH	E51SLCas9KH28	31774146	31774172	+	2049	TTAGTAACCAACAGGTTGTGTCA	CCAG	7
51	SLUCAS9KH	E51SLCas9KH29	31774148	31774174	+	2050	AGTAACCAACAGGTTGTGTCAACC	AGAG	7
51	SLUCAS9KH	E51SLCas9KH30	31774154	31774180	+	2051	CACAGGTTGTGTCAACCAGAGTA	ACAG	14
51	SLUCAS9KH	E51SLCas9KH31	31774160	31774186	+	2052	TTGTGTCAACCAGAGTAACAGTC	TGAG	9
51	SLUCAS9KH	E51SLCas9KH32	31774163	31774189	+	2053	TGTCAACCAGAGTAACAGTCTGA	GTAG	9
51	SLUCAS9KH	E51SLCas9KH33	31774164	31774190	+	179	GTCACCAGAGTAACAGTCTGAG	TAGG	14

51	SLUCAS9KH	E51SLCas9KH34	31774166	31774192	+	2054	CACCAGAGTAACAGTCTGAGTA	GGAG	11
51	SLUCAS9KH	E51SLCas9KH35	31774180	31774206	+	180	TCTGAGTAGGAGCTAAAAATATT	TTGG	11
51	SLUCAS9KH	E51SLCas9KH36	31774181	31774207	+	181	CTGAGTAGGAGCTAAAAATATT	TGGG	21
51	SLUCAS9KH	E51SLCas9KH37	31774194	31774220	+	2055	AAAATATTTTGGGTTTTTGCAA	AAAG	56
51	SLUCAS9KH	E51SLCas9KH38	31774195	31774221	+	182	AAATATTTTGGGTTTTTGCAA	AAGG	61
51	SLUCAS9KH	E51SLCas9KH39	31773927	31773953	-	2056	GAAAAAATGATAAAAAGTTGGCA	GAAG	77
51	SLUCAS9KH	E51SLCas9KH40	31773930	31773956	-	2057	TGAGAAAAAATGATAAAAGTTG	GCAG	124
51	SLUCAS9KH	E51SLCas9KH41	31773933	31773959	-	183	GTATGAGAAAAAATGATAAAAG	TTGG	99
51	SLUCAS9KH	E51SLCas9KH42	31773937	31773963	-	2058	GAAGGTATGAGAAAAAATGATA	AAAG	64
51	SLUCAS9KH	E51SLCas9KH43	31773952	31773978	-	2059	GATGATCATCAAGCAGAAGGTA	TGAG	11
51	SLUCAS9KH	E51SLCas9KH44	31773958	31773984	-	184	CAACGAGATGATCATCAAGCAG	AAGG	7
51	SLUCAS9KH	E51SLCas9KH45	31773959	31773985	-	2060	TCAACGAGATGATCATCAAGCA	GAAG	3
51	SLUCAS9KH	E51SLCas9KH46	31773962	31773988	-	2061	ATATCAACGAGATGATCATCAA	GCAG	7
51	SLUCAS9KH	E51SLCas9KH47	31773965	31773991	-	2062	AGGATATCAACGAGATGATCAT	CAAG	7
51	SLUCAS9KH	E51SLCas9KH48	31773977	31774003	-	2063	TGGGTGACCTTGAGGATATCAA	CGAG	17
51	SLUCAS9KH	E51SLCas9KH49	31773988	31774014	-	185	GAGGGTGATGGTGGGTGACCTT	GAGG	22
51	SLUCAS9KH	E51SLCas9KH50	31773989	31774015	-	2064	AGAGGGTGATGGTGGGTGACCT	TGAG	48
51	SLUCAS9KH	E51SLCas9KH51	31773999	31774025	-	186	ATAAAATCACAGAGGGTGATGG	TGGG	27
51	SLUCAS9KH	E51SLCas9KH52	31774000	31774026	-	187	TATAAAATCACAGAGGGTGATG	GTGG	23
51	SLUCAS9KH	E51SLCas9KH53	31774003	31774029	-	188	AGTTATAAAATCACAGAGGGTG	ATGG	20
51	SLUCAS9KH	E51SLCas9KH54	31774009	31774035	-	189	TGATCAAGTTATAAAATCACAG	AGGG	29
51	SLUCAS9KH	E51SLCas9KH55	31774010	31774036	-	190	TTGATCAAGTTATAAAATCACA	GAGG	30
51	SLUCAS9KH	E51SLCas9KH56	31774011	31774037	-	2065	CTTGATCAAGTTATAAAATCAC	AGAG	14
51	SLUCAS9KH	E51SLCas9KH57	31774013	31774039	-	2066	TGCTTGATCAAGTTATAAAATC	ACAG	11
51	SLUCAS9KH	E51SLCas9KH58	31774027	31774053	-	2067	CGACTGGCTTTCTCTGCTTGAT	CAAG	8
51	SLUCAS9KH	E51SLCas9KH59	31774046	31774072	-	191	GGGCTTGGACAGAACTTACCGA	CTGG	2
51	SLUCAS9KH	E51SLCas9KH60	31774060	31774086	-	2068	GGCAGATTTCAACCGGGCTTGG	ACAG	5

51	SLUCAS9KH	E51SLCas9KH61	31774064	31774090	-	192	CTCTGGCAGATTTC AACCGGGC	TTGG	1
51	SLUCAS9KH	E51SLCas9KH62	31774069	31774095	-	193	ACCTGCTCTGGCAGATTCAAC	CGGG	10
51	SLUCAS9KH	E51SLCas9KH63	31774070	31774096	-	194	TACCTGCTCTGGCAGATTCAA	CCGG	10
51	SLUCAS9KH	E51SLCas9KH64	31774081	31774107	-	2069	GATGTTGGAGGTACCTGCTCTG	GCAG	7
51	SLUCAS9KH	E51SLCas9KH65	31774084	31774110	-	195	CTTGATGTTGGAGGTACCTGCT	CTGG	7
51	SLUCAS9KH	E51SLCas9KH66	31774096	31774122	-	196	AATGCCATCTTCCTTGATGTTG	GAGG	22
51	SLUCAS9KH	E51SLCas9KH67	31774097	31774123	-	2070	AAATGCCATCTTCCTTGATGTT	GGAG	19
51	SLUCAS9KH	E51SLCas9KH68	31774099	31774125	-	197	AGAAATGCCATCTTCCTTGATG	TTGG	26
51	SLUCAS9KH	E51SLCas9KH69	31774123	31774149	-	2071	TAAGGAACTGCCATCTCCAAA	CTAG	41
51	SLUCAS9KH	E51SLCas9KH70	31774144	31774170	-	198	GGTGACACAACCTGTGTTACT	AAGG	6
51	SLUCAS9KH	E51SLCas9KH71	31774145	31774171	-	2072	TGGTGACACAACCTGTGTTAC	TAAG	10
51	SLUCAS9KH	E51SLCas9KH72	31774153	31774179	-	199	TGTTACTCTGGTGACACAACCT	GTGG	22
51	SLUCAS9KH	E51SLCas9KH73	31774168	31774194	-	200	AGCTCCTACTCAGACTGTTACT	CTGG	2
51	SLUCAS9KH	E51SLCas9KH74	31774181	31774207	-	2073	CCCCAAATATTTTAGCTCCTAC	TCAG	10
51	SLUCAS9KH	E51SLCas9KH75	31774192	31774218	-	2074	TTTTGCAAAAACCCAAATATT	TTAG	43
53	SACAS9KKH	E53SaCas9KKH1	31679352	31679380	+	1056	AAAAGGTATCTTTGATACTAAC	CTTGGT	45
53	SACAS9KKH	E53SaCas9KKH2	31679361	31679389	+	1057	CTTTGATACTAACCTTGTTTC	TGTGAT	20
53	SACAS9KKH	E53SaCas9KKH3	31679373	31679401	+	25	CCTTGGTTTCTGTGATTTTCTT	TTGGAT	122
53	SACAS9KKH	E53SaCas9KKH4	31679477	31679505	+	26	TCCTTAGCTTCCAGCCATTGTG	TTGAAT	42
53	SACAS9KKH	E53SaCas9KKH5	31679510	31679538	+	1058	AACATTTCAATCAACTGTTGCC	TCCGGT	46
53	SACAS9KKH	E53SaCas9KKH6	31679519	31679547	+	1059	TTCAACTGTTGCCTCCGGTTCT	GAAGGT	9
53	SACAS9KKH	E53SaCas9KKH7	31679543	31679571	+	1060	AGGTGTTCTTGTACTTCATCCC	ACTGAT	16
53	SACAS9KKH	E53SaCas9KKH8	31679550	31679578	+	27	CTTGTAATTCATCCCACTGATT	CTGAAT	58
53	SACAS9KKH	E53SaCas9KKH9	31679565	31679593	+	28	ACTGATTCTGAATTTTCAAC	TAGAAT	78
53	SACAS9KKH	E53SaCas9KKH10	31679577	31679605	+	1061	TTCTTTCAACTAGAATAAAAGG	AAAAAT	86
53	SACAS9KKH	E53SaCas9KKH11	31679581	31679609	+	1062	TTCAACTAGAATAAAAGGAAAA	ATAAAT	420
53	SACAS9KKH	E53SaCas9KKH12	31679588	31679616	+	1063	AGAATAAAAGGAAAAATAATA	TATAGT	5266

53	SACAS9KKH	E53SaCas9KKH13	31679346	31679374	-	1064	GTTAGTATCAAAGATACCTTTT	TAAAAT	31
53	SACAS9KKH	E53SaCas9KKH14	31679359	31679387	-	1065	CACAGAAACCAAGGTTAGTATC	AAAGAT	33
53	SACAS9KKH	E53SaCas9KKH15	31679368	31679396	-	1066	AAAGAAAATCACAGAAACCAAG	GTTAGT	456
53	SACAS9KKH	E53SaCas9KKH16	31679372	31679400	-	1067	TCCAAAAGAAAATCACAGAAAC	CAAGGT	246
53	SACAS9KKH	E53SaCas9KKH17	31679387	31679415	-	1068	ATACAGTAGATGCAATCCAAAA	GAAAAT	49
53	SACAS9KKH	E53SaCas9KKH18	31679399	31679427	-	1069	AGGAGGGTCCCTATACAGTAGA	TGCAAT	13
53	SACAS9KKH	E53SaCas9KKH19	31679404	31679432	-	1070	ATGGAAGGAGGGTCCCTATACA	GTAGAT	20
53	SACAS9KKH	E53SaCas9KKH20	31679408	31679436	-	1071	AGTCATGGAAGGAGGGTCCCTA	TACAGT	27
53	SACAS9KKH	E53SaCas9KKH21	31679419	31679447	-	29	AGCCAAGCTTGAGTCATGGAAG	GAGGGT	36
53	SACAS9KKH	E53SaCas9KKH22	31679433	31679461	-	30	TTAGGACAGGCCAGAGCCAAGC	TTGAGT	30
53	SACAS9KKH	E53SaCas9KKH23	31679462	31679490	-	1072	TGGAAGCTAAGGAAGAAGCTGA	GCAGGT	103
53	SACAS9KKH	E53SaCas9KKH24	31679493	31679521	-	1073	AATGAAATGTTAAAGGATTCAA	CACAAT	200
53	SACAS9KKH	E53SaCas9KKH25	31679503	31679531	-	31	GCAACAGTTGAATGAAATGTTA	AAGGAT	155
53	SACAS9KKH	E53SaCas9KKH26	31679513	31679541	-	1074	AGAACCGGAGGCAACAGTTGAA	TGAAAT	11
53	SACAS9KKH	E53SaCas9KKH27	31679518	31679546	-	32	CCTTCAGAACCGGAGGCAACAG	TTGAAT	8
53	SACAS9KKH	E53SaCas9KKH28	31679523	31679551	-	1075	GAACACCTTCAGAACCGGAGGC	AACAGT	10
53	SACAS9KKH	E53SaCas9KKH29	31679555	31679583	-	1076	AAAGAATTCAGAATCAGTGGGA	TGAAGT	106
53	SACAS9KKH	E53SaCas9KKH30	31679560	31679588	-	33	AGTTGAAAGAAATTCAGAATCAG	TGGGAT	110
53	SACAS9KKH	E53SaCas9KKH31	31679565	31679593	-	1077	ATTCTAGTTGAAAGAATTCAGA	ATCAGT	134
53	SACAS9KKH	E53SaCas9KKH32	31679569	31679597	-	34	TTTTATTCTAGTTGAAAGAATT	CAGAAT	399
53	SACAS9KKH	E53SaCas9KKH33	31679576	31679604	-	35	TTTTTCCTTTTATTCTAGTTGA	AAGAAT	475
53	SACAS9KKH	E53SaCas9KKH34	31679585	31679613	-	1078	ATATATTTATTTTCCTTTTAT	TCTAGT	2133
53	SLUCAS9KH	E53SLCas9KH1	31679353	31679379	+	201	AAAGGTATCTTTGATACTAACC	TTGG	13
53	SLUCAS9KH	E53SLCas9KH2	31679373	31679399	+	202	CCTTGGTTCTGTGATTTTCTT	TTGG	51
53	SLUCAS9KH	E53SLCas9KH3	31679391	31679417	+	2075	TCTTTGGATTGCATCTACTGT	ATAG	18
53	SLUCAS9KH	E53SLCas9KH4	31679392	31679418	+	203	CTTTTGGATTGCATCTACTGTA	TAGG	12
53	SLUCAS9KH	E53SLCas9KH5	31679393	31679419	+	204	TTTTGGATTGCATCTACTGTAT	AGGG	15

53	SLUCAS9KH	E53SLCas9KH6	31679414	31679440	+	2076	TAGGGACCCCTCCTTCCATGACT	CAAG	11
53	SLUCAS9KH	E53SLCas9KH7	31679419	31679445	+	205	ACCCTCCTTCCATGACTCAAGC	TTGG	11
53	SLUCAS9KH	E53SLCas9KH8	31679425	31679451	+	206	CTTCCATGACTCAAGCTTGGCT	CTGG	10
53	SLUCAS9KH	E53SLCas9KH9	31679436	31679462	+	2077	CAAGCTTGGCTCTGGCCTGTCC	TAAG	16
53	SLUCAS9KH	E53SLCas9KH10	31679446	31679472	+	2078	TCTGGCCTGTCTAAGACCTGC	TCAG	18
53	SLUCAS9KH	E53SLCas9KH11	31679458	31679484	+	2079	TAAGACCTGCTCAGCTTCTTCC	TTAG	16
53	SLUCAS9KH	E53SLCas9KH12	31679465	31679491	+	2080	TGCTCAGCTTCTTCTTAGCTT	CCAG	24
53	SLUCAS9KH	E53SLCas9KH13	31679511	31679537	+	207	ACATTTCACTCAACTGTTGCCT	CCGG	15
53	SLUCAS9KH	E53SLCas9KH14	31679519	31679545	+	2081	TTCAACTGTTGCCTCCGGTTCT	GAAG	6
53	SLUCAS9KH	E53SLCas9KH15	31679520	31679546	+	208	TCAACTGTTGCCTCCGGTTCTG	AAGG	4
53	SLUCAS9KH	E53SLCas9KH16	31679564	31679590	+	2082	CACGATTTCTGAATTCCTTCAA	CTAG	32
53	SLUCAS9KH	E53SLCas9KH17	31679572	31679598	+	2083	CTGAATTCCTTCAACTAGAATA	AAAG	71
53	SLUCAS9KH	E53SLCas9KH18	31679573	31679599	+	209	TGAATTCCTTCAACTAGATAA	AAGG	48
53	SLUCAS9KH	E53SLCas9KH19	31679589	31679615	+	2084	GAATAAAAGGAAAAATAAATAT	ATAG	574
53	SLUCAS9KH	E53SLCas9KH20	31679592	31679618	+	2085	TAAAAGGAAAAATAAATATATA	GTAG	765
53	SLUCAS9KH	E53SLCas9KH21	31679361	31679387	-	2086	CACAGAAACCAAGTTAGTATC	AAAG	6
53	SLUCAS9KH	E53SLCas9KH22	31679369	31679395	-	2087	AAGAAAATCACAGAAACCAAGG	TTAG	88
53	SLUCAS9KH	E53SLCas9KH23	31679373	31679399	-	210	CCAAAAGAAAATCACAGAAACC	AAGG	52
53	SLUCAS9KH	E53SLCas9KH24	31679374	31679400	-	2088	TCCAAAAGAAAATCACAGAAAC	CAAG	75
53	SLUCAS9KH	E53SLCas9KH25	31679382	31679408	-	2089	AGATGCAATCCAAAAGAAAATC	ACAG	89
53	SLUCAS9KH	E53SLCas9KH26	31679392	31679418	-	2090	CCTATACAGTAGATGCAATCCA	AAAG	4
53	SLUCAS9KH	E53SLCas9KH27	31679406	31679432	-	2091	ATGGAAGGAGGGTCCCTATACA	GTAG	8
53	SLUCAS9KH	E53SLCas9KH28	31679409	31679435	-	2092	GTCATGGAAGGAGGGTCCCTAT	ACAG	12
53	SLUCAS9KH	E53SLCas9KH29	31679420	31679446	-	211	GCCAAGCTTGAGTCATGGAAGG	AGGG	10
53	SLUCAS9KH	E53SLCas9KH30	31679421	31679447	-	212	AGCCAAGCTTGAGTCATGGAAG	GAGG	21
53	SLUCAS9KH	E53SLCas9KH31	31679422	31679448	-	2093	GAGCCAAGCTTGAGTCATGGAA	GGAG	14
53	SLUCAS9KH	E53SLCas9KH32	31679424	31679450	-	213	CAGAGCCAAGCTTGAGTCATGG	AAGG	18

53	SLUCAS9KH	E53SLCas9KH33	31679425	31679451	-	2094	CCAGAGCCAAGCTTGAGTCATG	GAAG	18
53	SLUCAS9KH	E53SLCas9KH34	31679428	31679454	-	214	AGGCCAGAGCCAAGCTTGAGTC	ATGG	23
53	SLUCAS9KH	E53SLCas9KH35	31679434	31679460	-	2095	TAGGACAGGCCAGAGCCAAGCT	TGAG	17
53	SLUCAS9KH	E53SLCas9KH36	31679440	31679466	-	2096	AGGTCTTAGGACAGGCCAGAGC	CAAG	23
53	SLUCAS9KH	E53SLCas9KH37	31679445	31679471	-	2097	TGAGCAGGTCTTAGGACAGGCC	AGAG	27
53	SLUCAS9KH	E53SLCas9KH38	31679447	31679473	-	2098	GCTGAGCAGGTCTTAGGACAGG	CCAG	35
53	SLUCAS9KH	E53SLCas9KH39	31679451	31679477	-	215	AGAACTGAGCAGGTCTTAGGA	CAGG	44
53	SLUCAS9KH	E53SLCas9KH40	31679452	31679478	-	2099	AAGAAGCTGAGCAGGTCTTAGG	ACAG	16
53	SLUCAS9KH	E53SLCas9KH41	31679456	31679482	-	216	AAGGAAGAAGCTGAGCAGGTCT	TAGG	53
53	SLUCAS9KH	E53SLCas9KH42	31679457	31679483	-	2100	TAAGGAAGAAGCTGAGCAGGTC	TTAG	25
53	SLUCAS9KH	E53SLCas9KH43	31679463	31679489	-	217	GGAAGCTAAGGAAGAAGCTGAG	CAGG	70
53	SLUCAS9KH	E53SLCas9KH44	31679464	31679490	-	2101	TGGAAGCTAAGGAAGAAGCTGA	GCAG	52
53	SLUCAS9KH	E53SLCas9KH45	31679467	31679493	-	2102	GGCTGGAAGCTAAGGAAGAAGC	TGAG	41
53	SLUCAS9KH	E53SLCas9KH46	31679472	31679498	-	2103	ACAATGGCTGGAAGCTAAGGAA	GAAG	27
53	SLUCAS9KH	E53SLCas9KH47	31679475	31679501	-	2104	AACACAATGGCTGGAAGCTAAG	GAAG	18
53	SLUCAS9KH	E53SLCas9KH48	31679478	31679504	-	218	TTCAACACAATGGCTGGAAGCT	AAGG	87
53	SLUCAS9KH	E53SLCas9KH49	31679479	31679505	-	2015	ATTCAACACAATGGCTGGAAGC	TAAG	24
53	SLUCAS9KH	E53SLCas9KH50	31679484	31679510	-	2016	AAAGGATTCAACACAATGGCTG	GAAG	12
53	SLUCAS9KH	E53SLCas9KH51	31679487	31679513	-	219	GTTAAAGGATTCAACACAATGG	CTGG	12
53	SLUCAS9KH	E53SLCas9KH52	31679491	31679517	-	220	AAATGTTAAAGGATTCAACACA	ATGG	37
53	SLUCAS9KH	E53SLCas9KH53	31679505	31679531	-	221	GCAACAGTTGAATGAAATGTTA	AAGG	28
53	SLUCAS9KH	E53SLCas9KH54	31679506	31679532	-	2107	GGCAACAGTTGAATGAAATGTT	AAAG	25
53	SLUCAS9KH	E53SLCas9KH55	31679524	31679550	-	2108	AACACCTTCAGAACCGGAGGCA	ACAG	7
53	SLUCAS9KH	E53SLCas9KH56	31679530	31679556	-	222	TACAAGAACACCTTCAGAACCG	GAGG	10
53	SLUCAS9KH	E53SLCas9KH57	31679531	31679557	-	2109	GTACAAGAACACCTTCAGAAC	GGAG	10
53	SLUCAS9KH	E53SLCas9KH58	31679533	31679559	-	223	AAGTACAAGAACACCTTCAGAA	CCGG	17
53	SLUCAS9KH	E53SLCas9KH59	31679539	31679565	-	2110	GGGATGAAGTACAAGAACACCT	TCAG	18

53	SLUCAS9KH	E53SLCas9KH60	31679550	31679576	-	2111	TCAGAATCAGTGGGATGAAGTA	CAAG	27
53	SLUCAS9KH	E53SLCas9KH61	31679556	31679582	-	2112	AAGAATTCAGAATCAGTGGGAT	GAAG	27
53	SLUCAS9KH	E53SLCas9KH62	31679562	31679588	-	224	AGTTGAAAGAATTCAGAATCAG	TGGG	95
53	SLUCAS9KH	E53SLCas9KH63	31679563	31679589	-	225	TAGTTGAAAGAATTCAGAATCA	GTGG	33
53	SLUCAS9KH	E53SLCas9KH64	31679566	31679592	-	2113	TTCTAGTTGAAAGAATTCAGAA	TCAG	43
53	SLUCAS9KH	E53SLCas9KH65	31679572	31679598	-	2114	CTTTTATTCTAGTTGAAAGAAT	TCAG	61
53	SLUCAS9KH	E53SLCas9KH66	31679579	31679605	-	2115	ATTTTTCCTTTTATTCTAGTTG	AAAG	122
53	SLUCAS9KH	E53SLCas9KH67	31679586	31679612	-	2116	TATATTATTTTTCCTTTTATT	CTAG	978

Пример 4: Оценка пар онРНК

А. Материалы и методы

1. Селекция онРНК

Подмножество онРНК SaCas9-ККН или SluCas9, обнаруженное в гене *DMD*, было выбрано для оценки частоты и профиля инделей. Критерии, использованные для выбора этих онРНК, включали их способность индуцировать изменение рамки считывания и/или пропуск экзона в паре, в дополнение к существованию гомологичного аналога из мыши, собаки и NHR. Эта селекция включала 27 онРНК, расположенных в экзоне 45, 39 онРНК, расположенных в экзоне 51, и 29 онРНК, расположенных в экзоне 53. Количество спрогнозированных нецелевых сайтов определяли для каждой онРНК.

2. Трансфекция клеток HEK293FT

Клетки 293FT трансфицировали в 12-луночных планшетах с 750 нг плазмиды+2,25 мкл липофектамина 2000. Через три дня после трансфекции клетки обрабатывали трипсином и сортировали по GFP. GFP-положительные клетки сортировали непосредственно в буфере для лизиса, и экстракцию ДНК проводили с использованием набора ДНК крови Promega Maxwell RSC. Затем на ДНК проводили ПЦР с использованием экзон-специфических праймеров, нацеленных на соответствующий сайт рестрикции.

3. Глубокое секвенирование ампликонов подготовка библиотеки и анализ данных

Соответствующие локусы для каждого экзона амплифицировали с помощью ПЦР, и продукты использовали для приготовления библиотек секвенирования с использованием набора реагентов MiSeq V3, 600 циклов. Анализ инделей был выполнен с использованием $\pm$ 10-нт окна количественного определения CRISPResso2. Профилирование инделей состояло из 8 категорий инделей, перечисленных в **таблице 6**.

Таблица 6.

Группа инделей	Порядок ранжирования	Определение
Ампликон дикого типа		
NE	1	вставка = 0 и делеция = 0
RF +1	2	1-нт вставка для направляющей молекулы для изменения рамки считывания
Другие RF	3	делеция $3n+1$ в пределах границ экзона для одиночной направляющей молекулы для изменения рамки считывания отсутствие редактирования направляющей молекулой к экзону
		агрегированная делеция $3n+1$ в пределах границы экзона для двух направляющих молекул для изменения рамки считывания
		< 17-нт вставка для одиночной направляющей

		молекулы для изменения рамки считывания отсутствие редактирования направляющей молекулой к экзону
		< 17-нт агрегированная вставка 3n+1 для двух направляющих молекул для изменения рамки считывания
Пропуск экзона	4	инделы перекрываются с акцептором сплайсинга (AG) (5'-конец целевого экзона)
		Делеция с ≥ 9 -нуклеотидным перекрытием с окном сплайсинга для одной из двух направляющих молекул
		вставка точно в сайты сплайсинга GT/AG и длиной ≥ 9 нуклеотидов для одной из двух направляющих молекул
ОЕ	5	Другие инделы
Ампликон с делецией		
Точная делеция	1	делеция сегментов между двумя сайтами рестрикции
(Остальные)	2	Профилирование инделей одиночного разрыва с фазой 3n
Ампликон с инверсией		
ОЕ	1	все инделы

4. Конфигурации AAV для одновекторных кандидатов с двумя сайтами рестрикции

Комбинация ориентации промотора, конфигурации промотора, NLS и каркасов была выбрана для создания плазмид AAV и оценки экспрессии трансгена онРНК, технологичности AAV и эффективности редактирования *in vitro* и *in vivo*. Конфигурации плазмиды AAV перечислены в **таблице 7**. Последовательности промотора, NLS и каркаса приведены в **таблице 8**.

Таблица 7:

Промотор РНК- полимеразы III	Ориентация	Конфи- гурация	NLS1	Эндо- нуклеаза	NLS2	NLS3	Каркас
hU6c:hU6c	$\leftarrow \alpha \rightarrow$	hU6c- Cas9- hU6c	c-Мyc- GSVD	SluCas9	SV-40- GSGS	Нуклеоплазмин- GSGS	V5
	$\leftarrow \alpha \rightarrow$	hU6c-	c-Мyc-	SaCas9-	SV-40-	Нуклеоплазмин-	V2

		Cas9-hU6c	GSVD	KKH	GSGS	GSGS	
	$\leftarrow \alpha \rightarrow$	hU6c-Cas9-hU6c	c-Myc-GSVD	SluCas9	SV-40-MCS-GSGS	Нуклеоплазмин-GSGS	V5
	$\leftarrow \alpha \rightarrow$	hU6c-Cas9-hU6c	c-Myc-GSVD	SaCas9-KKH	SV-40-MCS-GSGS	Нуклеоплазмин-GSGS	V2
hU6:7SK2	$\leftarrow \alpha \rightarrow$	hU6c-Cas9-7SK2	c-Myc-GSVD	SluCas9	SV-40-GSGS	Нуклеоплазмин-GSGS	V5
	$\leftarrow \alpha \rightarrow$	hU6c-Cas9-7SK2	c-Myc-GSVD	SaCas9-KKH	SV-40-GSGS	Нуклеоплазмин-GSGS	V2
	$\leftarrow \alpha \rightarrow$	hU6c-Cas9-7SK2	c-Myc-GSVD	SluCas9	SV-40-MCS-GSGS	Нуклеоплазмин-GSGS	V5
	$\leftarrow \alpha \rightarrow$	hU6c-Cas9-7SK2	c-Myc-GSVD	SaCas9-KKH	SV-40-MCS-GSGS	Нуклеоплазмин-GSGS	V2
hU6c:H1m	$\leftarrow \alpha \rightarrow$	hU6c-Cas9-H1m	c-Myc-GSVD	SluCas9	SV-40-GSGS	Нуклеоплазмин-GSGS	V5
	$\leftarrow \alpha \rightarrow$	hU6c-Cas9-H1m	c-Myc-GSVD	SaCas9-KKH	SV-40-GSGS	Нуклеоплазмин-GSGS	V2
7SK2:H1m	$\leftarrow \alpha \rightarrow$	7SK2-Cas9-H1m	SV-40-GS	SluCas9	Нуклеоплазмин	Н/Д	V5
	$\leftarrow \alpha \rightarrow$	7SK2-Cas9-H1m	SV-40-GS	SaCas9-KKH	Нуклеоплазмин	Н/Д	V2
	$\leftarrow \alpha \rightarrow$	7SK2-Cas9-H1m	SV-40(+)	SluCas9	Нуклеоплазмин	Н/Д	V5
	$\leftarrow \alpha \rightarrow$	7SK2-Cas9-H1m	SV-40(+)	SaCas9-KKH	Нуклеоплазмин	Н/Д	V2
	$\leftarrow \alpha \rightarrow$	7SK2-Cas9-H1m	c-Myc-GSVD	SluCas9	SV-40-MCS-GSGS	Нуклеоплазмин-GSGS	V5

					GSGS		
	$\leftarrow \alpha \rightarrow$	7SK2-Cas9-H1m	c-Myc-GSVD	SaCas9-KKH	SV-40-MCS-GSGS	Нуклеоплазмин-GSGS	V2
	$\leftarrow \alpha \rightarrow$	7SK2-Cas9-H1m	c-Myc-GSVD	SluCas9	SV-40-MCS-GSGS	Нуклеоплазмин-GSGS	V2
H1m:M11	$\leftarrow \alpha \rightarrow$	H1m-Cas9-M11	c-Myc-GSVD	SluCas9	SV-40-MCS-GSGS	Нуклеоплазмин-GSGS	V5
	$\leftarrow \alpha \rightarrow$	H1m-Cas9-M11	c-Myc-GSVD	SaCas9-KKH	SV-40-MCS-GSGS	Нуклеоплазмин-GSGS	V5

Таблица 8:

Промотор	Последовательности
hU6c	GAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATAC AAGGCTGTTAGAGAGATAATTGGAATTAATTTGACTGTAAACAC AAAGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAGTAATAATTTCT TTGGGTAGTTTGCAGTTTTTAAAATTATGTTTTTAAAATGGACTATC ATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTAT ATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACC (SEQ ID NO: 705)
7SK2	CTGCAGTATTTAGCATGCCCCACCCATCTGCAAGGCATTCTGGAT AGTGTCAAAACAGCCGGAAATCAAGTCCGTTTATCTCAAACCTTT AGCATTTTGGGAATAAATGATATTTGCTATGCTGGTTAAATTAGA TTTTAGTTAAATTTCTGCTGAAGCTCTAGTACGATAAGCAACTT GACCTAAGTGTAAGTTGAGACTTCCTTCAGGTTTATATAGCTTG TGCGCCGCTTGGGTACCTC (SEQ ID NO: 706)
H1m	AATATTTGCATGTCGCTATGTGTTCTGGGAAATCACCATAAACGT GAAATGTCTTTGGATTTGGGAATCTTATAAGTTCTGTATGAGACC ACTCTTTCCC (SEQ ID NO: 707)
M11	ATATTTAGCATGTCGCTATGTGTTCTGGGAAACTTGACCTAAGTG TAAAGTTGAGATTTCTTCAGGTTTATATAGTTCTGTATGAGACC ACTCTTTCCC (SEQ ID NO: 708)
NLS-линкер	AK последовательности
c-Myc-GSVD	PAAKKKKLDGSVD (SEQ ID NO: 36)

SV-40-GS	PKKKRKVGS (SEQ ID NO: 37)
SV-40 (+)	PKKKRKVGIIHGVPA (SEQ ID NO: 38)
SV-40-GSGS	GSGSPKKRKV (SEQ ID NO: 39)
SV-40-MCS-GSGS	TGGGPGGGAAAGSGSPKKRKV (SEQ ID NO: 40)
Нуклеоплазмин-GSGS	GSGSKRPAATKKAGQAKKKK (SEQ ID NO: 41)
Каркас	Последовательности
Каркас SluCas9 варианта_5	GUUUCAGUACUCUGGAAACAGAAUCUACUGAAACAAGACAAU AUGUCGUGUUUAUCCCAUCAAUUUUUAUUGGUGGGAU (SEQ ID NO: 922)
Каркас SluCas9 варианта_2	GTTTAAGTACTCTGTGCTGGAAACAGCACAGAATCTACTTAAAC AAGGCAAAATGCCGTGTTTATCTCGTCAACTTGTTGGCGAGA (SEQ ID NO: 500)

Последовательности выбранных праймеров, использованных для амплификации конкретного локуса человека, содержащего сайты онРНК, показаны в **таблице 9**.

Таблица 9:

Название	Последовательность
MiSeq_hE45_F	TCGTCCGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGTCTTTCTG TCTTGTATCCTTTGG (SEQ ID NO: 724)
MiSeq_hE45_R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGAATGTTA GTGCCTTTCACCC (SEQ ID NO: 725)
TIDE_hE45_F*	GTCTTTCTGTCTTGTATCCTTTGG (SEQ ID NO: 726)

*TIDE_hE45_F используется для секвенирования по Сэнгеру.

5. Результаты

Набор онРНК, обнаруженных в гене DMD, был выбран для оценки частоты и профиля инделей. Среди этой выборки 27 онРНК были расположены в экзоне 45, 39 онРНК были расположены в экзоне 51 и 29 онРНК были расположены в экзоне 53. Чтобы оценить частоту инделей и профили редактирования, трансфекцию плазмидами проводили в линиях клеток HEK293FT (**Фиг. 6В**) и Neuro-2a (**Фиг. 6Д**). Средняя частота инделей онРНК, нацеленных на экзон 45, была определена в клетках HEK293FT (**Фиг. 6В**) и в клетках Neuro-2a (**Фиг. 6Д**) с высокоэффективной онРНК SpCas9 (E45Sp52), включенной в качестве эталона. Из них 20 пар онРНК показали среднюю общую частоту делеций выше 60%, а 9 пар онРНК показали среднюю точную частоту делеций сегментов выше 50% в клетках

293FT. Пять онРНК, протестированных на линии клеток Neuro-2a, показали среднюю точную частоту делеции сегментов выше 40% (**Фиг. 6D**). Что касается профиля инделей, было обнаружено, что пары онРНК E45SaKKH10/20, E45Slu21/7 и E45Slu18/4 имеют самый высокий процент точной делеции сегментов, которая может привести к потенциальному изменению рамки считывания экзонов в клетках 293FT (**Фиг. 6B**), и пары онРНК E45SaKKH10/23, было обнаружено, что E45Slu17/22, E45Slu17/23 и E45Slu19/21 имеют самый высокий процент точной делеции сегментов, которая может привести к потенциальному изменению рамки считывания экзона в клетках Neuro-2a (**Фиг. 6D**). В **таблице 10** показаны SEQ ID NO, соответствующие идентификаторам онРНК на **Фиг. 6B** и **6C**.

Таблица 10:

Идентификатор онРНК на некоторых фигурах, включая Фиг. 6 и Фиг. 8	SEQ ID NO
SaCas9: 2 и 7	10 и 15
SaCas9: 2 и 8	10 и 16
SaCas9: 4 и 8	12 и 16
SaCas9-KKH: 2 и 9	1001 и 1005
SaCas9-KKH: 2 и 26	1001 и 15
SaCas9-KKH: 2 и 27	1001 и 16
SaCas9-KKH: 7 и 9	1003 и 1005
SaCas9-KKH: 27 и 7	16 и 1003
SaCas9-KKH: 10 и 16	12 и 1010
SaCas9-KKH: 10 и 18	12 и 1012
SaCas9-KKH: 10 и 20	12 и 1013
SaCas9-KKH: 10 и 23	10 и 1016
SaCas9-KKH: 24 и 9	1017 и 1005
SaCas9-KKH: 24 и 27	1017 и 16
SaCas9-KKH: 25 и 27	1018 и 16
SluCas9: 21 и 7	148 и 134
SluCas9: 22 и 8	149 и 135
SluCas9: 23 и 8	150 и 135
SluCas9: 4 и 9	131 и 136
SluCas9: 24 и 9	151 и 136
SluCas9: 12 и 4	139 и 131
SluCas9: 12 и 24	139 и 151
SluCas9: 13 и 4	140 и 131

SluCas9: 13 и 24	140 и 151
SluCas9: 14 и 21	141 и 148
SluCas9: 17 и 22	144 и 149
SluCas9: 17 и 23	144 и 150
SluCas9: 18 и 4	145 и 131
SluCas9: 18 и 24	145 и 151
SluCas9: 19 и 21	146 и 148
SaCas9-4	12
SluCas9-24	151
EX-145	Контроль SpCas9 (ATCTTACAGGAACTCCAGGA) (SEQ ID NO: 727)

Пример 5: Тестирование каркасных последовательностей онРНК

1. Материалы и методы

Первичные миобласты скелетных мышц человека (HsMM; Lonza CC-2580: партия № 20TL070666, P0) выделяли и пассировали в базальной среде для миобластов скелетных мышц SkBM®-2 плюс SkGM®-2 SingleQuots (CC-3246, CC-3244; Lonza). в инкубаторе при 37°C с 5% CO₂. Когда культура HsMM достигала приблизительно от 80% до 90% конфлюэнтности и активно пролиферировала, клетки собирали для доставки рибонуклеопротеина SluCas9 (РНП). После оттаивания клетки однократно пассировали перед доставкой РНП SluCas9.

Для формирования РНП SluCas9 соответствующее количество синтетической онРНК (Synthego: SO# 7292552) и рекомбинантного белка SluCas9 (Aldevron: партия № M22536-01) смешивали с добавленным раствором для нуклеофекции первичных клеток P5 (Lonza V4XP-5032). Всего было протестировано три дозы онРНК:SluCas9, включая низкую дозу с соотношением 37,5 пмоль:6,25 пмоль, среднюю дозу 75 пмоль:12,5 пмоль и высокую дозу 150:25. Белки онРНК и SluCas9 инкубировали не менее 10 минут при комнатной температуре для образования РНП Cas9-онРНК.

Пока формировался РНП SluCas9, HsMM промывали забуференным солевым раствором NEPES, отделяли от колб с тканевой культурой трипсином и центрифугировали при 90хg в течение 10 минут. Осадки клеток ресуспендировали в свежей, предварительно нагретой, полной ростовой среде. Подсчитывали количество клеток. Соответствующее количество клеток переносили в новую центрифужную пробирку, осаждали центрифугированием при 90хg в течение 10 минут и ресуспендировали в дополненном растворе для нуклеофекции. Около 200000 клеток в 15 мкл раствора для нуклеофекции смешивали с примерно 7 мкл предварительно сформированного комплекса РНП SluCas9:онРНК.

Приблизительно 20 мкл смеси клеток и РНП переносили в 16-луночную пробирку

для нуклеофекции и затем подвергали нуклеофекции с использованием программы DS-158 в 4D-Nucleofector (Lonza). Сразу после нуклеофекции в каждую кювету для нуклеофекции добавляли около 80 мкл предварительно подогретой среды и инкубировали при 37° в течение 10 минут. Содержимое (100 мкл) каждой кюветы для нуклеофекции переносили в одну лунку 12-луночного планшета, заполненного 2 мл среды, и инкубировали при 37°C в течение 48 часов.

Для определения жизнеспособности клеток через 48 часов после нуклеофекции клетки окрашивали Hoechst и йодидом пропидия (Life Technologies). Затем жизнеспособность клеток оценивали с помощью ImageXpress Micro (Molecular Devices). Как правило, образцы с общей жизнеспособностью клеток выше 70% собирали и анализировали для анализа инделей.

Для выделения геномной ДНК из HsMM клетки промывали солевым раствором, трипсинизировали и центрифугировали. Осадки клеток обрабатывали буфером для лизиса из набора Maxwell RSC Blood DNA Kit (Promega, № AS1400), а геномные ДНК экстрагировали с использованием инструмента Maxwell® RSC48 (Promega, № AS8500) в соответствии с инструкциями производителя. Концентрации геномных ДНК определяли с использованием набора для анализа двухцепочечной ДНК Qubit™ 1x HS (Thermo Fisher Scientific, Q33231) в соответствии с инструкциями производителя.

Чтобы определить эффективность редактирования генов, геномные ДНК амплифицировали с использованием праймеров, фланкирующих геномную область экзона 45 DMD. Использовали следующие последовательности праймеров: MiSeq_hE45_F TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGgtctttctgtctgtatcctttgg (SEQ ID NO: 724) и MiSeq_hE45_R GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGaatgttagtcctttcaccc (SEQ ID NO: 725). Размер ампликонов подтверждали анализом небольшого количества ПЦР-продуктов на 2% E-Gel (Thermo Fisher Scientific). Затем часть ПЦР-продукта и прямой праймер отправили на секвенирование по Сэнгеру в Genewiz.

Результаты секвенирования, которые прошли через фильтр по качеству, использовали для определения эффективности редактирования и профиля инделей с использованием алгоритма TIDE (отслеживание инделей с помощью DEcomposition). Для анализа использовали следующую версию алгоритма <https://shiny.vrtx.com/app/orrj/tide/> с соответствующей последовательностью онРНК, параметрами анализа по умолчанию и образцом, который подвергли ложной нуклеофекции, в качестве контроля. Процент других вставок и делеций, которые потенциально могут восстановить рамку считывания конкретных представляющих интерес мутаций пациентов с DMD, был обозначен как «Другие RF». Это представляет собой сумму делеций в 2, 5, 8, 11 п.н. в пределах окна выравнивания от -20 п.н. до +20 п.н. вокруг сайта рестрикции Cas9. Эффективность редактирования (% мутации) выводится для +1 п.н. вставки, RF. Затем для построения графика других инделей из TIDE использовали программу Prism 9.

2. Результаты

Для оптимизации и повышения эффективности редактирования генов лучших кандидатов на одиночную направляющую РНК SluCas9 (онРНК) различные каркасные последовательности онРНК были протестированы в первичных миобластах скелетных мышц человека (HsMM) с использованием синтетических онРНК, как показано в **таблице 11** ниже. Были протестированы две спейсерные последовательности: E45SL23 (SEQ ID NO: 150 (ДНК); SEQ ID NO: 930 (РНК)) и E45SL24 (SEQ ID NO: 151 (ДНК); SEQ ID NO: 931 (РНК)). Были протестированы три каркасные последовательности: Slu-VCGT-4.5 (SEQ ID NO: 601 (ДНК); SEQ ID NO: 918 (РНК)), Slu-VCGT-4 (SEQ ID NO: 917 (ДНК); SEQ ID NO: 919 (РНК)), Slu-VCGT-5 (SEQ ID NO: 901 (ДНК); SEQ ID NO: 920 (РНК)).

Таблица 11: Иллюстративные онРНК для тестирования

онРНК, ID	Каркас (SEQ ID NO РНК)	Каркас (версия РНК)	Спейсер SEQ ID NO	Спейсер (версия РНК)	SEQ ID NO онРНК	Последовательность онРНК
E45SL23- VCGT- 4.5	Slu-VCGT- 4.5 (SEQ ID NO: 918)	GUUUAAGUAC UCUGUGCUGG AAACAGCACA GAAUCUACUG AAACAAGACA AUAUGUCGUG UUUAUCCCAU CAAUUUAUUG GUGGGA	930	GGUAUCU UACAGGA ACUCCAG G	924	GGUAUCUUACAGG AACUCCAGGGUUU AAGUACUCUGUGC UGGAAACAGCACA GAAUCUACUGAAA CAAGACAAUAUGU CGUGUUUAUCCCAU CAAUUUAUUGGUG GGA
E45SL24- VCGT- 4.5	Slu-VCGT- 4.5 (SEQ ID NO: 919)	GUUUAAGUAC UCUGUGCUGG AAACAGCACA GAAUCUACUG AAACAAGACA AUAUGUCGUG UUUAUCCCAU CAAUUUAUUG GUGGGA	931	UUUUGGU AUCUUAC AGGAACU C	925	UUUUGGUAUCUUA CAGGAACUCGUUU AAGUACUCUGUGC UGGAAACAGCACA GAAUCUACUGAAA CAAGACAAUAUGU CGUGUUUAUCCCAU CAAUUUAUUGGUG GGA
E45SL23- VCGT-4	Slu-VCGT-4 (SEQ ID NO: 920)	GUUUCAGUAC UCUGUGCUGG AAACAGCACA GAAUCUACUG AAACAAGACA AUAUGUCGUG UUUAUCCCAU	930	GGUAUCU UACAGGA ACUCCAG G	926	GGUAUCUUACAGG AACUCCAGGGUUUC AGUACUCUGUGCU GGAAACAGCACAG AAUCUACUGAAAC AAGACAAUAUGUC GUGUUUAUCCCAUC

		CAAUUUAUUG GUGGGAU				AAUUUAUUGGUGG GAU
E45SL24- VCGT-4	Slu-VCGT-4 (SEQ ID NO: 921)	GUUUCAGUAC UCUGUGCUGG AAACAGCACA GAAUCUACUG AAACAAGACA AUAUGUCGUG UUUAUCCCAU CAAUUUAUUG GUGGGAU	931	UUUUGGU AUCUUAC AGGAACU C	927	UUUUGGUAUCUUA CAGGAACUCGUUUC AGUACUCUGUGCU GGAAACAGCACAG AAUCUACUGAAAC AAGACAAUAUGUC GUGUUUAUCCCAUC AAUUUAUUGGUGG GAU
E45SL23- VCGT-5	Slu-VCGT-5 (SEQ ID NO: 922)	GUUUcAGUAC UCUGGAAACA GAAUCUACUG AAACAAGACA AUAUGUCGUG UUUAUCCCAU CAAUUUAUUG GUGGGAU	930	GGUAUCU UACAGGA ACUCCAG G	928	GGUAUCUUACAGG AACUCCAGGGUUUc AGUACUCUGGAAA CAGAAUCUACUGA AACAAGACAAUAU GUCGUGUUUAUCCC AUCAAUUUAUUGG UGGGAU
E45SL24- VCGT-5	Slu-VCGT-5 (SEQ ID NO: 923)	GUUUcAGUAC UCUGGAAACA GAAUCUACUG AAACAAGACA AUAUGUCGUG UUUAUCCCAU CAAUUUAUUG GUGGGAU	931	UUUUGGU AUCUUAC AGGAACU C	929	UUUUGGUAUCUUA CAGGAACUCGUUUc AGUACUCUGGAAA CAGAAUCUACUGA AACAAGACAAUAU GUCGUGUUUAUCCC AUCAAUUUAUUGG UGGGAU

Три каркасные последовательности различаются идентичностью нуклеотидов и, таким образом, в структуре «петля-на-стебле» I во вторичной структуре РНК (**Фиг. 7А**). Помимо различий в структуре «петля-на-стебле» I, у Slu-VCGT-4.5 отсутствует последний нуклеотид U на 3'-конце стебля 3 (не показано). Результаты демонстрируют, что каркас Slu-VCGT-5 обеспечивает более высокую эффективность редактирования по сравнению с направляющими молекулами с каркасом V4 или V4.5 для большинства протестированных условий (показано на **Фиг. 7В**).

Пример 6

1. Материалы и методы

Трансфекция клеток HEK293FT

Клетки 293FT трансфицировали в 12-луночных планшетах с 750 нг плазмиды+2,25

мкл липофектамина 2000. Через три дня после трансфекции клетки обрабатывали трипсином и сортировали по GFP. GFP-положительные клетки сортировали непосредственно в буфере для лизиса, и экстракцию ДНК проводили с использованием набора ДНК крови Promega Maxwell RSC. Затем на ДНК проводили ПЦР с использованием экзон-специфических праймеров, нацеленных на соответствующий сайт рестрикции.

Трансфекция клеток N2a

Клетки N2a (Neuro2a) трансфицировали в 12-луночных планшетах после 24-часового роста 1000 нг плазмиды+3 мкл липофектамина 2000. Через три дня после трансфекции клетки обрабатывали трипсином и сортировали по GFP (зеленый флуоресцентный белок). GFP-положительные клетки сортировали с помощью FACS (сортировки флуоресцентно-активированных клеток) непосредственно в буфере для лизиса, а экстракцию ДНК проводили с использованием набора ДНК крови Promega Maxwell RSC. Затем на ДНК проводили ПЦР с использованием экзон-специфических праймеров, нацеленных на соответствующий сайт рестрикции.

Подготовка библиотеки для глубокого секвенирования ампликонов для клеток HEK293FT

Геномную ДНК экстрагировали после сортировки 100 тыс. GFP-положительных клеток и подвергали амплификации локус-специфическим ампликоном. Амплифицированные продукты очищали с помощью частиц AMPure (0,8x) с последующим контролем качества с 1% E-Gel, а концентрации измеряли с использованием QuBiT для нормализации образцов. Баркодирование методом ПЦР проводили с индексами i5 и i7, и их очищали с помощью 0,7x AMPure гранул с последующим контролем качества с TapeStation или 1% E-Gel. Затем баркодированные образцы измеряли с помощью QuBiT, и в зависимости от концентрации образцы объединяли и подвергали подготовке библиотеки для загрузки в MiSeq. 8 пМ библиотеки загружали с добавлением 20% PhiX, а результат передавали специалистам по вычислительной геномике для оценки эффективности внесения инделей для направляющих молекул.

Культура первичных миобластов скелетных мышц (HsMM) человека

В нулевой день два замороженных флакона с HsMM (партия 20TL070666) оттаивали и клетки выращивали в полной ростовой среде в термостате с контролем влажности при 37°C, 5% CO₂ в двух колбах T75. На следующий день, на 1-й день, среду заменили. На 3-й день клетки пассировали таким образом, чтобы было 9×10 клеток, высеянных в 7 колб T175. На 4-й день в каждой колбе среду меняли. На 6-е сутки проводили нуклеофекцию РНП.

Нуклеофекция клеток HsMM

Клетки HsMM подвергали нуклеофекции РНП с использованием нуклеофектора Lonza 4D. Для каждого образца 7 мкл РНП объединяли с 0,3еб клеток в 15 мкл раствора Р5. РНП готовили в соотношении нРНК:Cas9 6:1 при различных концентрациях. Для образцов с двойным разрезом, которые содержат 2 нРНК, РНП сначала предварительно получали с одиночной нРНК. РНП получали путем инкубации нРНК и белка в течение 20 мин при комнатной температуре. После электропорации к каждому образцу добавляли 80 мкл

полной питательной среды и образцы инкубировали в термостате с контролем влажности при 37°C, 5% CO₂. Через 10 минут образцы переносили в 12-луночные планшеты, содержащие 2 мл полной питательной среды, предварительно уравновешенной в термостате с контролем влажности при 37°C, 5% CO₂.

Сбор клеток и экстракция ДНК

Для определения жизнеспособности клеток через 48 часов после нуклеофекции клетки окрашивали Hoechst и йодидом пропидия (Life Technologies). Затем жизнеспособность клеток оценивали с помощью ImageXpress Micro (Molecular Devices). Как правило, образцы с общей жизнеспособностью клеток выше 70% собирали и анализировали для анализа инделей. Для выделения геномной ДНК из HsMM клетки промывали солевым раствором, трипсинизировали и центрифугировали. Осадки клеток обрабатывали буфером для лизиса из набора Maxwell RSC Blood DNA Kit (Promega, № AS1400), а геномные ДНК экстрагировали с использованием инструмента Maxwell® RSC48 (Promega, № AS8500) в соответствии с инструкциями производителя. Концентрации геномных ДНК определяли с использованием набора для анализа двухцепочечной ДНК Qubit™ 1x HS (Thermo Fisher Scientific, Q33231) в соответствии с инструкциями производителя.

Получение библиотеки глубокого секвенирования ампликонов для HsMM

Чтобы определить эффективность редактирования генов, геномные ДНК амплифицировали с использованием праймеров, фланкирующих геномную область экзона 45 DMD. Использовали следующие последовательности праймеров: MiSeq_hE45_F TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGgtctttctgtctgtatcctttgg (SEQ ID NO: 724) и MiSeq_hE45_R GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGaatgttagtcctttcaccc (SEQ ID NO: 725). Размер ампликонов подтверждали анализом небольшого количества ПЦР-продуктов на 2% E-Gel (Thermo Fisher Scientific). ПЦР-продукт очищали с помощью частиц AMPure XP (A63881). Очищенный ПЦР-продукт снова амплифицировали с праймерами, содержащими баркоды и адаптеры Illumina. Несколько баркодированных образцов были объединены, комбинированы с библиотекой PhiX и загружены на платформу Illumina MiSeq. Набор реагентов MiSeq v3 (MS-102-3003) использовали для проведения анализа на 600 циклов.

Поддержание и дифференцировка миотрубочек C2C12

C2C12 поддерживают в среде DMEM с добавлением 10% FBS (эмбриональной бычьей сыворотки) и 1% пен./стрепт. Для целей культивирования клетки не должны достигать > 75% конфлюэнтности. Миобласты C2C12 дифференцируются в DMEM с добавлением 2% HS и 1% пен./стрепт. Вкратце, клетки высевают при 42-45 тыс./см² и начинают дифференцировку через 24 часа после посева (как только клетки достигают ~ 90-95% конфлюэнтности). Среду для дифференцировки заменяют в 1-й день, а затем обновляют через день.

Трансдукция миотрубочек C2C12

Миобластам C2C12 давали возможность дифференцироваться в миотрубочки в среде для дифференцировки (DMEM с 2% лошадиной сывороткой и 1% пен./стрепт.) в течение 6 дней. За два часа до вирусной трансдукции миотрубочки обрабатывали нейраминидазой типа III (Sigma-Aldrich, 50 мЕд/мл) с последующим двукратным промыванием средой для дифференцировки. Миотрубочки инкубировали с AAV (MOI 1.0E7) и центрифугировали при 1000xg при 4°C в течение 1,5 часов. После трансдукции путем центрифугирования вирус аспирируют и миотрубочки однократно промывают холодным PBS, а затем дважды промывают средой для дифференцировки. Миотрубочки культивируют в среде для дифференцировки в течение дополнительной недели (7 дней) перед тем, как их собирают для анализа инделей (ICE/NGS) или фиксируют для иммуногистохимического анализа (ИHC). Экстракцию ДНК/РНК проводили с использованием набора Qiagen AllPrep DNA/RNA Minikit.

Ядерная локализация Cas9 с помощью иммуофлуоресцентного окрашивания миотрубочек C2C12

Через 7 дней после трансдукции AAV (12-й день дифференцировки миотрубочек) миотрубочки C2C12 фиксировали 4% параформальдегидом (PFA) в течение 20 минут при комнатной температуре (КТ). После фиксации клетки дважды промывали PBS с последующей пермеабиллизацией PBS-0,5% Тритона в течение 15 минут при комнатной температуре. Перед инкубацией с первичными антителами клетки инкубировали с блокирующим буфером в течение 30 мин при комнатной температуре (PBS+10%FBS+0,1% тритона). Затем клетки инкубировали с первичными антителами в блоке в течение 2 часов при комнатной температуре (или в течение ночи при 4°C) с последующими 3 промывками PBS-Твин 0,1%. Вторичные антитела добавляют на 1,5-2 часа при комнатной температуре. Антитела для этих исследований перечислены в **таблице 12**:

Таблица 12:

<u>Первичные антитела</u>	<u>Хозяин</u>	<u>Разведение</u>
SluCas9 (GenScript 11E3A9-1)	Мышь	1:100
SaCas9 (Diagenode C15200230-100)	Мышь	1:400
MyoG	Кролик	1:200
Вторичные антитела	Хозяин	Разведение
Антимышиное 488		1:500
Антикроличье 594		1:500

Количественный анализ векторного генома

Количественную полимеразную цепную реакцию (кПЦР) использовали для количественного определения уровней ДНК AAV9 в дифференцированных клетках C2C12. гДНК экстрагировали с использованием набора Qiagen AllPrep, количественно определяли с помощью флуорометра Qubit 4 и разводили до конечной концентрации 2,5 нг/мкл.

Абсолютную количественную оценку векторов AAV9 выполняли путем построения стандартной кривой, полученной из линейаризованных плазмид известного качества,

кодирующих представляющую интерес область. Набор для контроля качества (QC) был включен для проверки методов количественного определения. Набор контрольных образцов без матрицы (NTC) был включен для подтверждения специфичности реакций.

Реакции кПЦР проводили в трех повторностях с использованием системы для ПЦР в реальном времени QuantStudio 6 Flex (Thermo Fisher). Линейный регрессионный анализ был выполнен с использованием значений порогового цикла (Ct) стандартной кривой. Из этой линейной регрессии значения Ct образцов использовали для количественного определения количества копий на мкг гДНК AAV9, присутствующих в каждом образце.

Экспрессия трансгена Cas9 и онРНК

Полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией (ОТ-кПЦР) использовали для количественного определения уровней мРНК Cas9 и экспрессии нРНК в дифференцированных клетках C2C12. РНК экстрагировали с использованием набора Qiagen AllPrep, выделенную РНК определяли количественно с помощью флуорометра Qubit 4 и разводили до конечной концентрации 20 нг/мкл. Абсолютное количественное определение нРНК и мРНК Cas9 выполняли путем построения стандартной кривой, полученной на основе транскрипта T7 известного качества, кодирующего соответствующую представляющую интерес область. Набор для контроля качества (QC) был включен для проверки методов количественного определения. Набор контрольных образцов без матрицы (NTC) был включен для подтверждения специфичности реакций.

Реакции ОТ-кПЦР проводили в трех повторностях с использованием системы для ПЦР в реальном времени QuantStudio 6 Flex (Thermo Fisher). Линейный регрессионный анализ был выполнен с использованием значений порогового цикла (Ct) стандартной кривой. Из этой линейной регрессии значения Ct образцов использовали для количественного определения количества копий на мкг РНК либо мРНК Cas9, либо нРНК, присутствующих в образцах.

Получение библиотеки глубокого секвенирования ампликонов для C2C12

гДНК выделяли с помощью набора Qiagen AllPrep. Соответствующий локус экзона 45 мышиногo Dmd амплифицировали с помощью ПЦР, а амплифицированные продукты очищали с помощью частиц AMPure (0,8x) с последующим контролем качества с использованием 1% E-Gel. Концентрации ДНК измеряли с помощью QuBiT для нормализации образцов, и библиотеки секвенирования Illumina были получены из этих ПЦР-продуктов с использованием набора реагентов MiSeq v3 (600 циклов).

Анализ данных секвенирования нового поколения

Для обработки данных секвенирования Illumina использовали специально разработанный биоинформатический процесс. Во-первых, были удалены прочтения низкого качества. Прочтения, которые прошли фильтр качества, были обрезаны с помощью Trimmomatic для удаления адаптеров и оснований низкого качества. Затем прочтения, сопоставленные с геномом PhiX, были удалены, а парно-концевые прочтения были объединены с использованием PEAR. На основе ожидаемых сайтой рестрикции, соответствующих двум направляющим молекулам, были созданы три эталонные

последовательности ампликонов - ампликон дикого типа, ампликон с делецией, т.е. с делецией между сайтами рестрикции для двух направляющих молекул и ампликон с инверсией, т.е. с инверсией последовательности между двумя сайтами рестрикции для двух направляющих молекул. Объединенные прочтения были назначены одному из трех ампликонов (дикий тип, делеция, инверсия) на основе оценки выравнивания, полученной с помощью алгоритма Нидлмана - Вунша, реализованного в ParasailNeedle. Строка CIGAR, представленная алгоритмом выравнивания, была проанализирована для определения последовательности событий инделей. Сводная таблица событий инделей и их частоты была дополнена информацией о длине экзона, каркасе экзона и положении преждевременного стоп-кодона, введенного в результате мутации, вызывающей заболевание DMD, чтобы охарактеризовать Cas9-ассоциированные события инделей как продуктивные (например, точная делеция, RF +1, другая RF, пропуск экзона) или непродуктивные (например, ОЕ) (таблица 13). На протяжении всего этого процесса применялся строгий набор критериев QQC для фильтрации образцов низкого качества. (Таблица 13).

Таблица 13:

Группа инделей	График упорядочения по рангу	Определение
Ампликон дикого типа		
NE	1	вставка = 0 и делеция = 0
RF +1	2	1-нт вставка для направляющей молекулы для изменения рамки считывания
Другие RF	3	делеция $3n+1$ в пределах границ экзона для одиночной направляющей молекулы для изменения рамки считывания отсутствие редактирования направляющей молекулой к экзону
		агрегированная делеция $3n+1$ в пределах границы экзона для двух направляющих молекул для изменения рамки считывания
		< 17-нт вставка для одиночной направляющей молекулы для изменения рамки считывания отсутствие редактирования направляющей молекулой к экзону
		< 17-нт агрегированная вставка $3n+1$ для двух направляющих молекул для изменения рамки считывания
Пропуск	4	инделы перекрываются с акцептором сплайсинга (AG)

экзона		(5'-конец целевого экзона)
		Делеция с ≥ 9 -нуклеотидным перекрытием с окном сплайсинга для одной из двух направляющих молекул
		вставка точно в сайты сплайсинга GT/AG и длиной ≥ 9 нуклеотидов для одной из двух направляющих молекул
ОЕ	5	Другие инделы
Ампликон с делецией		
Точная делеция	1	делеция сегментов между двумя сайтами рестрикции
(Остальные)	2	Профилирование инделей одиночного разрыва с фазой 3n
Ампликон с инверсией		
ОЕ	1	все инделы

Животные и дизайн исследования

Это исследование было разработано для оценки универсальных векторов для редактирования генов, которые были созданы для включения как онРНК, так и эндонуклеазы Cas9 для опосредования редактирования генов в локусе DMD. В этом исследовании эффективность одновекторных редактирующих гены кандидатов оценивали *in vivo* путем измерения восстановления дистрофина, редактирования целевых генов, тканевых векторных геномов и экспрессии трансгенов Cas9 и онРНК после внутрибрюшинного введения мышам dEx44 на 4-й или 5-й день после рождения.

В таблице 14А описан дизайн исследования *in vivo*:

Группа, №	Линия мышей	Возраст	Исследуемое соединение	Конфигурация вектора исследуемого соединения	Кол-во животных	Доза (гв/кг)	Сбор и анализ образцов
1	ДТ	PND4- PND5	Носитель	Н/Д	6	Н/Д	Сбор тканей через 4 недели после введения дозы Соберите: сердце, переднюю большеберцовую мышцу, квадрицепсы, трицепсы,
2	ΔEx44				6	Н/Д	
3			EX-145	AAV9-Cas9 : AAV9-M-sgRNA-145	8	1×10^{14} : 1×10^{14}	
4			AAV9-E45S124	Slu24:2XNLS:7S K-H1m	8	2×10^{14}	
5			AAV9-vVT046	Slu18/4:2XNLS+	8	2×10^{14}	

			:hU6-hU6			диафрагму и печень
6		AAV9-vVT047	Slu18/4:3XNLS: hU6-hU6	8	2×10^{14}	Анализы: восстановление дистрофина,
7		AAV9-vVT048	Slu18/4:3XNLS: hU6-7SK	8	2×10^{14}	целое редактирование
8		AAV9-vVT052	Slu21/7:2XNLS+ :7SK-H1m	8	2×10^{14}	генов, экспрессия белка Cas9, количество копий
9		AAV9-vVT054	Slu24:3XNLS:7S K-H1m	8	2×10^{14}	векторного генома и экспрессия
10		AAV9-vVT049	Slu18/4:3XNLS: H1m-M11	8	2×10^{14}	трансгена в выбранных тканях
11		AAV9-vVT050B	Slu18/4:3XNLS: 7SK- H1m	8	2×10^{14}	
13		AAV9-vVT051	Slu18/4:2XNLS+ :7SK- H1m	8	2×10^{14}	
14		AAV9-vVT053B	SaKKH10/20:2X NLS+:7SK- H1m	8	2×10^{14}	

ДТ = дикий тип

PND4-PND5 = с 4-го по 5-й день после родов

Н/Д = нет данных

Подготовка библиотеки глубокого секвенирования ампликонов для исследования *in vivo*

ДНК экстрагировали из ткани сердца, квадрицепса и трицепса мышцы с использованием набора Maxwell RSC Tissue DNA Kit и количественно определяли с помощью Qubit. Соответствующий локус экзона 45 гена DMD мышцы амплифицировали с помощью ПЦР. ПЦР-продукты визуализировали с помощью E-Gel и TapeStation для подтверждения правильного размера и очищали с использованием частиц AMPure XP. Затем ПЦР-продукты подвергались второй реакции ПЦР для добавления уникальных 5' и 3' баркодов, соответствующих каждому образцу. Эти ПЦР-продукты количественно определяли с помощью Qubit и нормализовали до 4 нМ каждый. Затем нормализованные продукты объединяли, комбинировали с библиотекой PhiX для увеличения разнообразия и загружали в прибор MiSeq. Библиотеку секвенировали с использованием набора реагентов MiSeq v3 (600 циклов), а необработанные данные передали специалистам DCS.

Анализ данных секвенирования нового поколения для исследования *in vivo*

Для обработки данных секвенирования Illumina использовали специально разработанный биоинформатический процесс. Во-первых, были удалены прочтения низкого качества (ниже Q30). Сохранившиеся прочтения были обрезаны с помощью

Trimmomatic для удаления адаптеров и оснований низкого качества. Затем прочтения, сопоставленные с геномом PhiX, были удалены, а парно-концевые прочтения были объединены с использованием PEAR. На основе ожидаемых сайтой рестрикции, соответствующих двум направляющим молекулам, были созданы три эталонные последовательности ампликонов - ампликон дикого типа, ампликон с делецией, т.е. с делецией между сайтами рестрикции для двух направляющих молекул и ампликон с инверсией, т.е. с инверсией последовательности между двумя сайтами рестрикции для двух направляющих молекул. Объединенные прочтения были назначены одному из трех ампликонов (дикий тип, делеция, инверсия) на основе оценки выравнивания, полученной с помощью алгоритма Нидлмана - Вунша, реализованного в ParasailNeedle. Строка CIGAR, представленная алгоритмом выравнивания, была проанализирована для определения последовательности событий инделей. Сводная таблица событий инделей и их частоты была дополнена информацией о длине экзона, каркасе экзона и положении преждевременного стоп-кодона, введенного в результате мутации, вызывающей заболевание DMD, чтобы охарактеризовать Cas9-ассоциированные события инделей как продуктивные (например, точная делеция, RF +1, другая RF, пропуск экзона) или непродуктивные (например, ОЕ) (таблица 1). На протяжении всего этого процесса применялся строгий набор критериев контроля качества для фильтрации образцов низкого качества, и все образцы проверялись на наличие потенциального загрязнения от других групп лечения в том же исследовании.

2. Результаты

Скрининг вызывающих двойной разрыв онРНК in vitro

Средняя частота инделей для онРНК, нацеленных на экзон 45, была протестирована на первичных миобластах скелетных мышц человека (HsMM) (Фиг. 8) с высокоэффективной онРНК SpCas9 (E45Sp52), включенной в качестве эталона. Каждая из пяти оцененных пар онРНК SluCas9 показала среднюю точную частоту делеции сегментов выше 60% (Фиг. 8). Последовательности спейсеров для направляющих РНК, использованные на Фиг. 8 (то есть, 18, 4, и 18+4; 21, 7, и 21+7; 17, 22, и 17+22; 17, 23 и 17+23; и 19, 21, и 19+21) показаны в таблице 10.

Средняя частота инделей для онРНК, нацеленных на экзон 51, была определена в клетках HEK293FT (Фиг. 9), которая демонстрирует частоту инделей выше 50% и среднюю точную частоту делеций сегментов выше 50% для E51SaKKH20/9, E51SaKKH20/27, E51SL10/3, E51SL31/5, E51SL31/7, E51SL31/8, E51SL10/16, E51SL23/31 и E51SL10/24 в клетках HEK293FT. В таблице 14В показаны идентификатор онРНК и последовательность спейсера для каждой пары онРНК, показанной на Фиг. 9, где пары, показанные на оси X на Фиг. 9 (например, 2+6), находятся внутри идентификатора онРНК в качестве последнего символа каждого элемента (например, E51Sa2_E51Sa6).

Таблица 14В:

онРНК, ID	Последовательность протоспейсеров (запятая разделяет два спейсера)
-----------	--

E51Sa2_E51Sa6	GTTGTGTCACCAGAGTAACAG (SEQ ID NO: 20), TTGATCAAGTTATAAAATCACA (SEQ ID NO: 24)
E51SaCas9KKH4_E51SaCas9KKH43	ATGATCATCTCGTTGATATCCT (SEQ ID NOS: 1022, 2031), TAGCTCCTACTCAGACTGTTAC (SEQ ID NO: 1055)
E51SaCas9KKH20_E51SaCas9KKH5	CCACAGGTTGTGTCACCAGAGT (SEQ ID NO: 1037), AAGGTCACCCACCATCACCTC (SEQ ID NO: 1023)
E51SaCas9KKH43_E51SaCas9KKH6	TAGCTCCTACTCAGACTGTTAC (SEQ ID NO: 1055), ATCACCTCTGTGATTTTATAA (SEQ ID NO: 1024)
E51SaCas9KKH43_E51SaCas9KKH7	TAGCTCCTACTCAGACTGTTAC (SEQ ID NO: 1055), ATAACTTGATCAAGCAGAGAAA (SEQ ID NO: 1025)
E51SaCas9KKH20_E51SaCas9KKH9	CCACAGGTTGTGTCACCAGAGT (SEQ ID NO: 1037), ATCAAGCAGAGAAAGCCAGTCG (SEQ ID NO: 1027)
E51SaCas9KKH10_E51SaCas9KKH43	CAGTCGGTAAGTTCTGTCCAAG (SEQ ID NO: 1028), TAGCTCCTACTCAGACTGTTAC (SEQ ID NO: 1055)
E51SaCas9KKH11_E51SaCas9KKH43	GTAAGTTCTGTCCAAGCCCGGT (SEQ ID NO: 1029), TAGCTCCTACTCAGACTGTTAC (SEQ ID NO: 1055)
E51SaCas9KKH12_E51SaCas9KKH20	AGCCCGGTTGAAATCTGCCAGA (SEQ ID NOS: 1030, 2041), CCACAGGTTGTGTCACCAGAGT (SEQ ID NO: 1037)
E51SaCas9KKH13_E51SaCas9KKH20	AGCAGGTACCTCCAACATCAAG (SEQ ID NOS: 1031, 2043), CCACAGGTTGTGTCACCAGAGT (SEQ ID NO: 1037)
E51SaCas9KKH14_E51SaCas9KKH20	CAACATCAAGGAAGATGGCATT (SEQ ID NO: 1032), CCACAGGTTGTGTCACCAGAGT (SEQ ID NO: 1037)
E51SaCas9KKH20_E51SaCas9KKH27	CCACAGGTTGTGTCACCAGAGT (SEQ ID NO: 1037), TCAACGAGATGATCATCAAGCA (SEQ ID NOS: 1042, 2060)
E51SaCas9KKH20_E51SaCas9KKH28	CCACAGGTTGTGTCACCAGAGT (SEQ ID NO: 1037), GTGACCTTGAGGATATCAACGA (SEQ ID NO: 1043)
E51SaCas9KKH20_E51SaCas9KKH29	CCACAGGTTGTGTCACCAGAGT (SEQ ID NO: 1037), TGGGTGACCTTGAGGATATCAA (SEQ ID NOS: 1044, 2063)
E51SaCas9KKH20_E51SaCas9KKH32	CCACAGGTTGTGTCACCAGAGT (SEQ ID NO: 1037), AAGTTATAAAATCACAGAGGGT (SEQ ID NO: 1045)
E51SaCas9KKH20_E51SaCas9KKH33	CCACAGGTTGTGTCACCAGAGT (SEQ ID NO: 1037), ATCAAGTTATAAAATCACAGAG (SEQ ID NO: 1046)

E51SaCas9KKH20_E51SaCas9KKH34	CCACAGGTTGTGTCACCAGAGT (SEQ ID NO: 1037), TTGATCAAGTTATAAAAATCACA (SEQ ID NO: 24)
E51SaCas9KKH35_E51SaCas9KKH43	CTTTCTCTGCTTGATCAAGTTA (SEQ ID NO: 1047), TAGCTCCTACTCAGACTGTTAC (SEQ ID NO: 1055)
E51SaCas9KKH20_E51SaCas9KKH36	CCACAGGTTGTGTCACCAGAGT (SEQ ID NO: 1037), CCGACTGGCTTTCTCTGCTTGA (SEQ ID NO: 1048)
E51SaCas9KKH20_E51SaCas9KKH39	CCACAGGTTGTGTCACCAGAGT (SEQ ID NO: 1037), AAATGCCATCTTCCTTGATGTT (SEQ ID NOS: 1051, 2070)
E51SaCas9KKH20_E51SaCas9KKH41	CCACAGGTTGTGTCACCAGAGT (SEQ ID NO: 1037), AGGAAACTGCCATCTCCAAACT (SEQ ID NO: 1053)
E51SL1_E51SL10	TGATCATCTCGTTGATATCCTC (SEQ ID NO: 170), GTCACCAGAGTAACAGTCTGAG (SEQ ID NO: 179)
E51SL2_E51SL31	TTGATCAAGCAGAGAAAGCCAG (SEQ ID NO: 171), AGCTCCTACTCAGACTGTTACT (SEQ ID NO: 200)
E51SL10_E51SL3	GTCACCAGAGTAACAGTCTGAG (SEQ ID NO: 179), AGTCGGTAAGTTCTGTCCAAGC (SEQ ID NO: 172)
E51SL31_E51SL5	AGCTCCTACTCAGACTGTTACT (SEQ ID NO: 200), CAGAGCAGGTACCTCCAACATC (SEQ ID NO: 174)
E51SL31_E51SL7	AGCTCCTACTCAGACTGTTACT (SEQ ID NO: 200), CAAGGAAGATGGCATTCTAGT (SEQ ID NO: 176)
E51SL31_E51SL8	AGCTCCTACTCAGACTGTTACT (SEQ ID NO: 200), AGATGGCATTCTAGTTTGGAG (SEQ ID NO: 177)
E51SL10_E51SL15	GTCACCAGAGTAACAGTCTGAG (SEQ ID NO: 179), CAACGAGATGATCATCAAGCAG (SEQ ID NO: 184)
E51SL10_E51SL16	GTCACCAGAGTAACAGTCTGAG (SEQ ID NO: 179), GAGGGTGATGGTGGGTGACCTT (SEQ ID NOS: 22, 185)
E51SL10_E51SL18	GTCACCAGAGTAACAGTCTGAG (SEQ ID NO: 179), TATAAAAATCACAGAGGGTGATG (SEQ ID NOS: 23, 187)
E51SL10_E51SL19	GTCACCAGAGTAACAGTCTGAG (SEQ ID NO: 179), AGTTATAAAAATCACAGAGGGTG (SEQ ID NO: 188)
E51SL10_E51SL20	GTCACCAGAGTAACAGTCTGAG (SEQ ID NO: 179), TGATCAAGTTATAAAAATCACAG (SEQ ID NO: 189)
E51SL21_E51SL31	TTGATCAAGTTATAAAAATCACA (SEQ ID NO: 24), AGCTCCTACTCAGACTGTTACT (SEQ ID NO: 200)

E51SL22_E51SL31	GGGCTTGGACAGAACTTACCGA (SEQ ID NO: 191), AGCTCCTACTCAGACTGTTACT (SEQ ID NO: 200)
E51SL23_E51SL31	CTCTGGCAGATTTCAACCGGGC (SEQ ID NO: 192), AGCTCCTACTCAGACTGTTACT (SEQ ID NO: 200)
E51SL10_E51SL24	GTCACCAGAGTAACAGTCTGAG (SEQ ID NO: 179), ACCTGCTCTGGCAGATTTCAAC (SEQ ID NO: 193)
E51SL25_E51SL31	TACCTGCTCTGGCAGATTTCAA (SEQ ID NO: 194), AGCTCCTACTCAGACTGTTACT (SEQ ID NO: 200)
E51SL10_E51SL26	GTCACCAGAGTAACAGTCTGAG (SEQ ID NO: 179), CTTGATGTTGGAGGTACCTGCT (SEQ ID NO: 195)
E51SL10_E51SL27	GTCACCAGAGTAACAGTCTGAG (SEQ ID NO: 179), AATGCCATCTTCCTTGATGTTG (SEQ ID NO: 196)
E51SL10_E51SL28	GTCACCAGAGTAACAGTCTGAG (SEQ ID NO: 179), AGAAATGCCATCTTCCTTGATG (SEQ ID NO: 197)
E51SLCas9KH26_E51SLCas9KH73	GATGGCAGTTTCCTTAGTAACC (SEQ ID NOS: 1036, 2048), AGCTCCTACTCAGACTGTTACT (SEQ ID NO: 200)
E51SLCas9KH25_E51SLCas9KH73	TAGTTTGGAGATGGCAGTTTCC (SEQ ID NO: 2047), AGCTCCTACTCAGACTGTTACT (SEQ ID NO: 200)
E51SLCas9KH24_E51SLCas9KH73	TGGCATTTCTAGTTTGGAGATG (SEQ ID NO: 2046), AGCTCCTACTCAGACTGTTACT (SEQ ID NO: 200)
E51SLCas9KH21_E51SLCas9KH73	CAAGGAAGATGGCATTCTAGT (SEQ ID NO: 176), AGCTCCTACTCAGACTGTTACT (SEQ ID NO: 200)
E51SLCas9KH20_E51SLCas9KH30	AACATCAAGGAAGATGGCATT (SEQ ID NO: 2044), CACAGGTTGTGTCACCAGAGTA (SEQ ID NO: 2051)
E51SLCas9KH19_E51SLCas9KH30	GGTACCTCCAACATCAAGGAAG (SEQ ID NO: 175), CACAGGTTGTGTCACCAGAGTA (SEQ ID NO: 2051)
E51SLCas9KH20_E51SLCas9KH32	AACATCAAGGAAGATGGCATT (SEQ ID NO: 2044), TGTCACCAGAGTAACAGTCTGA (SEQ ID NO: 2053)
E51SLCas9KH20_E51SLCas9KH34	AACATCAAGGAAGATGGCATT (SEQ ID NO: 2044), CACCAGAGTAACAGTCTGAGTA (SEQ ID NO: 2054)
E51SLCas9KH18_E51SLCas9KH73	AGCAGGTACCTCCAACATCAAG (SEQ ID NOS: 1031, 2043), AGCTCCTACTCAGACTGTTACT (SEQ ID NO: 200)
E51SLCas9KH17_E51SLCas9KH73	CAGAGCAGGTACCTCCAACATC (SEQ ID NO: 174), AGCTCCTACTCAGACTGTTACT (SEQ ID NO: 200)
E51Sa2	GTTGTGTCACCAGAGTAACAGT (SEQ ID NO: 20)

E51SL10	GTCACCAGAGTAACAGTCTGAG (SEQ ID NO: 179)
E51SluCas9-2	TTGATCAAGCAGAGAAAGCCAG (SEQ ID NO: 171)
E51SluCas9-10	GTCACCAGAGTAACAGTCTGAG (SEQ ID NO: 179)

Конфигурации AAV для одновекторных кандидатов с двумя сайтами рестрикции

Для создания плазмид AAV и оценки экспрессии трансгенов онРНК, технологичности AAV и эффективности редактирования *in vitro* и *in vivo* было выбрано сочетание ориентаций промоторов, и конфигураций, последовательностей NLS и каркасов онРНК. Конфигурации плазмид AAV приведены в таблице 15 и таблице 16. Последовательности промотора, NLS и каркаса приведены в таблице 17.

Направляющие РНК получали в соответствии со стандартными методами в формате одиночной направляющей молекулы (онРНК). Был получен одиночный вектор AAV, который экспрессирует пару направляющих РНК и вариант SaCas9 или пару направляющих РНК и вариант SluCas9. Векторы AAV вводили клеткам C2C12 *in vitro* и мышам (например, мышам dEx44) *in vivo* для оценки способности AAV экспрессировать направляющую РНК и Cas9, редактировать целевой экзон и изменять рамку считывания гена дистрофина (только исследования *in vivo*).

Таблица 15:

Промотор РНК- полимеразы III	Ориентация	Конфигурация	NLS1	Эндонукле аза	NLS2	NLS3	Каркас
hU6c:hU6c	← α →	hU6c-Cas9- hU6c	c-Мyc- GSVD	SluCas9	SV-40-GSGS	Нуклеоплаз мин-GSGS	V5
	← α →	hU6c-Cas9- hU6c	c-Мyc- GSVD	SaCas9- KKH	SV-40-GSGS	Нуклеоплаз мин-GSGS	V2
	← α →	hU6c-Cas9- hU6c	c-Мyc- GSVD	SluCas9	SV-40-MCS- GSGS	Нуклеоплаз мин-GSGS	V5
	← α →	hU6c-Cas9- hU6c	c-Мyc- GSVD	SaCas9- KKH	SV-40-MCS- GSGS	Нуклеоплаз мин-GSGS	V2
	← α →	hU6c-Cas9- hU6c	SV-40 (+)	SluCas9	Нуклеоплаз мин	Н/Д	V5
	← α →	hU6c-Cas9- hU6c	SV-40 (+)	SaCas9- KKH	Нуклеоплаз мин	Н/Д	V2
	← ← α	hU6c-hU6c- Cas9	c-Мyc- GSVD	SluCas9	SV-40-GSGS	Нуклеоплаз мин-GSGS	V5
	← ← α	hU6c-hU6c-	c-Мyc-	SaCas9-	SV-40-GSGS	Нуклеоплаз	V2

		Cas9	GSVD	KKH		мин-GSGS	
	$\leftarrow \leftarrow \alpha$	hU6c-hU6c-Cas9	c-Myc-GSVD	SluCas9	SV-40-MCS-GSGS	Нуклеоплазмин-GSGS	V5
	$\leftarrow \leftarrow \alpha$	hU6c-hU6c-Cas9	c-Myc-GSVD	SaCas9-KKH	SV-40-MCS-GSGS	Нуклеоплазмин-GSGS	V2
	$\leftarrow \leftarrow \alpha$	hU6c-hU6c-Cas9	SV-40(+)	SluCas9	Нуклеоплазмин	Н/Д	V5
	$\leftarrow \leftarrow \alpha$	hU6c-hU6c-Cas9	SV-40(+)	SaCas9-KKH	Нуклеоплазмин	Н/Д	V2
	$\rightarrow \rightarrow \alpha$	hU6c-hU6c-Cas9	c-Myc-GSVD	SluCas9	SV-40-GSGS	Нуклеоплазмин-GSGS	V5
	$\rightarrow \rightarrow \alpha$	hU6c-hU6c-Cas9	c-Myc-GSVD	SaCas9-KKH	SV-40-GSGS	Нуклеоплазмин-GSGS	V2
	$\rightarrow \rightarrow \alpha$	hU6c-hU6c-Cas9	c-Myc-GSVD	SluCas9	SV-40-MCS-GSGS	Нуклеоплазмин-GSGS	V5
	$\rightarrow \rightarrow \alpha$	hU6c-hU6c-Cas9	c-Myc-GSVD	SaCas9-KKH	SV-40-MCS-GSGS	Нуклеоплазмин-GSGS	V2
	$\rightarrow \rightarrow \alpha$	hU6c-hU6c-Cas9	SV-40(+)	SluCas9	Нуклеоплазмин	Н/Д	V5
	$\rightarrow \rightarrow \alpha$	hU6c-hU6c-Cas9	SV-40(+)	SaCas9-KKH	Нуклеоплазмин	Н/Д	V2
hU6c:7SK2	$\leftarrow \alpha \rightarrow$	hU6c-Cas9-7SK2	c-Myc-GSVD	SluCas9	SV-40-GSGS	Нуклеоплазмин-GSGS	V5
	$\leftarrow \alpha \rightarrow$	hU6c-Cas9-7SK2	c-Myc-GSVD	SaCas9-KKH	SV-40-GSGS	Нуклеоплазмин-GSGS	V2
	$\leftarrow \alpha \rightarrow$	hU6c-Cas9-7SK2	c-Myc-GSVD	SluCas9	SV-40-MCS-GSGS	Нуклеоплазмин-GSGS	V5
	$\leftarrow \alpha \rightarrow$	hU6c-Cas9-7SK2	c-Myc-GSVD	SaCas9-KKH	SV-40-MCS-GSGS	Нуклеоплазмин-GSGS	V2
	$\leftarrow \leftarrow \alpha$	hU6c-7SK2-Cas9	c-Myc-GSVD	SluCas9	SV-40-MCS-GSGS	Нуклеоплазмин-GSGS	V5
	$\leftarrow \leftarrow \alpha$	hU6c-7SK2-Cas9	c-Myc-GSVD	SaCas9-KKH	SV-40-MCS-GSGS	Нуклеоплазмин-GSGS	V2

	$\leftarrow \leftarrow \alpha$	hU6c-7SK2-Cas9	c-Myc-GSVD	SluCas9	SV-40-GSGS	Нуклеоплаз мин-GSGS	V5
	$\leftarrow \leftarrow \alpha$	hU6c-7SK2-Cas9	c-Myc-GSVD	SaCas9-KKH	SV-40-GSGS	Нуклеоплаз мин-GSGS	V2
	$\leftarrow \leftarrow \alpha$	hU6c-7SK2-Cas9	SV-40(+)	SluCas9	Нуклеоплаз мин	Н/Д	V5
	$\leftarrow \leftarrow \alpha$	hU6c-7SK2-Cas9	SV-40(+)	SaCas9-KKH	Нуклеоплаз мин	Н/Д	V2
	$\rightarrow \rightarrow \alpha$	hU6c-7SK2-Cas9	c-Myc-GSVD	SluCas9	SV-40-MCS-GSGS	Нуклеоплаз мин-GSGS	V5
	$\rightarrow \rightarrow \alpha$	hU6c-7SK2-Cas9	c-Myc-GSVD	SaCas9-KKH	SV-40-MCS-GSGS	Нуклеоплаз мин-GSGS	V2
	$\rightarrow \rightarrow \alpha$	hU6c-7SK2-Cas9	c-Myc-GSVD	SluCas9	SV-40-GSGS	Нуклеоплаз мин-GSGS	V5
	$\rightarrow \rightarrow \alpha$	hU6c-7SK2-Cas9	c-Myc-GSVD	SaCas9-KKH	SV-40-GSGS	Нуклеоплаз мин-GSGS	V2
	$\rightarrow \rightarrow \alpha$	hU6c-7SK2-Cas9	SV-40(+)	SluCas9	Нуклеоплаз мин	Н/Д	V5
	$\rightarrow \rightarrow \alpha$	hU6c-7SK2-Cas9	SV-40(+)	SaCas9-KKH	Нуклеоплаз мин	Н/Д	V2
7SK2:hU6c	$\leftarrow \alpha \rightarrow$	7SK2-Cas9-hU6c	c-Myc-GSVD	SluCas9	SV-40-GSGS	Нуклеоплаз мин-GSGS	V5
	$\leftarrow \alpha \rightarrow$	7SK2-Cas9-hU6c	c-Myc-GSVD	SaCas9-KKH	SV-40-GSGS	Нуклеоплаз мин-GSGS	V2
	$\leftarrow \alpha \rightarrow$	7SK2-Cas9-hU6c	c-Myc-GSVD	SluCas9	SV-40-MCS-GSGS	Нуклеоплаз мин-GSGS	V5
	$\leftarrow \alpha \rightarrow$	7SK2-Cas9-hU6c	c-Myc-GSVD	SaCas9-KKH	SV-40-MCS-GSGS	Нуклеоплаз мин-GSGS	V2
	$\leftarrow \leftarrow \alpha$	7SK2-hU6c-Cas9	c-Myc-GSVD	SluCas9	SV-40-MCS-GSGS	Нуклеоплаз мин-GSGS	V5
	$\leftarrow \leftarrow \alpha$	7SK2-hU6c-Cas9	c-Myc-GSVD	SaCas9-KKH	SV-40-MCS-GSGS	Нуклеоплаз мин-GSGS	V2
	$\leftarrow \leftarrow \alpha$	7SK2-hU6c-Cas9	c-Myc-GSVD	SluCas9	SV-40-GSGS	Нуклеоплаз мин-GSGS	V5

	$\leftarrow \leftarrow \alpha$	7SK2-hU6c-Cas9	c-Myc-GSVD	SaCas9-KKH	SV-40-GSGS	Нуклеоплаз мин-GSGS	V2
	$\leftarrow \leftarrow \alpha$	7SK2-hU6c-Cas9	SV-40 (+)	SluCas9	Нуклеоплаз мин	Н/Д	V5
	$\leftarrow \leftarrow \alpha$	7SK2-hU6c-Cas9	SV-40 (+)	SaCas9-KKH	Нуклеоплаз мин	Н/Д	V2
	$\rightarrow \rightarrow \alpha$	7SK2-hU6c-Cas9	c-Myc-GSVD	SluCas9	SV-40-MCS-GSGS	Нуклеоплаз мин-GSGS	V5
	$\rightarrow \rightarrow \alpha$	7SK2-hU6c-Cas9	c-Myc-GSVD	SaCas9-KKH	SV-40-MCS-GSGS	Нуклеоплаз мин-GSGS	V2
	$\rightarrow \rightarrow \alpha$	7SK2-hU6c-Cas9	c-Myc-GSVD	SluCas9	SV-40-GSGS	Нуклеоплаз мин-GSGS	V5
	$\rightarrow \rightarrow \alpha$	7SK2-hU6c-Cas9	c-Myc-GSVD	SaCas9-KKH	SV-40-GSGS	Нуклеоплаз мин-GSGS	V2
	$\rightarrow \rightarrow \alpha$	7SK2-hU6c-Cas9	SV-40 (+)	SluCas9	Нуклеоплаз мин	Н/Д	V5
	$\rightarrow \rightarrow \alpha$	7SK2-hU6c-Cas9	SV-40 (+)	SaCas9-KKH	Нуклеоплаз мин	Н/Д	V2
hU6c:H1m	$\leftarrow \alpha \rightarrow$	hU6c-Cas9-H1m	c-Myc-GSVD	SluCas9	SV-40-GSGS	Нуклеоплаз мин-GSGS	V5
	$\leftarrow \alpha \rightarrow$	hU6c-Cas9-H1m	c-Myc-GSVD	SaCas9-KKH	SV-40-GSGS	Нуклеоплаз мин-GSGS	V2
7SK2:H1m	$\leftarrow \alpha \rightarrow$	7SK2-Cas9-H1m	SV-40-GS	SluCas9	Нуклеоплаз мин	Н/Д	V5
	$\leftarrow \alpha \rightarrow$	7SK2-Cas9-H1m	SV-40-GS	SaCas9-KKH	Нуклеоплаз мин	Н/Д	V2
	$\leftarrow \alpha \rightarrow$	7SK2-Cas9-H1m	SV-40 (+)	SluCas9	Нуклеоплаз мин	Н/Д	V5
	$\leftarrow \alpha \rightarrow$	7SK2-Cas9-H1m	SV-40 (+)	SaCas9-KKH	Нуклеоплаз мин	Н/Д	V2
	$\leftarrow \alpha \rightarrow$	7SK2-Cas9-H1m	c-Myc-GSVD	SluCas9	SV-40-MCS-GSGS	Нуклеоплаз мин-GSGS	V5

	$\leftarrow \alpha \rightarrow$	7SK2-Cas9-H1m	c-Мyc-GSVD	SaCas9-KKH	SV-40-MCS-GSGS	Нуклеоплазм-ин-GSGS	V2
	$\leftarrow \alpha \rightarrow$	7SK2-Cas9-H1m	c-Мyc-GSVD	SaCas9	SV-40-MCS-GSGS	Нуклеоплазм-ин-GSGS	V2
H1m:M11	$\leftarrow \alpha \rightarrow$	H1m-Cas9-M11	c-Мyc-GSVD	SluCas9	SV-40-MCS-GSGS	Нуклеоплазм-ин-GSGS	V5
	$\leftarrow \alpha \rightarrow$	H1m-Cas9-M11	c-Мyc-GSVD	SaCas9-KKH	SV-40-MCS-GSGS	Нуклеоплазм-ин-GSGS	V2

Таблица 16:

	Промотор РНК-полимеразы III	Ориентация	Конфигурация
Самокомплементарный AAV	hU6:H1:7SK	$\rightarrow \rightarrow \rightarrow$	hU6-H1-7SK1
	hU6:7SK	$\rightarrow o \rightarrow$	hU6-спейсер-7SK1
	hU6:7SK	$\rightarrow \rightarrow o$	hU6-7SK-спейсер
	hU6c:hU6c	$\leftarrow o \rightarrow$	hU6c-спейсер-hU6c
	hU6c:mU6	$\leftarrow o \rightarrow$	hU6c-спейсер-mU6
	7SK2:hU6c:hU6c:7SK2	$\leftarrow o \rightarrow$	7SK2-hU6c-спейсер-hU6c-7SK2
	7SK2:hU6c:mU6:7SK2	$\leftarrow o \rightarrow$	7SK2-hU6c-спейсер-mU6c-7SK2
	7SK2:hU6c:hU6c:7SK2	$\leftarrow o \rightarrow$	7SK2-hU6c-спейсер-hU6c-7SK2
	7SK2:hU6c:mU6:7SK2	$\leftarrow o \rightarrow$	7SK2-hU6c-спейсер-mU6-7SK2
Одноцепочечный AAV	hU6c:hU6c	$\leftarrow o \rightarrow$	hU6c-спейсер-hU6c
	hU6c:mU6	$\leftarrow o \rightarrow$	hU6c-спейсер-mU6
	7SK2:hU6c:hU6c:7SK2	$\leftarrow o \rightarrow$	7SK2-hU6c-спейсер-hU6c-7SK2
	7SK2:hU6c:mU6:7SK2	$\leftarrow o \rightarrow$	7SK2-hU6c-спейсер-mU6c-7SK2
	7SK2:hU6c:hU6c:7SK2	$\leftarrow o \rightarrow$	7SK2-hU6c-спейсер-hU6c-7SK2

	7SK2:hU6c:mU6:7SK2	← o →	7SK2-hU6c-спейсер-mU6-7SK2
--	--------------------	-------	----------------------------

Таблица 17:

Промотор	Последовательности
hU6c	GAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAA GGCTGTTAGAGAGATAATTGGAATTAATTTGACTGTAAACACAAAG ATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAGTAATAATTTCTTGGGT AGTTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTTAAAATGGACTATCATATGCTT ACCGTAACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTG GAAAGGACGAAACACC (SEQ ID NO: 705)
7SK2	CTGCAGTATTTAGCATGCCCCACCCATCTGCAAGGCATTCTGGATA GTGTCAAAACAGCCGGAATCAAGTCCGTTTATCTCAAACCTTAGC ATTTTGGGAATAAATGATATTTGCTATGCTGGTTAAATTAGATTTTA GTAAATTTCTGCTGAAGCTCTAGTACGATAAGCAACTTGACCTA AGTGTAAGTTGAGACTTCCTTCAGGTTTATATAGCTTGTGCGCCGC TTGGGTACCTC (SEQ ID NO: 706)
H1m	AATATTTGCATGTCGCTATGTGTTCTGGGAAATCACCATAAACGTG AAATGTCTTTGGATTTGGGAATCTTATAAGTTCTGTATGAGACCACT CTTTCCC (SEQ ID NO: 707)
M11	ATATTTAGCATGTCGCTATGTGTTCTGGGAAACTTGACCTAAGTGTA AAGTTGAGATTTCTTCAGGTTTATATAGTTCTGTATGAGACCACTC TTTCCC (SEQ ID NO: 708)
hU6	ccCGAGTCCAACACCCGTGGGAATCCCATGGGCACCATGGCCCCTCG CTCCAAAAATGCTTTCGCGTCGCGCAGACACTGCTCGGTAGTTTCG GGGATCAGCGTTTGAGTAAGAGCCCGCGTCTGAACCTCCGCGCCG CCCCGGCCCCAGTGGAAGACGCGCAGGCAAAACGCACCACGTGA CGGAGCGTGACCGCGCGCCGAGCGCGCGCCAAGGTCGGGCAGGAA GAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAA GGCTGTTAGAGAGATAATTAGAATTAATTTGACTGTAAACACAAAG ATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAGTAATAATTTCTTGGGT AGTTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTTAAAATGGACTATCATATGCTT ACCGTAACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTG GAAAGGACGAAACACC (SEQ ID NO: 42)
mU6	Gatccgacgcgccatctctagggccgcgccgccccctcgacagactgtgggagaagctcggtactcc cctgccccggtaatttgcataataatttcctagtaactatagaggcttaattgtgcgataaaagacagataatctgtt

	cttttaataactagctacattttacatgataggctggatttctataagagatacaaataactaaattatttttaaaaaaac agcacaaaaggaaactcacctaactgtaaagtaattgtgtgttttgagactataaatatcccttgagaaaaagcct tggt (SEQ ID NO: 43)
H1	CATATTTGCATGTCGCTATGTGTTCTGGGAAATCACCATAAACGTG AAATGTCTTTGGATTTGGGAATCTTATAAGTTCTGTATGAGACCACG GTACACC (SEQ ID NO: 44)
7SK1	CTGCAGTATTTAGCATGCCCCACCCATCTGCAAGGCATTCTGGATA GTGTCAAAACAGCCGGAAATCAAGTCCGTTTATCTCAAACCTTTAGC ATTTTGGGAATAAATGATATTTGCTATGCTGGTTAAATTAGATTTTA GTTAAATTTCTGCTGAAGCTCTAGTACGATAAGTAACTTGACCTA AGTGTAAGTTGAGATTTCTTCAGGTTTATATAGCTTGTGCGCCGC CTGGGTAC (SEQ ID NO: 45)
NLS- линкер	АК последовательности
с-Мус- GSVD	PAAKKKKLDGSVD (SEQ ID NO: 36)
SV-40-GS	PKKKRKVGS (SEQ ID NO: 37)
SV-40 (+)	PKKKRKVGIHGVPAА (SEQ ID NO: 38)
SV-40- GSGS	GSGSPKKRKV (SEQ ID NO: 39)
SV-40-MCS- GSGS	TGGGPGGGAAAGSGSPKKRKV (SEQ ID NO: 40)
Нуклеоплаз мин-GSGS	GSGSKRPAATKKAGQAKKKK (SEQ ID NO: 41)
Каркас	Последовательности
Каркас SluCas9 варианта_5	GUUUCAGUACUCUGGAAACAGAAUCUACUGAAACAAGACAAUUAU GUCGUGUUUAUCCCAUCAAUUUAUUGGUGGGGAU (SEQ ID NO: 922)
Каркас SaCas9 варианта_2	GTTTAAGTACTCTGTGCTGGAAACAGCACAGAATCTACTTAAACAA GGCAAAATGCCGTGTTTATCTCGTCAACTTGTTGGCGAGA (SEQ ID NO: 500)

В частности, была проверена способность *in vitro* опосредованной одиночным AAV доставки компонентов редактирования генов продуктивно редактировать и приводить к точной делеции сегментов в миотрубочках мышей C2C12 (**таблица 18В, Фиг. 10**). На Фиг. 10-12 и 14-17 идентификаторы векторов vVT 046, 047, 048, 054 и 052 показаны в **таблице**

18B вместе с соответствующими им парами онРНК. vVT009 имеет конфигурацию 7SK2-SluCas9-H1m с каркасом SluV2 и NLS SV40 на N-конце и NLS нуклеоплазмина на С-конце. vVT053B имеет ту же конфигурацию и последовательность, что и vVT053. Буква В означает делецию А в остове pVT053B (вне ITR), которая была введена во время клонирования. Спейсерные последовательности, используемые в этих парах онРНК, следующие (**таблица 18A**):

Таблица 18A:

онРНК, ID	Последовательность протоспейсера (две последовательности протоспейсера разделены запятой)
E45SL18_E45SL4	TTGTCAGAACAcTGAATGCAAC (SEQ ID NO: 553), cTTGaCGCTGCCCAATGCCATC (SEQ ID NO: 300)
E45SL21_E45SL7	TACAGGAACTCCAGGATGGCAT (SEQ ID NO: 148/306), CTGgCAGAAgAgAAAGAGGT (SEQ ID NO: 301)
E45SaCas9KKH10_E 45SaCas9KKH20	TTGaCGCTGCCCAATGCCATCC (SEQ ID NO: 317), ACAGATGtCAaTATTCTACAaG (SEQ ID NO: 554)

Выбранные конфигурации AAV оценивали для количественного определения генома вектора (**Фиг. 11**) и экспрессии трансгена (**Фиг. 12**), а также иммунофлуоресценции в миотрубочках мышей C2C12 (**Фиг. 13**). Три вектора AAV, vVT046, vVT047 и vVT048, показали среднюю точную частоту делеции сегментов выше 15% в миотрубочках мышей C2C12 (**Фиг. 10**). Эквивалентное число копий векторного генома (**Фиг. 11**) и экспрессию трансгена Cas9 (**Фиг. 12A**) наблюдали для всех векторов AAV в миотрубочках мышей C2C12. Более высокую экспрессию онРНК наблюдали для комбинации промоторов hU6-H1m-7SK, hU6c-hU6c и hU6c-7SK2 PolIII (**Фиг. 12B**). Несколько более низкую экспрессию онРНК наблюдали для комбинации промоторов 7SK2-H1m (**Фиг. 12B**). онРНК, расположенная выше Cas9, демонстрировала в целом более высокую экспрессию в комбинации промоторов 7SK2-H1m (**Фиг. 12B**). Cas9 с 2xNLS+ и 3xNLS приводит к лучшей локализации Cas9 в миоядрах (**Фиг. 13**).

Таблица 18B:

Ориентация	Конфигурация	NLS1	Эндонуклеаза	NLS2	NLS3	Пара онПНК	Каркас	ID вектора
← ⇄ →	hU6c-Cas9-hU6c	SV-40 (+)	SluCas9	Нуклеоплазмин	Н/Д	E45Slu18/4	V5	vVT046
← ⇄ →	hU6c-Cas9-hU6c	c-Мyc-GSVD	SluCas9	SV-40-GSGS	Нуклеоплазмин-GSGS	E45Slu18/4	V5	vVT047
← ⇄ →	hU6c-Cas9-7SK2	c-Мyc-GSVD	SluCas9	SV-40-GSGS	Нуклеоплазмин-GSGS	E45Slu18/4	V5	vVT048
← ⇄ →	H1m-Cas9-M11	c-Мyc-GSVD	SluCas9	SV-40-GSGS	Нуклеоплазмин-GSGS	E45Slu18/4	V5	vVT049
← ⇄ →	7SK2-Cas9-H1m	c-Мyc-GSVD	SluCas9	SV-40-GSGS	Нуклеоплазмин-GSGS	E45Slu18/4	V5	vVT050
← ⇄ →	7SK2-Cas9-H1m	SV-40 (+)	SluCas9	Нуклеоплазмин	Н/Д	E45Slu18/4	V5	vVT051
← ⇄ →	7SK2-Cas9-H1m	SV-40 (+)	SluCas9	Нуклеоплазмин	Н/Д	E45Slu21/7	V5	vVT052
← ⇄ →	7SK2-Cas9-H1m	SV-40 (+)	SaCas9-KKH	Нуклеоплазмин	Н/Д	E45SaKKH10/20	V2	vVT053
← ⇄ →	7SK2-Cas9-H1m	c-Мyc-GSVD	SluCas9	SV-40-GSGS	Нуклеоплазмин-GSGS	E45Slu24	V5	vVT054

Была проверена способность *in vivo* одиночной AAV-опосредованной доставки компонентов для редактирования генов успешно изменять рамку считывания экзон 45 в сердечной и скелетной мышцах мышей dEx44. Все выбранные конфигурации AAV показали среднюю общую частоту делеций выше 12,5%, а пара онПНК E45Slu18/4 показала среднюю точную частоту делеций сегментов выше 15% в сердце (**Фиг. 14А**). vVT047 с парой онПНК E45Slu18/4 показал среднюю точную частоту делеций сегментов выше 5% в четырехглавой мышце (**Фиг. 14В**). Все выбранные конфигурации AAV показали среднее восстановление общего белка дистрофина выше 30% ДТ в сердцах мышей dEx44 DMD (**Фиг. 15А**). vVT054, vVT046, vVT047 и vVT048 продемонстрировали среднее восстановление общего белка дистрофина выше 10% ДТ в четырехглавой мышце мышей dEx44 DMD (**Фиг. 15В**). Векторы AAV с 2xNLS+ и 3xNLS повышают эффективность редактирования и восстановления дистрофина в скелетных мышцах (**Фиг. 15В**). Эквивалентное количество векторных генов AAV наблюдали для всех групп в сердце и скелетных мышцах. В сердце наблюдали более высокое общее количество копий вектора AAV, чем в скелетных мышцах (**Фиг. 16А и 16В**). Расположенная выше онПНК экспрессировалась более эффективно, чем расположенная ниже кассета в векторах vVT046, vVT047, vVT048 AAV (**Фиг. 17А и 17В**). Уровни экспрессии расположенной как выше, так и ниже онПНК были снижены относительно уровней Cas9 в мышцах по сравнению с тканями сердца (**Фиг. 17А и 17В**).

Аналогичные эксперименты проводили с различными онПНК (см. спейсерные последовательности в **таблице 19; Фиг. 18А-18С**) и эндонуклеазой Cas12i2 в экзоне 45 в клетках HEK293FT.

Таблица 19:

онПНК, ID	Последовательности протоспейсеров (две последовательности протоспейсера разделены запятой)
E45CAS12I2TTN26_E45	TTCCCCAGTTGCATTCAATG (SEQ ID NO: 555),

CAS12I2TTN39	GGCAGCGGCAAACCTGTTGTC (SEQ ID NO: 556)
E45CAS12I2TTN27_E45 CAS12I2TTN39	CCCAGTTGCATTCAATGTTC (SEQ ID NO: 557), GGCAGCGGCAAACCTGTTGTC (SEQ ID NO: 556)
E45CAS12I2TTN29_E45 CAS12I2TTN43	AATGTTCTGACAACAGTTTG (SEQ ID NO: 558), TGGTATCTTACAGGAACTCC (SEQ ID NO: 559)
E45CAS12I2TTN27_E45 CAS12I2TTN40	CCCAGTTGCATTCAATGTTC (SEQ ID NO: 557), CAGGAACTCCAGGATGGCAT (SEQ ID NO: 560)
E45CAS12I2TTN19_E45 CAS12I2TTN39	TTGAGGATTGCTGAATTATT (SEQ ID NO: 561), GGCAGCGGCAAACCTGTTGTC (SEQ ID NO: 556)
E45CAS12I2TTN26_E45 CAS12I2TTN40	TTCCCCAGTTGCATTCAATG (SEQ ID NO: 555),CAGGAACTCCAGGATGGCAT (SEQ ID NO: 560)
E45CAS12I2TTN39_E45 CAS12I2TTN43	GGCAGCGGCAAACCTGTTGTC (SEQ ID NO: 556),TGGTATCTTACAGGAACTCC (SEQ ID NO: 559)
E45CAS12I2TTN19_E45 CAS12I2TTN29	TTGAGGATTGCTGAATTATT (SEQ ID NO: 561), AATGTTCTGACAACAGTTTG (SEQ ID NO: 558)
E45CAS12I2TTN17_E45 CAS12I2TTN39	CCTGTAGAATACTGGCATCT (SEQ ID NO: 562), GGCAGCGGCAAACCTGTTGTC (SEQ ID NO: 556)
E45CAS12I2TTN18_E45 CAS12I2TTN25	CTGTAGAATACTGGCATCTG (SEQ ID NO: 563), CTTCCCCAGTTGCATTCAAT (SEQ ID NO: 564)
E45CAS12I2TTN15_E45 CAS12I2TTN25	TTCTGTAGAATACTGGCAT (SEQ ID NO: 565), CTTCCCCAGTTGCATTCAAT (SEQ ID NO: 564)
E45CAS12I2TTN16_E45 CAS12I2TTN26	TCCTGTAGAATACTGGCATC (SEQ ID NO: 566), TTCCCCAGTTGCATTCAATG (SEQ ID NO: 555)
E45CAS12I2TTN16_E45 CAS12I2TTN27	TCCTGTAGAATACTGGCATC (SEQ ID NO: 566), CCCAGTTGCATTCAATGTTC (SEQ ID NO: 557)
E45CAS12I2TTN21_E45 CAS12I2TTN43	GAGGATTGCTGAATTATTTC (SEQ ID NO: 567), TGGTATCTTACAGGAACTCC (SEQ ID NO: 559)
E45CAS12I2TTN38_E45 CAS12I2TTN43	TCAGAACATTGAATGCAACT (SEQ ID NO: 568), TGGTATCTTACAGGAACTCC (SEQ ID NO: 559)
E45CAS12I2TTN18_E45 CAS12I2TTN28	CTGTAGAATACTGGCATCTG (SEQ ID NO: 563), CATTCAATGTTCTGACAACA (SEQ ID NO: 569)
E45CAS12I2TTN21_E45 CAS12I2TTN32	GAGGATTGCTGAATTATTTC (SEQ ID NO: 567), CCGCTGCCCAATGCCATCCT (SEQ ID NO: 570)
E45CAS12I2TTN26_E45	TTCCCCAGTTGCATTCAATG (SEQ ID NO: 555),

CAS12I2TTN36	AGCAATCCTCAAAAACAGAT (SEQ ID NO: 571)
E45CAS12I2TTN32_E45 CAS12I2TTN38	CCGCTGCCCAATGCCATCCT (SEQ ID NO: 570), TCAGAACATTGAATGCAACT (SEQ ID NO: 568)
E45CAS12I2TTN15_E45 CAS12I2TTN28	TTCCTGTAGAATACTGGCAT (SEQ ID NO: 565),CATTCAATGTTCTGACAACA (SEQ ID NO: 569)
E45CAS12I2TTN27_E45 CAS12I2TTN36	CCCAGTTGCATTCAATGTTC (SEQ ID NO: 557),AGCAATCCTCAAAAACAGAT (SEQ ID NO: 571)
E45CAS12I2TTN17_E45 CAS12I2TTN29	CCTGTAGAATACTGGCATCT (SEQ ID NO: 562),AATGTTCTGACAACAGTTTG (SEQ ID NO: 558)
E45CAS12I2TTN18_E45 CAS12I2TTN40	CTGTAGAATACTGGCATCTG (SEQ ID NO: 563),CAGGAACTCCAGGATGGCAT (SEQ ID NO: 560)
E45CAS12I2TTN15_E45 CAS12I2TTN40	TTCCTGTAGAATACTGGCAT (SEQ ID NO: 565),CAGGAACTCCAGGATGGCAT (SEQ ID NO: 560)
E45CAS12I2TTN18_E45 CAS12I2TTN30	CTGTAGAATACTGGCATCTG (SEQ ID NO: 563),TGACAACAGTTTGCCGCTGC (SEQ ID NO: 572)
E45CAS12I2TTN15_E45 CAS12I2TTN30	TTCCTGTAGAATACTGGCAT (SEQ ID NO: 565),TGACAACAGTTTGCCGCTGC (SEQ ID NO: 572)
E45CAS12I2TTN16_E45 CAS12I2TTN43	TCCTGTAGAATACTGGCATC (SEQ ID NO: 566),TGGTATCTTACAGGAACTCC (SEQ ID NO: 559)
E45CAS12I2TTN16_E45 CAS12I2TTN32	TCCTGTAGAATACTGGCATC (SEQ ID NO: 566),CCGCTGCCCAATGCCATCCT (SEQ ID NO: 570)
E45CAS12I2TTN11_E45 CAS12I2TTN25	GCAGACCTCCTGCCACCGCA (SEQ ID NO: 573),CTTCCCCAGTTGCATTCAAT (SEQ ID NO: 564)
E45CAS12I2TTN12_E45 CAS12I2TTN26	CAGACCTCCTGCCACCGCAG (SEQ ID NO: 574),TTCCCCAGTTGCATTCAATG (SEQ ID NO: 555)
E45CAS12I2TTN26_E45 CAS12I2TTN35	TTCCCCAGTTGCATTCAATG (SEQ ID NO: 555),TACAGGAAAAATTGGGAAGC (SEQ ID NO: 575)
E45CAS12I2TTN36_E45 CAS12I2TTN43	AGCAATCCTCAAAAACAGAT (SEQ ID NO: 571),TGGTATCTTACAGGAACTCC (SEQ ID NO: 559)
E45CAS12I2TTN12_E45 CAS12I2TTN27	CAGACCTCCTGCCACCGCAG (SEQ ID NO: 574),CCCAGTTGCATTCAATGTTC (SEQ ID NO: 557)
E45CAS12I2TTN27_E45 CAS12I2TTN35	CCCAGTTGCATTCAATGTTC (SEQ ID NO: 557),TACAGGAAAAATTGGGAAGC (SEQ ID NO: 575)
E45CAS12I2TTN32_E45	CCGCTGCCCAATGCCATCCT (SEQ ID NO:

CAS12I2TTN36	570),AGCAATCCTCAAAAACAGAT (SEQ ID NO: 571)
E45CAS12I2TTN11_E45 CAS12I2TTN28	GCAGACCTCCTGCCACCGCA (SEQ ID NO: 573),CATTCAATGTTCTGACAACA (SEQ ID NO: 569)
E45CAS12I2TTN34_E45 CAS12I2TTN39	GGAAGCCTGAATCTGCGGTG (SEQ ID NO: 576),GGCAGCGGCAAACCTGTTGTC (SEQ ID NO: 556)
E45CAS12I2TTN39_E45 CAS12I2TTN7	GGCAGCGGCAAACCTGTTGTC (SEQ ID NO: 556), TTCTGTCTGACAGCTGTTTG (SEQ ID NO: 577)
E45CAS12I2TTN11_E45 CAS12I2TTN40	GCAGACCTCCTGCCACCGCA (SEQ ID NO: 573),CAGGAACCTCCAGGATGGCAT (SEQ ID NO: 560)
E45CAS12I2TTN11_E45 CAS12I2TTN30	GCAGACCTCCTGCCACCGCA (SEQ ID NO: 573),TGACAACAGTTTGCCGCTGC (SEQ ID NO: 572)
E45CAS12I2TTN12_E45 CAS12I2TTN43	CAGACCTCCTGCCACCGCAG (SEQ ID NO: 574),TGGTATCTTACAGGAACTCC (SEQ ID NO: 559)
E45CAS12I2TTN29_E45 CAS12I2TTN34	AATGTTCTGACAACAGTTTG (SEQ ID NO: 558),GGAAGCCTGAATCTGCGGTG (SEQ ID NO: 576)
E45CAS12I2TTN35_E45 CAS12I2TTN43	TACAGGAAAAATTGGGAAGC (SEQ ID NO: 575),TGGTATCTTACAGGAACTCC (SEQ ID NO: 559)
E45CAS12I2TTN29_E45 CAS12I2TTN7	AATGTTCTGACAACAGTTTG (SEQ ID NO: 558),TTCTGTCTGACAGCTGTTTG (SEQ ID NO: 577)
E45CAS12I2TTN12_E45 CAS12I2TTN32	CAGACCTCCTGCCACCGCAG (SEQ ID NO: 574),CCGCTGCCCCAATGCCATCCT (SEQ ID NO: 570)
E45CAS12I2TTN32_E45 CAS12I2TTN35	CCGCTGCCCCAATGCCATCCT (SEQ ID NO: 570),TACAGGAAAAATTGGGAAGC (SEQ ID NO: 575)

Это описание и иллюстративные варианты осуществления не следует рассматривать как ограничивающие. Для целей данного описания и прилагаемой формулы изобретения, если не указано иное, все числа, выражающие количества, проценты или пропорции, и другие числовые значения, используемые в описании и пунктах формулы изобретения, следует понимать как модифицированные во всех случаях термином «около», в той мере, в какой они уже не были изменены таким образом. Соответственно, если не указано иное, числовые параметры, указанные в нижеследующем описании и прилагаемой формуле изобретения, являются приближенными значениями, которые могут варьироваться в зависимости от желаемых свойств, которые необходимо получить. Как минимум, что не стоит трактовать как попытку ограничить применение доктрины эквивалентов объемом формулы изобретения, каждый числовой параметр необходимо, по меньшей мере, толковать с учетом числа приведенных значимых цифр и путем применения обычных методов округления.

Следует отметить, что, как используется в этом описании и прилагаемой формуле изобретения, формы единственного числа, а также любое использование любого слова в единственном числе включают ссылки во множественном числе, если прямо и однозначно не ограничены одной ссылкой. В контексте данного документа термин «включать» и его грамматические варианты не имеют ограничительного характера, так что перечисление элементов в списке не исключает других подобных элементов, которые могут быть заменены или добавлены к перечисленным элементам.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция, содержащая:

а. одиночную молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую:

i. нуклеиновую кислоту, кодирующую Cas9 *Staphylococcus aureus* (SaCas9) или *Staphylococcus lugdunensis* (SluCas9), и по меньшей мере одну, по меньшей мере две или по меньшей мере три направляющие РНК; или

ii. нуклеиновую кислоту, кодирующую Cas9 *Staphylococcus aureus* (SaCas9) или *Staphylococcus lugdunensis* (SluCas9) и от одной до n направляющих РНК, где n не превышает максимальное количество направляющих РНК, которые могут быть экспрессированы из указанной нуклеиновой кислоты; или

iii. нуклеиновую кислоту, кодирующую Cas9 *Staphylococcus aureus* (SaCas9) или *Staphylococcus lugdunensis* (SluCas9), и 1, 2 или 3 направляющих РНК; или

б. две молекулы нуклеиновой кислоты, содержащие:

i. первую нуклеиновую кислоту, кодирующую Cas9 *Staphylococcus aureus* (SaCas9) или *Staphylococcus lugdunensis* (SluCas9); и

вторую нуклеиновую кислоту, которая не кодирует SaCas9 или SluCas9 и кодирует любое из следующего:

(1). по меньшей мере одну, по меньшей мере две, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять или по меньшей мере шесть направляющих РНК; или

(2). от одной до n направляющих РНК, где n равно максимальному количеству направляющих РНК, которые могут быть экспрессированы из указанной нуклеиновой кислоты; или

(3). от одной до шести направляющих РНК; или

ii. первую нуклеиновую кислоту, кодирующую Cas9 *Staphylococcus aureus* (SaCas9) или *Staphylococcus lugdunensis* (SluCas9) и

(1). по меньшей мере одну, по меньшей мере две или по меньшей мере три направляющие РНК; или

(2). от одной до n направляющих РНК, где n равно максимальному количеству направляющих РНК, которые могут быть экспрессированы из указанной нуклеиновой кислоты; или

(3). 1, 2 или 3 направляющих РНК; и

вторую нуклеиновую кислоту, которая не кодирует SaCas9 или SluCas9, где вторая нуклеиновая кислота необязательно содержит любое из следующего:

(1). по меньшей мере одну, по меньшей мере две, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять или по меньшей мере шесть направляющих РНК; или

(2). от одной до n направляющих РНК, где n равно максимальному количеству направляющих РНК, которые могут быть экспрессированы из указанной нуклеиновой кислоты; или

(3). от одной до шести направляющих РНК; или

iii. первую нуклеиновую кислоту, кодирующую Cas9 *Staphylococcus aureus* (SaCas9)

или *Staphylococcus lugdunensis* (SluCas9), и по меньшей мере одну, по меньшей мере две или по меньшей мере три направляющие РНК; и

вторую нуклеиновую кислоту, которая не кодирует SaCas9 или SluCas9 и кодирует от одной до шести направляющих РНК; или

iv. первую нуклеиновую кислоту, кодирующую Cas9 *Staphylococcus aureus* (SaCas9) или *Staphylococcus lugdunensis* (SluCas9), и по меньшей мере две направляющие РНК, где по меньшей мере одна направляющая РНК связывается выше целевой последовательности, и по меньшей мере одна направляющая РНК связывается ниже целевой последовательности; и

вторую нуклеиновую кислоту, которая не кодирует SaCas9 или SluCas9 и кодирует по меньшей мере одну дополнительную копию каждой из направляющих РНК, закодированных в первой нуклеиновой кислоте,

где направляющая РНК нацелена на область гена дистрофина.

2. Композиция, содержащая две молекулы нуклеиновой кислоты, включающие i) первую нуклеиновую кислоту, кодирующую Cas9 *Staphylococcus aureus* (SaCas9) или *Staphylococcus lugdunensis* (SluCas9), и первую и вторую направляющие РНК, которые вырезают часть гена DMD; и ii) вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую по меньшей мере 2 или по меньшей мере 3 копии первой направляющей РНК и по меньшей мере 2 или по меньшей мере 3 копии второй направляющей РНК.

3. Композиция, содержащая одну или более молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих эндонуклеазу, и пару направляющих РНК, где каждая направляющая РНК нацелена на отличную последовательность в гене DMD, где эндонуклеаза и пара направляющих РНК способны вырезать фрагмент ДНК из гена DMD; где фрагмент ДНК имеет длину от 5 до 250 нуклеотидов.

4. Композиция по п. 3, где эндонуклеаза представляет собой эндонуклеазу Cas класса 2 типа II.

5. Композиция по п. 3, где эндонуклеаза Cas класса 2 типа II представляет собой SpCas9, SaCas9 или SluCas9.

6. Композиция по п. 3, где эндонуклеаза не является эндонуклеазой Cas класса 2 типа V.

7. Композиция по п. 3, где вырезаемый фрагмент ДНК содержит сайт акцептора сплайсинга или сайт донора сплайсинга.

8. Композиция по п. 3, где вырезаемый фрагмент ДНК содержит преждевременный стоп-кодон в гене DMD.

9. Композиция по п. 3, где вырезаемый фрагмент ДНК не содержит весь экзон гена DMD.

10. Композиция по любому из пп. 1-9, где направляющая РНК содержит любое одно из следующего:

а. когда используется SaCas9, одна или более спейсерных последовательностей, выбранных из любой из SEQ ID NO: 1-35, 1000-1078 и 3000-3069; или

b. когда используется SluCas9a, одна или более спейсерных последовательностей, выбранных из любой из SEQ ID NO: 100-225, 2000-2116 и 4000-4251; или

c. когда используется SaCas9, одна или более спейсерных последовательностей, содержащих по меньшей мере 20 смежных нуклеотидов спейсерной последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 1-35, 1000-1078 и 3000-3069; или

d. когда используется SluCas9a, одна или более спейсерных последовательностей, содержащих по меньшей мере 20 смежных нуклеотидов спейсерной последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 100-225, 2000-2116 и 4000-4251; или

e. когда используется SaCas9, одна или более спейсерных последовательностей, которые имеют по меньшей мере 90% идентичности с любой из SEQ ID NO: 1-35, 1000-1078 и 3000-3069; или

f. когда используется SluCas9, одна или более спейсерных последовательностей, которые имеют по меньшей мере 90% идентичности с любой из SEQ ID NO: 100-225, 2000-2116 и 4000-4251; или

g. когда SaCas9 используется по меньшей мере с двумя направляющими РНК, первая и вторая спейсерные последовательности выбраны из любой из следующих пар спейсерных последовательностей: SEQ ID NO: 10 и 15; 10 и 16; 12 и 16; 1001 и 1005; 1001 и 15; 1001 и 16; 1003 и 1005; 16 и 1003; 12 и 1010; 12 и 1012; 12 и 1013; 10 и 1016; 1017 и 1005; 1017 и 16; 1018 и 16; 15 и 10; 16 и 10; 16 и 12; 1005 и 1001; 15 и 1001; 16 и 1001; 1005 и 1003; 1003 и 16; 1010 и 12; 1012 и 12; 1013 и 12; 1016 и 10; 1005 и 1017; 16 и 1017; и 16 и 1018; или

h. когда SaCas9 используется по меньшей мере с двумя направляющими РНК, по меньшей мере 17, 18, 19, 20 или 21 непрерывный нуклеотид первой и второй спейсерной последовательности, выбранной из любой из следующих пар спейсерных последовательностей: SEQ ID NO: 10 и 15; 10 и 16; 12 и 16; 1001 и 1005; 1001 и 15; 1001 и 16; 1003 и 1005; 16 и 1003; 12 и 1010; 12 и 1012; 12 и 1013; 10 и 1016; 1017 и 1005; 1017 и 16; 1018 и 16; 15 и 10; 16 и 10; 16 и 12; 1005 и 1001; 15 и 1001; 16 и 1001; 1005 и 1003; 1003 и 16; 1010 и 12; 1012 и 12; 1013 и 12; 1016 и 10; 1005 и 1017; 16 и 1017; и 16 и 1018; или

i. когда SaCas9 используется по меньшей мере с двумя направляющими РНК, по меньшей мере на 90% идентичными первой и второй спейсерным последовательностям, выбранным из любой из следующих пар спейсерных последовательностей: SEQ ID NO: 10 и 15; 10 и 16; 12 и 16; 1001 и 1005; 1001 и 15; 1001 и 16; 1003 и 1005; 16 и 1003; 12 и 1010; 12 и 1012; 12 и 1013; 10 и 1016; 1017 и 1005; 1017 и 16; 1018 и 16; 15 и 10; 16 и 10; 16 и 12; 1005 и 1001; 15 и 1001; 16 и 1001; 1005 и 1003; 1003 и 16; 1010 и 12; 1012 и 12; 1013 и 12; 1016 и 10; 1005 и 1017; 16 и 1017; и 16 и 1018; или

j. когда SluCas9 используют по меньшей мере с двумя направляющими РНК, первая и вторая спейсерные последовательности выбраны из любой из следующих пар спейсерных последовательностей: SEQ ID NO: 148 и 134; 149 и 135; 150 и 135; 131 и 136; 151 и 136; 139 и 131; 139 и 151; 140 и 131; 140 и 151; 141 и 148; 144 и 149; 144 и 150; 145 и 131; 145 и 151; 146 и 148; 134 и 148; 135 и 149; 135 и 150; 136 и 131; 136 и 151; 131 и 139; 151 и 139; 131 и 140; 151 и 140; 148 и 141; 149 и 144; 150 и 144; 131 и 145; 151 и 145; и 148 и 146; или

k. когда SluCas9 используется по меньшей мере с двумя направляющими РНК, по меньшей мере 17, 18, 19, 20 или 21 непрерывный нуклеотид первой и второй спейсерной последовательности, выбранной из любой из следующих пар спейсерных последовательностей: SEQ ID NO: 148 и 134; 149 и 135; 150 и 135; 131 и 136; 151 и 136; 139 и 131; 139 и 151; 140 и 131; 140 и 151; 141 и 148; 144 и 149; 144 и 150; 145 и 131; 145 и 151; 146 и 148; 134 и 148; 135 и 149; 135 и 150; 136 и 131; 136 и 151; 131 и 139; 151 и 139; 131 и 140; 151 и 140; 148 и 141; 149 и 144; 150 и 144; 131 и 145; 151 и 145; и 148 и 146; или

l. когда SluCas9 используется по меньшей мере с двумя направляющими РНК, по меньшей мере на 90% идентичными первой и второй спейсерным последовательностям, выбранным из любой из следующих пар спейсерных последовательностей: SEQ ID NO: 148 и 134; 149 и 135; 150 и 135; 131 и 136; 151 и 136; 139 и 131; 139 и 151; 140 и 131; 140 и 151; 141 и 148; 144 и 149; 144 и 150; 145 и 131; 145 и 151; 146 и 148; 134 и 148; 135 и 149; 135 и 150; 136 и 131; 136 и 151; 131 и 139; 151 и 139; 131 и 140; 151 и 140; 148 и 141; 149 и 144; 150 и 144; 131 и 145; 151 и 145; и 148 и 146; или

m. когда SluCas9 используется по меньшей мере с двумя направляющими РНК, по меньшей мере на 90% идентичными первой и второй спейсерным последовательностям, выбранным из любой из следующих пар спейсерных последовательностей:

- i. SEQ ID NO: 148 и 134,
- ii. SEQ ID NO: 145 и 131,
- iii. SEQ ID NO: 144 и 149;
- iv. SEQ ID NO: 144 и 150; и
- v. SEQ ID NO: 146 и 148; или

n. когда SaCas9-ККН используется по меньшей мере с двумя направляющими РНК, по меньшей мере на 90% идентичными первой и второй спейсерным последовательностям, выбранным из любой из следующих пар спейсерных последовательностей:

- i. SEQ ID NO: 12 и 1013; и
- ii. SEQ ID NO: 12 и 1016.

11. Композиция, содержащая одиночную молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую одну или более направляющих РНК и Cas9, где одиночная молекула нуклеиновой кислоты содержит:

a. первую нуклеиновую кислоту, кодирующую одну или более спейсерных последовательностей, выбранных из любой из SEQ ID NO: 1-35, 1000-1078 или 3000-3069, и вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую Cas9 *Staphylococcus aureus* (SaCas9); или

b. первую нуклеиновую кислоту, кодирующую одну или более спейсерных последовательностей, выбранных из любой из SEQ ID NO: 100-225, 2000-2116 или 4000-4251 и вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую *Staphylococcus lugdunensis* (SluCas9); или

c. первую нуклеиновую кислоту, кодирующую одну или более спейсерных последовательностей, содержащих по меньшей мере 20 смежных нуклеотидов спейсерной последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 1-35, 1000-1078 или 3000-3069, и

вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую Cas9 *Staphylococcus aureus* (SaCas9); или

d. первую нуклеиновую кислоту, кодирующую одну или более спейсерных последовательностей, содержащих по меньшей мере 20 смежных нуклеотидов спейсерной последовательности, выбранной из любой из SEQ ID NO: 100-225, 2000-2116 или 4000-4251 и вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую *Staphylococcus lugdunensis* (SluCas9); или

e. первую нуклеиновую кислоту, кодирующую одну или более спейсерных последовательностей, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с любой из SEQ ID NO: 1-35, 1000-1078 или 3000-3069, и вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую Cas9 *Staphylococcus aureus* (SaCas9); или

f. первую нуклеиновую кислоту, кодирующую одну или более спейсерных последовательностей, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с любой из SEQ ID NO: 100-225, 2000-2116 или 4000-4251 и вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую *Staphylococcus lugdunensis* (SluCas9); или

g. первую нуклеиновую кислоту, кодирующую пару направляющих РНК, содержащую первую и вторую спейсерные последовательности, выбранные из любой из следующих пар спейсерных последовательностей: SEQ ID NO: 10 и 15; 10 и 16; 12 и 16; 1001 и 1005; 1001 и 15; 1001 и 16; 1003 и 1005; 16 и 1003; 12 и 1010; 12 и 1012; 12 и 1013; 10 и 1016; 1017 и 1005; 1017 и 16; 1018 и 16; 15 и 10; 16 и 10; 16 и 12; 1005 и 1001; 15 и 1001; 16 и 1001; 1005 и 1003; 1003 и 16; 1010 и 12; 1012 и 12; 1013 и 12; 1016 и 10; 1005 и 1017; 16 и 1017; и 16 и 1018; и вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую Cas9 *Staphylococcus aureus* (SaCas9); или

h. первую нуклеиновую кислоту, кодирующую пару направляющих РНК, содержащую по меньшей мере 17, 18, 19, 20 или 21 смежный нуклеотид первой и второй спейсерных последовательностей, выбранных из любой из следующих пар спейсерных последовательностей: SEQ ID NO: 10 и 15; 10 и 16; 12 и 16; 1001 и 1005; 1001 и 15; 1001 и 16; 1003 и 1005; 16 и 1003; 12 и 1010; 12 и 1012; 12 и 1013; 10 и 1016; 1017 и 1005; 1017 и 16; 1018 и 16; 15 и 10; 16 и 10; 16 и 12; 1005 и 1001; 15 и 1001; 16 и 1001; 1005 и 1003; 1003 и 16; 1010 и 12; 1012 и 12; 1013 и 12; 1016 и 10; 1005 и 1017; 16 и 1017; и 16 и 1018; и вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую Cas9 *Staphylococcus aureus* (SaCas9); или

i. первую нуклеиновую кислоту, кодирующую пару направляющих РНК, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с первой и второй спейсерными последовательностями, выбранными из любой из следующих пар спейсерных последовательностей: SEQ ID NO: 10 и 15; 10 и 16; 12 и 16; 1001 и 1005; 1001 и 15; 1001 и 16; 1003 и 1005; 16 и 1003; 12 и 1010; 12 и 1012; 12 и 1013; 10 и 1016; 1017 и 1005; 1017 и 16; 1018 и 16; 15 и 10; 16 и 10; 16 и 12; 1005 и 1001; 15 и 1001; 16 и 1001; 1005 и 1003; 1003 и 16; 1010 и 12; 1012 и 12; 1013 и 12; 1016 и 10; 1005 и 1017; 16 и 1017; и 16 и 1018; и вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую Cas9 *Staphylococcus aureus* (SaCas9); или

j. первую нуклеиновую кислоту, кодирующую пару направляющих РНК, содержащую первую и вторую спейсерные последовательности, выбранные из любой из следующих пар спейсерных последовательностей: SEQ ID NO: 148 и 134; 149 и 135; 150 и

135; 131 и 136; 151 и 136; 139 и 131; 139 и 151; 140 и 131; 140 и 151; 141 и 148; 144 и 149; 144 и 150; 145 и 131; 145 и 151; 146 и 148; 134 и 148; 135 и 149; 135 и 150; 136 и 131; 136 и 151; 131 и 139; 151 и 139; 131 и 140; 151 и 140; 148 и 141; 149 и 144; 150 и 144; 131 и 145; 151 и 145; и 148 и 146; и вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую *Staphylococcus lugdunensis* (SluCas9); или

к. первую нуклеиновую кислоту, кодирующую пару направляющих РНК, содержащую по меньшей мере 17, 18, 19, 20 или 21 смежный нуклеотид первой и второй спейсерных последовательностей, выбранных из любой из следующих пар спейсерных последовательностей: SEQ ID NO: 148 и 134; 149 и 135; 150 и 135; 131 и 136; 151 и 136; 139 и 131; 139 и 151; 140 и 131; 140 и 151; 141 и 148; 144 и 149; 144 и 150; 145 и 131; 145 и 151; 146 и 148; 134 и 148; 135 и 149; 135 и 150; 136 и 131; 136 и 151; 131 и 139; 151 и 139; 131 и 140; 151 и 140; 148 и 141; 149 и 144; 150 и 144; 131 и 145; 151 и 145; и 148 и 146; и вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую *Staphylococcus lugdunensis* (SluCas9); или

л. первую нуклеиновую кислоту, кодирующую пару направляющих РНК, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с первой и второй спейсерными последовательностями, выбранными из любой из следующих пар спейсерных последовательностей: SEQ ID NO: 148 и 134; 149 и 135; 150 и 135; 131 и 136; 151 и 136; 139 и 131; 139 и 151; 140 и 131; 140 и 151; 141 и 148; 144 и 149; 144 и 150; 145 и 131; 145 и 151; 146 и 148; 134 и 148; 135 и 149; 135 и 150; 136 и 131; 136 и 151; 131 и 139; 151 и 139; 131 и 140; 151 и 140; 148 и 141; 149 и 144; 150 и 144; 131 и 145; 151 и 145; и 148 и 146; и вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую *Staphylococcus lugdunensis* (SluCas9); или

м. первую нуклеиновую кислоту, кодирующую пару направляющих РНК, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с первой и второй спейсерными последовательностями, выбранными из любой из следующих пар спейсерных последовательностей:

- i. SEQ ID NO: 148 и 134,
- ii. SEQ ID NO: 145 и 131,
- iii. SEQ ID NO: 144 и 149;
- iv. SEQ ID NO: 144 и 150;
- v. SEQ ID NO: 146 и 148;

и вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую *Staphylococcus lugdunensis* (SluCas9);

или

н. первую нуклеиновую кислоту, кодирующую пару направляющих РНК, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с первой и второй спейсерными последовательностями, выбранными из любой из следующих пар спейсерных последовательностей:

- i. SEQ ID NO: 12 и 1013; и
- ii. SEQ ID NO: 12 и 1016;

и вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую SaCas9-ККН.

12. Композиция, содержащая одну или более молекул нуклеиновой кислоты,

кодирующих *Staphylococcus lugdunensis* (SluCas9), и по меньшей мере две направляющие РНК, где первая и вторая направляющие РНК нацелены на разные последовательности в гене DMD, где первая и вторая направляющие РНК содержат последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с первой и второй спейсерными последовательностями, выбранными из любой из следующих пар спейсерных последовательностей:

- i. SEQ ID NO: 148 и 134,
- ii. SEQ ID NO: 145 и 131,
- iii. SEQ ID NO: 144 и 149;
- iv. SEQ ID NO: 144 и 150;
- v. SEQ ID NO: 146 и 148.

13. Композиция, содержащая одну или более молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих эндонуклеазу, и по меньшей мере две направляющие РНК, где каждая направляющая РНК нацелена на отличную последовательность в гене DMD, где каждая направляющая РНК содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с первой и второй спейсерными последовательностями, выбранными из любой из следующих пар спейсерных последовательностей:

- i. SEQ ID NO: 12 и 1013; и
- ii. SEQ ID NO: 12 и 1016; и

вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую SaCas9-KKH.

14. Композиция по любому из предшествующих пунктов, где первая и/или вторая нуклеиновая кислота, если она присутствует, кодирует по меньшей мере две направляющие РНК.

15. Композиция по любому из предшествующих пунктов, где первая и/или вторая нуклеиновая кислота, если она присутствует, кодирует по меньшей мере три направляющие РНК.

16. Композиция по любому из предыдущих пунктов, где первая и/или вторая нуклеиновая кислота, если она присутствует, кодирует по меньшей мере четыре направляющие РНК.

17. Композиция по любому из предшествующих пунктов, где первая и/или вторая нуклеиновая кислота, если она присутствует, кодирует по меньшей мере пять направляющих РНК.

18. Композиция по любому из предшествующих пунктов, где первая и/или вторая нуклеиновая кислота, если она присутствует, кодирует по меньшей мере шесть направляющих РНК.

19. Композиция по любому из предшествующих пунктов, где первая и/или вторая нуклеиновая кислота, если она присутствует, кодирует по меньшей мере семь направляющих РНК.

20. Композиция по любому из предшествующих пунктов, где первая и/или вторая нуклеиновая кислота, если она присутствует, кодирует по меньшей мере восемь

направляющих РНК.

21. Композиция по любому из предшествующих пунктов, где первая нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую эндонуклеазу, и по меньшей мере одну, по меньшей мере две или по меньшей мере три направляющие РНК.

22. Композиция по любому из предшествующих пунктов, где первая нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую эндонуклеазу, и от одной до n направляющих РНК, где n представляет собой не более максимального количества направляющих РНК, которые могут быть экспрессированы из указанной нуклеиновой кислоты.

23. Композиция по любому из предшествующих пунктов, где первая нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую эндонуклеазу, и от одной до трех направляющих РНК.

24. Композиция по любому из предшествующих пунктов, где вторая нуклеиновая кислота, если она присутствует, кодирует по меньшей мере одну, по меньшей мере две, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять или по меньшей мере шесть направляющих РНК.

25. Композиция по любому из предшествующих пунктов, где вторая нуклеиновая кислота, если она присутствует, кодирует от одной до n направляющих РНК, где n не превышает максимальное количество направляющих РНК, которые могут быть экспрессированы из указанной нуклеиновой кислоты.

26. Композиция по любому из предшествующих пунктов, где вторая нуклеиновая кислота, если она присутствует, кодирует от одной до шести направляющих РНК.

27. Композиция по любому из предшествующих пунктов, где вторая нуклеиновая кислота, если она присутствует, кодирует 2-10, 2-9, 2-8, 2-7, 2-6, 2-5, 2-4 или 2-3 направляющие РНК.

28. Композиция по любому из предшествующих пунктов, где вторая нуклеиновая кислота, если она присутствует, кодирует 2, 3, 4, 5 или 6 направляющих РНК.

29. Композиция по любому из предшествующих пунктов, содержащая по меньшей мере две молекулы нуклеиновой кислоты, где направляющая РНК, кодируемая первой нуклеиновой кислотой и второй нуклеиновой кислотой, является одной и той же.

30. Композиция по любому из предшествующих пунктов, содержащая по меньшей мере две молекулы нуклеиновой кислоты, где направляющие РНК, кодируемые первой нуклеиновой кислотой и второй нуклеиновой кислотой, отличаются друг от друга.

31. Композиция по любому из предшествующих пунктов, содержащая по меньшей мере две молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие по меньшей мере две направляющие РНК, где по меньшей мере одна направляющая РНК связывается с целевой последовательностью в экзоне гена DMD, расположенном выше преждевременного стоп-кодона, и где по меньшей мере одна направляющая РНК связывается с целевой последовательностью в экзоне гена DMD, расположенном ниже преждевременного стоп-кодона.

32. Композиция по любому из предшествующих пунктов, содержащая по меньшей мере две молекулы нуклеиновой кислоты, где первая молекула нуклеиновой кислоты и вторая молекула нуклеиновой кислоты кодируют одну и ту же направляющую РНК.

33. Композиция по любому из предшествующих пунктов, содержащая по меньшей мере две молекулы нуклеиновой кислоты, каждая из которых кодирует по меньшей мере одну направляющую РНК, где вторая молекула нуклеиновой кислоты кодирует направляющую РНК, которая связывается с той же целевой последовательностью, что и направляющая РНК в первой молекуле нуклеиновой кислоты.

34. Композиция по любому из предшествующих пунктов, содержащая по меньшей мере две молекулы нуклеиновой кислоты, где вторая молекула нуклеиновой кислоты кодирует по меньшей мере 2, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5 или по меньшей мере 6 направляющих РНК, где направляющие РНК во второй молекуле нуклеиновой кислоты связываются с той же целевой последовательностью, что и направляющая РНК в первой молекуле нуклеиновой кислоты.

35. Композиция по любому из предшествующих пунктов, где композиция содержит по меньшей мере две молекулы нуклеиновой кислоты, где первая молекула нуклеиновой кислоты содержит последовательность, кодирующую эндонуклеазу, где вторая молекула нуклеиновой кислоты кодирует первую направляющую РНК и вторую направляющую РНК, где первая направляющая РНК и вторая направляющая РНК имеют разные последовательности, и где вторая молекула нуклеиновой кислоты не кодирует эндонуклеазу.

36. Композиция по п. 35, где первая молекула нуклеиновой кислоты также кодирует копию первой направляющей РНК и копию второй направляющей РНК.

37. Композиция по п. 35 или п. 36, где вторая молекула нуклеиновой кислоты кодирует две копии первой направляющей РНК и две копии второй направляющей РНК.

38. Композиция по любому из пп. 35-37, где вторая молекула нуклеиновой кислоты кодирует три копии первой направляющей РНК и три копии второй направляющей РНК.

39. Композиция по любому из пп. 35-37, где первая молекула нуклеиновой кислоты содержит от 5' к 3' плюс-цепи: обратную комплементарную цепь первой каркасной последовательности направляющей РНК, обратную комплементарную цепь нуклеотидной последовательности, кодирующей последовательность первой направляющей РНК, обратную комплементарную цепь промотора для экспрессии последовательности нуклеотидов, кодирующей последовательность первой направляющей РНК, промотор для экспрессии нуклеотидной последовательности, кодирующей эндонуклеазу, нуклеотидную последовательность, кодирующую эндонуклеазу, последовательность полиаденилирования, промотор для экспрессии второй направляющей РНК в том же направлении, что и промотор для эндонуклеазы, последовательность второй направляющей РНК и вторую каркасную последовательность направляющей РНК.

40. Композиция по п. 39, где промотор для экспрессии нуклеотидной последовательности, кодирующей первую последовательность направляющей РНК, в

первой молекуле нуклеиновой кислоты представляет собой промотор U6, и промотор для экспрессии нуклеотидной последовательности, кодирующей вторую направляющую РНК, в первой молекуле нуклеиновой кислоты является промотором U6.

41. Композиция по любому из пп. 35-40, где первая молекула нуклеиновой кислоты находится в первом векторе, а вторая нуклеиновая кислота находится в отдельном втором векторе.

42. Композиция по любому из пп. 35-41, где первая молекула нуклеиновой кислоты кодирует эндонуклеазу *Cas9 Staphylococcus aureus* (SaCas9), и где первая направляющая РНК содержит первую последовательность, а вторая направляющая РНК содержит вторую последовательность из любой из следующих пар последовательностей: SEQ ID NO: 10 и 15; 10 и 16; 12 и 16; 1001 и 1005; 1001 и 15; 1001 и 16; 1003 и 1005; 16 и 1003; 12 и 1010; 12 и 1012; 12 и 1013; 10 и 1016; 1017 и 1005; 1017 и 16; 1018 и 16; 15 и 10; 16 и 10; 16 и 12; 1005 и 1001; 15 и 1001; 16 и 1001; 1005 и 1003; 1003 и 16; 1010 и 12; 1012 и 12; 1013 и 12; 1016 и 10; 1005 и 1017; 16 и 1017; и 16 и 1018.

43. Композиция по п. 42, где первая направляющая РНК содержит последовательность SEQ ID NO: 12, и вторая направляющая РНК содержит последовательность SEQ ID NO: 1013.

44. Композиция по любому из пп. 35-43, где первая молекула нуклеиновой кислоты кодирует эндонуклеазу *Staphylococcus lugdunensis* (SluCas9), и где первая направляющая РНК содержит первую последовательность, а вторая направляющая РНК содержит вторую последовательность из любой из следующих пар последовательностей: SEQ ID NO: 148 и 134; 149 и 135; 150 и 135; 131 и 136; 151 и 136; 139 и 131; 139 и 151; 140 и 131; 140 и 151; 141 и 148; 144 и 149; 144 и 150; 145 и 131; 145 и 151; 146 и 148; 134 и 148; 135 и 149; 135 и 150; 136 и 131; 136 и 151; 131 и 139; 151 и 139; 131 и 140; 151 и 140; 148 и 141; 149 и 144; 150 и 144; 131 и 145; 151 и 145; и 148 и 146.

45. Композиция по п. 44, где:

а) первая направляющая РНК содержит последовательность SEQ ID NO: 148, и вторая направляющая РНК содержит последовательность SEQ ID NO: 134; или

б) вторая направляющая РНК содержит последовательность SEQ ID NO: 145, и вторая направляющая РНК содержит последовательность SEQ ID NO: 131.

46. Композиция по любому из пп. 35-45, где первая нуклеиновая кислота находится в первом векторе, а вторая нуклеиновая кислота находится в отдельном втором векторе.

47. Композиция по п. 46, где первый и второй векторы представляют собой вирусные векторы.

48. Композиция по п. 47, где вирусные векторы представляют собой векторы AAV9.

49. Композиция по п. 48, где каждый из векторов AAV9 имеет размер менее 5 т.п.н., менее 4,9 т.п.н., менее 4,85 т.п.н., менее 4,8 т.п.н. или менее 4,75 т.п.н. от ITR до ITR, включая оба ITR.

50. Композиция по п. 48 или п. 49, где каждый вектор AAV9 имеет размер 3,9-5 т.п.н., 4-5 т.п.н., 4,2-5 т.п.н., 4,4-5 т.п.н., 4,6-5 т.п.н., 4,7-5 т.п.н., 3,9-4,9 т.п.н., 4,2-4,9 т.п.н.,

4,4-4,9 т.п.н., 4,7-4,9 т.п.н., 3,9-4,85 т.п.н., 4,2-4,85 т.п.н., 4,4-4,85 т.п.н., 4,6-4,85 т.п.н., 4,7-4,85 т.п.н., 4,7-4,9 т.п.н., 3,9-4,8 т.п.н., 4,2-4,8 т.п.н., 4,4-4,8 т.п.н. или 4,6-4,8 т.п.н. от ITR до ITR, включая оба ITR.

51. Композиция по любому из пп. 47-50, где первый вектор имеет размер от 4,4 до 4,85 т.п.н. от ITR до ITR, включая оба ITR.

52. Композиция по любому из предшествующих пунктов, где направляющая РНК связывается с одной или более целевыми последовательностями в гене DMD.

53. Композиция по любому из предшествующих пунктов, где направляющая РНК связывается с одной или более целевыми последовательностями в экзоне гена DMD.

54. Композиция по любому из предшествующих пунктов, содержащая две направляющие РНК, где i) каждая направляющая РНК нацелена на последовательность в пределах экзона; ii) одна направляющая РНК нацелена на последовательность внутри экзона, а другая нацелена на последовательность внутри интрона; или iii) каждая направляющая РНК нацелена на последовательность в интроне.

55. Композиция по любому из предшествующих пунктов, содержащая по меньшей мере две направляющие РНК, где i) каждая направляющая РНК нацелена на одну и ту же геномную целевую последовательность; ii) каждая направляющая РНК нацелена на другую целевую последовательность; или iii) по меньшей мере одна направляющая РНК нацелена на одну последовательность, и по меньшей мере одна направляющая РНК нацелена на отличную последовательность.

56. Композиция по любому из предшествующих пунктов, содержащая направляющую РНК, которая связывается с экзоном гена DMD, где экзон выбран из экзонов 43, 44, 45, 50, 51 и 53.

57. Композиция по любому из предшествующих пунктов, содержащая по меньшей мере две направляющие РНК, которые связываются с экзоном гена DMD, где по меньшей мере одна направляющая РНК связывается с целевой последовательностью в экзоне гена DMD, и по меньшей мере одна направляющая РНК связывается с другой целевой последовательностью в том же экзоне гена DMD.

58. Композиция по любому из предшествующих пунктов, содержащая по меньшей мере две направляющие РНК, где по меньшей мере одна направляющая РНК связывается с целевой последовательностью в экзоне, расположенном выше преждевременного стоп-кодона, и по меньшей мере одна направляющая РНК связывается с целевой последовательностью в экзоне, расположенном ниже преждевременного стоп-кодона.

59. Композиция по любому из предшествующих пунктов, содержащая по меньшей мере две направляющие РНК, где по меньшей мере одна направляющая РНК связывается с целевой последовательностью в экзоне гена DMD, и по меньшей мере одна направляющая РНК связывается с другой целевой последовательностью в одном и том же экзоне гена DMD, где при экспрессии *in vivo* или *in vivo* часть экзона вырезается.

60. Композиция по любому из предшествующих пунктов, содержащая по меньшей мере две направляющие РНК, где после экспрессии *in vitro* или *in vivo* в комбинации с РНК-

направляемой эндонуклеазой направляющие РНК вырезают часть экзона.

61. Композиция по любому из предшествующих пунктов, содержащая по меньшей мере две направляющие РНК, где после экспрессии *in vitro* или *in vivo* в комбинации с РНК-направляемой эндонуклеазой направляющие РНК вырезают часть экзона, и где часть экзона, оставшаяся после вырезания, повторно соединяется с однонуклеотидной вставкой.

62. Композиция по любому из предшествующих пунктов, содержащая по меньшей мере две направляющие РНК, где после экспрессии *in vitro* или *in vivo* в комбинации с РНК-направляемой эндонуклеазой направляющие РНК вырезают часть экзона, где часть экзона, оставшаяся после вырезания, повторно соединяется без нуклеотидной вставки.

63. Композиция по любому из предшествующих пунктов, содержащая по меньшей мере две направляющие РНК, где после экспрессии *in vitro* или *in vivo* в комбинации с РНК-направляемой эндонуклеазой направляющие РНК вырезают часть экзона, где вырезаемая часть экзона имеет размер 5-250 нуклеотидов.

64. Композиция по любому из предшествующих пунктов, содержащая по меньшей мере две направляющие РНК, где после экспрессии *in vitro* или *in vivo* в комбинации с РНК-направляемой эндонуклеазой направляющие РНК вырезают часть экзона, где вырезаемая часть экзона имеет размер 5-250, 5-200, 5-150, 5-100, 5-75, 5-50, 5-25, 5-10, 20-250, 20-200, 20-150, 20-100, 20-75, 20-50, 20-25, 50-250, 50-200, 50-150, 50-100, 50-75 нуклеотидов.

65. Композиция по любому из предшествующих пунктов, содержащая по меньшей мере две направляющие РНК, где после экспрессии *in vitro* или *in vivo* в комбинации с РНК-направляемой эндонуклеазой направляющие РНК вырезают часть экзона, где вырезаемая часть экзона имеет размер 8-167 нуклеотидов.

66. Композиция по любому из предшествующих пунктов, где направляющая РНК представляет собой онРНК.

67. Композиция по любому из предшествующих пунктов, где направляющая РНК является модифицированной.

68. Композиция по любому из предшествующих пунктов, где направляющая РНК модифицирована, и где модификация изменяет одно или более 2'-положений и/или фосфодиэфирных связей.

69. Композиция по любому из предшествующих пунктов, где направляющая РНК модифицирована и где модификация изменяет один или более или все первые три нуклеотида направляющей РНК и/или последние три нуклеотида онРНК.

70. Композиция по любому из пп. 66-69, где модификация изменяет один или более или все последние три нуклеотида направляющей РНК.

71. Композиция по любому из предшествующих пунктов, где направляющая РНК является модифицированной, и где модификация включает одну или более из фосфоротиоатной модификации, 2'-ОМе модификации, 2'-О-МОЕ модификации, 2'-F модификации, 2'-О-метин-4' мостиковой модификации, 3'-тиофосфоацетатной модификации или 2'-дезоксидификации.

72. Композиция по любому из предшествующих пунктов, где дополнительно

содержит фармацевтически приемлемый эксципиент.

73. Композиция по любому из предшествующих пунктов, где связана с липидной наночастицей (ЛНЧ).

74. Композиция по любому из предшествующих пунктов, где связана с вирусным вектором.

75. Композиция по любому из предшествующих пунктов, где связана с вирусным вектором, и где вирусный вектор представляет собой вектор на основе аденоассоциированного вируса, лентивирусный вектор, дефицитный по интегразе лентивирусный вектор, аденовирусный вектор, вектор на основе вируса осповакцины, альфавирусный вектор или вектор на основе вируса простого герпеса.

76. Композиция по любому из предшествующих пунктов, где связана с вирусным вектором, и где вирусный вектор представляет собой вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV).

77. Композиция по любому из предшествующих пунктов, где связана с вирусным вектором, где вирусный вектор представляет собой вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV) и где вектор AAV представляет собой вектор AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh10, AAVrh74 или AAV9, где номер после AAV указывает на серотип AAV.

78. Композиция по любому из предшествующих пунктов, где связана с вирусным вектором, где вирусный вектор представляет собой вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV) и где вектор AAV представляет собой вектор AAV серотипа 9 (AAV9).

79. Композиция по п. 78, где вектор AAV серотипа 9 имеет размер менее 5 т.п.н., менее 4,9 т.п.н., менее 4,85 т.п.н., менее 4,8 т.п.н. или менее 4,75 т.п.н. от ITR до ITR, включая оба ITR.

80. Композиция по п. 78 или п. 79, где вектор AAV серотипа 9 имеет размер 3,9-5 т.п.н., 4-5 т.п.н., 4,2-5 т.п.н., 4,4-5 т.п.н., 4,6-5 т.п.н., 4,7-5 т.п.н., 3,9-4,9 т.п.н., 4,2-4,9 т.п.н., 4,4-4,9 т.п.н., 4,7-4,9 т.п.н., 3,9-4,85 т.п.н., 4,2-4,85 т.п.н., 4,4-4,85 т.п.н., 4,6-4,85 т.п.н., 4,7-4,85 т.п.н., 4,7-4,9 т.п.н., 3,9-4,8 т.п.н., 4,2-4,8 т.п.н., 4,4-4,8 т.п.н. или 4,6-4,8 т.п.н. от ITR до ITR, включая оба ITR.

81. Композиция по любому из пп. 78-80, где вектор AAV серотипа 9 имеет размер 4,4-4,85 т.п.н. от ITR до ITR, включая оба ITR.

82. Композиция по любому из предшествующих пунктов, где связана с вирусным вектором, где вирусный вектор представляет собой вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV) и где вектор AAV представляет собой вектор AAVrh10.

83. Композиция по любому из предшествующих пунктов, где связана с вирусным вектором, где вирусный вектор представляет собой вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV) и где вектор AAV представляет собой вектор AAVrh74.

84. Композиция по любому из предшествующих пунктов, где связана с вирусным вектором, где вирусный вектор содержит тканеспецифический промотор.

85. Композиция по любому из предшествующих пунктов, где связана с вирусным вектором, где вирусный вектор содержит специфический для мышц промотор, необязательно где специфический для мышц промотор представляет собой промотор мышечной креатинкиназы, промотор десмина, промотор МНСК7, промотор SPc5-12 или промотор СК8е.

86. Композиция по любому из предшествующих пунктов, где связана с вирусным вектором, где вирусный вектор содержит любой один или более из следующих промоторов: промотор U6, H1 и 7SK.

87. Композиция по любому из предшествующих пунктов, содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую SaCas9, где по меньшей мере одна направляющая РНК содержит спейсерную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 12, 15, 16, 20, 27, 28, 32, 33 и 35.

88. Композиция по любому из предшествующих пунктов, содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую SaCas9, где SaCas9 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 711.

89. Композиция по любому из предшествующих пунктов, содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую SaCas9, где SaCas9 представляет собой вариант аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 711.

90. Композиция по любому из предшествующих пунктов, содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую SaCas9, где SaCas9 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 715-717.

91. Композиция по любому из предшествующих пунктов, содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую SluCas9, где по меньшей мере одна направляющая РНК содержит спейсерную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 131, 134, 135, 136, 139, 144, 148, 149, 150, 151, 179, 184, 201, 210, 223, 224, и 225.

92. Композиция по любому из предшествующих пунктов, содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую SluCas9, где SluCas9 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 712.

93. Композиция по любому из предшествующих пунктов, содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую SluCas9, где SluCas9 представляет собой вариант аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 712.

94. Композиция по любому из предшествующих пунктов, содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую SluCas9, где SluCas9 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 718-720.

95. Композиция по п. 1, где одиночная молекула нуклеиновой кислоты или первая нуклеиновая кислота содержит от 5' к 3' плюс-цепи: обратную комплементарную цепь нуклеотидной последовательности, кодирующей последовательность первой направляющей РНК, обратную комплементарную цепь нуклеотидной последовательности,

кодирующей последовательности первой направляющей РНК, обратную комплементарную цепь промотора для экспрессии нуклеотидной последовательности, кодирующей последовательности первой направляющей РНК, промотор для экспрессии нуклеотидной последовательности, кодирующей Cas9 *Staphylococcus aureus* (SaCas9) или *Staphylococcus lugdunensis* (SluCas9), нуклеотидную последовательность, кодирующую SaCas9 или SluCas9, последовательность полиаденилирования, промотор для экспрессии второй направляющей РНК в том же направлении, что и промотор для SaCas9 или SluCas9, нуклеотидную последовательность, кодирующую последовательности второй направляющей РНК, и нуклеотидную последовательность, кодирующую вторую каркасную последовательности направляющей РНК.

96. Композиция по п. 95, где промотор для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей первую последовательности направляющей РНК, представляет собой промотор U6, а промотор для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей вторую направляющую РНК, представляет собой промотор U6.

97. Композиция по п. 95 или п. 96, где SaCas9 или SluCas9 содержат по меньшей мере два сигнала ядерной локализации (NLS).

98. Композиция по п. 97, где SaCas9 или SluCas9 содержат с-Мус NLS, слитую с N-концом SaCas9 или SluCas9, необязательно посредством линкера.

99. Композиция по п. 97 или п. 98, где SaCas9 или SluCas9 содержат NLS SV40, слитую с С-концом SaCas9 или SluCas9, необязательно посредством линкера.

100. Композиция по любому из пп. 95-99, где SaCas9 или SluCas9 содержат NLS нуклеоплазм, слитый с С-концом SaCas9 или SluCas9, необязательно посредством линкера.

101. Композиция по любому из пп. 95-100, где SaCas9 или SluCas9 содержат:

а) NLS с-Мус, слитый с N-концом SaCas9 или SluCas9, необязательно с помощью линкера,

б) NLS SV40, слитый с С-концом SaCas9 или SluCas9, необязательно с помощью линкера, и

с) NLS, нуклеоплазм, слитый с С-концом SV40 NLS, необязательно с помощью линкера,

102. Композиция по любому из пп. 95-101, где каркасная последовательности для первой направляющей РНК содержит последовательности SEQ ID NO: 901.

103. Композиция по любому из пп. 95-102, где каркасная последовательности для второй направляющей РНК содержит последовательности SEQ ID NO: 901.

104. Композиция по любому из пп. 95-103, где одиночная молекула нуклеиновой кислоты или первая нуклеиновая кислота имеет размер менее 5 т.п.н., менее 4,9 т.п.н., 4,85, 4,8 или 4,75 т.п.н.

105. Композиция по любому из пп. 95-104, где одиночная молекула нуклеиновой кислоты или первая нуклеиновая кислота имеет размер 3,9-5 т.п.н., 4-5 т.п.н., 4,2-5 т.п.н., 4,4-5 т.п.н., 4,6-5 т.п.н., 4,7-5 т.п.н., 3,9-4,9 т.п.н., 4,2-4,9 т.п.н., 4,4-4,9 т.п.н., 4,7-4,9 т.п.н.,

3,9-4,85 т.п.н., 4,2-4,85 т.п.н., 4,4-4,85 т.п.н., 4,6-4,85 т.п.н., 4,7-4,85 т.п.н., 4,7-4,9 т.п.н., 3,9-4,8 т.п.н., 4,2-4,8 т.п.н., 4,4-4,8 т.п.н. или 4,6-4,8 т.п.н.

106. Композиция по п. 105, где одиночная молекула нуклеиновой кислоты или первая нуклеиновая кислота имеет размер 4,4-4,85 т.п.н.

107. Композиция, содержащая направляющую РНК, кодируемую последовательностью, содержащей любую из SEQ ID NO: 1-35, 1000-1078, или 3000-3069 или их комплементарные цепи.

108. Композиция, содержащая направляющую РНК, кодируемую последовательностью, содержащей любую из SEQ ID NO: 100-225, 2000-2116, или 4000-4251 или их комплементарные цепи.

109. Композиция по любому из пп. 1-108 для применения при лечении мышечной дистрофии Дюшенна (DMD).

110. Композиция по любому из пп. 1-108 для применения для создания одного или более двухцепочечных разрывов в любом одном или более экзонах 43, 44, 45, 50, 51 или 53 гена дистрофина.

111. Способ лечения мышечной дистрофии Дюшенна (DMD), включающий доставку в клетку композиции по любому из пп. 1-108.

112. Способ лечения мышечной дистрофии Дюшенна (DMD), включающий доставку в клетку одиночной молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей:

i) нуклеиновую кислоту, кодирующую одну или более направляющих РНК, где одна или более направляющих РНК содержат:

а. спейсерную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1-35, 1000-1078 или 3000-3069;

б. спейсерную последовательность, содержащую по меньшей мере 20 смежных нуклеотидов спейсерной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1-35, 1000-1078, или 3000-3069; или

с. спейсерную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с любой из SEQ ID NO: 1-35, 1000-1078, 3000-3069; и

ii) нуклеиновую кислоту, кодирующую *Cas9 Staphylococcus aureus* (SaCas9).

113. Способ лечения мышечной дистрофии Дюшенна (DMD), включающий доставку в клетку одиночной молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей:

i) молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую одну или более направляющих РНК, где одна или более направляющих РНК содержат:

а. спейсерную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 100-225, 2000-2116, или 4000-4251;

б. спейсерную последовательность, содержащую по меньшей мере 20 смежных нуклеотидов спейсерной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 100-225, 2000-2116, или 4000-4251; или

с. спейсерную последовательность, которая имеет по меньшей мере 90% идентичности с любой из SEQ ID NO: 100-225, 2000-2116, или 4000-4251; и

ii) молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую *Staphylococcus lugdunensis* (SluCas9).

114. Способ лечения мышечной дистрофии Дюшенна (DMD), включающий доставку в клетку одиночной молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей:

i) нуклеиновую кислоту, кодирующую пару направляющих РНК, содержащую:

а. первую и вторую спейсерные последовательности, выбранные из любой из SEQ ID NO: 10 и 15; 10 и 16; 12 и 16; 1001 и 1005; 1001 и 15; 1001 и 16; 1003 и 1005; 16 и 1003; 12 и 1010; 12 и 1012; 12 и 1013; 10 и 1016; 1017 и 1005; 1017 и 16; 1018 и 16; 15 и 10; 16 и 10; 16 и 12; 1005 и 1001; 15 и 1001; 16 и 1001; 1005 и 1003; 1003 и 16; 1010 и 12; 1012 и 12; 1013 и 12; 1016 и 10; 1005 и 1017; 16 и 1017; и 16 и 1018;

б. первую и вторую спейсерные последовательности, содержащие по меньшей мере 17, 18, 19, 20 или 21 смежный нуклеотид любой из SEQ ID NO: 10 и 15; 10 и 16; 12 и 16; 1001 и 1005; 1001 и 15; 1001 и 16; 1003 и 1005; 16 и 1003; 12 и 1010; 12 и 1012; 12 и 1013; 10 и 1016; 1017 и 1005; 1017 и 16; 1018 и 16; 15 и 10; 16 и 10; 16 и 12; 1005 и 1001; 15 и 1001; 16 и 1001; 1005 и 1003; 1003 и 16; 1010 и 12; 1012 и 12; 1013 и 12; 1016 и 10; 1005 и 1017; 16 и 1017; и 16 и 1018; или

с. первую и вторую спейсерные последовательности, которые имеют по меньшей мере 90% идентичности с любой из SEQ ID NO: 10 и 15; 10 и 16; 12 и 16; 1001 и 1005; 1001 и 15; 1001 и 16; 1003 и 1005; 16 и 1003; 12 и 1010; 12 и 1012; 12 и 1013; 10 и 1016; 1017 и 1005; 1017 и 16; 1018 и 16; 15 и 10; 16 и 10; 16 и 12; 1005 и 1001; 15 и 1001; 16 и 1001; 1005 и 1003; 1003 и 16; 1010 и 12; 1012 и 12; 1013 и 12; 1016 и 10; 1005 и 1017; 16 и 1017; и 16 и 1018; и

ii) нуклеиновую кислоту, кодирующую Cas9 *Staphylococcus aureus* (SaCas9).

115. Способ лечения мышечной дистрофии Дюшенна (DMD), включающий доставку в клетку одиночной молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей:

i) нуклеиновую кислоту, кодирующую пару направляющих РНК, содержащую:

а. первую и вторую спейсерные последовательности, выбранные из любой из SEQ ID NO: 148 и 134; 149 и 135; 150 и 135; 131 и 136; 151 и 136; 139 и 131; 139 и 151; 140 и 131; 140 и 151; 141 и 148; 144 и 149; 144 и 150; 145 и 131; 145 и 151; и 146 и 148;

б. первую и вторую спейсерные последовательности, содержащие по меньшей мере 17, 18, 19, 20 или 21 смежный нуклеотид любой из SEQ ID NO: 148 и 134; 149 и 135; 150 и 135; 131 и 136; 151 и 136; 139 и 131; 139 и 151; 140 и 131; 140 и 151; 141 и 148; 144 и 149; 144 и 150; 145 и 131; 145 и 151; 146 и 148; 134 и 148; 135 и 149; 135 и 150; 136 и 131; 136 и 151; 131 и 139; 151 и 139; 131 и 140; 151 и 140; 148 и 141; 149 и 144; 150 и 144; 131 и 145; 151 и 145; и 148 и 146; или

с. первую и вторую спейсерные последовательности, которые имеют по меньшей мере 90% идентичности с любой из SEQ ID NO: 148 и 134; 149 и 135; 150 и 135; 131 и 136; 151 и 136; 139 и 131; 139 и 151; 140 и 131; 140 и 151; 141 и 148; 144 и 149; 144 и 150; 145 и 131; 145 и 151; 146 и 148; 134 и 148; 135 и 149; 135 и 150; 136 и 131; 136 и 151; 131 и 139; 151 и 139; 131 и 140; 151 и 140; 148 и 141; 149 и 144; 150 и 144; 131 и 145; 151 и 145; и 148

и 146; и

ii) нуклеиновую кислоту, кодирующую *Staphylococcus lugdunensis* (SluCas9).

116. Способ по любому из предшествующих пунктов способов или применения, где одиночную молекулу нуклеиновой кислоты доставляют в клетку в одном векторе.

117. Способ по любому из предшествующих пунктов способов или применения, включающий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую SaCas9, где спейсерная последовательность выбрана из любой из SEQ ID NO: 12, 15, 16, 20, 27, 28, 32, 33 и 35.

118. Способ по любому из предшествующих пунктов способов или применения, включающий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую SaCas9, где SaCas9 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 711.

119. Способ по любому из предшествующих пунктов способов или применения, включающий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую SaCas9, где SaCas9 представляет собой вариант аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 711.

120. Способ по любому из предшествующих пунктов способов или применения, включающий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую SaCas9, где SaCas9 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 715-717.

121. Способ по любому из предшествующих пунктов способов или применения, включающий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую SluCas9, где спейсерная последовательность выбрана из любой из SEQ ID NO: 131, 134, 135, 136, 139, 144, 148, 149, 150, 151, 179, 184, 201, 210, 223, 224, и 225.

122. Способ по любому из предшествующих пунктов способов или применения, включающий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую SluCas9, где SluCas9 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 712.

123. Способ по любому из предшествующих пунктов способов или применения, включающий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую SluCas9, где SluCas9 представляет собой вариант аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 712.

124. Способ по любому из предшествующих пунктов способов или применения, включающий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую SluCas9, где SluCas9 содержит аминокислотную последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 718-720.

125. Способ вырезания части экзона с преждевременным стоп-кодоном у субъекта с мышечной дистрофией Дюшенна (DMD), включающий доставку в клетку одиночной молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей:

i) нуклеиновую кислоту, кодирующую пару направляющих РНК, где первая направляющая РНК связывается с целевой последовательностью в пределах экзона, расположенного выше преждевременного стоп-кодона, и где вторая направляющая РНК связывается с последовательностью, расположенной ниже преждевременного стоп-кодона, и ниже последовательности, связанной первой направляющей РНК; и

ii) нуклеиновую кислоту, кодирующую Cas9 *Staphylococcus aureus* (SaCas9);

где пара направляющих РНК и SaCas9 вырезают часть экзона.

126. Способ вырезания части экзона с преждевременным стоп-кодоном у субъекта с

мышечной дистрофией Дюшенна (DMD), включающий доставку в клетку одиночной молекулы нуклеиновой кислоты, содержащей:

i) нуклеиновую кислоту, кодирующую пару направляющих РНК, где первая направляющая РНК связывается с целевой последовательностью в пределах экзона, расположенного выше преждевременного стоп-кодона, и где вторая направляющая РНК связывается с последовательностью, расположенной ниже преждевременного стоп-кодона, и ниже последовательности, связанной первой направляющей РНК; и

ii) нуклеиновую кислоту, кодирующую *Staphylococcus lugdunensis* (SluCas9);

где пара направляющих РНК и SaCas9 вырезают часть экзона.

127. Способ по любому из предшествующих пунктов способов, включающий одиночную молекулу нуклеиновой кислоты, причем одиночную молекулу нуклеиновой кислоты доставляют в клетку в одном векторе.

128. Способ по любому из предшествующих пунктов способов, где часть гена DMD вырезается и части гена, оставшиеся после вырезания, повторно соединяются с одонуклеотидной вставкой.

129. Способ по любому из предшествующих пунктов способов, где часть гена DMD вырезается и части экзона, оставшиеся после вырезания, повторно соединяются без нуклеотидной вставки.

130. Способ по любому из предшествующих пунктов способов, где вырезается часть гена DMD, где вырезаемая часть гена имеет размер 5-250, 5-200, 5-150, 5-100, 5-75, 5-50, 5-25, 5-10, 20-250, 20-200, 20-150, 20-100, 20-75, 20-50, 20-25, 50-250, 50-200, 50-150, 50-100 и 50-75 нуклеотидов.

131. Способ по любому из предшествующих пунктов способов, где вырезается часть гена DMD, где вырезаемая часть экзона имеет размер 8-167 нуклеотидов.

132. Способ по любому из предшествующих пунктов способов, где вырезается часть гена DMD, где часть находится в пределах экзона 43, 44, 45, 50, 51, или 53.

133. Способ по любому из предшествующих пунктов способов, включающий пару направляющих РНК, где пара направляющих РНК содержит первую и вторую спейсерные последовательности, выбранные из любой из SEQ ID NO: 10 и 15; 10 и 16; 12 и 16; 1001 и 1005; 1001 и 15; 1001 и 16; 1003 и 1005; 16 и 1003; 12 и 1010; 12 и 1012; 12 и 1013; 10 и 1016; 1017 и 1005; 1017 и 16; 1018 и 16; 15 и 10; 16 и 10; 16 и 12; 1005 и 1001; 15 и 1001; 16 и 1001; 1005 и 1003; 1003 и 16; 1010 и 12; 1012 и 12; 1013 и 12; 1016 и 10; 1005 и 1017; 16 и 1017; и 16 и 1018.

134. Способ по любому из предшествующих пунктов способов, включающий пару направляющих РНК, где пара направляющих РНК содержит первую и вторую спейсерные последовательности, выбранные из любой из SEQ ID NO: 148 и 134; 149 и 135; 150 и 135; 131 и 136; 151 и 136; 139 и 131; 139 и 151; 140 и 131; 140 и 151; 141 и 148; 144 и 149; 144 и 150; 145 и 131; 145 и 151; 146 и 148; 134 и 148; 135 и 149; 135 и 150; 136 и 131; 136 и 151; 131 и 139; 151 и 139; 131 и 140; 151 и 140; 148 и 141; 149 и 144; 150 и 144; 131 и 145; 151 и 145; и 148 и 146.

135. Способ по любому из предшествующих пунктов способов, включающий SaCas9, где SaCas9 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 715.

136. Композиция или способ по любому из предшествующих пунктов способов, где одиночная молекула нуклеиновой кислоты представляет собой вектор AAV, где вектор содержит от 5' к 3' плюс-цепи: обратную комплементарную цепь первой каркасной последовательности онРНК, обратную комплементарную цепь нуклеиновой кислоты, кодирующей первую направляющую последовательность онРНК, обратную комплементарную цепь промотора для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей первую онРНК, промотор для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей SaCas9 (например, СК8е), нуклеиновую кислоту, кодирующую SaCas9, последовательность полиаденилирования, промотор для экспрессии второй онРНК в том же направлении, что и промотор для SaCas9, вторую направляющую последовательность онРНК и вторую каркасную последовательность онРНК.

137. Композиция или способ по п. 136, где промотор для экспрессии первой направляющей последовательности онРНК представляет собой промотор hU6.

138. Композиция или способ по любому из пп. 136-137, где промотор для экспрессии второй направляющей последовательности онРНК представляет собой промотор hU6.

139. Композиция или способ по любому из пп. 136-137, где промотор для экспрессии первой направляющей последовательности онРНК представляет собой промотор hU6, а промотор для экспрессии второй направляющей последовательности онРНК представляет собой промотор hU6.

140. Композиция или способ по любому из пп. 136-137, где промотор для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей первую направляющую последовательность онРНК, представляет собой промотор 7SK.

141. Композиция или способ по любому из пп. 136-137, где промотор для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей вторую направляющую последовательность онРНК, представляет собой промотор 7SK.

142. Композиция или способ по любому из пп. 136-137, где промотор для экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей вторую направляющую последовательность онРНК, представляет собой промотор H1m.

143. Композиция или способ по любому из предшествующих пунктов, где последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая SaCas9 или SluCas9, слита с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей одну или более последовательностей ядерной локализации (NLS).

144. Композиция или способ по любому из предшествующих пунктов, где последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая SaCas9 или SluCas9, слита с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей последовательность ядерной локализации (NLS).

145. Композиция или способ по любому из предшествующих пунктов, где последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая SaCas9 или SluCas9, слита с двумя

последовательностями нуклеиновой кислоты, каждая из которых кодирует последовательность ядерной локализации (NLS).

146. Композиция или способ по любому из предшествующих пунктов, где последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая SaCas9 или SluCas9, слита с тремя последовательностями нуклеиновой кислоты, кодирующими одну или более последовательностей ядерной локализации (NLS).

147. Композиция или способ по любому из пп. 143-146, где один или более NLS включают NLS SV40.

148. Композиция или способ по любому из пп. 143-147, где один или более NLS включают NLS с-Мус.

149. Композиция или способ по любому из пп. 143-148, где один или более NLS включают NLS нуклеоплазмينا.

150. Композиция или способ по любому из предшествующих пунктов, где нуклеиновая кислота, кодирующая направляющую РНК, или нуклеиновая кислота, кодирующая пару направляющих РНК, содержат последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 600, 601, или 900-917, и где композиция или способ включают нуклеиновую кислоту, кодирующую SluCas9.

151. Композиция или способ по любому из предшествующих пунктов, где нуклеиновая кислота, кодирующая направляющую РНК, или нуклеиновая кислота, кодирующая пару направляющих РНК, содержат последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NO: 901-917, и где композиция или способ включают нуклеиновую кислоту, кодирующую SluCas9.

152. Композиция по любому из предшествующих пунктов, где молекула нуклеиновой кислоты кодирует по меньшей мере первую направляющую РНК и вторую направляющую РНК.

153. Композиция по п. 152, где молекула нуклеиновой кислоты кодирует спейсерную последовательность для первой направляющей РНК, каркасную последовательность для первой направляющей РНК, спейсерную последовательность для второй направляющей РНК и каркасную последовательность для второй направляющей РНК.

154. Композиция по п. 152, где спейсерная последовательность для первой направляющей РНК и спейсерная последовательность для второй направляющей РНК являются одинаковыми.

155. Композиция по п. 152, где спейсерная последовательность для первой направляющей РНК и спейсерная последовательность для второй направляющей РНК отличаются.

156. Композиция по любому из пп. 153-155, где каркасная последовательность для первой направляющей РНК и каркасная последовательность для второй направляющей РНК являются одинаковыми.

157. Композиция по любому из пп. 153-156, где каркасная последовательность для

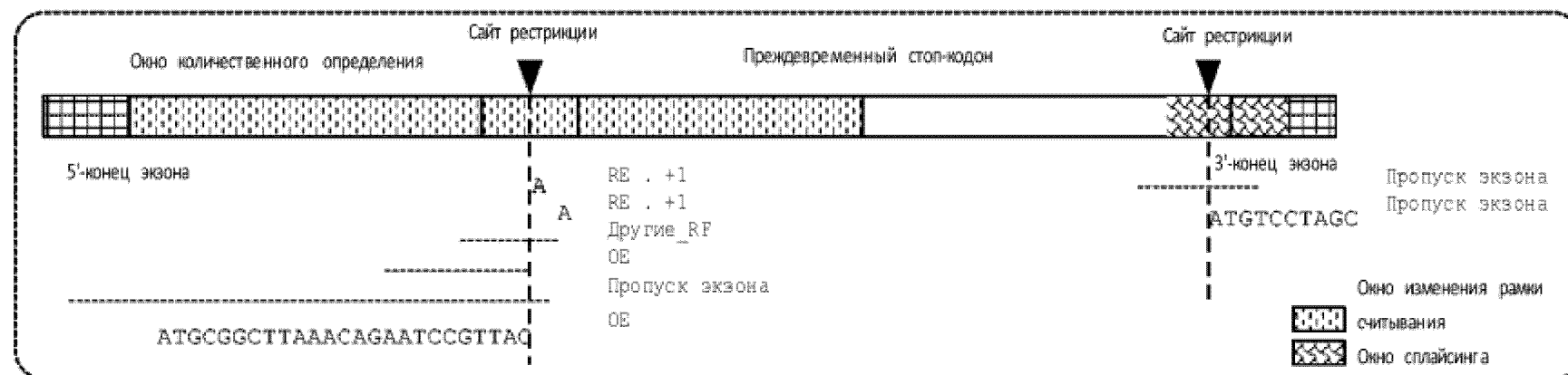
первой направляющей РНК и каркасная последовательность для второй направляющей РНК отличаются.

158. Композиция по п. 156, где каркасная последовательность для первой направляющей РНК содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 901-916, и где каркасная последовательность для второй направляющей РНК содержит отличную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 901-916.

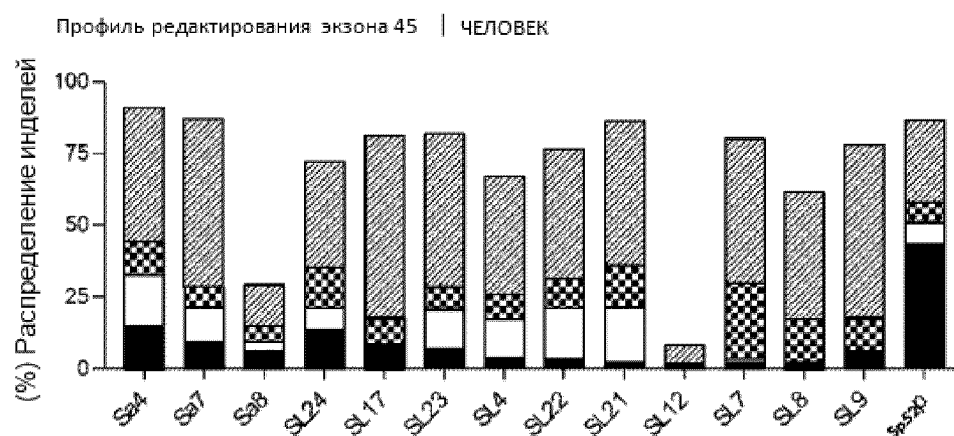
По доверенности

Кол-во онРНК	Конечная конфигурация	Промоторы
2	$\rightarrow \Rightarrow \rightarrow$	7SK2-Cas9-H1m
2	$\leftarrow \Rightarrow \rightarrow$	hU6c-Cas9-H1m
2	$\leftarrow \Rightarrow \rightarrow$	7SK2-Cas9-H1m
2	$\leftarrow \leftarrow \Rightarrow$	H1m-hU6c-Cas9
2	$\Rightarrow \rightarrow \rightarrow$	Cas9-hU6c-H1m
1	$\Rightarrow \rightarrow$	Cas9-hU6c

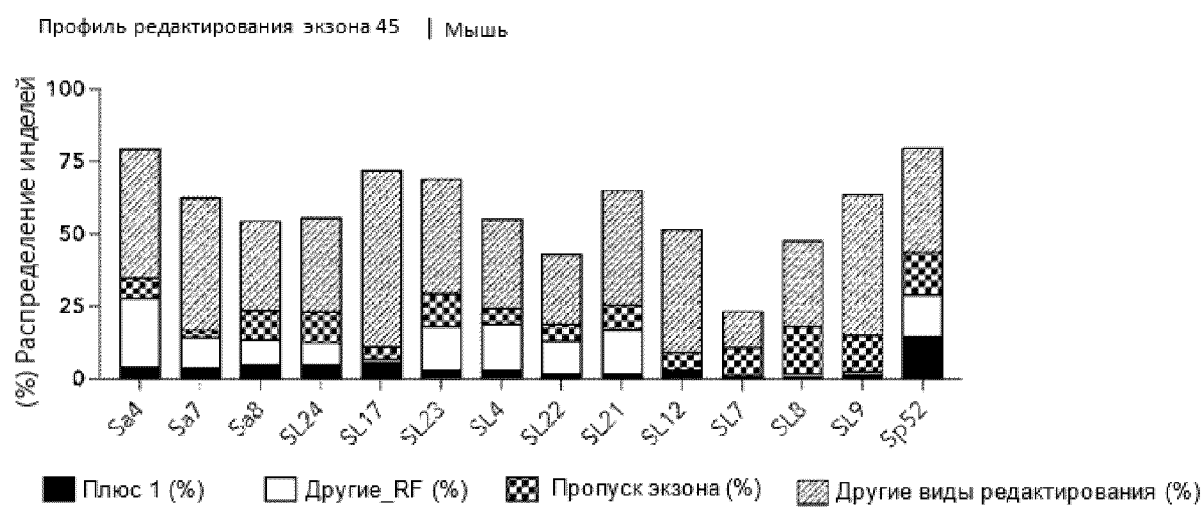
Фиг. 1



Фиг. 2

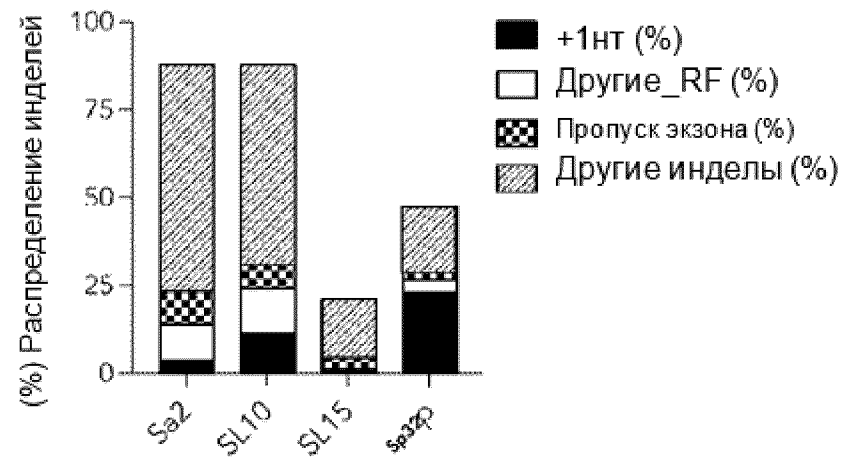


Фиг. 3А



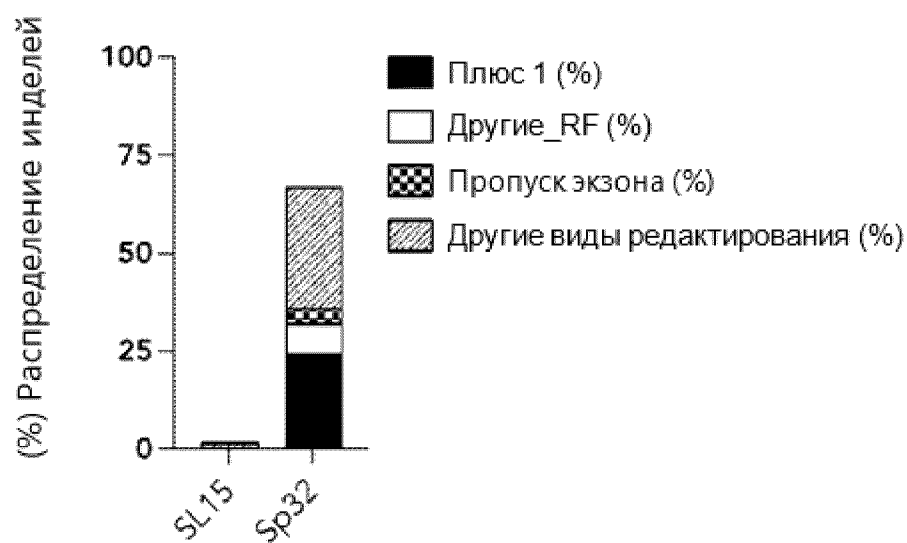
Фиг. 3В

Профиль редактирования экзона 51 | ЧЕЛОВЕК

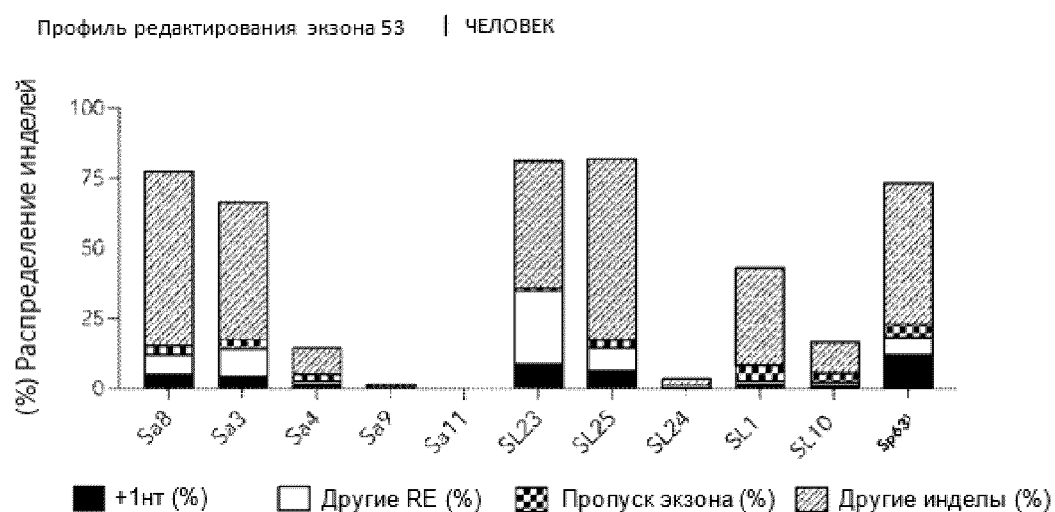


Фиг. 4А

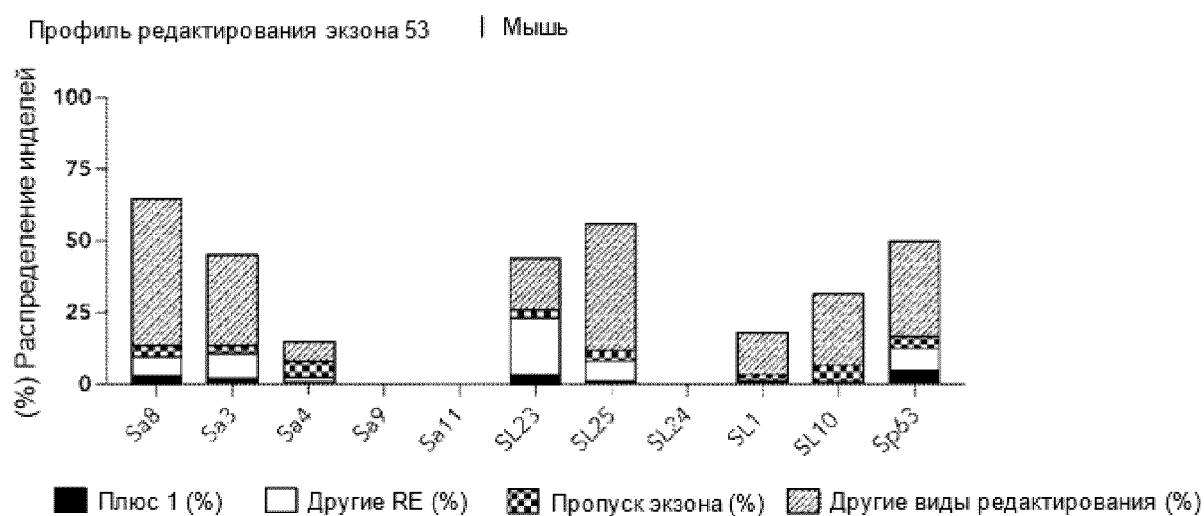
Профиль редактирования экзона 51 | Мышь



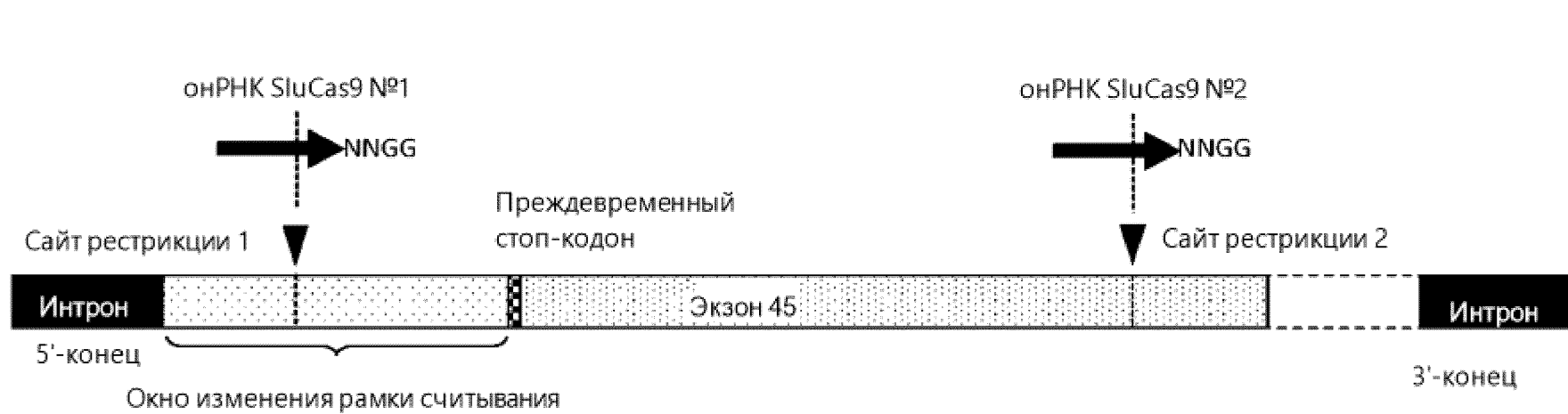
Фиг. 4В



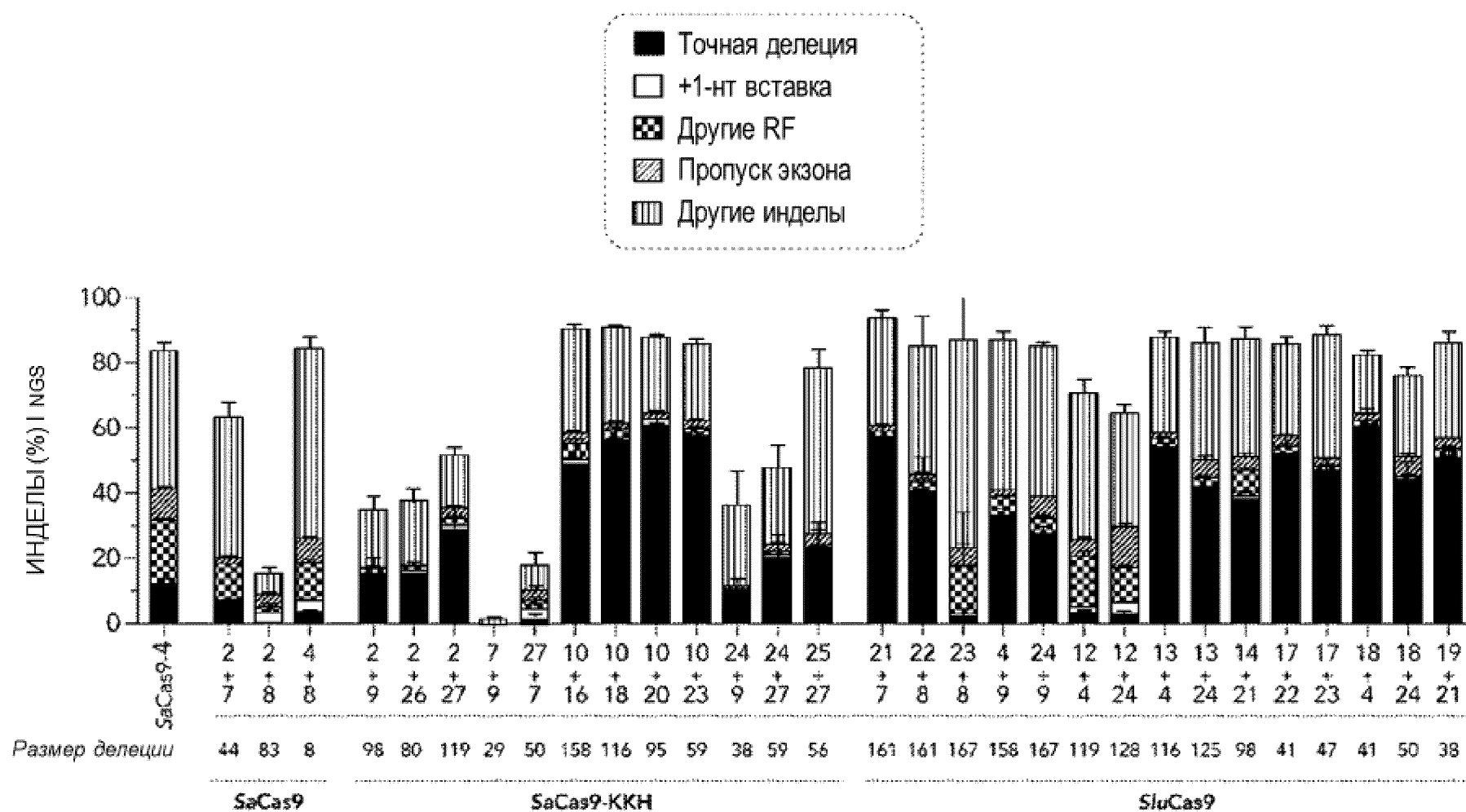
Фиг. 5А



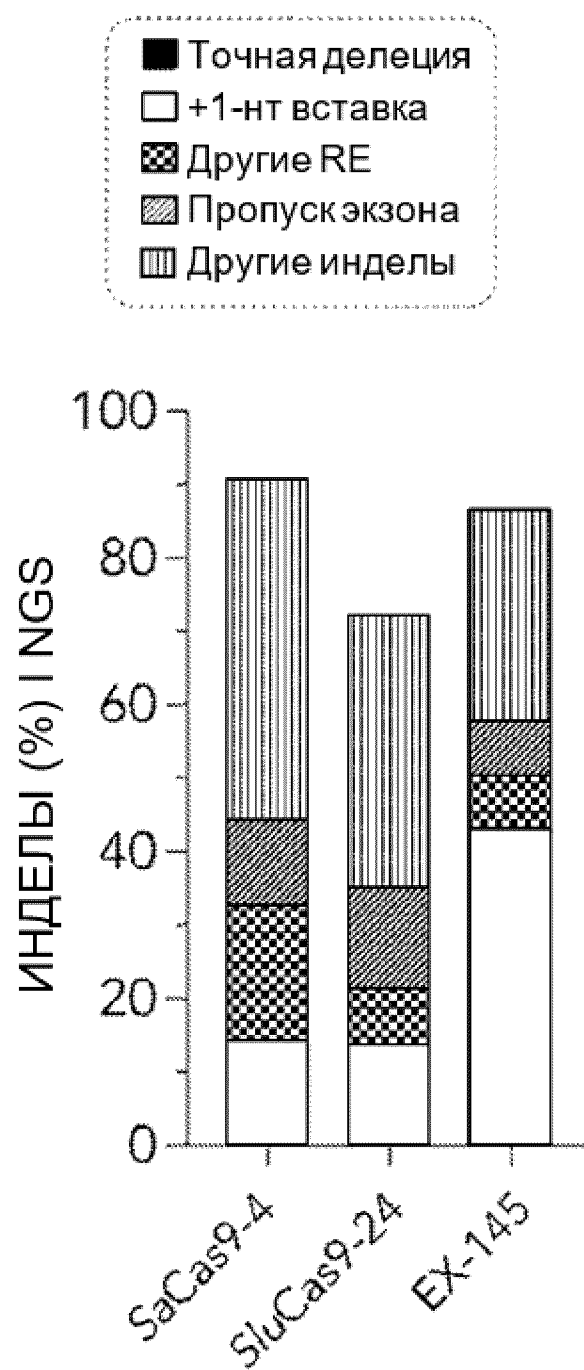
Фиг. 5В



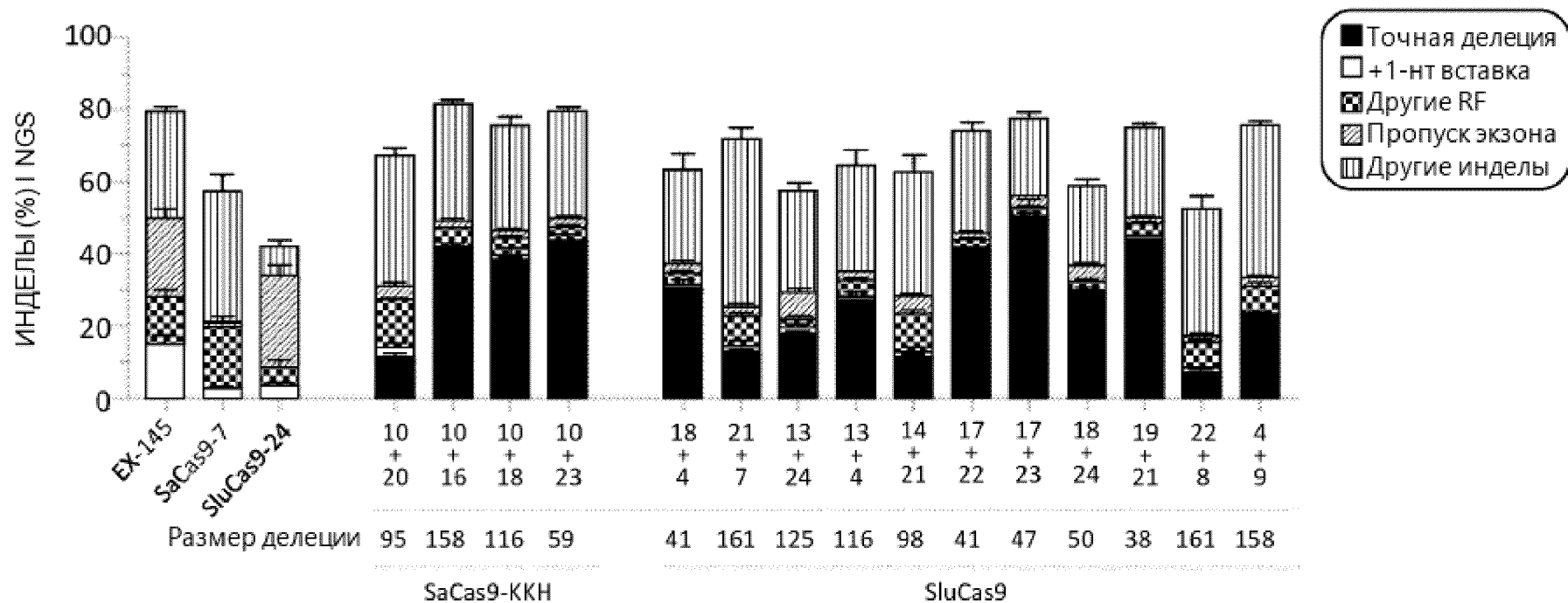
Фиг. 6А



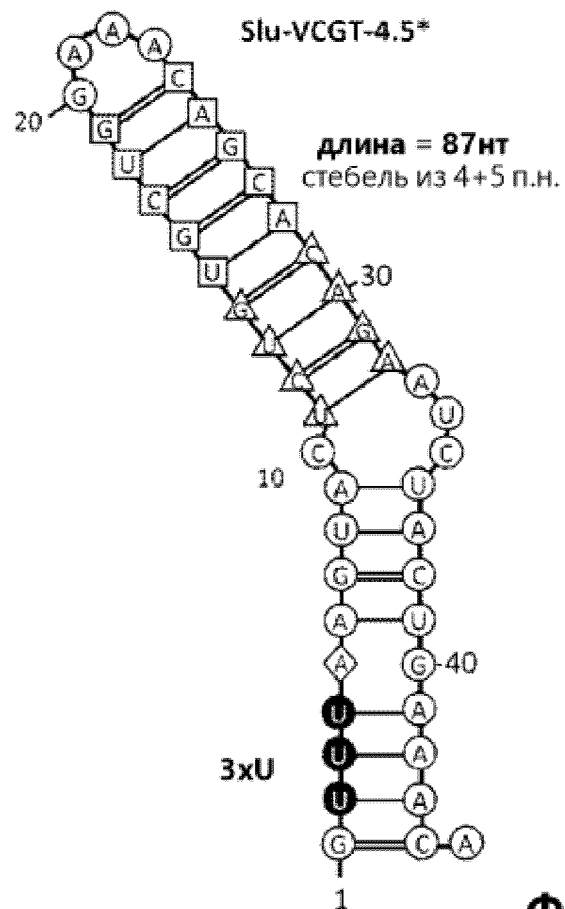
Фиг. 6В



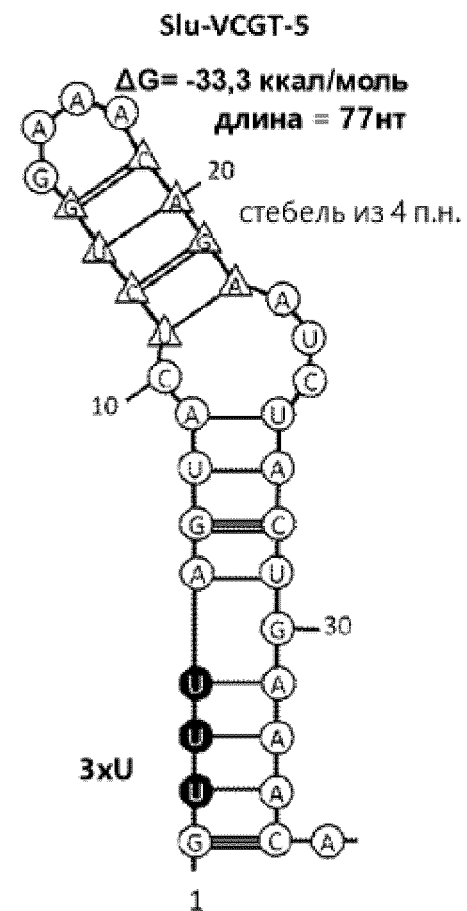
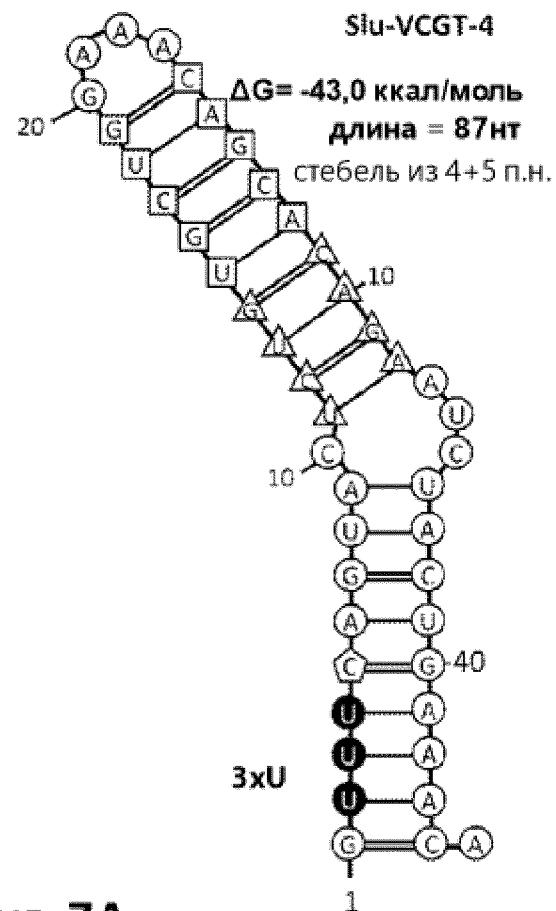
Фиг. 6С

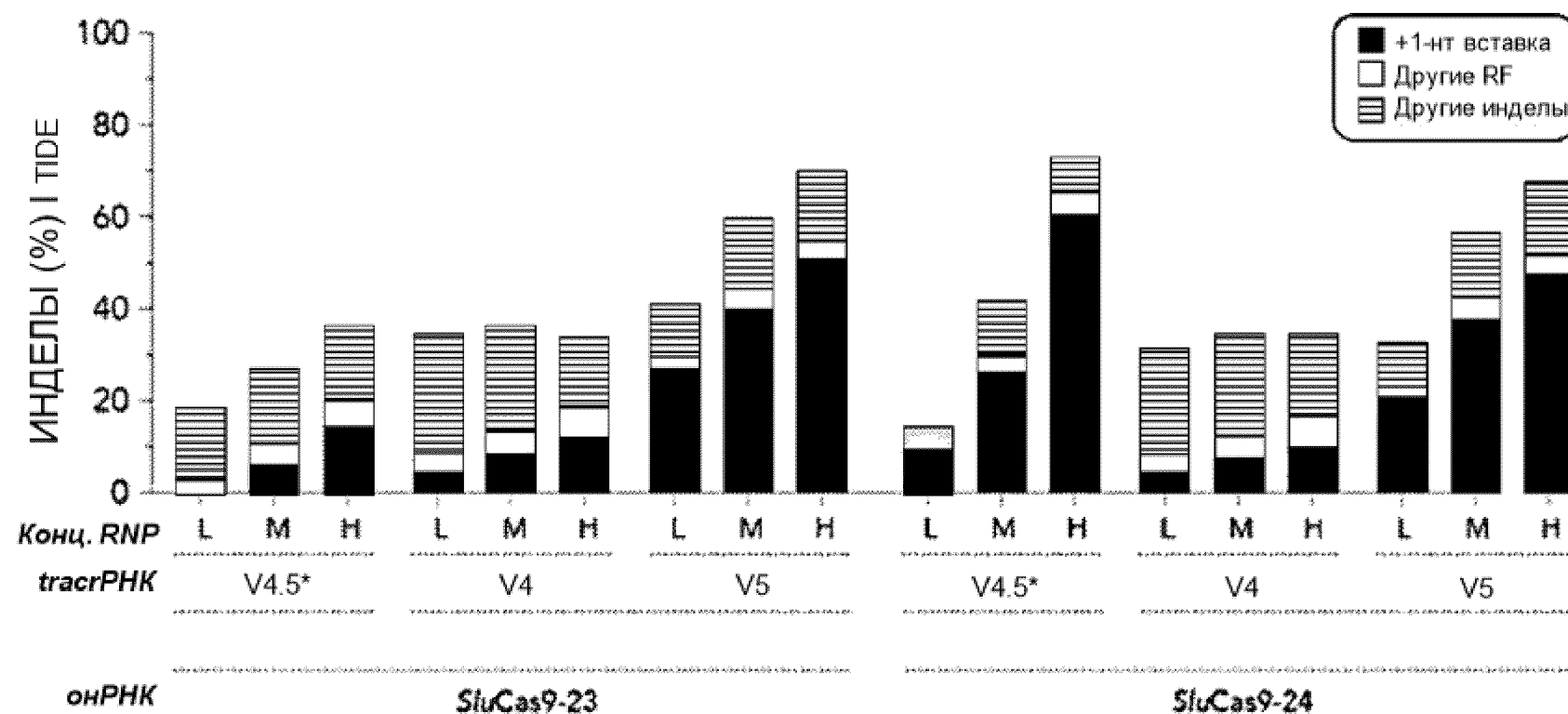


Фиг. 6D

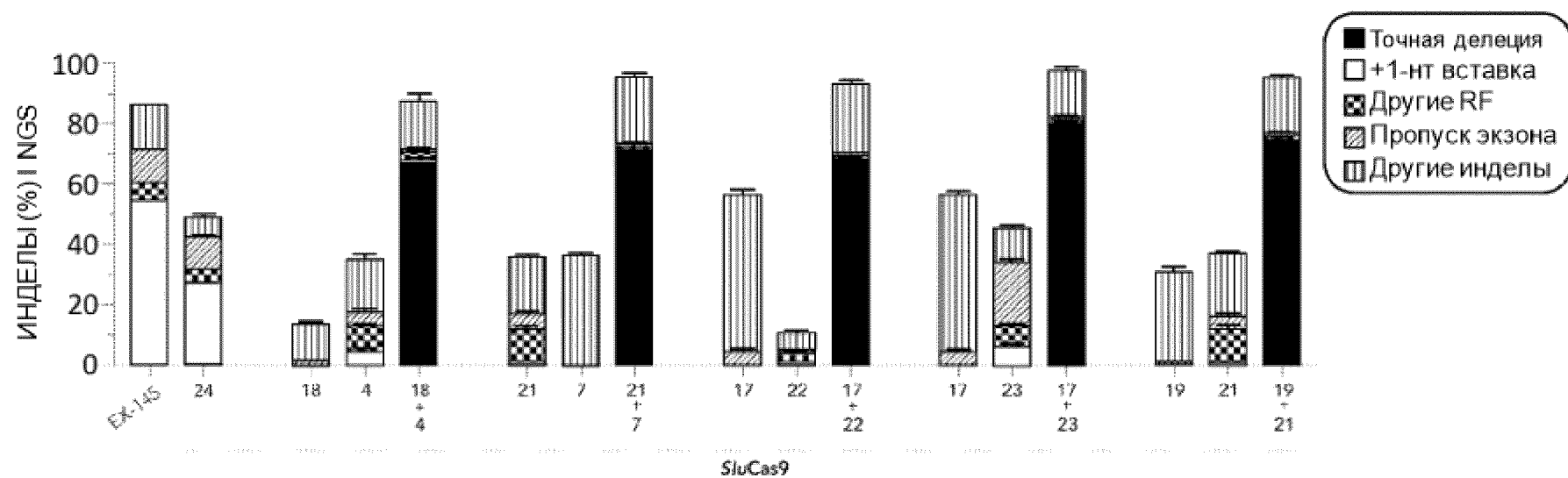


Фиг. 7А

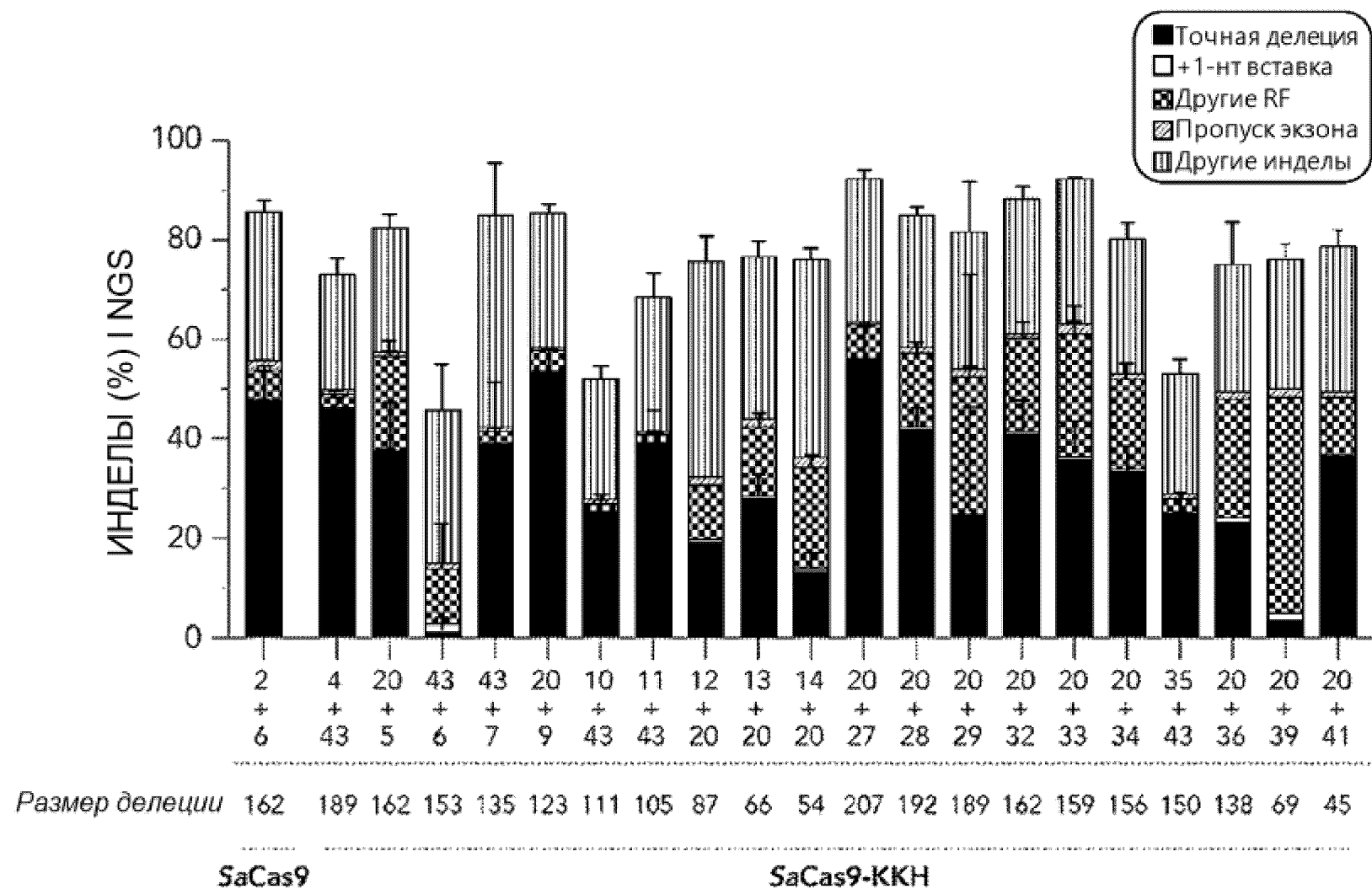




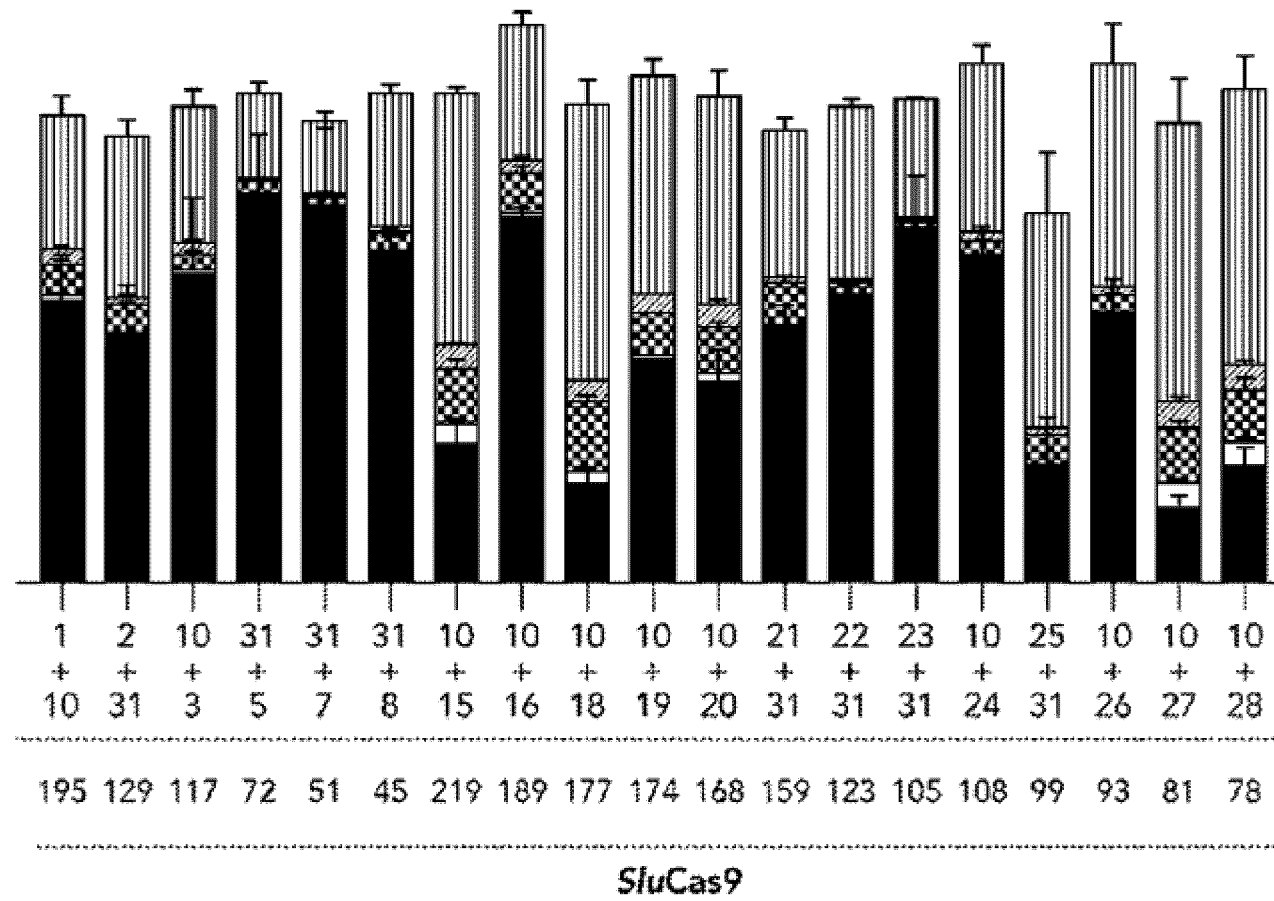
Фиг. 7B



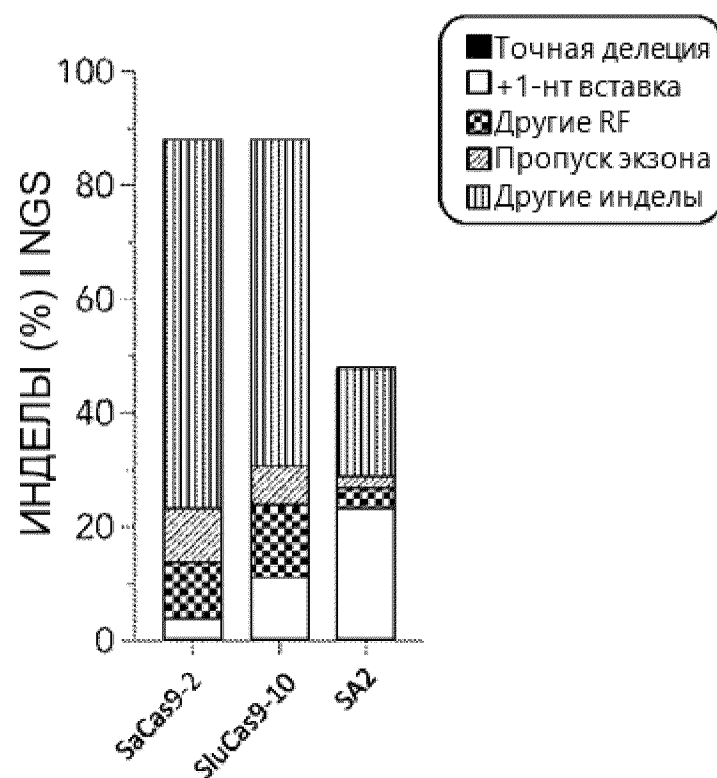
Фиг. 8



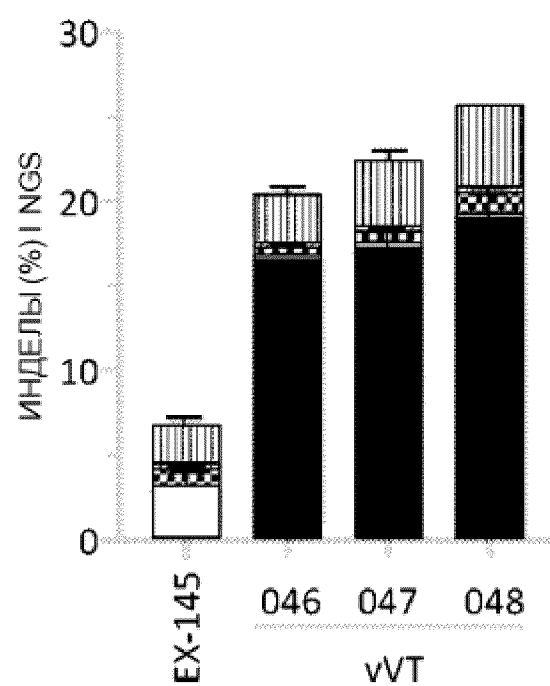
Фиг. 9А



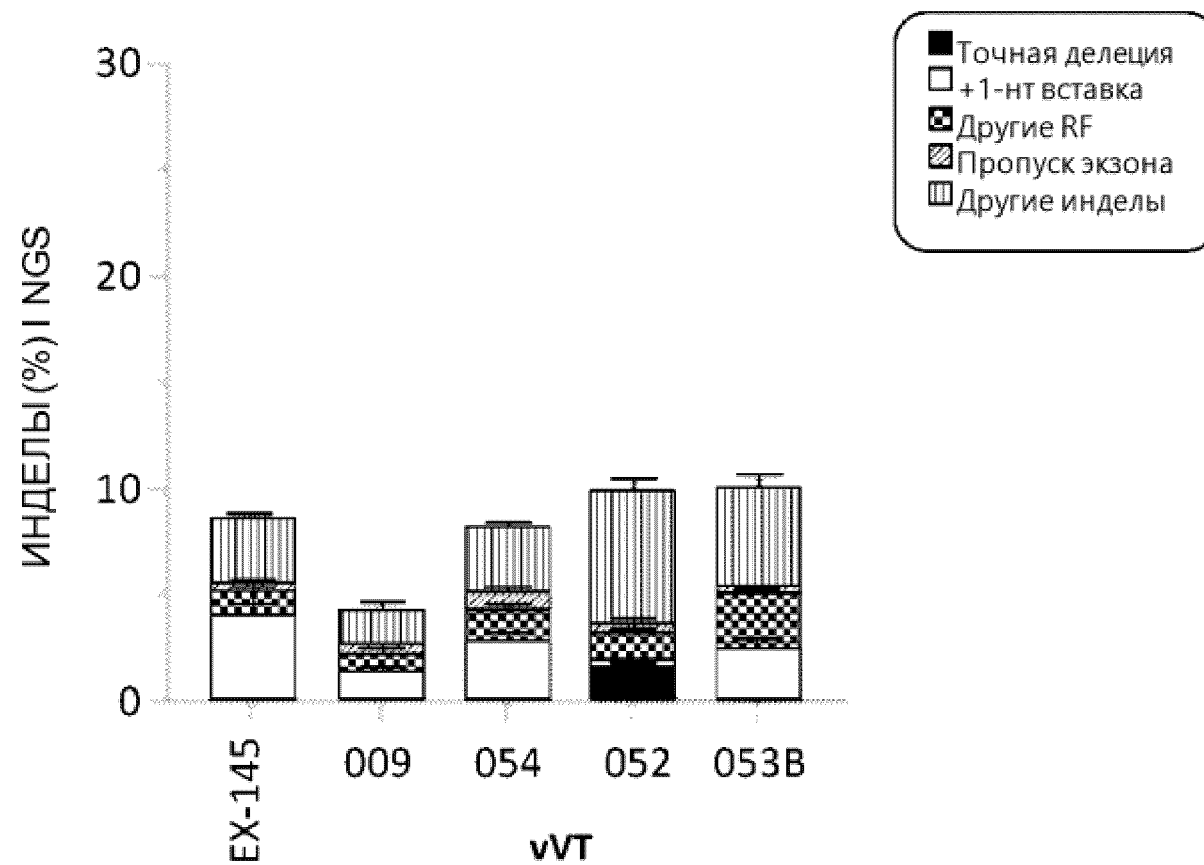
Фиг. 9А (продолжение)



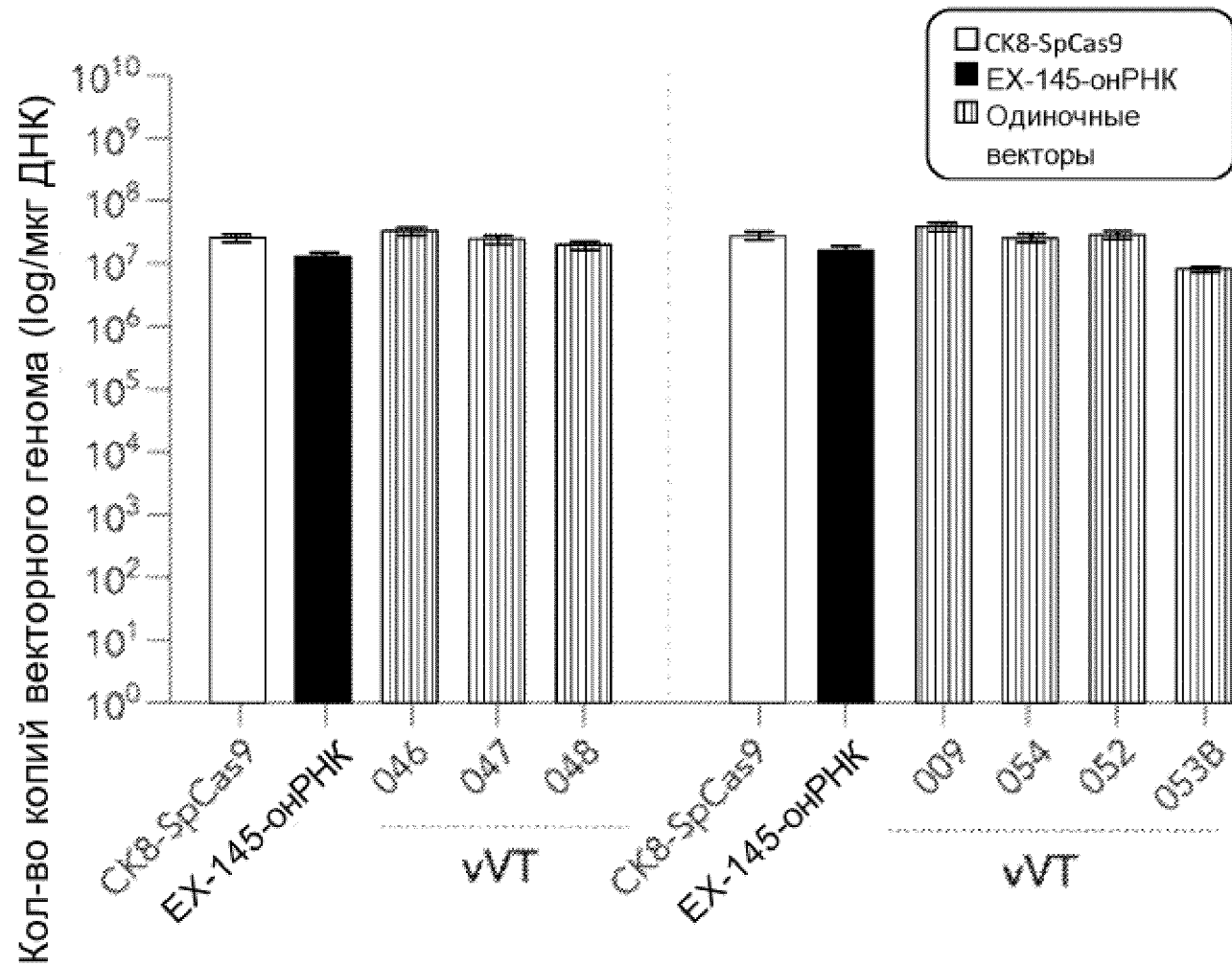
Фиг. 9В



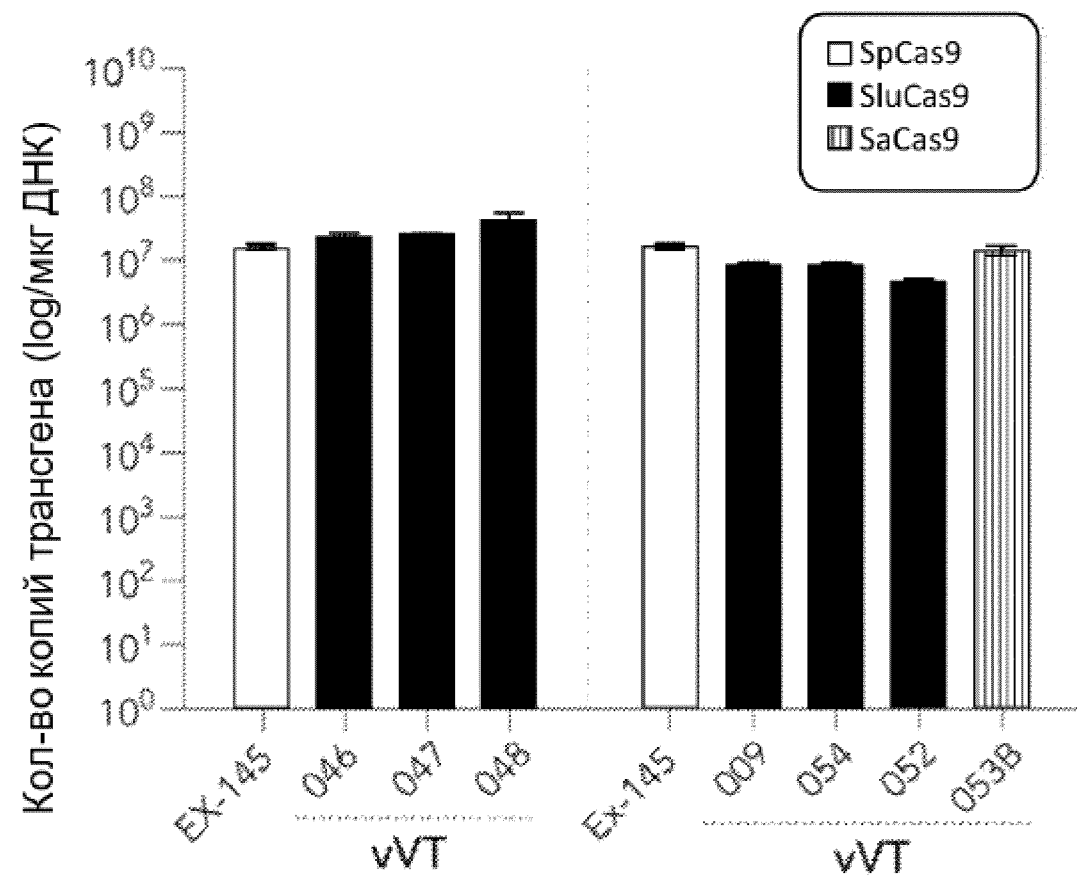
Фиг. 10А



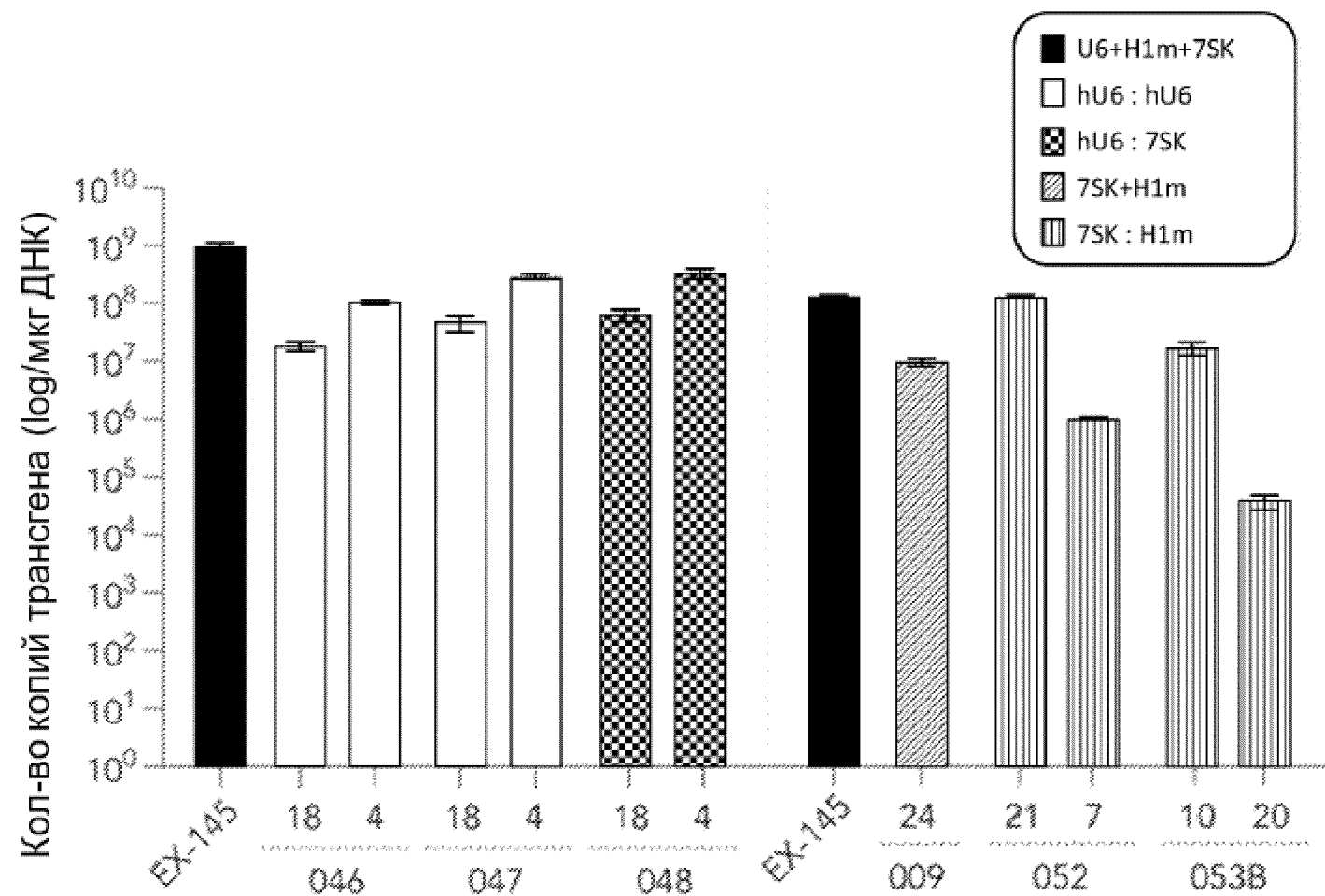
Фиг. 10В



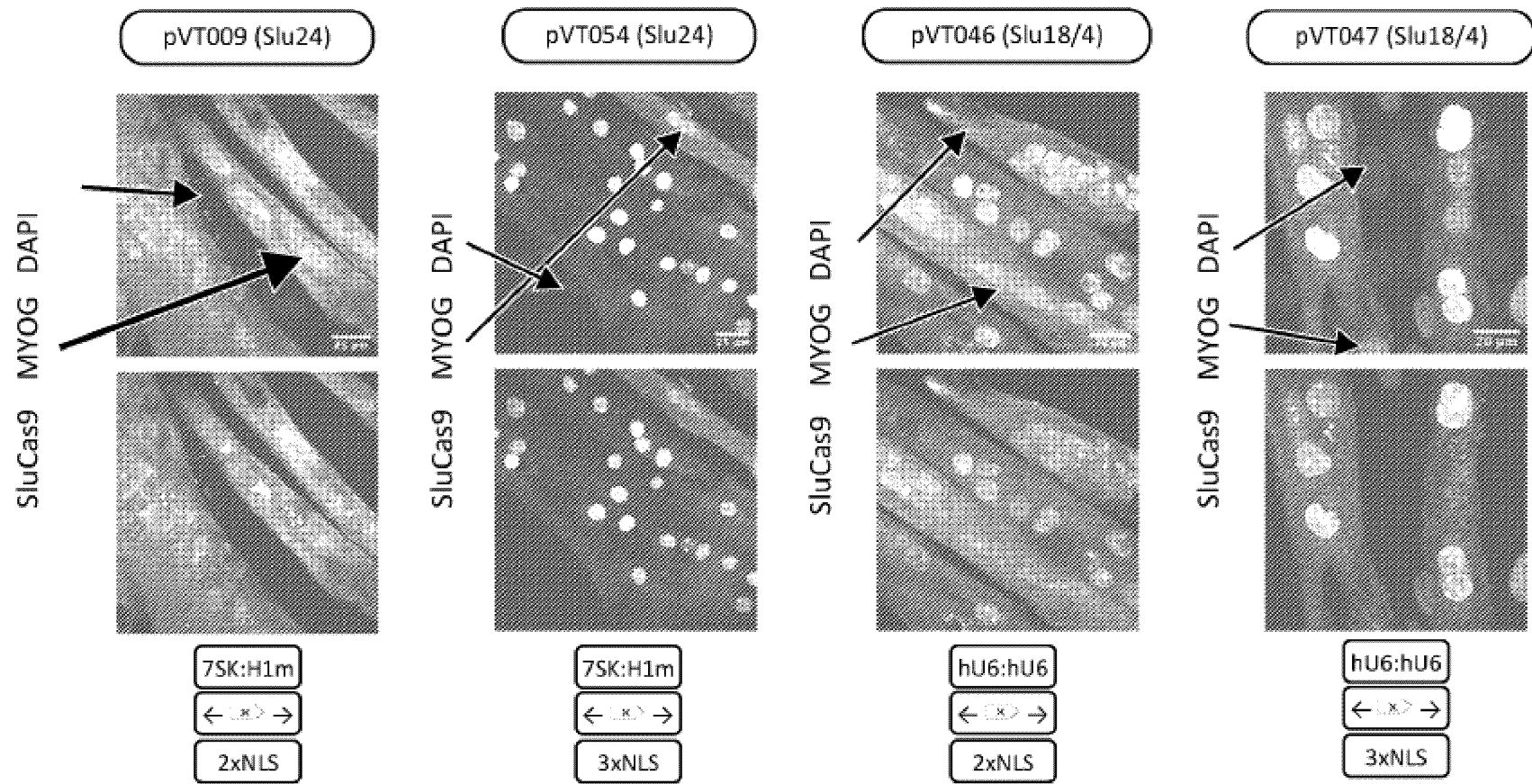
Фиг. 11



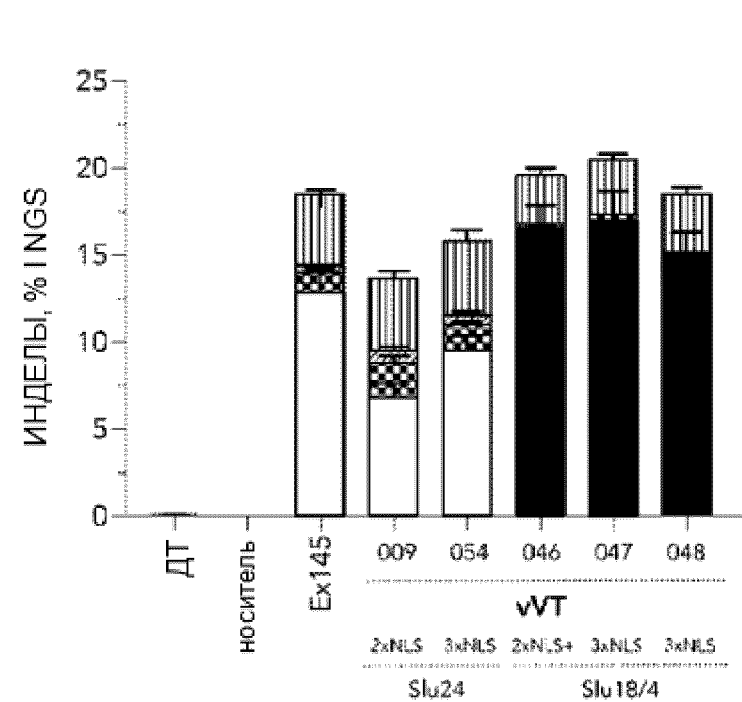
Фиг. 12А



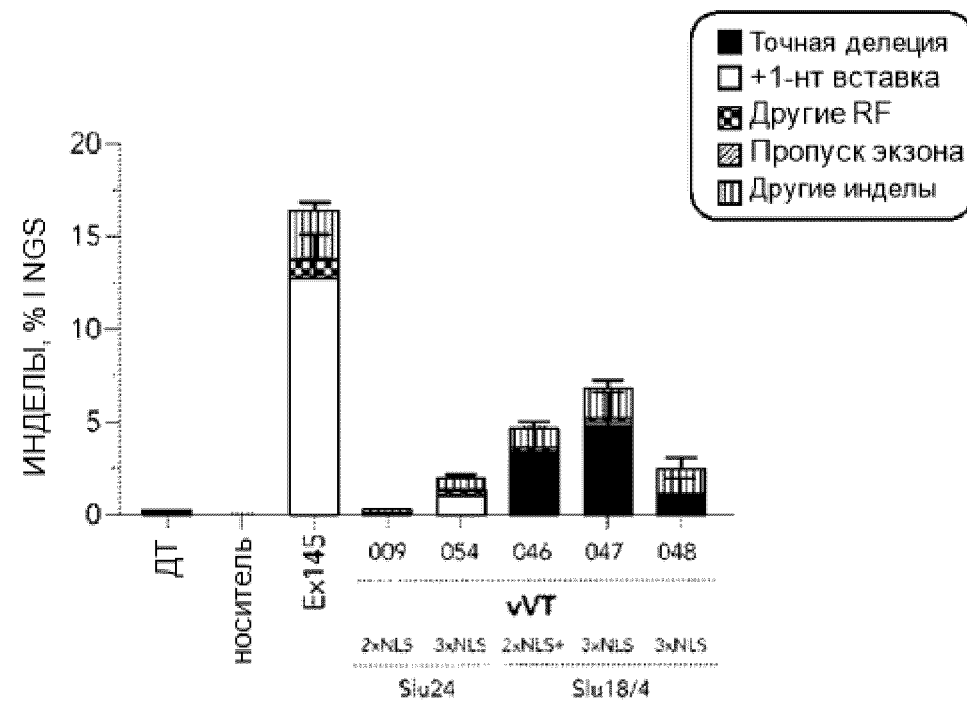
Фиг. 12В



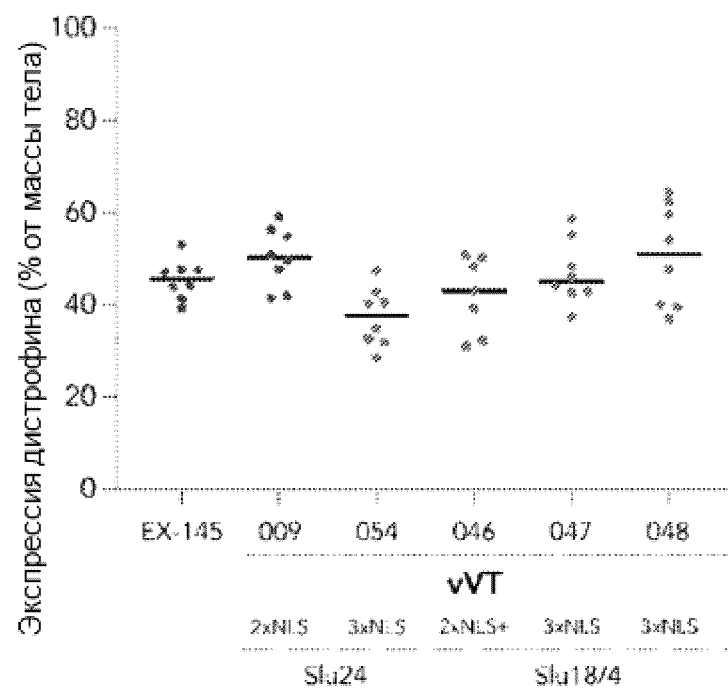
Фиг. 13



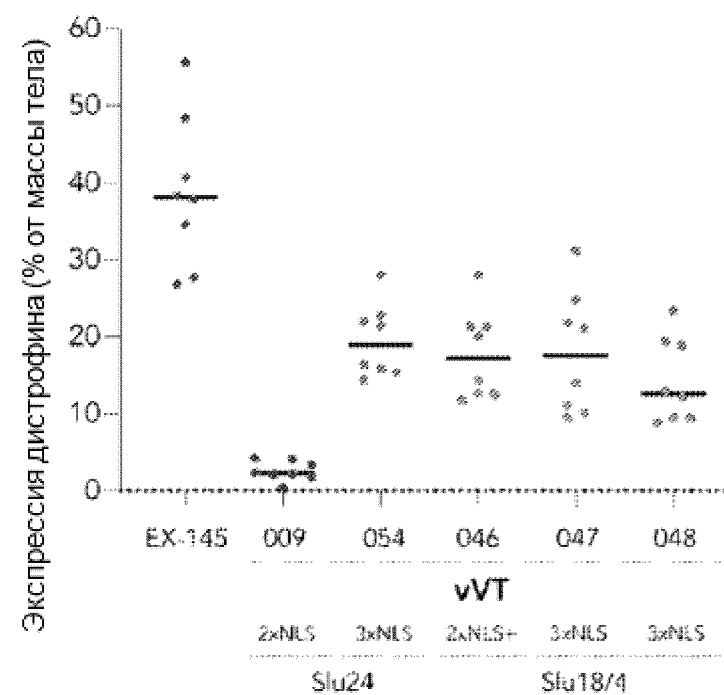
Фиг. 14А



Фиг. 14В

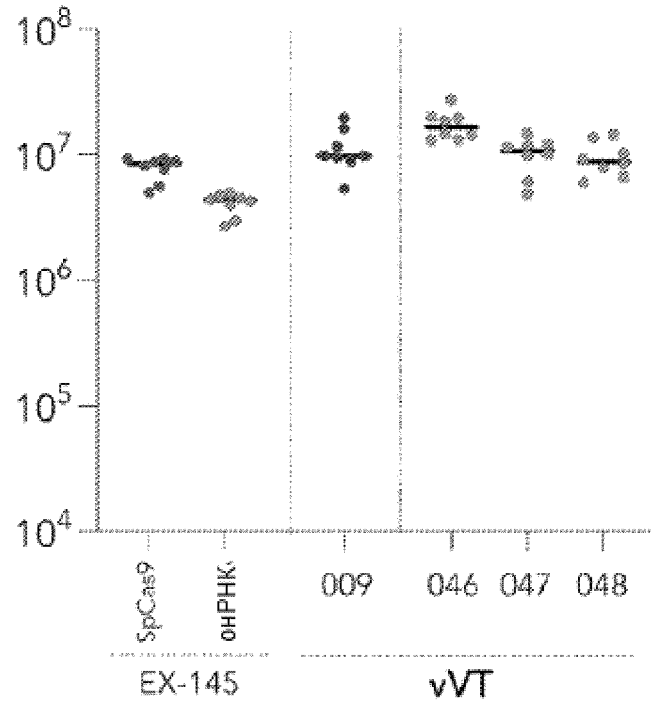


Фиг. 15A



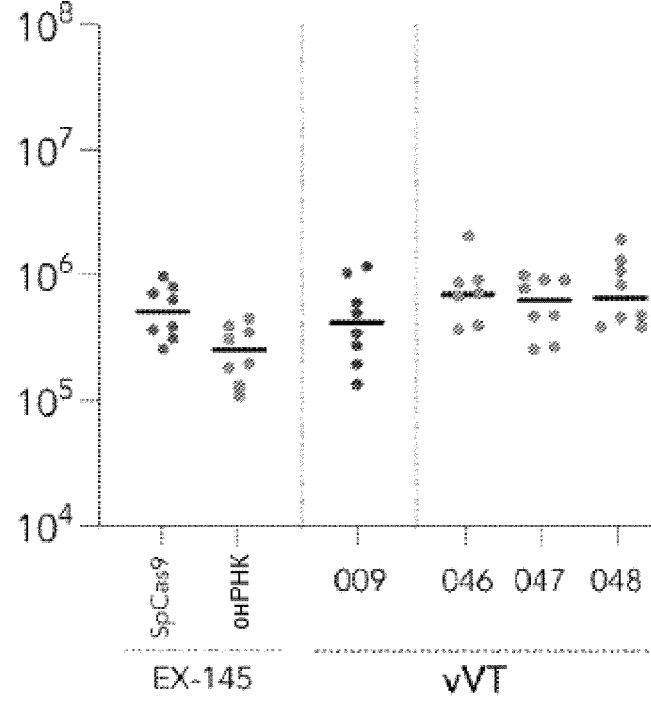
Фиг. 15B

Кол-во копий векторного генома (log/мкг ДНК)

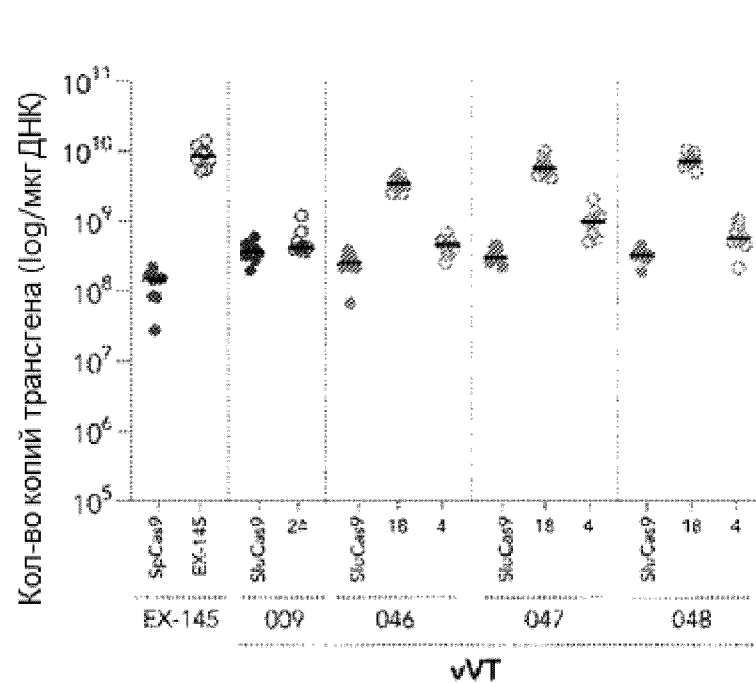


Фиг. 16А

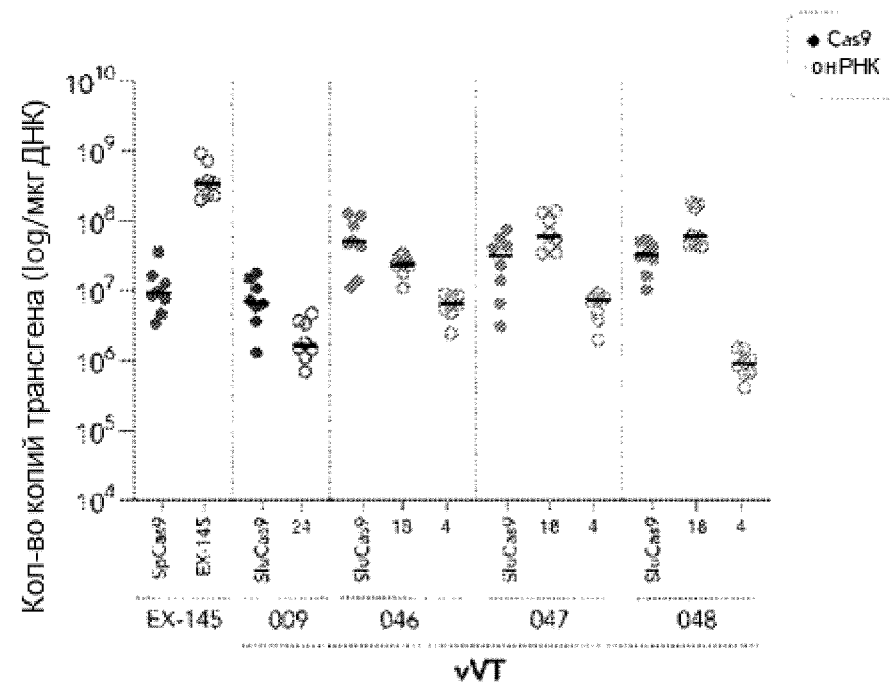
Кол-во копий векторного генома (log/мкг ДНК)



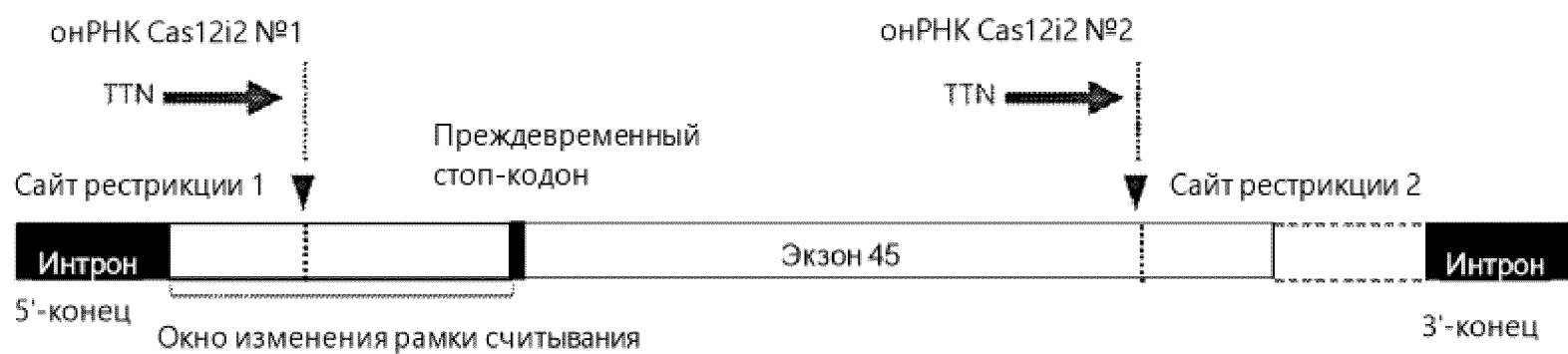
Фиг. 16В



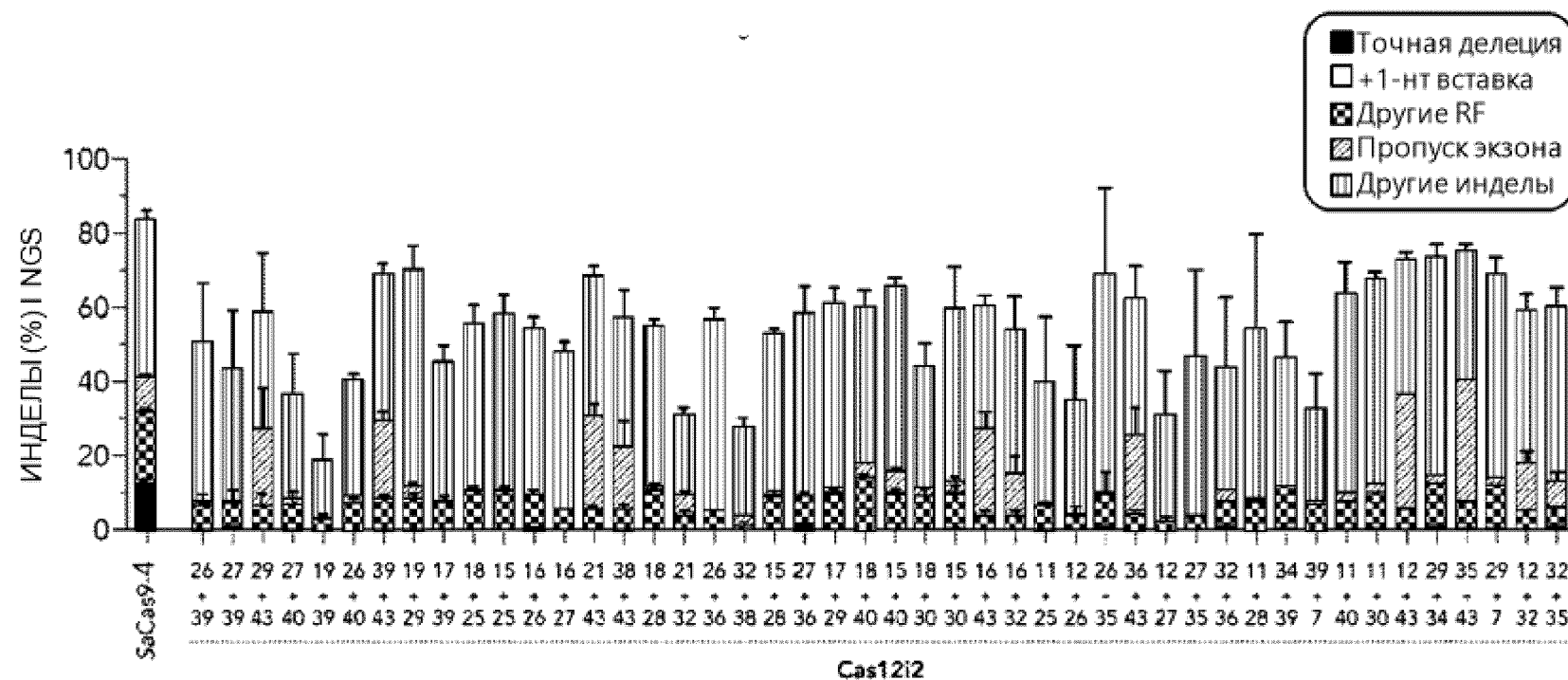
Фиг. 17А



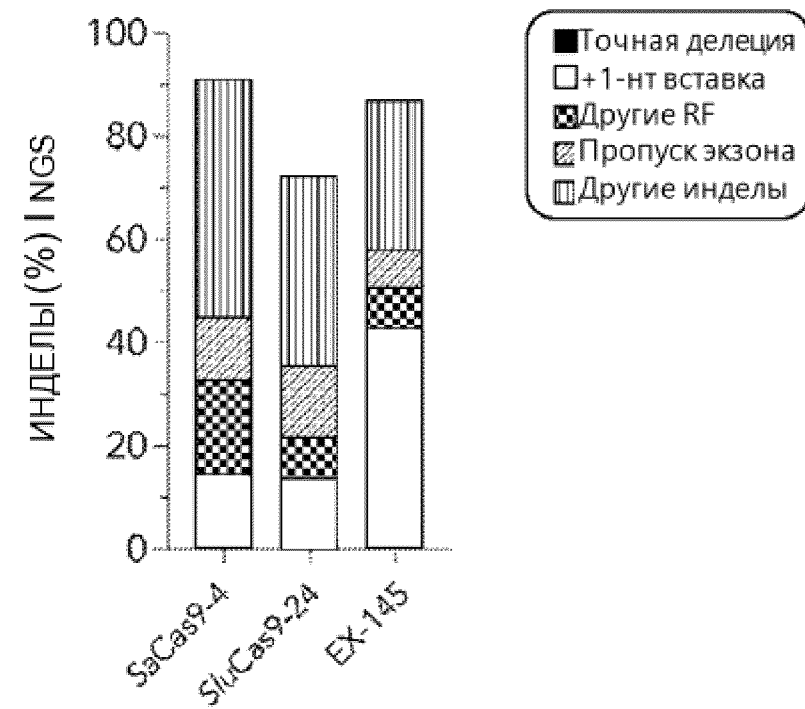
Фиг. 17В



Фиг. 18А



Фиг. 18В



Фиг. 18С