

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202190872 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2021.08.26

(51) Int. Cl. C12N 15/10 (2006.01)  
C12N 9/04 (2006.01)  
C12N 15/52 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2019.09.27

(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ГЕННОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ  
ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ (LDHA)

(31) 62/738,956; 62/834,334; 62/841,740

(72) Изобретатель:  
Даймек Закари Уильям, Одате Сёбу,  
Хюбнер Анетт, Сридхар Сридхани,  
Мюррей Брэдли Эндрю, Стрэппс  
Уолтер (US)

(32) 2018.09.28; 2019.04.15; 2019.05.01

(33) US

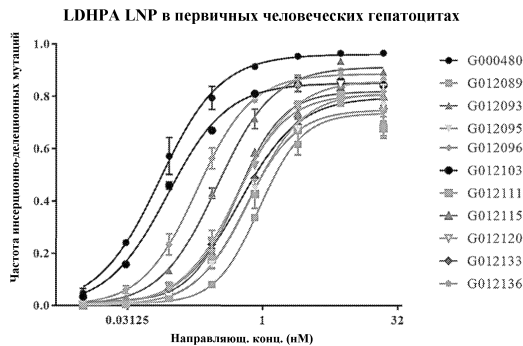
(86) PCT/US2019/053423

(87) WO 2020/069296 2020.04.02

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

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

(57) Представлены композиции и способы для редактирования, например введения двухцепочечных разрывов, внутри гена LDHA. Представлены композиции и способы лечения субъекта, имеющего гипероксалурию.



A1

202190872

202190872

A1

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-567963EA/025

### КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ГЕННОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ ЛАКТАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ (LDHA)

[1] Данная заявка заявляет приоритет предварительной заявки на патент США № 62/738,956, поданной 28 сентября 2018 г., предварительной заявки на патент США № 62/834,334, поданной 15 апреля 2019 г., и предварительной заявкой на патент США № 62/841,740, поданной 1 мая 2019 г., содержание каждой из которых полностью включено посредством ссылки для всех целей.

[2] Уровень оксалатов, которые обычно выводятся с мочой в виде продуктов метаболизма почками, повышен у пациентов с гипероксалурией. Существует несколько типов гипероксалурии, в том числе первичная гипероксалурия, оксалоз, кишечная гипероксалурия и гипероксалурия, связанная с употреблением в пищу продуктов с высоким содержанием оксалатов. Избыток оксалатов может соединиться с кальцием с образованием оксалата кальция в почках и других органах. Отложения оксалата кальция могут вызвать обширное отложение оксалата кальция (нефрокальциноз) или образование камней в почках и мочевом пузыре (мочекаменная болезнь) и привести к повреждению почек. Общие осложнения со стороны почек при гипероксалурии включают кровь в моче (гематурию), инфекции мочевыводящих путей, повреждение почек и терминальную стадию почечной недостаточности (ESRD). Со временем почки у пациентов с гипероксалурией могут перестать работать, а уровень оксалатов в крови может повыситься. Отложение оксалатов в тканях по всему организму, например системный оксалоз, может возникать из-за высокого уровня оксалатов в крови и может привести к осложнениям, по меньшей мере, в костях, сердце, коже и глазах. Почечная недостаточность может возникнуть в любом возрасте, в том числе у детей, особенно у субъектов с гипероксалурией. Почечный диализ или двойная трансплантация органов почек/печени рассматривают как единственные варианты лечения.

[3] Первичная гипероксалурия (PH) - редкое генетическое заболевание, поражающее людей всех возрастов, от младенцев до пожилых. PH включает три подтипа, включающих генетические дефекты, которые изменяют экспрессию трех различных белков. PH1 включает аланин-глиоксилатаминотрансферазу или AGT/AGT1. PH2 включает глиоксилат/гидроксипируватредуктазу или GR/HPR, а PH3 включает 4-гидрокси-2-оксоглутаратальдозу или HOGA. В PH1 мутации обнаруживаются в ферменте аланинглиоксилатаминотрансферазе (AGT или AGT1), который кодируется геном AGXT. Обычно AGT превращает глиоксилат в глицин в пероксисомах печени. У пациентов с PH1 мутантный AGT не может расщеплять глиоксилат и уровни глиоксилата, и его метаболита оксалата повышаются. Люди не могут окислять оксалат, а высокий уровень оксалата у субъектов с PH1 вызывает гипероксалурию.

[4] Чтобы определить, есть ли у субъекта гипероксалурия, можно собрать суточную мочу и измерить уровни оксалата, гликолата и других органических кислот. Генетическое

тестирование или биопсия печени могут быть выполнены для окончательного диагноза генетических форм гипероксалурии. См., например, Cochat P et al., (2012) *Nephrol Dial Transplant* 5:1729-36. У нормальных здоровых субъектов суточные уровни оксалата и гликолата в моче составляют менее 45 мг/день, но у пациентов с гипероксалурией типичными являются уровни оксалата в моче более 100 мг/день. См., например, Cochat P. (2013). *N Engl J Med* 369:649-658.

[5] Уровни гликолата в плазме у здоровых людей обычно составляют 4-8 микромоль, но у пациентов с гипероксалурией уровни гликолата могут варьироваться в широких пределах и повышаются у 2/3 пациентов с гипероксалурией. См., например, Marangella, M et al. (1992) *J. Urol.* 148:986-989. В то время как большинство пациентов с генетическими формами гипероксалурии в настоящее время диагностируются с помощью генетического тестирования, суточный анализ мочи является основным способом, используемым для наблюдения за пациентами с гипероксалурией для выяснения реакции на лечение. *Id.*

[6] Лактатдегидрогеназа (LDH) - это фермент, обнаруженный почти в каждой клетке, который регулирует как гомеостаз лактата и пирувата, так и метаболизм глиоксилата и оксалата. LDH состоит из 4 полипептидов, образующих тетрамер. Идентифицировано пять изоферментов LDH, различающихся по субъединичному составу и тканевому распределению. Двумя наиболее распространенными формами LDH являются мышечная (M) форма, кодируемая геном LDHA, и сердечная (H) форма, кодируемая геном LDHB. В пероксисоме клеток печени LDH является ключевым ферментом, ответственным за преобразование глиоксилата в оксалат, который затем секретируется в плазму и выводится почками. Lai et al. (2018) *Mol Ther.* 26(8): 1983-1995.

[7] Увеличение выработки оксалата приводит к осаждению кристаллов оксалата кальция в почках и к почечной недостаточности. По мере прогрессирования гипероксалурии, оксалаты откладываются во всех тканях. Субъекты с наследственной недостаточностью M-субъединицы лактатдегидрогеназы не демонстрируют нарушения функции печени или печеночно-специфического фенотипа, что свидетельствует о том, что ингибирование или уменьшение количества экспрессии лактатдегидрогеназы (LDH) в печени, предлагаемого ключевого фермента, ответственного за превращение глиоксилата в оксалат, может предотвратить накопление оксалата у субъектов с гипероксалурией без побочных эффектов из-за потери M-субъединицы лактатдегидрогеназы. Данная гипотеза была проверена на генно-инженерных моделях гипероксалурии на мышинных моделях и на мышинных моделях, в которых гипероксалурия вызывается химически этиленгликолем (EG). См. Kanno, T et al. (1988) *Clin. Chim. Acta* 173, 89-98; Takahashi, Y et al. (1995) *Intern. Med.* 34, 326-329; и Tsujino, S et al. (1994) *Ann. Neurol.* 36, 661-665.

[8] Поскольку LDH играет ключевую роль на заключительном этапе выработки оксалатов, siРНК LDHA, направленная в гепатоциты посредством конъюгации с остатками N-ацетилгалактозамина (GalNAc), была использована для опосредования сайленсинга LDHA в мышинных моделях гипероксалурии. См. Lai et al. (2018) *Mol Ther.* 26(8): 1983-1995. Обработка мышей этой siРНК LDHA приводила к снижению печеночной LDH и

эффективному восстановлению оксалата, а также предотвращала отложение кристаллов оксалата кальция как на генно-инженерных моделях гипероксалурии на мышах, так и на моделях химически индуцированной гипероксалурии на мышах. *Id.* Подавление печеночной LDH у мышей не приводило к резкому повышению уровня циркулирующих печеночных ферментов, лактат-ацидозу или миопатии напряжения.

[9] Идея лечения пациентов с гипероксалурией путем ингибирования LDHA дополнительно подтверждается лечением LDHA siРНК как нечеловеческих приматов, так и гуманизированных химерных мышей, у которых печень состоит до 80% из гепатоцитов человека. *Id.*

[10] Соответственно, предоставлены следующие варианты воплощения изобретения. В некоторых вариантах воплощения изобретения в описании представлены композиции и способы с использованием направляющей РНК с РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом, таким как система CRISPR/Cas, для существенного снижения или нокаута экспрессии гена LDHA, тем самым существенно снижая или устраняя выработку LDH, тем самым снижая содержание оксалата в моче и увеличивая содержание гликолата в сыворотке. Существенное снижение или устранение выработки LDH за счет изменения гена LDHA может быть долгосрочным или постоянным лечением гипероксалурии.

#### **РАСКРЫТИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

[11] Предусмотрены следующие варианты воплощения изобретения.

Вариант воплощения изобретения 01. Способ индукции двухцепочечного разрыва (DSB) или одноцепочечного разрыва (SSB) в гене LDHA, включающий доставку композиции в клетку, причем композиция содержит:

а. направляющую РНК, содержащую

направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NOs: 1-84 и 100-192; или по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID NOs: 1 -84 и 100-192; или

направляющую последовательность, которая на не менее чем 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NOs: 1-84 и 100-192; или

направляющую последовательность, содержащую любую из SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 27, 32, 45, 48, 62, 66, 68, 70, 73, 75, 76, 77, 78, и 80; или

направляющую последовательность, содержащую любую из SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 27, 32, 45 и 48; или

направляющую последовательность, содержащую любую из SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 25, 27, 32, 45, 48, 62, 66, 68, 70, 73, 75, 76, 77, 78, 80, 103, 109, 123, 133, 149, 153, 156 и 184; или

направляющую последовательность, содержащую любую из SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 25, 27, 32, 45, 48, 103 и 123; и необязательно

б. РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

Вариант воплощения изобретения 02. Способ снижения экспрессии гена LDHA, включающий доставку композиции в клетку, причем композиция содержит:

а. направляющую РНК, содержащую направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NOs: 1-84 и 100-192; или по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID NOs: 1-84 и 100-192; или

направляющую последовательность, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NOs: 1-84 и 100-192; или

направляющую последовательность, содержащую любую из SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 27, 32, 45, 48, 62, 66, 68, 70, 73, 75, 76, 77, 78 и 80; или

направляющую последовательность, содержащую любую из SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 27, 32, 45 и 48; или

направляющую последовательность, содержащую любую из SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 25, 27, 32, 45, 48, 62, 66, 68, 70, 73, 75, 76, 77, 78, 80, 103, 109, 123, 133, 149, 153, 156 и 184; или

направляющую последовательность, содержащую любую из SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 25, 27, 32, 45, 48, 103 и 123; и необязательно

б. РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

Вариант воплощения изобретения 03. Способ лечения или профилактики гипероксалурии, включающий введение композиции нуждающемуся в этом субъекту, причем композиция содержит:

а. направляющую РНК, содержащую направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NOs: 1-84 и 100-192; или по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID NOs: 1-84 и 100-192; или

направляющую последовательность, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NOs: 1-84 и 100-192; или

направляющую последовательность, содержащую любую из SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 27, 32, 45, 48, 62, 66, 68, 70, 73, 75, 76, 77, 78 и 80; или

направляющую последовательность, содержащую любую из SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 27, 32, 45 и 48; или

направляющую последовательность, содержащую любую из SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 25, 27, 32, 45, 48, 62, 66, 68, 70, 73, 75, 76, 77, 78, 80, 103, 109, 123, 133, 149, 153, 156 и 184; или

направляющую последовательность, содержащую любую из SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 25, 27, 32, 45, 48, 103 и 123; и необязательно

б. РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновую кислоту,

кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, тем самым производя лечение или профилактику гипероксалурии.

Вариант воплощения изобретения 04. Способ лечения или профилактики терминальной стадии почечной недостаточности (ESRD), вызванной гипероксалурией, включающий введение композиции нуждающемуся в этом субъекту, причем композиция содержит:

а. направляющую РНК, содержащую направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NOs: 1-84 и 100-192; или по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID NOs: 1-84 и 100-192; или

направляющую последовательность, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NOs: 1-84 и 100-192; или

направляющую последовательность, содержащую любую из SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 27, 32, 45, 48, 62, 66, 68, 70, 73, 75, 76, 77, 78 и 80; или

направляющую последовательность, содержащую любую из SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 27, 32, 45 и 48; или

направляющую последовательность, содержащую любую из SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 25, 27, 32, 45, 48, 62, 66, 68, 70, 73, 75, 76, 77, 78, 80, 103, 109, 123, 133, 149, 153, 156 и 184; или

направляющую последовательность, содержащую любую из SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 25, 27, 32, 45, 48, 103 и 123; и необязательно

б. РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, тем самым производя лечение или профилактику (ESRD), вызванной гипероксалурией.

Вариант воплощения изобретения 05. Способ лечения или профилактики любого из: образования и отложения оксалата кальция, первичной гипероксалурии (включая РН1, РН2 и РН3), оксалоза, гематурии, кишечной гипероксалурии, гипероксалурии, связанной с употреблением в пищу продуктов с высоким содержанием оксалатов; и отсрочки или уменьшения необходимости в трансплантации почки или печени, включающий введение композиции нуждающемуся в этом субъекту, причем композиция содержит:

а. направляющую РНК, содержащую направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NOs: 1-84 и 100-192; или по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID NOs: 1-84 и 100-192; или

направляющую последовательность, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NOs: 1-84 и 100-192; или

направляющую последовательность, содержащую любую из SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 27, 32, 45, 48, 62, 66, 68, 70, 73, 75, 76, 77, 78 и 80; или

направляющую последовательность, содержащую любую из SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 27, 32, 45 и 48; или

направляющую последовательность, содержащую любую из SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 25, 27, 32, 45, 48, 62, 66, 68, 70, 73, 75, 76, 77, 78, 80, 103, 109, 123, 133, 149, 153, 156 и 184; или

направляющую последовательность, содержащую любую из SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 25, 27, 32, 45, 48, 103 и 123; и необязательно

б. РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, тем самым производя лечение или профилактику любого из: образования и отложения оксалата кальция, первичной гипероксалурии, оксалоза, гематурии и отсрочки или уменьшения потребности в трансплантации почки или печени.

Вариант воплощения изобретения 06. Способ увеличения концентрации гликолата в сыворотке, включающий введение композиции нуждающемуся в этом субъекту, причем композиция содержит:

а. направляющую РНК, содержащую

направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NOs: 1-84 и 100-192; или по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID NOs: 1-84 и 100-192; или

направляющую последовательность, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NOs: 1-84 и 100-192; или

направляющую последовательность, содержащую любую из SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 27, 32, 45, 48, 62, 66, 68, 70, 73, 75, 76, 77, 78 и 80; или

направляющую последовательность, содержащую любую из SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 27, 32, 45 и 48; или

направляющую последовательность, содержащую любую из SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 25, 27, 32, 45, 48, 62, 66, 68, 70, 73, 75, 76, 77, 78, 80, 103, 109, 123, 133, 149, 153, 156 и 184; или

направляющую последовательность, содержащую любую из SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 25, 27, 32, 45, 48, 103 и 123; и необязательно

б. РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, тем самым увеличивая концентрацию гликолата в сыворотке.

Вариант воплощения изобретения 07. Способ снижения содержания оксалата в моче у субъекта, включающий введение композиции нуждающемуся в этом субъекту, причем композиция содержит:

а. направляющую РНК, содержащую

направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NOs: 1-84 и 100-192; или по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности,

выбранной из SEQ ID NOs: 1-84 и 100-192; или

направляющую последовательность, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NOs: 1-84 и 100-192; или

направляющую последовательность, содержащую любую из SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 27, 32, 45, 48, 62, 66, 68, 70, 73, 75, 76, 77, 78 и 80; или

направляющую последовательность, содержащую любую из SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 27, 32, 45 и 48; или

направляющую последовательность, содержащую любую из SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 25, 27, 32, 45, 48, 62, 66, 68, 70, 73, 75, 76, 77, 78, 80, 103, 109, 123, 133, 149, 153, 156 и 184; или

направляющую последовательность, содержащую любую из SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 25, 27, 32, 45, 48, 103 и 123; и необязательно

б. РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, тем самым снижая содержание оксалата в моче субъекта.

Вариант воплощения изобретения 08. Способ в соответствии с любым из вариантов воплощения изобретения, где вводят РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

Вариант воплощения изобретения 09. Композиция, содержащая:

а. направляющую РНК, содержащую

направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NOs: 1-84 и 100-192; или по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID NOs: 1-84 и 100-192; или

направляющую последовательность, которая на не менее 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NOs: 1-84 и 100-192; или

направляющую последовательность, содержащую любую из SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 27, 32, 45, 48, 62, 66, 68, 70, 73, 75, 76, 77, 78, и 80 или

направляющую последовательность, содержащую любую из SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 27, 32, 45 и 48; или

направляющую последовательность, содержащую любую из SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 25, 27, 32, 45, 48, 62, 66, 68, 70, 73, 75, 76, 77, 78, 80, 103, 109, 123, 133, 149, 153, 156, и 184; или

направляющую последовательность, содержащую любую из SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 25, 27, 32, 45, 48, 103, и 123; и необязательно

б. РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

Вариант воплощения изобретения 10. Композиция, содержащая короткую одиночную направляющую РНК (короткую sgРНК), содержащую:



а. направляющую последовательность, содержащую:

любую из направляющих последовательностей, выбранных из SEQ ID NOs: 1-84 и 100-192; или

по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов любой из направляющих последовательностей, выбранных из SEQ ID NOs: 1-84 и 100-192; или

по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентичности, выбранной из SEQ ID NOs: 1-84 и 100-192; или

любую из SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 27, 32, 45, 48, 62, 66, 68, 70, 73, 75, 76, 77, 78 и 80; или

любую из SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 27, 32, 45 и 48; или

направляющую последовательность, содержащую любую из SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 25, 27, 32, 45, 48, 62, 66, 68, 70, 73, 75, 76, 77, 78, 80, 103, 109, 123, 133, 149, 153, 156 и 184; или

направляющую последовательность, содержащую любую из SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 25, 27, 32, 45, 48, 103 и 123; и

б. консервативную часть sgРНК, содержащую область шпильки, где область шпильки не содержит по меньшей мере 5-10 нуклеотидов и, необязательно, где короткая sgРНК содержит одну или несколько из 5'-концевой модификации и 3'-концевой модификации.

Вариант воплощения изобретения 11. Композиция в соответствии с вариантом воплощения изобретения 10, содержащая последовательность SEQ ID NO: 202.

Вариант воплощения изобретения 12. Композиция в соответствии с вариантом воплощения изобретения 10 или вариантом воплощения изобретения 11, содержащая 5'-концевую модификацию.

Вариант воплощения изобретения 13. Композиция в соответствии с любым из вариантов воплощения изобретения 10-12, где короткая sgРНК содержит 3'-концевую модификацию.

Вариант воплощения изобретения 14. Композиция в соответствии с любым из вариантов воплощения изобретения 10-13, где короткая sgРНК содержит 5'-концевую модификацию и 3'-концевую модификацию.

Вариант воплощения изобретения 15. Композиция в соответствии с любым из вариантов воплощения изобретения 10-14, где короткая sgРНК содержит 3' хвост.

Вариант воплощения изобретения 16. Композиция в соответствии с вариантом воплощения изобретения 15, где 3' хвост содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов.

Вариант воплощения изобретения 17. Композиция в соответствии с вариантом воплощения изобретения 15, где 3' хвост содержит приблизительно 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-7, 1-10, по меньшей мере 1-2, по меньшей мере 1-3, по меньшей мере, 1-4, по меньшей мере, 1-5, по меньшей мере, 1-7 или по меньшей мере 1-10 нуклеотидов.

Вариант воплощения изобретения 18. Композиция в соответствии с любым из вариантов воплощения изобретения 10-17, где короткая sgРНК не содержит 3' хвост.

Вариант воплощения изобретения 19. Композиция в соответствии с любым из вариантов воплощения изобретения 10-18, содержащая модификацию в области шпильки.

Вариант воплощения изобретения 20. Композиция в соответствии с любым из вариантов воплощения изобретения 10-19, содержащая 3'-концевую модификацию и модификацию в области шпильки.

Вариант воплощения изобретения 21. Композиция в соответствии с любым из вариантов воплощения изобретения 10-20, содержащая 3'-концевую модификацию, модификацию в области шпильки и 5'-концевую модификацию.

Вариант воплощения изобретения 22. Композиция в соответствии с любым из вариантов воплощения изобретения 10-21, содержащая 5'-концевую модификацию и модификацию в области шпильки.

Вариант воплощения изобретения 23. Композиция в соответствии с любым из вариантов воплощения изобретения 10-22, в которой в области шпильки отсутствуют по меньшей мере 5 последовательных нуклеотидов.

Вариант воплощения изобретения 24. Композиция в соответствии с любым из вариантов воплощения изобретения 10-23, отличающаяся тем, что по меньшей мере 5-10 нуклеотидов отсутствуют:

- а. те, которые находятся внутри шпильки 1;
- б. те, которые находятся внутри шпильки 1 и «N» между шпилькой 1 и шпилькой 2;
- в. те, которые находятся внутри шпильки 1, и два нуклеотида находятся непосредственно на 3' шпильки 1;
- г. включающие по меньшей мере часть шпильки 1;
- д. те, которые находятся внутри шпильки 2;
- е. включающие по меньшей мере часть шпильки 2;
- ж. те, которые находятся внутри шпильки 1 и шпильки 2;
- з. включающие по меньшей мере часть шпильки 1 и включающие «N» между шпилькой 1 и шпилькой 2;
- и. включающие по меньшей мере часть шпильки 2 и включающие «N» между шпилькой 1 и шпилькой 2;
- к. включающие по меньшей мере часть шпильки 1, включающие «N» между шпилькой 1 и шпилькой 2 и включающие по меньшей мере часть шпильки 2;
- л. те, которые находятся внутри шпильки 1 или шпильки 2, необязательно включая «N» между шпилькой 1 и шпилькой 2;
- м. являются последовательными;
- н. являются последовательными и включают «N» между шпилькой 1 и шпилькой 2;
- о. являются последовательными и охватывают как по меньшей мере часть шпильки 1 и часть шпильки 2;
- п. являются последовательными и охватывают, по меньшей мере, часть шпильки 1 и "N" между шпилькой 1 и шпилькой 2;
- р. являются последовательными и охватывают, по меньшей мере, часть шпильки 1 и

два нуклеотида непосредственно через 3' шпильки 1;

- с. состоят из 5-10 нуклеотидов;
- т. состоят из 6-10 нуклеотидов;
- у. состоят из 5-10 последовательных нуклеотидов;
- ф. состоят из 6-10 последовательных нуклеотидов; или
- х. состоят из нуклеотидов 54-58 SEQ ID NO: 400.

Вариант воплощения изобретения 25. Композиция в соответствии с любым из вариантов воплощения изобретения 10-24, содержащая консервативную часть sgРНК, содержащую область связывания, где в области некнуса отсутствует по меньшей мере один нуклеотид.

Вариант воплощения изобретения 26. Композиция в соответствии с вариантом воплощения изобретения 25, где нуклеотиды, отсутствующие в области некнуса, включают любой один или несколько из:

- а. по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов в области некнуса;
  - б. по меньшей мере или точно 1-2 нуклеотида, 1-3 нуклеотида, 1-4 нуклеотида, 1-5 нуклеотидов, 1-6 нуклеотидов, 1-10 нуклеотидов или 1-15 нуклеотидов в области некнуса;
- и

в. каждый нуклеотид в области некнуса.

Вариант воплощения изобретения 27. Композиция, содержащая модифицированную одиночную направляющую РНК (sgРНК), содержащую

- а. направляющую последовательность, включающую:
  - любую из направляющих последовательностей, выбранных из SEQ ID NOs: 1-84 и 100-192; или
  - по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов любой из направляющих последовательностей, выбранных из SEQ ID NOs: 1-84 и 100-192; или
  - по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентичны последовательности, выбранной из SEQ ID NOs: 1-84 и 100-192; или
  - любую из SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 27, 32, 45, 48, 62, 66, 68, 70, 73, 75, 76, 77, 78 и 80; или
  - любую из SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 27, 32, 45 и 48; или
  - любую из SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 25, 27, 32, 45, 48, 62, 66, 68, 70, 73, 75, 76, 77, 78, 80, 103, 109, 123, 133, 149, 153, 156 и 184; или
  - любую из SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 25, 27, 32, 45, 48, 103 и 123; и дополнительно содержащий

б. одну или несколько модификаций, выбранных из:

1. модификацию YA на одном или нескольких сайтах YA направляющей области;
2. модификацию YA на одном или нескольких сайтах YA консервативной области;
3. модификацию YA на одном или нескольких сайтах YA направляющей области и на одном или нескольких сайтах YA консервативной области;
4. i) модификацию YA на двух или более сайтах YA направляющей области;

ii) модификацию YA на одном или нескольких сайтах YA консервативной области 2, 3, 4 и 10; и

iii) модификацию YA на одном или нескольких сайтах YA консервативной области 1 и 8; или

5. i) модификацию YA на одном или нескольких сайтах YA направляющей области, где сайт YA направляющей области находится на или после нуклеотида 8 от 5'-конца 5' сайта терминации транскрипции;

ii) модификацию YA на одном или нескольких сайтах YA консервативной области 2, 3, 4 и 10; и необязательно;

iii) модификацию YA на одном или нескольких сайтах YA консервативной области 1 и 8; или

6. i) модификацию YA на одном или нескольких сайтах YA направляющей области, где сайт YA направляющей области находится в пределах 13 нуклеотидов от 3'-концевого нуклеотида направляющей области;

ii) модификацию YA на одном или нескольких сайтах YA консервативной области 2, 3, 4 и 10; и

iii) модификацию YA на одном или нескольких сайтах YA консервативной области 1 и 8; или

7. i) 5'-концевую модификацию и 3' концевую модификацию;

ii) модификацию YA на одном или нескольких сайтах YA консервативной области 2, 3, 4 и 10; и

iii) модификацию YA на одном или нескольких сайтах YA консервативной области 1 и 8; или

8. i) модификацию YA на сайте YA направляющей области, где модификация сайта YA направляющей области включает модификацию, которую не содержит по меньшей мере один нуклеотид, расположенный на 5' от сайта YA направляющей области;

ii) модификацию YA на одном или нескольких сайтах YA консервативной области 2, 3, 4 и 10; и

iii) модификацию YA на одном или нескольких сайтах YA консервативной области 1 и 8; или

9. i) модификацию YA на одном или нескольких сайтах YA консервативной области 2, 3, 4 и 10; и

ii) модификацию YA на сайтах консервативной области 1 и 8 YA; или

10. i) модификацию YA на одном или нескольких сайтах YA направляющей области, где сайт YA находится на или после нуклеотида 8 от 5'-конца;

ii) модификацию YA на одном или нескольких сайтах YA консервативной области 2, 3, 4 и 10; и

iii) модификацию одного или нескольких из H1-1 и H2-1; или

11. i) модификацию YA на одном или нескольких сайтах YA консервативной области 2, 3, 4 и 10;

ii) модификацию YA на одном или нескольких сайтах YA консервативной области 1, 5, 6, 7, 8 и 9; и

iii) модификацию одного или нескольких из H1-1 и H2-1; или

12. i) модификацию, такую как модификация YA, на одном или нескольких нуклеотидах, расположенных на или после нуклеотида 6 от 5' конца;

ii) модификацию YA на одном или нескольких сайтах YA направляющей последовательности;

iii) модификацию одного или нескольких из B3, B4 и B5, где B6 не содержит 2'-ОМе модификацию или включает модификацию, отличную от 2'-ОМе;

iv) модификацию LS10, где LS10 включает модификацию, отличную от 2'-фтор; и/или

v) модификацию на N2, N3, N4, N5, N6, N7, N10 или N11; и при этом верно по меньшей мере одно из следующего:

модификация YA на одном или нескольких сайтах YA направляющей области;

модификация YA на одном или нескольких сайтах YA консервативной области;

модификация YA на одном или нескольких сайтах YA направляющей области и на одном или нескольких сайтах YA консервативной области;

по меньшей мере, один из нуклеотидов 8-11, 13, 14, 17 или 18 от 5'-конца 5' сайта терминации транскрипции не содержит 2'-фтор-модификацию;

по меньшей мере, один из нуклеотидов 6-10 от 5'-конца 5' сайта терминации транскрипции не содержит фосфоротиоатной связи;

хотя бы один из B2, B3, B4 или B5 не содержит 2'-ОМе модификацию;

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

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

H1-1 содержит модификацию; или

H2-1 содержит модификацию; или

хотя бы один из H1-2, H1-3, H1-4, H1-5, H1-6, H1-7, H1-8, H1-9, H1-10, H2-1, H2-2, H2-3, H2-4, H2-5, H2-6, H2-7, H2-8, H2-9, H2-10, H2-11, H2-12, H2-13, H2-14 или H2-15 не содержит фосфоротиоатной связи.

Вариант воплощения изобретения 28. Композиция в соответствии с вариантом воплощения изобретения 27, содержащая SEQ ID NO: 450.

Вариант воплощения изобретения 29. Композиция в соответствии с любым из вариантов воплощения изобретения 9-28 для использования для индукции двухцепочечного разрыва (DSB) или одноцепочечного разрыва (SSB) в гене *LDHA* в клетке или субъекте.

Вариант воплощения изобретения 30. Композиция в соответствии с любым из вариантов воплощения изобретения 9-28 для использования для снижения экспрессии гена *LDHA* в клетке или субъекте.

Вариант воплощения изобретения 31. Композиция в соответствии с любым из

вариантов воплощения изобретения 9-28 для применения при лечении или профилактике гипероксалурии у субъекта.

Вариант воплощения изобретения 32. Композиция в соответствии с любым из вариантов воплощения изобретения 9-28 для использования для увеличения концентрации гликолата в сыворотке и/или плазме у субъекта.

Вариант воплощения изобретения 33. Композиция в соответствии с любым из вариантов воплощения изобретения 9-28 для использования для снижения концентрации оксалата в моче у субъекта.

Вариант воплощения изобретения 34. Композиция в соответствии с любым из вариантов воплощения изобретения 9-28 для применения при лечении или профилактике образования оксалата, отложения оксалата кальция в органах, первичной гипероксалурии, оксалоза, включая системный оксалоз, гематурию, терминальную стадию почечной недостаточности (ESRD) и/или отсрочку или уменьшение потребности в трансплантации почки или печени.

Вариант воплощения изобретения 35. Способ в соответствии с любым из вариантов воплощения изобретения 1-8, дополнительно включающий:

- а. индуцирование двухпочечного разрыва (DSB) в гене *LDHA* в клетке или субъекте;
- б. снижение экспрессии гена *LDHA* в клетке или субъекте;
- в. лечение или предотвращение гипероксалурии у субъекта;
- г. лечение или предотвращение первичной гипероксалурии у субъекта;
- д. лечение или профилактику PH1, PH2 и/или PH3 у субъекта;
- е. лечение или профилактику кишечной гипероксалурии у субъекта;
- ж. лечение или предотвращение гипероксалурии, связанной с употреблением у субъекта продуктов с высоким содержанием оксалатов;
- з. повышение концентрации гликолата в сыворотке и/или плазме у субъекта;
- и. снижение концентрации оксалата в моче у субъекта;
- к. снижение выработки оксалатов;
- л. уменьшение отложения оксалата кальция в органах;
- м. уменьшение гипероксалурии;
- н. лечение или профилактике оксалоза, включая системный оксалоз;
- о. лечение или профилактика гематурии;
- п. предотвращение терминальной стадии почечной недостаточности (ESRD); и/или
- р. отсрочку или уменьшение потребности в трансплантации почки или печени.

Вариант воплощения изобретения 36. Способ или композиция для применения в соответствии с любым из вариантов воплощения изобретения 1-8 или 29-35, где композиция увеличивает уровни гликолата в сыворотке и/или плазме.

Вариант воплощения изобретения 37. Способ или композиция для использования в соответствии с любым из вариантов воплощения изобретения 1-8 или 29-35, где композиция приводит к редактированию гена *LDHA*.

Вариант воплощения изобретения 38. Способ или композиция для использования в соответствии с вариантом воплощения изобретения 37, в котором редактирование вычисляется как процент от редактируемой популяции (редактирование в процентах).

Вариант воплощения изобретения 39. Способ или композиция для использования в соответствии с вариантом воплощения изобретения 38, в котором процент редактирования составляет от 30 до 99% популяции.

Вариант воплощения изобретения 40. Способ или композиция для использования в соответствии с вариантом воплощения изобретения 38, в котором процент редактирования составляет от 30 до 35%, 35 и 40%, 40 и 45%, 45 и 50%, 50 и 55%, 55 и 60%, 60 и 65%, 65 и 70%, 70 и 75%, 75 и 80%, 80 и 85%, 85 и 90%, 90 и 95% или 95 и 99% популяции.

Вариант воплощения изобретения 41. Способ или композиция для использования в соответствии с любым из вариантов воплощения изобретения 1-8 или 29-35, где композиция снижает концентрацию оксалата в моче.

Вариант воплощения изобретения 42. Способ или композиция для применения в соответствии с вариантом воплощения изобретения 41, где снижение содержания оксалата в моче приводит к уменьшению количества камней в почках и/или отложению оксалата кальция в почках, печени, мочевом пузыре, сердце, коже или глазах.

Вариант воплощения изобретения 43. Способ или композиция в соответствии с любым из вариантов воплощения изобретения, где направляющая последовательность выбрана из

- а. SEQ ID NOs: 1-84 и 100-192;
- б. SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 27, 32, 45, 48, 62, 66, 68, 70, 73, 75, 76, 77, 78 и 80;
- в. SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 27, 32, 45 и 48;
- г. SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 25, 27, 32, 45, 48, 62, 66, 68, 70, 73, 75, 76, 77, 78, 80, 103, 109, 123, 133, 149, 153, 156 и 184; и
- д. SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 25, 27, 32, 45, 48, 103 и 123.

Вариант воплощения изобретения 44. Способ или композиция в соответствии с любым из вариантов воплощения изобретения, где композиция содержит sgРНК, содержащую

- а. любую из SEQ ID NOs: 1001, 1005, 1007, 1008, 1014, 1023, 1027, 1032, 1045, 1048, 1063, 1067, 1069, 1071, 1074, 1076, 1077, 1078, 1079 и 1081; или
- б. любую из SEQ ID NOs: 2001, 2005, 2007, 2008, 2014, 2023, 2027, 2032, 2045, 2048, 2063, 2067, 2069, 2071, 2074, 2076, 2077, 2078, 2079 и 2081; или
- в. направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 27, 32, 45, 48, 62, 66, 68, 70, 73, 75, 76, 77, 78 и 80; или
- г. направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 27, 32, 45 и 48;
- д. направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 25, 27, 32, 45, 48, 62, 66, 68, 70, 73, 75, 76, 77, 78, 80, 103, 109, 123, 133, 149, 153, 156 и 184;

и

е. направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 25, 27, 32, 45, 48, 103 и 123.

Вариант воплощения изобретения 45. Способ или композиция в соответствии с любым из вариантов воплощения изобретения, где последовательность-мишень находится в любом из экзонов 1-8 гена *LDHA* человека.

Вариант воплощения изобретения 46. Способ или композиция в соответствии с вариантом воплощения изобретения 45, где последовательность-мишень находится в экзоне 1 или 2 гена *LDHA* человека.

Вариант воплощения изобретения 47. Способ или композиция в соответствии с вариантом воплощения изобретения 45, где последовательность-мишень находится в экзоне 3 гена *LDHA* человека.

Вариант воплощения изобретения 48. Способ или композиция в соответствии с вариантом воплощения изобретения 45, где последовательность-мишень находится в экзоне 4 гена *LDHA* человека.

Вариант воплощения изобретения 49. Способ или композиция в соответствии с вариантом воплощения изобретения 45, где последовательность-мишень находится в экзоне 5 или 6 гена *LDHA* человека.

Вариант воплощения изобретения 50. Способ или композиция в соответствии с вариантом воплощения изобретения 45, где последовательность-мишень находится в экзоне 7 или 8 гена *LDHA* человека.

Вариант воплощения изобретения 51. Способ или композиция в соответствии с любым из вариантов воплощения изобретения 1-50, где направляющая последовательность комплементарна последовательности-мишени в положительной цепи *LDHA*.

Вариант воплощения изобретения 52. Способ или композиция в соответствии с любым из вариантов воплощения изобретения 1-50, в котором направляющая последовательность комплементарна последовательности-мишени в отрицательной цепи *LDHA*.

Вариант воплощения изобретения 53. Способ или композиция в соответствии с любым из вариантов воплощения изобретения 1-50, в котором первая направляющая последовательность комплементарна первой последовательности-мишени в положительной цепи гена *LDHA*, и где композиция дополнительно содержит вторую направляющую последовательность, которая комплементарна второй последовательности-мишени в отрицательной цепи гена *LDHA*.

Вариант воплощения изобретения 54. Способ или композиция в соответствии с любым из вариантов воплощения изобретения, где направляющая РНК содержит направляющую последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NOs: 1-84 и 100-192, и дополнительно содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 200, где нуклеотиды SEQ ID NO: 200 расположены после направляющей последовательности на ее 3'-конце.

Вариант воплощения изобретения 55. Способ или композиция в соответствии с



любым из вариантов воплощения изобретения, где направляющая РНК содержит направляющую последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NOs: 1-84 и 100-192, и дополнительно содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 201, SEQ ID NO: 202, SEQ ID NO: 203 или любая из SEQ ID NO: 400-450, где нуклеотиды SEQ ID NO: 201, SEQ ID NO: 202 или SEQ ID NO: 203 расположены после направляющей последовательности на ее 3'-конце.

Вариант воплощения изобретения 56. Способ или композиция в соответствии с любым из вариантов воплощения изобретения, где направляющая РНК представляет собой единственную направляющую (sgРНК).

Вариант воплощения изобретения 57. Способ или композиция в соответствии с вариантом воплощения изобретения 56, где sgРНК содержит направляющую последовательность, содержащую любую из SEQ ID NOs: 1001, 1005, 1007, 1008, 1014, 1023, 1027, 1032, 1045, 1048, 1063, 1067, 1069, 1071, 1074, 1076, 1077, 1078, 1079 и 1081.

Вариант воплощения изобретения 58. Способ или композиция в соответствии с вариантом воплощения изобретения 56, где sgРНК содержит любую из SEQ ID NOs: 1001, 1005, 1007, 1008, 1014, 1023, 1027, 1032, 1045, 1048, 1063, 1067, 1069, 1071, 1074, 1076, 1077, 1078, 1079 и 1081 или их модифицированные версии, необязательно где модифицированные версии содержат SEQ ID NOs: 2001, 2005, 2007, 2008, 2014, 2023, 2027, 2032, 2045, 2048, 2063, 2067, 2069, 2071, 2074, 2076, 2077, 2078, 2079 и 2081.

Вариант воплощения изобретения 59. Способ или композиция в соответствии с любым из вариантов воплощения изобретения, в котором направляющая РНК модифицирована в соответствии с паттерном SEQ ID NO: 300, где N вместе представляют собой любую из направляющих последовательностей из Таблицы 1 (SEQ ID NOs 1-84 и 100-192).

Вариант воплощения изобретения 60. Способ или композиция в соответствии с вариантом воплощения 59, где каждый N в SEQ ID NO: 300 представляет собой любой природный или неприродный нуклеотид, где N образуют направляющую последовательность, а направляющая последовательность нацелена на Cas9 к гену *LDHA*.

Вариант воплощения изобретения 61. Способ или композиция в соответствии с любым из вариантов воплощения изобретения, где sgРНК содержит любую одну из направляющих последовательностей SEQ ID NOs: 1-84 и 100-192 и нуклеотидов SEQ ID NO: 201, SEQ ID NO: 202 или SEQ ID NO: 203.

Вариант воплощения изобретения 62. Способ или композиция в соответствии с любым из вариантов воплощения изобретения 56-61, где sgРНК содержит направляющую последовательность, которая составляет по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентичны последовательности, выбранной из SEQ ID NOs: 1-84 и 100-192.

Вариант воплощения изобретения 63. Способ или композиция в соответствии с вариантом воплощения изобретения 62, где sgРНК содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 27, 32, 45, 48, 62, 66, 68, 70, 73, 75, 76, 77, 78,

80, 1001, 1005, 1007, 1008, 1014, 1023, 1027, 1032, 1045, 1048, 1063, 1067, 1069, 1071, 1074, 1076, 1077, 1078, 1079, 1081, 2001, 2005, 2007, 2008, 2014, 2023, 2027, 2032, 2045, 2048, 2063, 2067, 2069, 2071, 2074, 2076, 2077, 2078, 2079, и 2081.

Вариант воплощения изобретения 64. Способ или композиция в соответствии с любым из вариантов воплощения изобретения, в котором направляющая РНК содержит по меньшей мере одну модификацию.

Вариант воплощения изобретения 65. Способ или композиция в соответствии с вариантом воплощения изобретения 64, где по меньшей мере одна модификация включает модифицированный 2'-О-метил (2'-О-Me) нуклеотид.

Вариант воплощения изобретения 66. Способ или композиция в соответствии с вариантом воплощения изобретения 64 или 65, содержащая фосфоротиоатную (PS) связь между нуклеотидами.

Вариант воплощения изобретения 67. Способ или композиция в соответствии с любым из вариантов воплощения изобретения 64-66, содержащая 2'-фтор (2'-F) модифицированный нуклеотид.

Вариант воплощения изобретения 68. Способ или композиция в соответствии с любым из вариантов воплощения изобретения 64-67, включающие модификацию одного или нескольких из первых пяти нуклеотидов на 5'-конце направляющей РНК.

Вариант воплощения изобретения 69. Способ или композиция в соответствии с любым из вариантов воплощения изобретения 64-68, включающая модификацию одного или нескольких из последних пяти нуклеотидов на 3'-конце направляющей РНК.

Вариант воплощения изобретения 70. Способ или композиция в соответствии с любым из вариантов воплощения изобретения 64-69, содержащие связь PS между первыми четырьмя нуклеотидами направляющей РНК.

Вариант воплощения изобретения 71. Способ или композиция в соответствии с любым из вариантов воплощения изобретения 64-70, содержащие связь PS между последними четырьмя нуклеотидами направляющей РНК.

Вариант воплощения изобретения 72. Способ или композиция в соответствии с любым из вариантов воплощения изобретения 64-71, содержащие модифицированный 2'-О-Me нуклеотид в первых трех нуклеотидах на 5'-конце направляющей РНК.

Вариант воплощения изобретения 73. Способ или композиция в соответствии с любым из вариантов воплощения изобретения 64-72, содержащие модифицированный 2'-О-Me нуклеотид на последних трех нуклеотидах на 3'-конце направляющей РНК.

Вариант воплощения изобретения 74. Способ или композиция в соответствии с любым из вариантов воплощения изобретения 64-73, где направляющая РНК содержит модифицированные нуклеотиды SEQ ID NO: 300.

Вариант воплощения изобретения 75. Способ или композиция в соответствии с любым из вариантов воплощения изобретения 1-74, где композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый эксципиент.

Вариант воплощения изобретения 76. Способ или композиция в соответствии с

любым из вариантов воплощения изобретения 1-75, где направляющая РНК связана с липидной наночастицей (LNP).

Вариант воплощения изобретения 77. Способ или композиция в соответствии с любым из вариантов воплощения изобретения 76, где LNP содержит катионный липид.

Вариант воплощения изобретения 78. Способ или композиция в соответствии с любым из вариантов воплощения изобретения 77, где катионный липид представляет собой (9Z, 12Z)-3-((4,4-бис(октилокси)бутаноил)окси)-2-(((3-(диэтиламино)пропокси)карбонил)окси)метил)пропил октадека-9,12-диеноат, также называемый 3-((4,4-бис(октилокси)бутаноил)окси)-2-(((3-(диэтиламино)пропокси)карбонил)окси)метил)пропил (9Z, 12Z) октадека-9,12-диеноат.

Вариант воплощения изобретения 79. Способ или композиция в соответствии с любым из вариантов воплощения изобретения 76-78, где LNP содержит нейтральный липид.

Вариант воплощения изобретения 80. Способ или композиция в соответствии с вариантом воплощения изобретения 79, где нейтральный липид представляет собой DSPC.

Вариант воплощения изобретения 81. Способ или композиция в соответствии с любым из вариантов воплощения изобретения 76-80, где LNP содержит липид-хелпер.

Вариант воплощения изобретения 82. Способ или композиция в соответствии с вариантом воплощения изобретения 81, где липид-хелпер представляет собой холестерин.

Вариант воплощения изобретения 83. Способ или композиция в соответствии с любым из вариантов воплощения изобретения 76-82, в которых LNP содержит липид-невидимку.

Вариант воплощения изобретения 84. Способ или композиция в соответствии с вариантом воплощения изобретения 83, где липид-невидимка представляет собой PEG2k-DMG.

Вариант воплощения изобретения 85. Способ или композиция в соответствии с любым из вариантов воплощения изобретения, где композиция дополнительно содержит РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

Вариант воплощения изобретения 86. Способ или композиция в соответствии с любым из вариантов воплощения изобретения, где композиция дополнительно содержит иРНК, которая кодирует РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

Вариант воплощения изобретения 87. Способ или композиция в соответствии с воплощениями 85 или 86, где РНК-направляемый ДНК-связывающий агент представляет собой Cas9.

Вариант воплощения изобретения 88. Способ или композиция в соответствии с любым из вариантов воплощения изобретения, где композиция представляет собой фармацевтический состав и дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель.

Вариант воплощения изобретения 89. Способ или композиция в соответствии с любым из вариантов воплощения изобретения 1-88, где последовательность, выбранная из















SEQ ID NOs: 1-84 и 100-192, представляет собой SEQ ID NO: 81.

Вариант воплощения изобретения 170. Способ или композиция в соответствии с любым из вариантов воплощения изобретения 1-88, где последовательность, выбранная из SEQ ID NOs: 1-84 и 100-192, представляет собой SEQ ID NO: 82.

Вариант воплощения изобретения 171. Способ или композиция в соответствии с любым из вариантов воплощения изобретения 1-88, где последовательность, выбранная из SEQ ID NOs: 1-84 и 100-192, представляет собой SEQ ID NO: 83.

Вариант воплощения изобретения 172. Способ или композиция в соответствии с любым из вариантов воплощения изобретения 1-88, где последовательность, выбранная из SEQ ID NOs: 1-84 и 100-192, представляет собой SEQ ID NO: 84.

Вариант воплощения изобретения 173. Способ или композиция в соответствии с любым из вариантов воплощения изобретения 1-88, где последовательность, выбранная из SEQ ID NOs: 1-84 и 100-192, представляет собой SEQ ID NO: 103.

Вариант воплощения изобретения 174. Способ или композиция в соответствии с любым из вариантов воплощения изобретения 1-88, где последовательность, выбранная из SEQ ID NOs: 1-84 и 100-192, представляет собой SEQ ID NO: 109.

Вариант воплощения изобретения 175. Способ или композиция в соответствии с любым из вариантов воплощения изобретения 1-88, где последовательность, выбранная из SEQ ID NOs: 1-84 и 100-192, представляет собой SEQ ID NO: 123.

Вариант воплощения изобретения 176. Способ или композиция в соответствии с любым из вариантов воплощения изобретения 1-88, где последовательность, выбранная из SEQ ID NOs: 1-84 и 100-192, представляет собой SEQ ID NO: 133.

Вариант воплощения изобретения 177. Способ или композиция в соответствии с любым из вариантов воплощения изобретения 1-88, где последовательность, выбранная из SEQ ID NOs: 1-84 и 100-192, представляет собой SEQ ID NO: 149.

Вариант воплощения изобретения 178. Способ или композиция в соответствии с любым из вариантов воплощения изобретения 1-88, где последовательность, выбранная из SEQ ID NOs: 1-84 и 100-192, представляет собой SEQ ID NO: 156.

Вариант воплощения изобретения 179. Способ или композиция в соответствии с любым из вариантов воплощения изобретения 1-88, где последовательность, выбранная из SEQ ID NOs: 1-84 и 100-192, представляет собой SEQ ID NO: 166.

Вариант воплощения изобретения 180. Способ или композиция в соответствии с любым из вариантов воплощения изобретения 1-88, в котором направляющая последовательность содержит любую из SEQ ID NOs: 2, 9, 13, 16, 22, 24, 25, 27, 30, 31, 32, 33, 35, 36, 40, 44, 45, 53, 55, 57, 60, 61-63, 65, 67, 69, 70, 71, 73, 76, 78, 79, 80, 82-84, 103, 109, 123, 133, 149, 156, и 166.

Вариант воплощения изобретения 181. Способ или композиция в соответствии с любым из вариантов воплощения изобретения 1-88, где направляющая последовательность включает любую из SEQ ID NOs: 100-102, 104-108, 110-122, 124-132, 134-148, 150-155, 157-165 и 167-192.

Вариант воплощения изобретения 182. Способ или композиция в соответствии с любым из вариантов воплощения изобретения 1-88, в котором направляющая последовательность содержит любую из SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 25, 27, 32, 45, 48, 62, 66, 68, 70, 73, 75, 76, 77, 78, 80, 103, 109, 123, 133, 149, 153, 156 и 184.

Вариант воплощения изобретения 183. Способ или композиция в соответствии с любым из вариантов воплощения изобретения 1-88, в котором направляющая последовательность содержит любую из SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 25, 27, 32, 45, 48, 103 и 123.

Вариант воплощения изобретения 184. Способ или композиция в соответствии с любым из вариантов воплощения изобретения 1-88, где направляющая РНК представляет собой sgРНК, содержащую любую из SEQ ID NO: 86-90.

Вариант воплощения изобретения 185. Способ или композиция в соответствии с любым из вариантов воплощения изобретения 1-88, где направляющая РНК представляет собой sgРНК, содержащую SEQ ID NO: 89.

Вариант воплощения изобретения 186. Способ или композиция в соответствии с любым из вариантов воплощения изобретения 1-88, где направляющая РНК представляет собой sgРНК, содержащую SEQ ID NO: 1001 или 2001.

Вариант воплощения изобретения 187. Способ или композиция в соответствии с любым из вариантов воплощения изобретения 1-88, где направляющая РНК представляет собой sgРНК, содержащую SEQ ID NO: 1005 или 2005.

Вариант воплощения изобретения 188. Способ или композиция в соответствии с любым из вариантов воплощения изобретения 1-88, где направляющая РНК представляет собой sgРНК, содержащую SEQ ID NO: 1007 или 2007.

Вариант воплощения изобретения 189. Способ или композиция в соответствии с любым из вариантов воплощения изобретения 1-88, где направляющая РНК представляет собой sgРНК, содержащую SEQ ID NO: 1008 или 2008.

Вариант воплощения изобретения 190. Способ или композиция в соответствии с любым из вариантов воплощения изобретения 1-88, где направляющая РНК представляет собой sgРНК, содержащую SEQ ID NO: 1014 или 2014.

Вариант воплощения изобретения 191. Способ или композиция в соответствии с любым из вариантов воплощения изобретения 1-88, где направляющая РНК представляет собой sgРНК, содержащую SEQ ID NO: 1023 или 2023.

Вариант воплощения изобретения 192. Способ или композиция в соответствии с любым из вариантов воплощения изобретения 1-88, где направляющая РНК представляет собой sgРНК, содержащую SEQ ID NO: 1027 или 2027.

Вариант воплощения изобретения 193. Способ или композиция в соответствии с любым из вариантов воплощения изобретения 1-88, где направляющая РНК представляет собой sgРНК, содержащую SEQ ID NO: 1032 или 2032.

Вариант воплощения изобретения 194. Способ или композиция в соответствии с любым из вариантов воплощения изобретения 1-88, где направляющая РНК представляет



любым из вариантов воплощения изобретения 206 или 207, где однократная доза или однократное введение:

- а. вызывает DSB; и/или
- б. снижает экспрессию гена LDHA; и/или
- в. лечит или предотвращает гипероксалурию; и/или
- г. лечит или предотвращает ESRD, вызванную гипероксалурией; и/или
- д. лечит или предотвращает образование и отложение оксалата кальция; и/или
- е. лечит или предотвращает первичную гипероксалурию (включая PH1, PH2 и PH3); и/или
- ж. лечит или предотвращает оксалоз; и/или
- з. лечит и предотвращает гематурию; и/или
- и. лечит или предотвращает кишечную гипероксалурию; и/или
- к. лечит или предотвращает гипероксалурию, связанную с употреблением в пищу продуктов с высоким содержанием оксалатов; и/или
- л. дает отсрочку или уменьшает потребность в трансплантации почки или печени; и/или
- м. увеличивает концентрацию гликолата в сыворотке крови; и/или
- н. снижает содержание оксалатов в моче.

Вариант воплощения изобретения 209. Способ или композиция в соответствии с вариантом воплощения изобретения 208, где однократная доза или однократное введение обеспечивает любое одно или несколько из а) - н) для 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 недель.

Вариант воплощения изобретения 210. Способ или композиция в соответствии с любым из вариантов воплощения изобретения 208, где однократная доза или однократное введение обеспечивает достижение пролонгированного действия.

Вариант воплощения изобретения 211. Способ или композиция в соответствии с любым из вариантов воплощения изобретения 1-208, дополнительно включающие достижение пролонгированного действия.

Вариант воплощения изобретения 212. Способ или композиция в соответствии с любым из вариантов воплощения изобретения 210 или 211, где стойкий эффект сохраняется по меньшей мере 1 месяц, по меньшей мере 3 месяца, по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере один год или по меньшей мере 5 лет.

Вариант воплощения изобретения 213. Способ или композиция в соответствии с любым из вариантов воплощения изобретения 1-212, где введение композиции приводит к терапевтически релевантному снижению оксалата в моче.

Вариант воплощения изобретения 214. Способ или композиция в соответствии с любым из вариантов воплощения изобретения 1-213, где введение композиции приводит к уровням оксалата в моче в пределах терапевтического диапазона.

Вариант воплощения изобретения 215. Способ или композиция в соответствии с любым из вариантов воплощения изобретения 1-214, где введение композиции приводит к

уровням оксалата в пределах 100, 120 или 150% от нормального диапазона.

Вариант воплощения изобретения 216. Применение композиции или состава в соответствии с любым из вариантов воплощения изобретения 9-215 для приготовления лекарственного средства для лечения человеческого субъекта, страдающего гипероксалурией.

[12] Также раскрыто применение композиции или препарата любого из вышних вариантов воплощения изобретения для приготовления лекарственного средства для лечения человеческого субъекта, страдающего гипероксалурией.

Также раскрыты любые из вышних композиций или составов для применения при лечении гипероксалурии или для использования в модификации (например, формировании инсерционно-делеционной мутации в или образовании сдвига рамки считывания или нонсенс-мутации в) гена *LDHA*.

### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ**

[13] На Фиг. 1 показан анализ ненаправленного действия некоторых sgРНК, направленных на *LDHA*.

[14] На Фиг. 2 показаны кривые доза-ответ редактирования % определенных sgРНКs, направленных на *LDHA* в РНН.

[15] На Фиг. 3 показаны кривые доза-ответ редактирования% определенных sgРНКs, направленных на *LDHA* в РСН.

[16] На Фиг. 4 показан Вестерн-блоттинг анализ модифицированных sgРНК, направленных на *LDHA* (перечисленных в Таблице 2) в РНН.

[17] На Фиг. 5 показаны уровни оксалата в моче после лечения LNP, содержащим модифицированные sgРНК *in vivo*, у мышей с дефицитом AGT.

[18] На Фиг. 6 показаны уровни оксалата в моче после лечения LNP, содержащим модифицированную sgРНК *in vivo*, у мышей с дефицитом AGT в 15-недельном исследовании.

[19] На Фиг. 7 показан Вестерн-блоттинг анализ после обработки LNP, содержащим модифицированную sgРНК *in vivo*, у мышей с дефицитом AGT в 15-недельном исследовании.

[20] На Фиг. 8 показано иммуногистохимическое окрашивание белка *LDHA in vivo* в печени мышей с дефицитом AGT.

[21] На Фиг. 9 показана корреляция между редактированием и уровнями белка, показанными в Таблице 19.

[22] На Фиг.10 помечены 10 YA сайтов консервативной области в иллюстративной последовательности sgРНК от 1 до 10 (SEQ ID NO: 2082).

Цифры 25, 45, 50, 56, 64, 67 и 83 указывают положение пиримидина сайтов 1, 5, 6, 7, 8, 9 и 10 YA в sgРНК с направляющей областью, обозначенной как (N) x, например, где x необязательно равен 20.

[23] На Фиг. 11 показана иллюстративная sgРНК (SEQ ID NO: 401; показаны не все модификации) в возможной вторичной структуре с метками, обозначающими отдельные

нуклеотиды консервативной области sgРНК, включая нижний стержень, выпетливание, верхний стержень, нексус (нуклеотиды которых могут обозначаться как N1-N18, соответственно, в направлении от 5' до 3'), области шпильки 1 и шпильки 2.

Нуклеотид между шпилькой 1 и шпилькой 2 обозначен n.

Направляющая область может присутствовать на sgРНК и обозначена на данной Фигуре как «(N)x» перед консервативной областью sgРНК.

[24] Фиг. 12A-12C демонстрируют кривые доза-эффект процентного редактирования определенных sgРНКs, направленных на *LDHA*, в первичных гепатоцитах яванских макаков.

[25] Фиг. 13A-13B демонстрируют кривые доза-эффект относительного снижения экспрессии *LDHA* после обработки липофекцией, содержащей определенные sgРНК, в первичных гепатоцитах человека и яванской макаки.

[26] Фиг. 14A - 14C демонстрируют дозозависимые уровни оксалата в моче, процентное редактирование и корреляцию между уровнями оксалата в моче и процентным редактированием, соответственно, после лечения LNP, содержащим определенную sgРНК AGT-дефицитных мышей.

[27] Фиг. 15A - 15B демонстрируют активность *LDHA* в образцах печени и мышц после обработки LNP, содержащим определенную sgРНК AGT-дефицитных мышей, в 15-недельном исследовании длительности действия, как описано в Примере 4.

[28] Фиг. 16A - 16B демонстрируют уровни пирувата в образцах печени и плазмы после обработки LNP, содержащим определенную sgРНК AGT-дефицитных мышей, в 15-недельном исследовании длительности действия, как описано в Примере 4.

[29] Фиг. 17 демонстрирует среднюю клиренс-функцию лактата плазмы у мышей, перенесших нефрэктомия 5/6 или плацебо-хирургию после лечения LNP, содержащим определенную sgРНК.

## **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

[30] Теперь будет сделана подробная ссылка на определенные варианты воплощения изобретения, примеры которых проиллюстрированы на прилагаемых чертежах. Хотя данное изобретение описано в связи с проиллюстрированными вариантами воплощения изобретения, следует понимать, что они не предназначены для ограничения данного изобретения данными вариантами воплощения изобретения.

Напротив, данное изобретение предназначено для охвата всех альтернатив, модификаций и эквивалентов, которые могут быть включены в данное изобретение, как определено прилагаемой формулой изобретения и включенными вариантами воплощения изобретения.

Перед подробным описанием настоящих идей следует понимать, что данное раскрытие не ограничивается конкретными композициями или стадиями процесса, поскольку таковые могут варьироваться.

Следует отметить, что при использовании в данном описании и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают ссылки на формы

множественного числа, если контекст явно не диктует иное.

[31] Таким образом, например, ссылка на «конъюгат» включает несколько конъюгатов, а ссылка на «клетку» включает несколько клеток и т.п.

[32] Числовые диапазоны включают числа, определяющие диапазон. Подразумевается, что измеренные и измеряемые значения являются приблизительными с учетом значащих цифр и погрешности, связанной с измерением. Также, использование терминов «содержать», «содержит», «содержащий», «включать», «включает» и «включающий» не предназначено для ограничения. Следует понимать, что как предшествующее общее описание, так и подробное описание являются только иллюстративными и пояснительными и не ограничивают доктрины данного изобретения.

[33] Если специально не о в описании, варианты воплощения изобретения в описании, которые перечисляют «содержащие» различные компоненты, также рассматриваются как «состоящие из» или «состоящие по существу из» перечисленных компонентов; варианты воплощения изобретения в описании, которые повторяют «состоящие из» различных компонентов, также рассматриваются как «содержащие» или «состоящие по существу из» перечисленных компонентов; и варианты воплощения изобретения в описании, которые повторяют «состоящие по существу из» различных компонентов, также рассматриваются как «состоящие из» или «содержащие» перечисленные компоненты (эта взаимозаменяемость не применяется к использованию данных терминов в формуле изобретения). Термин «или» используется во включительном смысле, то есть эквивалентен «и/или», если контекст явно не указывает иное.

Заголовки разделов, используемые в данной заявке, предназначены только для организационных целей и никоим образом не должны рассматриваться как ограничение желаемого объекта.

[34] В случае, если какой-либо материал, включенный посредством ссылки, противоречит любому термину, определенному в данном описании или любому другому явному содержанию в данном описании, данное описание превалирует.

Хотя настоящие доктрины описаны в связи с различными вариантами воплощения изобретения, не предполагается, что настоящие доктрины ограничиваются такими вариантами воплощения изобретения. Напротив, настоящие доктрины охватывают различные альтернативы, модификации и эквиваленты, что будет понятно специалистам в данной области техники.

### **Определения**

[35] Если не о иное, следующие термины и фразы, используемые в данной заявке, имеют следующие значения:

[36] «Полинуклеотид» и «нуклеиновая кислота» используются в данной заявке для обозначения мультимерного соединения, содержащего нуклеозиды или аналоги нуклеозидов, которые имеют азотистые гетероциклические основания или аналоги оснований, связанные вместе вдоль скелета, включая обычные РНК, ДНК, смешанную РНК-ДНК и полимеры, которые являются их аналогами. «Скелет» нуклеиновой кислоты



может состоять из множества связей, включая одну или несколько сахар-фосфодисложноэфирных связей, связей пептид-нуклеиновая кислота («пептидные нуклеиновые кислоты» или PNA; РСТ № WO 95/32305), фосфоротиоатных связей, метилфосфонатных связей или их комбинации.

Сахарные фрагменты нуклеиновой кислоты могут представлять собой рибозу, дезоксирибозу или аналогичные соединения с замещениями, например, 2' метокси или 2' галогенидные замены.

Азотистые основания могут быть обычными основаниями (A, G, C, T, U), их аналогами (например, модифицированные уридины, такие как 5-метоксиуридин, псевдоуридин или N1-метилпсевдоуридин или другие); инозин; производные пуринов или пиримидинов (например, N<sup>4</sup>-метил дезоксигуанозин, деаза- или азапурины, деаза- или азапиримидины, пиримидиновые основания с группами заместителей в 5 или 6 положении (например, 5-метилцитозин), пуриновые основания с заместителем в положениях 2, 6 или 8, 2-амино-6-метиламинопурин, O<sup>6</sup>-метилгуанин, 4-тиопиримидины, 4-аминопиримидины, 4-диметилгидразин-пиримидины и O<sup>4</sup>-алкил-пиримидины; патент США № 5,378,825 и РСТ № WO 93/13121).

Для общего обсуждения см. *The Biochemistry of the Nucleic Acids* 5-36, Adams et al., ed., 11<sup>th</sup> ed., 1992). Нуклеиновые кислоты могут включать один или несколько остатков «нуклеотидов с удаленным азотистым основанием», где основной скелет не содержит азотистого основания для положения (положений) полимера (патент США № 5,585,481).

Нуклеиновая кислота может содержать только обычные РНК или ДНК, сахара, основания и связи или может включать как обычные компоненты, так и замещения (например, обычные основания с 2'-метокси связями или полимеры, содержащие как обычные основания, так и одно или несколько аналогов оснований). Нуклеиновая кислота включает «запертую нуклеиновую кислоту» (LNA), аналог, содержащий один или несколько нуклеотидных мономеров LNA с бициклической фуранозной единицей, запертой в конформации, имитирующей РНК, что увеличивает аффинность гибридизации к комплементарным последовательностям РНК и ДНК (Vester и Wengel, 2004, *Biochemistry* 43(42):13233-41). РНК и ДНК имеют разные сахарные фрагменты и могут отличаться наличием урацила или его аналогов в РНК и тимина или его аналогов в ДНК.

[37] «Направляющая РНК», «gРНК» и «направляющая» используются в данной заявке взаимозаменяемо для обозначения либо sgРНК (также известной как CRISPR РНК), либо комбинации sgРНК и trРНК (также известной как tracrРНК).

СgРНК и trРНК могут быть связаны как одна молекула РНК (одиночная направляющая РНК, sgРНК) или как две отдельные молекулы РНК (двойная направляющая РНК, dgРНК). «Направляющая РНК» или «gРНК» относится к каждому типу. TrРНК может быть природной последовательностью или последовательностью trРНК с модификациями или вариациями по сравнению с встречающимися в природе последовательностями.

[38] Как используют в данной заявке, «направляющая последовательность» относится к последовательности в направляющей РНК, которая комплементарна

последовательности-мишени и функционирует, чтобы направлять направляющую РНК к последовательности-мишени для связывания или модификации (например, расщепления) с помощью РНК-направляемого ДНК-связывающего агента. «Направляющая последовательность» также может называться «нацеливающей последовательностью» или «спейсерной последовательностью». Направляющая последовательность может иметь 20 пар оснований в длину, например, в случае *Streptococcus pyogenes* (т.е. Spv Cas9) и родственных гомологов/ортологов Cas9. Более короткие или более длинные последовательности также могут использоваться в качестве направляющих, например, длиной 15, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидов. Например, в некоторых вариантах воплощения изобретения направляющая последовательность содержит по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID NOs: 1-84.

В некоторых вариантах воплощения изобретения последовательность-мишень находится, например, в гене или хромосоме и комплементарна направляющей последовательности. В некоторых вариантах воплощения изобретения степень комплементарности или идентичности между направляющей последовательностью и соответствующей ей последовательностью-мишенью может составлять приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%.

Например, в некоторых вариантах воплощения изобретения направляющая последовательность включает последовательность с приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидам последовательности, выбранной из SEQ ID NOs: 1-84. В некоторых вариантах воплощения изобретения направляющая последовательность и целевая область могут быть на 100% комплементарными или идентичными.

В других вариантах воплощения изобретения направляющая последовательность и целевая область могут содержать по меньшей мере одно несоответствие. Например, направляющая последовательность и последовательность-мишень могут содержать 1, 2, 3 или 4 несовпадений, где общая длина последовательности-мишени составляет по меньшей мере 17, 18, 19, 20 или более пар оснований. В некоторых вариантах воплощения изобретения направляющая последовательность и целевая область могут содержать 1-4 несовпадений, где направляющая последовательность содержит по меньшей мере 17, 18, 19, 20 или более нуклеотидов. В некоторых вариантах воплощения изобретения направляющая последовательность и целевая область могут содержать 1, 2, 3 или 4 несовпадений, где направляющая последовательность содержит 20 нуклеотидов.

[39] Последовательности-мишени для РНК-направляемых ДНК-связывающих агентов включают в себя как положительные, так и отрицательные цепи геномной ДНК (т.е. заданную последовательность и обратный комплемент последовательности), поскольку субстратом нуклеиновой кислоты для РНК-направляемого ДНК-связывающего агента является двухцепочечная нуклеиновая кислота. Соответственно, когда говорится, что направляющая последовательность «комплементарна последовательности-мишени»,

следует понимать, что направляющая последовательность может направлять направляющую РНК для связывания с обратным комплементом последовательности-мишени. Таким образом, в некоторых вариантах воплощения изобретения, где направляющая последовательность связывает обратный комплемент последовательности-мишени, направляющая последовательность идентична определенным нуклеотидам последовательности-мишени (например, последовательность-мишень, не включающая РАМ), за исключением замены U на T в направляющей последовательности.

[40] Как используют в данной заявке, «сайт YA» относится к 5'-пиримидин-аденин-3' динуклеотиду. «Сайт консервативной области YA» присутствует в консервативной области sgРНК. «Сайт YA направляющей области» присутствует в направляющей области sgРНК. Немодифицированный сайт YA в sgРНК может быть чувствительным к расщеплению эндонуклеазами, подобными РНазе-А, например, РНазой А. В некоторых вариантах воплощения изобретения sgРНК содержит приблизительно 10 сайтов YA в своей консервативной области. В некоторых вариантах воплощения изобретения sgРНК содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 сайтов YA в своей консервативной области.

Иллюстративные сайты YA консервативной области показаны на Фиг. 10. Иллюстративные сайты YA направляющей области не показаны на Фиг. 10, поскольку направляющая область может быть любой последовательностью, включая любое количество сайтов YA. В некоторых вариантах воплощения изобретения sgРНК содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 сайтов YA, ных на Фиг. 10. В некоторых вариантах воплощения изобретения sgРНК содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 сайтов YA в следующих позициях или их подмножестве: LS5-LS6; US3-US4; US9-US10; US12-B3; LS7-LS8; LS12-N1; N6-N7; N14-N15; N17-N18; и с N2-2 до N2-3. В некоторых вариантах воплощения изобретения сайт YA содержит модификацию, означающую, что по меньшей мере один нуклеотид сайта YA модифицирован.

[41] В некоторых вариантах воплощения изобретения пиримидин (также называемый положением пиримидина) сайта YA включает модификацию (которая включает модификацию, изменяющую межнуклеозидную связь непосредственно на 3' от сахара пиримидина).

В некоторых вариантах воплощения изобретения аденин (также называемый положением аденина) сайта YA содержит модификацию (которая включает модификацию, изменяющую межнуклеозидную связь непосредственно на 3' от сахара аденина).

В некоторых вариантах воплощения изобретения положение пиримидина и положение аденина сайта YA содержат модификации.

Используемый в данной заявке термин «РНК-направляемый ДНК-связывающий агент», означает полипептид или комплекс полипептидов, обладающих активностью связывания РНК и ДНК или субъединицу связывания ДНК такого комплекса, где активность связывания ДНК является специфичной для последовательности и зависит от последовательности РНК. Типичные агенты связывания ДНК, управляемые РНК, включают Cas клевазы/никазы и их инактивированные формы («агенты связывания ДНК

dCas»). «Нуклеаза Cas», также называемая «белком Cas», как используют в данной заявке, охватывает Cas-клевазы, Cas-никазы и связывающие ДНК агенты dCas. Cas-клевазы/никазы и ДНК-связывающие агенты dCas включают комплекс Csm или Cmr системы CRISPR типа III, его субъединицу Cas 10, Csm1 или Cmr2, комплекс Cascade системы CRISPR типа I, его субъединицу Cas3 и нуклеазы класса 2 Cas. Как используют в данной заявке, «нуклеаза класса Cas 2» представляет собой одноцепочечный полипептид с РНК-направляемой ДНК-связывающей активностью, такой как нуклеаза Cas9 или нуклеаза Cpf1. Нуклеазы Cas 2 класса включают клевазы Cas 2 класса и никазы Cas 2 класса (например, варианты Н840А, D10А или N863А), которые дополнительно обладают РНК-направляемой ДНК-расщепляющей или никазной активностью, и ДНК-связывающие агенты класса 2 dCas, в которых активность клевазы/никазы инактивирована. Нуклеазы Cas класса 2 включают, например, Cas9, Cpf1, C2c1, C2c2, C2c3, HF Cas9 (например, варианты N497А, R661А, Q695А, Q926А), НураCas9 (например, варианты N692А, M694А, Q695А, H698А), eSPCas9(1.0) (например, варианты K810А, K1003А, R1060А) и eSPCas9 (1.1) (например, варианты K848А, K1003А, R1060А) и их модификации. Белок Cpf1, Zetsche et al., *Cell*, 163: 1-13 (2015), гомологичен Cas9 и содержит RuvC-подобный домен нуклеазы. Последовательности Cpf1 Zetsche полностью включены в качестве ссылки. См., например, Zetsche, Таблицы S1 и S3. «Cas9» охватывает Spy Cas9, варианты Cas9, перечисленные в данной заявке, и их эквиваленты.

См., например, Makarova et al., *Nat Rev Microbiol*, 13(11): 722-36 (2015); Shmakov et al., *Molecular Cell*, 60:385-397 (2015).

[42] Используемый в данной заявке термин «рибонуклеопротеин» (RNP) или «комплекс RNP» относится к направляющей РНК вместе с РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом, таким как Cas-нуклеаза, например, Cas-клеваза, Cas-никаза или ДНК-связывающий агент dCas (например, Cas9). В некоторых вариантах воплощения изобретения направляющая РНК направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, такой как Cas9, к последовательности-мишени, а направляющая РНК гибридизируется с последовательностью-мишенью и связывается с ней; в случаях, когда агент представляет собой клевазу или никазу, за связыванием может следовать отщепление или односторонний разрыв.

[43] Как используют в данной заявке, первая последовательность считается «содержащей последовательность с идентичностью по меньшей мере X%» второй последовательности, если выравнивание первой последовательности со второй последовательностью показывает, что X% или более положений второй последовательности в его целиком соответствуют первой последовательности. Например, последовательность AAGA содержит последовательность со 100% идентичностью с последовательностью AAG, поскольку выравнивание даст 100% идентичность в том смысле, что присутствуют совпадения по всем трем положениям второй последовательности. Различия между РНК и ДНК (обычно обмен уридина на тимидин или наоборот) и присутствие аналогов нуклеозидов, таких как модифицированные уридины, не

вливают на различия в идентичности или комплементарности полинуклеотидов, если 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 является цитозин и 5-метилцитозин, оба из которых содержат гуанозин или модифицированный гуанозин в качестве комплемента).

Таким образом, например, последовательность 5'-AXG, где X представляет собой любой модифицированный уридин, такой как псевдоуридин, N1-метилпсевдоуридин или 5-метоксиуридин, считается на 100% идентичной AUG в том смысле, что обе они полностью комплементарны одной и той же последовательности (5'-CAU).

Иллюстративные алгоритмы выравнивания представляют собой алгоритмы Смита-Уотермана и Нидлмана-Вунша, которые хорошо известны в данной области техники. Специалист в данной области техники поймет, какой выбор алгоритма и настроек параметров подходит для данной пары последовательностей, подлежащих выравниванию; для последовательностей в целом одинаковой длины и ожидаемой идентичности больше 50% для аминокислот или больше 75% для нуклеотидов, алгоритм Нидлмана-Вунша с настройками по умолчанию интерфейса алгоритма Нидлмана-Вунша, предоставленными EBI на сайте [www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk) веб-сервер, как правило, является подходящим.

[44] «иРНК» используется в данной заявке для обозначения полинуклеотида, который представляет собой РНК или модифицированную РНК и включает открытую рамку считывания, которая может быть транслирована в полипептид (т.е. может служить субстратом для трансляции рибосомой и аминоацелированными тРНК). иРНК может включать фосфатно-сахарный скелет, включая остатки рибозы или их аналоги, например, остатки 2'-метокси-рибозы. В некоторых вариантах воплощения изобретения сахара фосфатно-сахарного скелет иРНК состоят по существу из остатков рибозы, остатков 2'-метокси-рибозы или их комбинации.

[45] Направляющие последовательности, используемые в описанных в данной заявке композициях и способах направляющих РНК, показаны в Таблице 1 и во всей заявке.

[46] Как используют в данной заявке, «инсерции» относятся к инсерционным/делеционным мутациям, состоящим из ряда нуклеотидов, которые либо вставлены, либо удалены на сайте двухцепочечных разрывов (DSB) в нуклеиновой кислоте-мишени.

[47] Используемый в данной заявке термин «нокдаун» относится к снижению экспрессии конкретного генного продукта (например, белка, иРНК или того и другого).

Нокдаун белка может быть измерен путем определения общего клеточного количества белка в интересующей ткани или популяции клеток. Способы измерения нокдауна иРНК известны и включают секвенирование иРНК, выделенной из представляющей интерес ткани или популяции клеток. В некоторых вариантах воплощения изобретения «нокдаун» может относиться к некоторой потере экспрессии конкретного генного продукта, например, к снижению количества транскрибируемой иРНК или

уменьшению количества белка, экспрессируемого популяцией клеток (включая популяции *in vivo*, такие как те, что находятся в тканях).

[48] Используемый в данной заявке термин «нокаут» относится к потере экспрессии определенного белка в клетке. Нокаут может быть измерен путем определения общего клеточного количества белка в клетке, ткани или популяции клеток. В некоторых вариантах воплощения изобретения способы раскрытия «нокаутируют» *LDHA* в одной или нескольких клетках (например, в популяции клеток, включая популяции *in vivo*, такие как популяции, обнаруженные в тканях). В некоторых вариантах воплощения изобретения нокаут - это не образование мутантного белка *LDHA*, например, созданного за счет инсерционно-делеционных мутаций, а скорее полная потеря экспрессии белка LDH в клетке. Используемый в данной заявке термин «LDH» относится к лактатдегидрогеназе, которая является генным продуктом гена *LDHA*. Последовательность *LDHA* дикого типа человека доступна по адресу NCBI Gene ID: 3939; Ensembl ENSG00000134333.

[49] «Гипероксалурия» - это состояние, характеризующееся избытком оксалата в моче. Примеры типов гипероксалурии включают первичную гипероксалурию (включая типы 1 (PH1), 2 (PH2) и 3 (PH3)), оксалоз, кишечную гипероксалурию и гипероксалурию, связанные с употреблением в пищу продуктов с высоким содержанием оксалатов. Гипероксалурия может быть идиопатической. Высокий уровень оксалата приводит к образованию камней из оксалата кальция и повреждению паренхимы почек, что приводит к прогрессирующему ухудшению функции почек и, в конечном итоге, к терминальной стадии почечной недостаточности. Таким образом, гипероксалурия может привести к чрезмерному производству оксалата и отложению кристаллов оксалата кальция в почках и мочевыводящих путях. Повреждение почек оксалатом вызывается сочетанием токсичности канальцев, отложением оксалата кальция в почках и непроходимостью мочевыводящих путей из-за камней оксалата кальция. Нарушение функции почек усугубляет заболевание, поскольку избыток оксалата больше не может эффективно выводиться, что приводит к последующему накоплению и кристаллизации оксалатов в костях, глазах, коже, сердце и других органах, приводя к тяжелым заболеваниям и смерти. Возможны почечная недостаточность и терминальная стадия почечной недостаточности. Одобренные фармацевтические препараты для лечения гипероксалурии отсутствуют.

[50] «Первичная гипероксалурия типа 1 (PH1)» представляет собой аутосомно-рецессивное заболевание, вызванное мутацией гена *AGXT*, который кодирует печеночный фермент пероксисомальную аланин-глиоксилатаминотрансферазу (*AGT*).

*AGT* метаболизирует глиоксилат до глицина. Отсутствие активности *AGT* или ее неправильное нацеливание на митохондрии позволяет окислять глиоксилат до оксалата, который может выводиться только с мочой.

[51] Нарушение лактатдегидрогеназы (*LDH*), печеночного, пероксисомального фермента, который превращает глиоксилат в оксилат перед выведением почками, является одним из возможных механизмов блокирования синтеза оксалата в больной печени, чтобы потенциально предотвратить патологию, развивающуюся при гипероксалурии. *LDH*,

кодируемый геном лактатдегидрогеназы (LDHA), катализирует превращение глиоксилата в оксалат. Подавление активности LDH должно подавлять выработку оксалатов, что приводит к снижению уровня оксалатов в моче, вызывая при этом накопление глиоксилата, который может быть преобразован в глиоксилат при помощи глиоксилаторедуктазы/гидроксипируватредуктазы (GRHPR). В отличие от оксалата, гликолат растворим и легко выводится с мочой. В настоящее время отсутствуют известные негативные побочные эффекты повышенного уровня гликолата.

Таким образом, в некоторых вариантах воплощения изобретения предложены способы ингибирования активности LDH, в которых после ингибирования образование оксалата ингибируется и производство гликолата увеличивается.

[52] Оксалат, продукт окисления глиоксилата, может выводиться только с мочой. Высокий уровень оксалата в моче («гипероксалурия») является симптомом гипероксалурии. Таким образом, повышенное содержание оксалатов в моче является признаком гипероксалурии. Оксалат может соединяться с кальцием с образованием оксалата кальция, который является основным компонентом камней в почках и мочевом пузыре. Отложения оксалата кальция в почках и других тканях могут привести к образованию крови в моче (гематурии), инфекциям мочевыводящих путей, повреждению почек, терминальной стадии почечной недостаточности и т.д. Со временем уровень оксалатов в крови может повыситься, а оксалат кальция может откладываться в других органах по всему телу (оксалоз или системный оксалоз).

[53] Как используют в данной заявке, «последовательность-мишень» относится к последовательности нуклеиновой кислоты в гене-мишени, которая комплементарна направляющей последовательности gРНК. Взаимодействие последовательности-мишени и направляющей последовательности заставляет РНК-направляемый связывающий ДНК агент связываться и потенциально разрывать или расщеплять (в зависимости от активности агента) внутри последовательности-мишени.

[54] Как используют в данной заявке, «лечение» относится к любому введению или применению терапевтического средства для лечения заболевания или расстройства у субъекта и включает ингибирование заболевания, остановку его развития, облегчение одного или нескольких симптомов заболевания, излечение заболевания или предотвращение рецидива одного или нескольких симптомов заболевания. Например, лечение гипероксалурии может включать облегчение симптомов гипероксалурии.

[55] Используемый в данной заявке термин «терапевтически релевантное снижение оксалата» или «уровни оксалата в терапевтическом диапазоне» означает снижение экскреции оксалата с мочой более чем на 30% по сравнению с исходным уровнем. См. Leumann и Hoppe (1999) *Nephrol Dial Transplant* 14:2556-2558 at 2557, вторая колонка. Например, достижение уровней оксалатов в терапевтических пределах означает снижение содержания оксалатов в моче более чем на 30% от исходного уровня.

В некоторых вариантах воплощения изобретения «нормальный уровень оксалата» или «нормальный диапазон оксалата» составляет от приблизительно 80 до приблизительно

122 мкг оксалата/мг креатинина. См. Li et al. (2016) *Biochim Biophys Acta* 1862(2):233-239. В некоторых вариантах воплощения изобретения терапевтически релевантное снижение оксалата достигает уровней менее или в пределах 200%, 150%, 125%, 120%, 115%, 110%, 105% или 100% от нормы.

[56] Термин «около» или «приблизительно» означает допустимую ошибку для конкретного значения, определенную специалистом в данной области техники, которая частично зависит от того, каким образом измеряется или определяется значение.

## II. Композиции

### A. Композиции, содержащие направляющую РНК (gРНК)

[57] В данной заявке представлены композиции, применимые для индукции двухпочечного разрыва (DSB) в гене *LDHA*, например, с использованием направляющей РНК с агентом связывания ДНК, управляемым РНК (например, системой CRISPR/Cas). Композиции можно вводить субъектам, имеющим или у которых подозревается гипероксалурия. Композиции можно вводить субъектам, имеющим повышенный выход оксалата с мочой или пониженный выход гликолата сыворотки. Направляющие последовательности, нацеленные на ген *LDHA*, показаны в Таблице 1 под SEQ ID NOs: 1-84.

[58] Каждая из направляющих последовательностей, показанных в Таблице 1 в SEQ ID NOs: 1-84 и 100-192, может дополнительно содержать дополнительные нуклеотиды для образования sgРНК, например, со следующей иллюстративной нуклеотидной последовательностью, следующей за направляющей последовательностью на ее 3'-конце:

GUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG (SEQ ID NO: 200) в ориентации от 5' до 3'.

В случае sgРНК, ные выше направляющие последовательности могут дополнительно содержать дополнительные нуклеотиды для образования sgРНК, например, со следующей приблизительной нуклеотидной последовательностью, следующей за 3' концом направляющей последовательности:

GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAAC UUGAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (SEQ ID NO: 201) или GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGA AAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC (SEQ ID NO: 203, которая представляет собой SEQ ID NO: 201 без четырех концевых U) в ориентации от 5' к 3'. В некоторых вариантах воплощения изобретения четыре концевых U в SEQ ID NO: 201 отсутствуют. В некоторых вариантах воплощения изобретения присутствуют только 1, 2 или 3 из четырех концевых U в SEQ ID NO: 201.

[59] В некоторых вариантах воплощения изобретения предусмотрены короткие одиночные направляющие РНК *LDHA* (короткие sgРНК *LDHA*), содержащие направляющую последовательность, как описано в данной заявке, и «консервативную часть sgРНК», содержащую область шпильки, причем область шпильки не содержит по меньшей мере 5-10 нуклеотидов или 6-10 нуклеотидов. В некоторых вариантах воплощения изобретения в области шпильки короткой одиночной направляющей РНК *LDHA* не хватает



5-10 нуклеотидов по отношению к консервативной части sgРНК, например нуклеотиды от Н1-1 до Н2-15 в Таблице 2В. В некоторых вариантах воплощения изобретения в области шпильки 1 короткой одиночной направляющей РНК *LDHA* не хватает 5-10 нуклеотидов относительно консервативной части sgРНК, например нуклеотидов от Н1-1 до Н1-12 в Таблице 2В.

[60] Иллюстративный «консервативный участок sgРНК» показан в Таблице 2А, которая показывает «консервативный участок» sgРНК *S. pyogenes Cas9* («spyCas9» (также называемый «spCas9»)). Первая строка показывает нумерацию нуклеотидов, вторая строка показывает последовательность (SEQ ID NO: 700); а в третьей строке показаны «домены». *Briner AE et al., Molecular Cell* 56:333-339 (2014) описывает функциональные домены sgРНК, называемые в данной заявке «доменами», включая «спейсерный» домен, ответственный за нацеливание, «нижний стержень», «выпуклость», «верхний стержень» (который может включать тетрапетлю), «нексус» и домены «шпилька 1» и «шпилька 2». См. Briner et al. на странице 334, Фигура 1А.

[61] В Таблице 2В представлена схема используемых в данной заявке доменов sgРНК.

В Таблице 2В «n» между областями представляет переменное количество нуклеотидов, например, от 0 до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более.

В некоторых вариантах воплощения изобретения n равен 0. В некоторых вариантах воплощения изобретения n равен 1.

[62] В некоторых вариантах воплощения изобретения изобретения sgРНК *LDHA* происходит от *S. pyogenes Cas9* («spyCas9») или его эквивалента spyCas9. В некоторых вариантах воплощения изобретения sgРНК не из *S. pyogenes* («не-spyCas9»). В некоторых вариантах воплощения изобретения 5-10 нуклеотидов или 6-10 нуклеотидов являются последовательными.

[63] В некоторых вариантах воплощения изобретения короткая sgРНК в *LDHA* не содержит по меньшей мере нуклеотидов 54-58 (AAAAA) консервативной части sgРНК *S. pyogenes Cas9* («spyCas9»), как показано в Таблице 2А. В некоторых вариантах воплощения изобретения короткая sgРНК *LDHA* представляет собой sgРНК, отличную от spyCas9, в которой отсутствуют по меньшей мере нуклеотиды, соответствующие нуклеотидам 54-58 (AAAAA) консервативной части spyCas9, как определено, например, путем попарного или структурного выравнивания.

В некоторых вариантах воплощения изобретения sgРНК, не относящаяся к spyCas9, представляет собой sgРНК *Staphylococcus aureus Cas9* («saCas9»).

[64] В некоторых вариантах воплощения изобретения короткая sgРНК *LDHA* не содержит по меньшей мере нуклеотидов 54-61 (AAAAAGUG) консервативной части sgРНК spyCas9. В некоторых вариантах воплощения изобретения короткая sgРНК *LDHA* не содержит по меньшей мере нуклеотидов 53-60 (GAAAAAGU) консервативной части sgРНК spyCas9. В некоторых вариантах воплощения изобретения короткая sgРНК *LDHA* не

содержит 4, 5, 6, 7 или 8 нуклеотидов из нуклеотидов 53-60 (GAAAAAGU) или нуклеотидов 54-61 (AAAAAGUG) консервативной части sgPHK *spyCas9* или соответствующих нуклеотидов консервативной части sgPHK, не являющейся *spyCas9*, как определено, например, путем попарного или структурного выравнивания.

[65] В некоторых вариантах воплощения изобретения sgPHK содержит любую одну из направляющих последовательностей SEQ ID NOs: 1-146 и дополнительные нуклеотиды для образования sgPHK, например, со следующей иллюстративной нуклеотидной последовательностью, следующей за направляющей последовательностью на ее 3'-конце:

GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAAC  
UU GGCACCGAGUCGGUGC (SEQ ID NO: 202) в ориентации от 5' к 3'.

В SEQ ID NO: 202 отсутствуют 8 нуклеотидов по отношению к консервативной последовательности направляющей РНК дикого типа:

GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAAC  
UUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC (SEQ ID NO:203).

[66] Таблица 1: Целевые направляющие последовательности *LDHA* и хромосомные координаты для человека и яванской макаки

Направляющая ID	Направляющая последовательность	Иллюстративные геномные координаты (“Hs” обозначает человека; “Cyno” обозначает макаку; отсутствие обозначения человека)	SEQ ID NO:
G012089	ACAUAGACCUACCUUAAUCA	chr11:18405564-18405584	1
G012090	AAAUAACUUAUGCUUACCAC	Hs: chr11:18403010-18403030 Cyno: chr14:49278339-49278359	2
G012091	AUGCAGUCAAAAGCCUCACC	chr11:18401009-18401029	3
G012092	UCAGGGUCUUUACGGAAUAA	chr11:18407112-18407132	4
G012093	CCUAUCAUACAGUGC UUAUG	chr11:18405436-18405456	5
G012094	CCGAUUCCGUUAACCUAAUGG	chr11:18402924-18402944	6
G012095	UAGACCUACCUUAAUCAUGG	chr11:18405561-18405581	7
G012096	UACAGAGAGUCCAAUAGCCC	chr11:18405486-18405506	8
G012097	CUUUUAGUGCCUGUAUGGAG	Hs: chr11:18403686-18403706	9

		Cyno: chr14:49277655-49277675	
G012098	CCCGAUUCCGUUACCUGAAUG	chr11:18402923-18402943	10
G012099	GGCUGGGGCACGUCAGCAAG	chr11:18400876-18400896	11
G012100	CCCCAUUAGGUAACGGAAUC	chr11:18402926-18402946	12
G012101	AAGCUGGUCAUUAUCACGGC	Hs: chr11:18400859-18400879 Cyno: chr14:49280125-49280145	13
G012103	UACACUUUGGGGGAUCCAAA	chr11:18407244-18407264	14
G012104	AUUUGAUGUCUUUUAGGACU	chr11:18399414-18399434	15
G012105	CUCCAAGCUGGUCAUUAUCA	Hs: chr11:18400855-18400875 Cyno: chr14:49280129-49280149	16
G012106	GUCCAUAUUGGCAACUCUAA	chr11:18396835-18396855	17
G012107	GGCUACACAUCCUGGGCUAU	chr11:18405473-18405493	18
G009440	UACCUUCAUUAAGAUACUGA	chr11:18396951-18396971	19
G012108	AGCCCGAUUCCGUUACCUGAA	chr11:18402921-18402941	20
G012109	GCCUUUCCCCCAUUAGGUAA	chr11:18402933-18402953	21
G012110	UACGCUGGACCAAUUAAGA	Hs: chr11:18400909-18400929 Cyno: chr14:49280075-49280095	22
G012111	UAUUUCUUUUAGUGCCUGUA	chr11:18403681-18403701	23
G012112	AGCUGGUCAUUAUCACGGCU	Hs: chr11:18400860-18400880 Cyno: chr14:49280124-49280144	24
G012113	GCUGGUCAUUAUCACGGCUG	Hs: chr11:18400861-18400881 Cyno: chr14:49280123-49280143	25
G012114	GCUGGGGCACGUCAGCAAGA	chr11:18400877-18400897	26

G012115	CUUUAUCAGUCCCUAAAUCU	Hs: chr11:18403748-18403768 Cyno: chr14:49277593-49277613	27
G012116	GCCCGAUUCCGUUACCUGAAU	chr11:18402922-18402942	28
G012117	UUUCAUCUUCAGGGUCUUUA	chr11:18407104-18407124	29
G012118	ACAACUGUAAUCUUAUUCUG	Hs: chr11:18396899-18396919 Cyno: chr14:49282661-49282681	30
G012119	CAUUAAGAUACUGAUGGCAC	Hs: chr11:18396945-18396965 Cyno: chr17:59812521-59812541	31
G012120	UUUAGGGACUGAUAAAGAU	Hs: chr11:18403751-18403771 Cyno: chr14:49277590-49277610	32
G012121	CUGAUAAAGAUAAAGAACAG	Hs: chr11:18403759-18403779 Cyno: chr14:49277582-49277602	33
G012122	UUACCUGAAUGGGGGAAAGGC	chr11:18402933-18402953	34
G012123	UGGAGUGGAAUGAAUGUUGC	Hs: chr11:18403701-18403721 Cyno: chr14:49277640-49277660	35
G012124	UCUUUAUCAGUCCCUAAAUC	Hs: chr11:18403749-18403769 Cyno: chr14:49277592-49277612	36
G012125	UCCGUUACCUGAAUGGGGGAA	chr11:18402929-18402949	37
G012126	UAUCUGCACUCUUCUUCAAA	chr11:18407226-18407246	38
G012127	UACCUGAAUGGGGGAAAGGCU	chr11:18402934-18402954	39

G012128	AGCCGUGAUAAUGACCAGCU	Hs: chr11:18400860-18400880 Cyno: chr14:49280124-49280144	40
G012129	CCCCAUUAGGUAACGGAAU	chr11:18402927-18402947	41
G012130	UUUAAAAUUGCAGCUCCUUU	chr11:18407262-18407282	42
G012131	GCUGAUUUUAAAUCUUCUAA	chr11:18396862-18396882	43
G012132	ACAUUCAUUCCACUCCAUAAC	Hs: chr11:18403698-18403718 Cyno: chr14:49277643-49277663	44
G012133	CCUUAUAUCAUGGUGGAAACU	Hs: chr11:18405553-18405573 Cyno: chr12:38488548-38488568	45
G012134	ACCUUAAUCAUGGUGGAAAC	chr11:18405554-18405574	46
G012135	CCUUUGCCAGAGACAAUCUU	chr11:18399529-18399549	47
G012136	GAAGGUGACUCUGACUUCUG	chr11:18407193-18407213	48
G012137	UAUUGGAAGCGGUUGCAAUC	chr11:18402894-18402914	49
G012138	AAGUCAGAGUCACCUUCACA	chr11:18407190-18407210	50
G012139	GACUCUGACUUCUGAGGAAG	chr11:18407199-18407219	51
G012140	UGCAACCGCUUCCAAUAACA	chr11:18402891-18402911	52
G012141	UAUUUUCUCCUUUUUCAUAG	Hs: chr11:18402819-18402839 Cyno: chr14:49278530-49278550	53
G012142	UUUUUUUCAUUCUUCUUCA	chr11:18407095-18407115	54
G012143	ACCAAAGUAGUCACUGUUCA	Cyno: chr14:49274629-49274649	55
G012145	ACGCAGUAAAAGGCUCACC	chr14:49279975-49279995	56
G012146	UUGCUUAUUGUUUCAAAUCC	Cyno: chr14:49279996-49280016 Hs: chr11:18400988-18401008	57

G012147	UUCCCCCUAUAGAUUCCUUC	chr14:49282754-49282774	58
G012148	UCGAGCUUUGUGGCAGUUAG	chr14:49283162-49283182	59
G012149	UUGGGGUUAAUAAACCGCGA	Cyno: chr14:49283034-49283054 Hs: chr11:18396528-18396548	60
G012150	UGAAGGCCCAUACCUUAGCG	Cyno: chr14:49282959-49282979 Hs: chr11:18396603-18396623	61
G012151	CGGUUUAUUAACCCCAAGUG	Cyno: chr14:49283037-49283057 Hs: chr11:18396525-18396545	62
G012152	CCCAUACCUUAGCGUGGAAA	Cyno: chr14:49282965-49282985 Hs: chr11:18396597-18396617	63
G012153	GGCUUUUCUGCACGUACCUC	chr14:49283141-49283161	64
G012154	GAAAAGGAAUAUCGACGUUU	Cyno: chr14:49282981-49283001 Hs: chr11:18396581-18396601	65
G012155	ACCGCGAUGGGUGAGCCCUC	chr14:49283021-49283041	66
G012156	GCGGUUUAUUAACCCCAAGU	Cyno: chr14:49283036-49283056 Hs: chr11:18396526-18396546	67
G012157	ACCGCACGCUUCAGUGCCUU	chr14:49283186-49283206	68
G012158	GGAAAAGGAAUAUCGACGUU	Cyno: chr14:49282980-49283000 Hs: chr11:18396582-18396602	69
G012159	GUGUAAGUAUAGCCUCCUGA	Cyno: chr14:49283003-	70

		49283023 Hs: chr11:18396559-18396579	
G012160	GAUAAUCCUUUCCACGCUA	Cyno: chr14:49282974-49282994 Hs: chr11:18396588-18396608	71
G012161	GCGAUGGGUGAGCCCUCAGG	chr14:49283018-49283038	72
G012162	GGAAAGGCCAGCCCCACUUG	Cyno: chr14:49283051-49283071 Hs: chr11:18396511-18396531	73
G012163	CACCGCACGCUUCAGUGCCU	chr14:49283187-49283207	74
G012164	UGCCACAAAGCUCGAGCCCA	chr14:49283167-49283187	75
G012165	GGUGUAAGUAUAGCCUCCUG	Cyno: chr14:49283002-49283022 Hs: chr11:18396560-18396580	76
G012166	UCCUGAGGGCUCACCCAUCG	chr14:49283017-49283037	77
G012167	AGGAAAGGCCAGCCCCACUU	Cyno: chr14:49283052-49283072 Hs: chr11:18396510-18396530	78
G012168	UUAUUAACCCCAAGUGGGGC	Cyno: chr14:49283041-49283061 Hs: chr11:18396521-18396541	79
G012169	GAGGAAAGGCCAGCCCCACU	Cyno: chr14:49283053-49283073 Hs: chr11:18396509-18396529	80
G012170	GCUCAAAGUGAUCUUGUCUG	chr14:49283072-49283092	81
G012171	CCUGGCUGUGUCCUUGCUGU	Cyno: chr14:49283105-49283125	82

		Hs: chr11:18396457-18396477	
G012172	CGCGGUUUAUUAACCCCAAG	Cyno: chr14:49283035-49283055 Hs: chr11:18396527-18396547	83
G012173	UGGGGUUAAUAAACCGCGAU	Cyno: chr14:49283033-49283053 Hs: chr11:18396529-18396549	84
G015538	UUUCCCAAAAACCGUGUUAU	Cyno: chr14:49278472-49278492	100
G015539	GAAAGAGGUUCACAAGCAGG	Cyno: chr14:49277560-49277580	101
G015540	GUGGAAAGAGGUUCACAAGC	Cyno: chr14:49277563-49277583	102
G015541	GAGAUGAUGGAUCUCCAACA	Cyno: chr12:38487918-38487938 Hs: chr11:18399484-18399504	103
G015542	UAAGGAAAAGGCUGCCAUGU	Cyno: chr17:59812615-59812635	104
G015543	UGUAACUGCAAACUCCAAGC	Cyno: chr14:49280141-49280161	105
G015544	CUUCCAAUAACACGGUUUUU	Cyno: chr14:49278466-49278486	106
G015545	AAAACCGUGUUAUUGGAAG	Cyno: chr14:49278466-49278486	107
G015546	GUUCACCCAUAUAAGCUGUCA	Cyno: chr14:49278391-49278411	108
G015547	UUCACCCAUAUAAGCUGUCAU	Cyno: chr14:49278390-49278410 Hs: chr11:18402959-18402979	109



G015548	ACCCAUUAAGCUGUCAUGGG	Cyno: chr14:49278387-49278407	110
G015549	UGGAAUCUCCAUGUUCCTCA	Cyno: chr14:49278359-49278379	111
G015550	AGAGUAUAAUGAAGAAUCUU	Cyno: chr12:38488514-38488534	112
G015551	GCUGAUUCAUAAUCUUCUAA	Cyno: chr14:49282698-49282718	113
G015552	CAAUUGAAGGGAGAGAUGA	Cyno: chr12:38487905-38487925	114
G015553	UCUUUGGUGUUCUAAGGAAA	Cyno: chr12:38487947-38487967	115
G015554	CAAUAAGCAACUUGCAGUUC	Cyno: chr14:49280006-49280026	116
G015555	ACAAUAAGCAACUUGCAGUU	Cyno: chr14:49280005-49280025	117
G015556	GCUUAUUGUUUCAAUCCAG	Cyno: chr12:38488136-38488156	118
G015557	ACUUCCAAUAACACGGUUUU	Cyno: chr14:49278465-49278485	119
G015558	CCCAUUAAGCUGUCAUGGGU	Cyno: chr14:49278386-49278406	120
G015559	UCCACUCCAUAACAGGCACAC	Cyno: chr12:38488327-38488347	121
G015560	AAGACUCUGCACCCAGAUUU	Cyno: chr14:49277607-49277627	122
G015561	AGACUCUGCACCCAGAUUUA	Cyno: chr14:49277606-49277626 Hs: chr11:18403735-18403755	123
G015562	CCAGUUUCCACCAUGAUUAA	Cyno: chr12:38488546-38488566	124
G015563	ACCAUGAUUAAGGGUCUCUA	Cyno: chr12:38488555-38488575	125

G015564	AUAGAGACCCUAAAUCAUGG	Cyno: chr12:38488556-38488576	126
G015565	UCCAUAGAGACCCUAAAUCA	Cyno: chr12:38488559-38488579	127
G015566	UAAGGGUCUCUAUGGAAUAA	Cyno: chr12:38488563-38488583	128
G015567	AGAUAAAGGAACAGUGGAAAG	Cyno: chr14:49277575-49277595	129
G015568	CAGAAUAAGAUUACAGUUGU	Cyno: chr14:49282661-49282681	130
G015569	AGAAUAAGAUUACAGUUGUU	Cyno: chr14:49282660-49282680	131
G015570	AACAACUGUAAUCUUAUUCU	Cyno: chr14:49282660-49282680	132
G015571	GAAUAAGAUUACAGUUGUUG	Cyno: chr14:49282659-49282679 Hs: chr11:18396901-18396921	133
G015572	CAACAACUGUAAUCUUAUUC	Cyno: chr14:49282659-49282679	134
G015573	AAGAUUACAGUUGUUGGGGU	Cyno: chr14:49282655-49282675	135
G015574	GUUGUUGGGGUUGGUGCUGU	Cyno: chr14:49282646-49282666	136
G015575	UGCCAUCAGUAUCUAAAUGA	Cyno: chr17:59812522-59812542	137
G015576	GUCCUUCAUUAAGAUACUGA	Cyno: chr17:59812527-59812547	138
G015577	CAGUAUCUAAAUGAAGGACU	Cyno: chr17:59812528-59812548	139
G015578	UGUCAUCGAAGACAAAUUGA	Cyno: chr12:38487893-38487913	140
G015579	GUCAUCGAAGACAAAUUGAA	Cyno: chr12:38487894-38487914	141

G015580	AGACAAUCUUUGGUGUUCUA	Cyno: chr12:38487953-38487973	142
G015581	AGAACACCAAAGAUUGUCUC	Cyno: chr12:38487954-38487974	143
G015582	GGCUGGGGCACGUCAACAAG	Cyno: chr14:49280108-49280128	144
G015583	GCUGGGGCACGUCAACAAGA	Cyno: chr14:49280107-49280127	145
G015584	GGGAGAAAGCCGUCUAAAUU	Cyno: chr14:49280087-49280107	146
G015585	UAAAGAUGUUCACGUUACGC	Cyno: chr14:49280060-49280080	147
G015586	GGGCUGUAUUUUACAACAUU	Cyno: chr14:49280026-49280046	148
G015587	UACGUGGCUUGGAAGAUAAAG	Cyno: chr14:49278496-49278516 Hs: chr11:18402853-18402873	149
G015588	ACUUAUCUCCAAGCCACGU	Cyno: chr14:49278495-49278515	150
G015589	UGCAACCACUCCAUAACA	Cyno: chr14:49278458-49278478	151
G015590	AGCCAGAUUCCGUUACCUGA	Cyno: chr14:49278428-49278448	152
G015591	GCCAGAUUCCGUUACCUGAU	Cyno: chr14:49278427-49278447	153
G015592	CCAGAUUCCGUUACCUGAUG	Cyno: chr14:49278426-49278446	154
G015593	CCCAUCAGGUAACGGAAUC	Cyno: chr14:49278423-49278443	155
G015594	CCCACCAUGACAGCUAAAU	Cyno: chr14:49278383-49278403 Hs: chr11:18402966-18402986	156

G015595	ACCCACCCAUGACAGCUUAA	Cyno: chr14:49278382-49278402	157
G015596	AGCUGUCAUGGGUGGGUCCU	Cyno: chr14:49278379-49278399	158
G015597	GCUGUCAUGGGUGGGUCCUU	Cyno: chr14:49278378-49278398	159
G015598	CUGUCAUGGGUGGGUCCUUG	Cyno: chr14:49278377-49278397	160
G015599	GGGUGGGUCCUUGGGGAACA	Cyno: chr14:49278370-49278390	161
G015600	GAGAUUCCAGUGUGCCUGUA	Cyno: chr12:38488318-38488338	162
G015601	UCCAGUGUGCCUGUAUGGAG	Cyno: chr12:38488323-38488343	163
G015602	AUCUGGGUGCAGAGUCUUCA	Cyno: chr14:49277609-49277629	164
G015603	AAUCUGGGUGCAGAGUCUUC	Cyno: chr14:49277608-49277628	165
G015604	UAUGAGGUGAUCAAACUCAA	Cyno: chr12:38488447-38488467 Hs: chr11:18405452-18405472	166
G015605	UGGACUCUCUGUAGCAGAUU	Cyno: chr12:38488488-38488508	167
G015606	CCCAGUUUCCACCAUGAUUA	Cyno: chr12:38488545-38488565	168
G015607	UGGGGUUGGUGCUGUUGGCA	Cyno: chr12:38487815-38487835	169
G015608	GAACACCAAAGAUUGUCUCU	Cyno: chr17:59812635-59812655	170
G015609	CAGAUUCCGUUACCUGAUGG	Cyno: chr14:49278425-49278445	171
G015610	UUACCUGAUGGGGGAAAGAC	Cyno: chr14:49278416-49278436	172

G015611	GUCUUUCCCCCAUCAGGUA	Cyno: chr14:49278416-49278436	173
G015612	UACCUGAUGGGGGAAAGACU	Cyno: chr14:49278415-49278435	174
G015613	CUCCCAGUCUUUCCCCCAUC	Cyno: chr14:49278410-49278430	175
G015614	AACUCAAGGCUACACAUCC	Cyno: chr17:59813145-59813165	176
G015615	ACUCAAGGCUACACAUCCU	Cyno: chr17:59813146-59813166	177
G015616	GGCUACACAUCCUGGGCCA	Cyno: chr17:59813153-59813173	178
G015617	UACAGAGAGUCCAAUGGCC	Cyno: chr17:59813166-59813186	179
G015618	AUCUGCUACAGAGAGUCCAA	Cyno: chr17:59813172-59813192	180
G015619	CCCUAAUCAUGGUGGAAAC	Cyno: chr12:38488549-38488569	181
G015620	CCUUGCAUUUUGGGACAGAA	Cyno: chr17:59813291-59813311	182
G015621	CCAUUCUGUCCAAAUGCA	Cyno: chr17:59813294-59813314	183
G015622	AGUGGAUAUCUUGACCUACG	Cyno: chr14:49278512-49278532	184
G015623	AUAUCUUGACCUACGUGGCU	Cyno: chr14:49278507-49278527	185
G015624	UAUUGGAAGUGGUUGCAAUC	Cyno: chr14:49278455-49278475	186
G015625	UCUUUCCCAGAGACAAUCUU	Cyno: chr17:59812643-59812663	187
G015626	GGUGGUUGAGAGUGCUUAUG	Cyno: chr17:59813116-59813136	188
G015627	CCUCAGUGUCCUUGCAUUU	Cyno: chr17:59813281-59813301	189

G015628	CUCAGUGUCCUUGCAUUUU	Сyno: chr17:59813282-59813302	190
G015629	CCAAAUGCAAGGAACACUG	Сyno: chr17:59813284-59813304	191
G015630	ACGUAGGUCAAGAUUCCAC	Сyno: chr12:38488155-38488175	192

[67] Таблица 2: номенклатура и последовательность направленных на LDHA gPHK и sgPHK

Направляющая ID (sgPHK)	Направляющая ID (crPHK)	sgPHK последовательность - немодифицированная	SEQ ID NO	sgPHK последовательность - модифицированная	SEQ ID NO
G012 089	CR00 11780	ACAUAGACCUACC UAAUCAGUUUUA GAGCUAGAAAUAG CAAGUAAAAUAA GGCUAGUCCGUUA UCAACUUGAAAAA GUGGCACCGAGUC GGUGCUUUU	1001	mA*mC*mA*UAGACCUACCU UAAUCAGUUUAGAmGmCm UmAmGmAmAmUmAmGm CAAGUAAAAUAGGCUAG UCCGUUAUCAmAmCmUmUm GmAmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUm CmGmGmUmGmCmU*mU*mU *mU	2001
G012 093	CR00 11784	CCUAUCAUACAGU GCUUAUGGUUUUA GAGCUAGAAAUAG CAAGUAAAAUAA GGCUAGUCCGUUA UCAACUUGAAAAA GUGGCACCGAGUC GGUGCUUUU	1005	mC*mC*mU*AUCAUACAGUG CUUAUGGUUUUAGAmGmCm UmAmGmAmAmUmAmGm CAAGUAAAAUAGGCUAG UCCGUUAUCAmAmCmUmUm GmAmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUm CmGmGmUmGmCmU*mU*mU *mU	2005
G012	CR00	UAGACCUACCUAA	1007	mU*mA*mG*ACCUACCUUAA	2007

095	11786	AUCAUGGGUUUUA GAGCUAGAAAUAG CAAGUUAAAAUAA GGCUAGUCCGUUA UCAACUUGAAAAA GUGGCACCGAGUC GGUGCUUUU		UCAUGGGUUUAGAmGmCm UmAmGmAmAmAmUmAmGm CAAGUUAAAAUAAGGCUAG UCCGUUAUCAmAmCmUmUm GmAmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUm CmGmGmUmGmCmU*mU*mU *mU	
G012 096	CR00 11787	UACAGAGAGUCCA AUAGCCCGUUUUA GAGCUAGAAAUAG CAAGUUAAAAUAA GGCUAGUCCGUUA UCAACUUGAAAAA GUGGCACCGAGUC GGUGCUUUU	1008	mU*mA*mC*AGAGAGUCCAA UAGCCCGUUUAGAmGmCm UmAmGmAmAmAmUmAmGm CAAGUUAAAAUAAGGCUAG UCCGUUAUCAmAmCmUmUm GmAmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUm CmGmGmUmGmCmU*mU*mU *mU	2008
G012 103	CR00 11793	UACACUUUGGGGG AUCCAAAUUUUAG AGCUAGAAAUAGC AAGUUAAAAUAAG GCUAGUCCGUUAU CAACUUGAAAAAG UGGCACCGAGUCG GUGCUUUU	1014	mU*mA*mC*ACUUUGGGGGA UCCAAAGUUUAGAmGmCm UmAmGmAmAmAmUmAmGm CAAGUUAAAAUAAGGCUAG UCCGUUAUCAmAmCmUmUm GmAmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUm CmGmGmUmGmCmU*mU*mU *mU	2014
G012 111	CR00 11801	UAUUUCUUUUAGU GCCUGUAGUUUUA GAGCUAGAAAUAG CAAGUUAAAAUAA GGCUAGUCCGUUA UCAACUUGAAAAA GUGGCACCGAGUC GGUGCUUUU	1023	mU*mA*mU*UUCUUUUAGU GCCUGUAGUUUAGAmGmC mUmAmGmAmAmAmUmAmG mCAAGUUAAAAUAAGGCUA GUCCGUUAUCAmAmCmUmU mGmAmAmAmAmAmGmUmG mGmCmAmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCmU*mU*m U*mU	2023

G012 115	CR00 11805	CUUUAUCAGUCCC UAAAUCUUUUUAG AGCUAGAAAUAGC AAGUUAAAAUAAG GCUAGUCCGUUAU CAACUUGAAAAAG UGGCACCGAGUCG GUGCUUUU	1027	mC*mU*mU*UUUAUCAGUCC CUAAAUCUGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAmUmAm GmCAAGUUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmAmGmUm GmGmCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*mU* mU*mU	2027
G012 120	CR00 11810	UUUAGGGACUGAU AAAGAUUUUUUAG AGCUAGAAAUAGC AAGUUAAAAUAAG GCUAGUCCGUUAU CAACUUGAAAAAG UGGCACCGAGUCG GUGCUUUU	1032	mU*mU*mU*AGGGACUGAU AAAGAUAGUUUUAGAmGmC mUmAmGmAmAmUmAmG mCAAGUUAAAAUAAGGCUA GUCCGUUAUCAmAmCmUmU mGmAmAmAmAmAmGmUmG mGmCmAmCmCmGmAmGmU mCmGmGmUmGmCmU*mU*m U*mU	2032
G012 133	CR00 11823	CCUUAUCAUGGU GGAAACUUUUUAG AGCUAGAAAUAGC AAGUUAAAAUAAG GCUAGUCCGUUAU CAACUUGAAAAAG UGGCACCGAGUCG GUGCUUUU	1045	mC*mC*mU*UAAUCAUGGUG GAAACUGUUUUAGAmGmCm UmAmGmAmAmAmUmAmGm CAAGUUAAAAUAAGGCUAG UCCGUUAUCAmAmCmUmUm GmAmAmAmAmAmGmUmGm GmCmAmCmCmGmAmGmUm CmGmGmUmGmCmU*mU*mU *mU	2045
G012 136	CR00 11826	GAAGGUGACUCUG ACUUCUGGUUUUA GAGCUAGAAAUAG CAAGUUAAAAUAA GGCUAGUCCGUUA UCAACUUGAAAAA GUGGCACCGAGUC GGUGCUUUU	1048	mG*mA*mA*GGUGACUCUGA CUUCUGUUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmUmAmGmC AAGUUAAAAUAAGGCUAGU CCGUUAUCAmAmCmUmUmG mAmAmAmAmAmGmUmGmG mCmAmCmCmGmAmGmUmC mGmGmUmGmCmU*mU*mU*	2048



				mU	
G012 151	CR00 11840	CGGUUUAUUAACC CCAAGUGGUUUUA GAGCUAGAAAUAG CAAGUUAAAAUAA GGCUAGUCCGUUA UCAACUUGAAAAA GUGGCACCGAGUC GGUGCUUUU	1063	mC*mG*mG*UUUAUUAACCC CAAGUG GUUUUAGAmGmCmUmAmG mAmAmAmUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGmAm AmAmAmAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmU*mU*mU*mU	2063
G012 155	CR00 11844	ACCGCGAUGGGUG AGCCCUCGUUUUA GAGCUAGAAAUAG CAAGUUAAAAUAA GGCUAGUCCGUUA UCAACUUGAAAAA GUGGCACCGAGUC GGUGCUUUU	1067	mA*mC*mC*GCGAUGGGUGA GCCCUC GUUUUAGAmGmCmUmAmG mAmAmAmUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGmAm AmAmAmAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmU*mU*mU*mU	2067
G012 157	CR00 11846	ACCGCACGCUUCA GUGCCUUGUUUUA GAGCUAGAAAUAG CAAGUUAAAAUAA GGCUAGUCCGUUA UCAACUUGAAAAA GUGGCACCGAGUC GGUGCUUUU	1069	mA*mC*mC*GCACGCUUCAG UGCCUU GUUUUAGAmGmCmUmAmG mAmAmAmUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGmAm AmAmAmAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmU*mU*mU*mU	2069
G012 159	CR00 11848	GUGUAAGUAUAGC CUCCUGAGUUUUA GAGCUAGAAAUAG CAAGUUAAAAUAA GGCUAGUCCGUUA UCAACUUGAAAAA GUGGCACCGAGUC	1071	mG*mU*mG*UAAGUAUAGCC UCCUGA GUUUUAGAmGmCmUmAmG mAmAmAmUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGmAm AmAmAmAmGmUmGmGmCm	2071

		GGUGCUUUU		AmCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmU*mU*mU*mU	
G012 162	CR00 11851	GGAAAGGCCAGCC CCACUUGGUUUUA GAGCUAGAAAUAG CAAGUUAAAAUAA GGCUAGUCCGUUA UCAACUUGAAAAA GUGGCACCGAGUC GGUGCUUUU	1074	mG*mG*mA*AAGGCCAGCCC CACUUG GUUUUAGAmGmCmUmAmG mAmAmAmUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGmAm AmAmAmAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmU*mU*mU*mU	2074
G012 164	CR00 11853	UGCCACAAAGCUC GAGCCAGUUUUA GAGCUAGAAAUAG CAAGUUAAAAUAA GGCUAGUCCGUUA UCAACUUGAAAAA GUGGCACCGAGUC GGUGCUUUU	1076	mU*mG*mC*CACAAAGCUCG AGCCCA GUUUUAGAmGmCmUmAmG mAmAmAmUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGmAm AmAmAmAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmU*mU*mU*mU	2076
G012 165	CR00 11854	GGUGUAAGUAUAG CCUCCUGGUUUUA GAGCUAGAAAUAG CAAGUUAAAAUAA GGCUAGUCCGUUA UCAACUUGAAAAA GUGGCACCGAGUC GGUGCUUUU	1077	mG*mG*mU*GUAAGUAUAG CCUCCUG GUUUUAGAmGmCmUmAmG mAmAmAmUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGmAm AmAmAmAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmU*mU*mU*mU	2077
G012 166	CR00 11855	UCCUGAGGGCUCA CCCAUCGUUUUAG AGCUAGAAAUAGC AAGUUAAAAUAAG GCUAGUCCGUUAU CAACUUGAAAAAG	1078	mU*mC*mC*UGAGGGCUCAC CCAUCG GUUUUAGAmGmCmUmAmG mAmAmAmUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGmAm	2078

		UGGCACCGAGUCG GUGCUUUU		AmAmAmAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmU*mU*mU*mU	
G012 167	CR00 11856	AGGAAAGGCCAGC CCCACUUGUUUUA GAGCUAGAAAUAG CAAGUUAAAAUAA GGCUAGUCCGUUA UCAACUUGAAAAA GUGGCACCGAGUC GGUGCUUUU	1079	mA*mG*mG*AAAGGCCAGCC CCACUU GUUUUAGAmGmCmUmAmG mAmAmAmUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGmAm AmAmAmAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmU*mU*mU*mU	2079
G012 169	CR00 11858	GAGGAAAGGCCAG CCCCACUGUUUUA GAGCUAGAAAUAG CAAGUUAAAAUAA GGCUAGUCCGUUA UCAACUUGAAAAA GUGGCACCGAGUC GGUGCUUUU	1081	mG*mA*mG*GAAAGGCCAGC CCCACU GUUUUAGAmGmCmUmAmG mAmAmAmUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGmAm AmAmAmAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmU*mU*mU*mU	2081

Таблица 2А (консервативная часть *spyCas9* sgPHK; SEQ ID NO:400)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
G	U	U	U	U	A	G	A	G	C	U	A	G	A	A	A	U	A	G	C	A	A	G	U	U	A	A	A	A	U
LS1-LS6						B1-B2		US1-US12											B2-B6			LS7-LS12							

31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	
A	A	G	G	C	U	A	G	U	C	C	G	U	U	A	U	C	A	A	C	U	U	G	A	A	A	A	A	A	G	U
Нек Yus																	H1-1 по H1-12													

61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76
G	G	C	A	C	C	G	A	G	U	C	G	G	U	G	C
N	H2-1 по H2-15														

Таблица 2В

	LS1-6		B1-2		US1-12		B3-6	
5'-конец (n)	Нижний ствол	n	выпетливание	n	Верхний ствол	n	выпетливание	n

продолжение

LS7-12		N1-18		H1-1 до H1-12		H2-1 до H2-15		
Нижний ствол	n	нексус	n	шпилька 1	n	шпилька 2	n	3'-конец

[68] В некоторых вариантах воплощения данное изобретение обеспечивает композицию, содержащую одну или несколько направляющих РНК (gРНК), содержащих направляющие последовательности, которые направляют РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, который может быть нуклеазой (например, нуклеазой Cas, такой как Cas9), к последовательности-мишени ДНК в *LDHA*. gРНК может содержать сgРНК, содержащую направляющую последовательность, показанную в Таблице 1. gРНК может содержать сgРНК, содержащую 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов из направляющей последовательности, показанной в Таблице 1.

В некоторых вариантах воплощения изобретения gРНК содержит сgРНК, содержащую последовательность с приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов направляющей последовательности, показанной в Таблице 1.

В некоторых вариантах воплощения изобретения gРНК содержит сgРНК, содержащую последовательность с приблизительно 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью направляющей последовательности, показанной в Таблице 1. gРНК может дополнительно содержать tgРНК. В каждом варианте композиции и способа, которые описаны в данной заявке, сgРНК и tgРНК могут быть связаны как одна РНК (sgРНК) или могут находиться на отдельных РНК (dgРНК). В контексте sgРНК компоненты сgРНК и tgРНК могут быть связаны ковалентно, например, через фосфодисложноэфирную связь или другую ковалентную связь.

[69] В каждом из вариантов воплощения композиции, применения и способа, описанных в данной заявке, направляющая РНК может содержать две молекулы РНК в виде «двойной направляющей РНК» или «dgРНК». dgРНК включает первую молекулу РНК, содержащую сgРНК, содержащую, например, направляющую последовательность, показанную в Таблице 1, и вторую молекулу РНК, содержащую tgРНК. Первая и вторая

молекулы РНК могут не быть связаны ковалентно, но могут образовывать дуплекс РНК через спаривание оснований между частями crРНК и trРНК.

[70] В каждом из вариантов воплощения композиции, применения и способа, описанных в данной заявке, направляющая РНК может содержать одну молекулу РНК в виде «единственной направляющей РНК» или «sgРНК». sgРНК может содержать crРНК (или ее часть), содержащую направляющую последовательность, показанную в Таблице 1, ковалентно связанную с trРНК. sgРНК может содержать 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов из направляющей последовательности, показанной в Таблице 1.

В некоторых вариантах воплощения изобретения crРНК и trРНК ковалентно связаны через линкер. В некоторых вариантах воплощения изобретения sgРНК образует структуру стержень-петля посредством спаривания оснований между частями crРНК и trРНК. В некоторых вариантах воплощения изобретения crРНК и trРНК ковалентно связаны через одну или несколько связей, которые не являются фосфодиэфирной связью.

[71] В некоторых вариантах воплощения изобретения trРНК может включать всю или часть последовательности trРНК, полученной из естественной системы CRISPR/Cas. В некоторых вариантах воплощения изобретения trРНК содержит усеченную или модифицированную trРНК дикого типа. Длина trРНК зависит от используемой системы CRISPR/Cas. В некоторых вариантах воплощения изобретения trРНК содержит или состоит из 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 или более 100 нуклеотидов.

В некоторых вариантах воплощения изобретения trРНК может содержать определенные вторичные структуры, такие как, например, одна или несколько структур шпильки или стержень-петля или одна или несколько структур выпетливания.

[72] В некоторых вариантах воплощения данное изобретение обеспечивает композицию, содержащую одну или несколько направляющих РНК, содержащих направляющую последовательность любой из SEQ ID NOs: 1-84.

[73] В некоторых вариантах воплощения данное изобретение обеспечивает композицию, содержащую одну или несколько sgРНК, содержащих любую из SEQ ID NOs: 1001, 1005, 1007, 1008, 1014, 1023, 1027, 1032, 1045, 1048, 1063, 1067, 1069, 1071, 1074, 1076, 1077, 1078, 1079 и 1081 или их модифицированные версии, как показано, например, в SEQ ID NOs: 2001, 2005, 2007, 2008, 2014, 2023, 2027, 2032, 2045, 2048, 2063, 2067, 2069, 2071, 2074, 2076, 2077, 2078, 2079 и 2081.

[74] В одном аспекте данное изобретение обеспечивает композицию, содержащую gРНК, которая содержит направляющую последовательность, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или на 90% идентична любой из нуклеиновых кислот SEQ ID NOs: 1-84.

[75] В других вариантах воплощения изобретения композиция содержит по меньшей мере одну, например, по меньшей мере две gРНК, содержащие направляющие последовательности, выбранные из любых двух или более направляющих последовательностей SEQ ID NOs: 1-84.

В некоторых вариантах воплощения изобретения композиция содержит по меньшей мере две гРНК, каждая из которых содержит направляющую последовательность, идентичную по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% любой из нуклеиновых кислот SEQ ID NOs: 1-84.

[76] Композиции направляющих РНК в соответствии с данным изобретением предназначены для распознавания (например, гибридизации) последовательности-мишени в гене *LDHA*. Например, последовательность-мишень *LDHA* может распознаваться и расщепляться предоставленной Cas-клевазой, содержащей направляющую РНК. В некоторых вариантах воплощения изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, такой как Cas-клеваза, может быть направлен направляющей РНК к последовательности-мишени гена *LDHA*, где направляющая последовательность направляющей РНК гибридизируется с последовательностью-мишенью и РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, такой как Cas-клеваза, расщепляет последовательность-мишень.

[77] В некоторых вариантах воплощения изобретения выбор одной или нескольких направляющих РНК определяется на основе последовательностей-мишеней в гене *LDHA*.

[78] Без ограничения какой-либо конкретной теорией, мутации (например, мутации сдвига рамки считывания, возникающие в результате инсерционно-делеционных мутаций, возникающих в результате опосредованного нуклеазой DSB) в определенных областях гена могут быть менее переносимыми, чем мутации в других областях гена, таким образом, расположение DSB является важным фактором количества или типа нокдауна белка, который может произойти. В некоторых вариантах воплощения изобретения гРНК, комплементарная или имеющая комплементарность последовательности-мишени в *LDHA*, используется для направления РНК-направляемого ДНК-связывающего агента в конкретное место в гене *LDHA*. В некоторых вариантах воплощения изобретения гРНК разработаны таким образом, чтобы иметь направляющие последовательности, которые комплементарны или имеют комплементарность последовательностям-мишеням в экзоне 1, экзоне 2, экзоне 3, экзоне 4, экзоне 5, экзоне 6, экзоне 7 или экзоне 8 *LDHA*.

[79] В некоторых вариантах воплощения изобретения направляющая последовательность по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична последовательности-мишени, присутствующей в гене *LDHA* человека.

В некоторых вариантах воплощения изобретения последовательность-мишень может быть комплементарной направляющей последовательности направляющей РНК. В некоторых вариантах воплощения изобретения степень комплементарности или идентичности между направляющей последовательностью направляющей РНК и ее соответствующей последовательностью-мишенью может составлять не менее 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%.

В некоторых вариантах воплощения изобретения последовательность-мишень и направляющая последовательность гРНК могут быть на 100% комплементарными или идентичными.

В других вариантах воплощения изобретения последовательность-мишень и направляющая последовательность gРНК могут содержать по меньшей мере одно несовпадение. Например, последовательность-мишень и направляющая последовательность gРНК могут содержать 1, 2, 3 или 4 несовпадения, где общая длина направляющей последовательности составляет 20. В некоторых вариантах воплощения изобретения последовательность-мишень и направляющая последовательность gРНК могут содержать 1-4 несовпадения, где направляющая последовательность составляет 20 нуклеотидов.

[80] В некоторых вариантах воплощения изобретения композиция или состав, раскрытые в данной заявке, содержат иРНК, содержащую открытую рамку считывания (ORF), кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, такой как нуклеаза Cas, как описано в данной заявке. В некоторых вариантах воплощения изобретения предоставляется, используется или вводится иРНК, содержащая ORF, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, такой как нуклеаза Cas.

### **Б. Модифицированные gРНК и иРНК**

[81] В некоторых вариантах воплощения изобретения gРНК химически модифицирована. gРНК, содержащая один или несколько модифицированных нуклеозидов или нуклеотидов, называется «модифицированной» gРНК или «химически модифицированной» gРНК для описания присутствия одного или нескольких неприродных и/или встречающихся в природе компонентов или конфигураций, которые используются вместо или в дополнение к каноническим остаткам А, G, C и U.

В некоторых вариантах воплощения изобретения модифицированная gРНК синтезируется с неканоническим нуклеозидом или нуклеотидом, в данной заявке это называется «модифицированный». Модифицированные нуклеозиды и нуклеотиды могут включать одно или несколько из: (i) изменение, например, замена одного или обоих несвязывающихся атомов кислорода фосфата и/или одного или нескольких связывающих атомов кислорода фосфата в связи скелета сложного фосфодиэфира (иллюстративная модификация скелета); (ii) изменение, например, замена составляющей сахара рибозы, например, 2'-гидроксила в сахаре рибозы (иллюстративная модификация сахара); (iii) полная замена фосфатного фрагмента линкерами «дефосфо» (иллюстративная модификация скелета); (iv) модификация или замена встречающегося в природе азотистого основания, в том числе неканоническим азотистым основанием (иллюстративная модификация основания); (v) замена или модификация рибозо-фосфатного скелета (иллюстративная модификация скелета); (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 сахар и/или модификацию скелета); и (vii) модификация или замена сахара (пример модификация сахара).

[82] Химические модификации, такие как перечисленные выше, могут быть объединены для получения модифицированных gРНК и/или иРНК, содержащих



нуклеозиды и нуклеотиды (вместе «остатки»), которые могут иметь две, три, четыре или более модификаций. Например, модифицированный остаток может иметь модифицированный сахар и модифицированное азотистое основание. В некоторых вариантах воплощения изобретения каждое основание гРНК модифицировано, например, все основания имеют модифицированную фосфатную группу, такую как фосфотиоатная группа.

В некоторых вариантах воплощения изобретения все или практически все фосфатные группы молекулы гРНК замещены фосфотиоатными группами. В некоторых вариантах воплощения изобретения модифицированные гРНК содержат по меньшей мере один модифицированный остаток на 5'-конце РНК или рядом с ним. В некоторых вариантах воплощения изобретения модифицированные гРНК содержат по меньшей мере один модифицированный остаток на 3'-конце РНК или рядом с ним.

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

[84] Немодифицированные нуклеиновые кислоты могут быть подвержены распаду, например, внутриклеточными нуклеазами или нуклеазами, обнаруженными в сыворотке. Например, нуклеазы могут гидролизовать сложные фосфодиэфирные связи нуклеиновых кислот. Соответственно, на одном аспекте описанные в данной заявке гРНК могут содержать один или несколько модифицированных нуклеозидов или нуклеотидов, например, для придания стабильности по отношению к внутриклеточным нуклеазам или нуклеазам на основе сыворотки. В некоторых вариантах воплощения изобретения описанные в данной заявке модифицированные молекулы гРНК могут проявлять сниженный врожденный иммунный ответ при введении в популяцию клеток как *in vivo*, так и *ex vivo*. Термин «врожденный иммунный ответ» включает клеточный ответ на экзогенные нуклеиновые кислоты, включая одноцепочечные нуклеиновые кислоты, который включает индукцию экспрессии и высвобождения цитокинов, особенно интерферонов, и гибель клеток.

[85] В некоторых вариантах воплощения модификации скелета фосфатная группа модифицированного остатка может быть модифицирована путем замещения одного или нескольких атомов кислорода другим заместителем. Кроме того, модифицированный остаток, например модифицированный остаток, присутствующий в модифицированной нуклеиновой кислоте, может включать полную замену немодифицированного фосфатного фрагмента модифицированной фосфатной группой, как описано в данной заявке. В

некоторых вариантах воплощения изобретения скелетная модификация фосфатного скелета может включать изменения, которые приводят либо к незаряженному линкеру, либо к заряженному линкеру с несимметричным распределением заряда.

[86] Примеры модифицированных фосфатных групп включают фосфоротиоат, фосфороселенаты, боранофосфаты, сложные эфиры боранофосфатов, гидрофосфонаты, фосфороамиды, алкил- или арилфосфонаты и сложные фосфотриэфиры. Атом фосфора в немодифицированной фосфатной группе является ахиральным. Однако замещение одного из мостиковых атомов кислорода одним из вышних атомов или групп атомов может сделать атом фосфора хиральным. Стереогенный атом фосфора может иметь конфигурацию «R» (в данной заявке Rp) или конфигурацию «S» (в данной заявке Sp).

Скелет также можно модифицировать путем замены мостикового кислорода (то есть кислорода, который связывает фосфат с нуклеозидом) на азот (мостиковые фосфорамидаты), серу (мостиковые фосфотиоаты) и углерод (мостиковые метиленфосфонаты). Замещение может происходить либо у связывающего кислорода, либо у обоих связывающих атомов кислорода.

[87] Фосфатная группа может быть заменена не содержащими фосфор соединителями в некоторых модификациях скелета. В некоторых вариантах воплощения изобретения заряженная фосфатная группа может быть заменена нейтральным фрагментом. Примеры фрагментов, которые могут заменять фосфатную группу, могут включать, без ограничения, например, метилфосфонат, гидроксиламино, силоксан, карбонат, карбоксиметил, карбамат, амид, тиоэфир, линкер оксида этилена, сульфат, сульфонамид, тиоформацеталь, формацеталь, оксим, метиленимино, метиленметиличино, метиленгидразо, метилендиметилгидразо и метиленоксиметиличино.

Также могут быть сконструированы стержневые структуры, которые могут имитировать нуклеиновые кислоты, в которых фосфатный линкер и рибозный сахар заменены нуклеозидными или нуклеотидными суррогатами, устойчивыми к нуклеазам.

[88] Такие модификации могут включать модификации скелета и сахара. В некоторых вариантах воплощения изобретения азотистые основания могут быть связаны суррогатным скелетом. Примеры могут включать, без ограничения, суррогаты нуклеозидов морфолино, циклобутила, пирролидина и пептидной нуклеиновой кислоты (PNA).

[89] Модифицированные нуклеозиды и модифицированные нуклеотиды могут включать одну или несколько модификаций сахарной группы, то есть модификации сахара. Например, 2'-гидроксильная группа (OH) может быть модифицирована, например, замещена рядом различных «окси» или «дезокси» заместителей. В некоторых вариантах воплощения изобретения модификации 2'-гидроксильной группы могут повысить стабильность нуклеиновой кислоты, поскольку гидроксил больше не может быть депротонирован с образованием 2'-алкоксидного иона.

[90] Примеры модификаций 2'-гидроксильных групп могут включать алкокси или арилокси (OR, где «R» может означать, например, алкил, циклоалкил, арил, аралкил, гетероарил или сахар); полиэтиленгликоли (PEG),  $O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OR$ , где R может

представлять собой, например, H или необязательно замещенный алкил, 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 воплощения изобретения модификация 2'-гидроксильной группы может представлять собой 2'-O-Me. В некоторых вариантах воплощения изобретения модификация 2'-гидроксильной группы может быть 2'-фтор модификацией, которая замещает 2'-гидроксильную группу фторидом. В некоторых вариантах воплощения изобретения модификация 2'-гидроксильной группы может включать «запертые» нуклеиновые кислоты (LNA), в которых 2'-гидроксил может быть связан, например, с помощью C<sub>1-6</sub>-алкиленового или C<sub>1-6</sub>-гетероалкиленового мостика с 4'-атомом углерода того же сахара рибозы, где типичные мостики могут включать метиленовые, пропиленовые, простые эфирные или аминные мостики; O-амино (где амино может представлять собой, например, NH<sub>2</sub>; алкиламино, диалкиламино, гетероцикллил, ариламино, диариламино, гетероариламино или дигетероариламино, этилендиамин или полиамино) и аминококси, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-амино (где амино может быть, например, NH<sub>2</sub>; алкиламино, диалкиламино, гетероцикллил, ариламино, диариламино, гетероариламино или дигетероариламино, этилендиамин или полиамино). В некоторых вариантах воплощения изобретения модификация 2'-гидроксильной группы может включать «отпертые» нуклеиновые кислоты (UNA), в которых рибозное кольцо не имеет связи C2'-C3'. В некоторых вариантах воплощения изобретения модификация 2'-гидроксильной группы может включать метоксиэтильную группу (МОЕ), (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, например, производное PEG).

[91] «Дезокси» 2' модификации могут включать водород (т.е. сахара дезоксирибозы, например, в выступающих частях частично dsPHK); галоген (например, бром, хлор, фтор или йод); амино (где амино может быть, например, NH<sub>2</sub>; алкиламино, диалкиламино, гетероцикллил, ариламино, диариламино, гетероариламино, дигетероариламино или аминокислотой); NH(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH)<sub>n</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-амино (где амино может быть, например, таким, как описано в данной заявке), NHC(O)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 на, например, амино, как описано в данной заявке.

[92] Модификация сахара может включать группу сахара, которая также может содержать один или несколько атомов углерода, которые обладают 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 сахара с удаленными основаниями. Эти сахара с удаленными основаниями также могут быть дополнительно модифицированы по одному или нескольким составляющим атомам сахара. Модифицированные нуклеиновые кислоты могут также включать один или несколько сахаров в L-форме, например, L-нуклеозидов.

[93] Описанные в данной заявке 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 приведенным, 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 воплощения изобретения азотистое основание может включать, например, встречающиеся в природе и синтетические производные основания.

[94] В вариантах воплощения изобретения, использующих двойную направляющую РНК, каждая из crРНК и tracrРНК может содержать модификации. Такие модификации могут присутствовать на одном или обоих концах crРНК и/или tracrРНК. В вариантах воплощения изобретения, содержащих sgРНК, один или несколько остатков на одном или обоих концах sgРНК могут быть химически модифицированы, и/или внутренние нуклеозиды могут быть модифицированы, и/или вся sgРНК может быть химически модифицирована.

Некоторые варианты воплощения изобретения содержат модификацию 5'-конца.

Некоторые варианты воплощения изобретения содержат модификацию 3'-конца.

[95] В некоторых вариантах воплощения изобретения направляющие РНК, раскрытые в данной заявке, содержат один из паттернов модификации, раскрытых в заявке WO2018/107028 A1, поданной 8 декабря 2017 г., под названием «Химически модифицированные направляющие РНК», содержание которой полностью включено в данную заявку посредством ссылки. В некоторых вариантах воплощения изобретения направляющие РНК, раскрытые в данной заявке, содержат одну из структур/моделей модификации, раскрытых в US 20170114334, содержание которой полностью включено в данную заявку посредством ссылки. В некоторых вариантах воплощения изобретения направляющие РНК, раскрытые в данной заявке, содержат одну из структур/моделей модификации, раскрытых в WO2017/136794, содержание которой полностью включено в данную заявку посредством ссылки.

### **В. YA модификации**

[96] Модификация на сайте YA (также называемая в данной заявке «модификацией YA») может быть модификацией межнуклеозидной связи, модификацией основания (пиримидина или аденина), например путем химической модификации, замещения или иным образом, и/или модификации сахара (например, в положении 2', таком как 2'-O-алкил, 2'-F, 2'-ное, 2'-F арабиноза, 2'-H (дезоксирибоза) и т.п.). В некоторых вариантах воплощения изобретения «модификация YA» представляет собой любую модификацию, которая изменяет структуру динуклеотидного мотива для снижения активности эндонуклеаз РНК,

например, препятствуя распознаванию или расщеплению сайта УА РНазой и/или путем стабилизации структуры РНК (например, вторичная структура), что снижает доступность сайта расщепления для РНазы. См. Peacock et al., *J Org Chem.* 76: 7295-7300 (2011); Behlke, *Oligonucleotides* 18:305-320 (2008); Ku et al., *Adv. Drug Delivery Reviews* 104: 16-28 (2016); Ghidini et al., *Chem. Commun.*, 2013, 49, 9036. Peacock et al., Behlke, Ku, и Ghidini предоставляют иллюстративные модификации, подходящие в качестве модификаций УА. Охватываются модификации, известные специалистам в данной области, для уменьшения эндонуклеолитического распада. Иллюстративные модификации 2'-рибозы, которые влияют на 2'-гидроксильную группу, участвующую в расщеплении РНКазой, представляют собой 2'-Н и 2'-О-алкил, включая 2'-О-Ме. Модификации, такие как бициклические аналоги рибозы, UNA и модифицированные межнуклеозидные связи остатков на сайте УА, могут быть модификациями УА. Типичными модификациями оснований, которые могут стабилизировать структуры РНК, являются псевдоуридин и 5-метилцитозин. В некоторых вариантах воплощения изобретения по меньшей мере один нуклеотид сайта УА модифицирован. В некоторых вариантах воплощения изобретения пиримидин (также называемый «пиримидиновым положением») сайта УА включает модификацию (которая включает модификацию, изменяющую межнуклеозидную связь непосредственно на 3' сахара пиримидина, модификацию пиримидинового основания и модификацию рибозы, например, в положении 2').

В некоторых вариантах воплощения изобретения аденин (также называемый «положением аденина») сайта УА включает модификацию (которая включает модификацию, изменяющую межнуклеозидную связь непосредственно на 3' сахара пиримидина, модификацию пиримидинового основания и модификацию рибозы, например, в ее 2' положении). В некоторых вариантах воплощения изобретения пиримидин и аденин сайта УА содержат модификации. В некоторых вариантах воплощения изобретения модификация УА снижает активность эндонуклеаз РНК.

[97] В некоторых вариантах воплощения изобретения sgРНК содержит модификации 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 или больше сайтов УА. В некоторых вариантах воплощения изобретения пиримидин сайта УА содержит модификацию (которая включает модификацию, изменяющую межнуклеозидную связь непосредственно на 3' сахара пиримидина).

В некоторых вариантах воплощения изобретения аденин сайта УА содержит модификацию (которая включает модификацию, изменяющую межнуклеозидную связь непосредственно на 3' сахара аденина). В некоторых вариантах воплощения изобретения пиримидин и аденин сайта УА содержат модификации, такие как модификации сахара, основания или межнуклеозидной связи. Модификации УА могут быть любыми из типов модификаций, изложенных в данной заявке. В некоторых вариантах воплощения изобретения модификации УА содержат один или несколько из фосфоротиоата, 2'-ОМе или 2'-фторо. В некоторых вариантах воплощения изобретения УА модификации включают модификации пиримидина, содержащие один или несколько из фосфоротиоата,

2'-ОМе или 2'-фторо.

В некоторых вариантах воплощения изобретения модификация YA включает бициклический аналог рибозы (например, LNA, BNA или ENA) в дуплексной области РНК, которая содержит один или несколько сайтов YA. В некоторых вариантах воплощения изобретения модификация YA включает бициклический аналог рибозы (например, LNA, BNA или ENA) в дуплексной области РНК, которая содержит сайт YA, причем модификация YA расположена дистально в отношении сайта YA.

[98] В некоторых вариантах воплощения изобретения sgРНК содержит модификацию сайта YA направляющей области. В некоторых вариантах воплощения изобретения направляющая область содержит 1, 2, 3, 4, 5 или более сайтов YA («сайты YA направляющей области»), которые могут содержать модификации YA. В некоторых вариантах воплощения изобретения один или несколько сайтов YA, расположенных на 5-конце, 6-конце, 7-конце, 8-конце, 9-конце или 10-конце 5'-конца 5'-сайта терминации транскрипции (где «5-конец» и т.д., относится к положению 5 на 3'-конце направляющей области, т.е. в главной степени 3'-нуклеотиду в направляющей области) содержат модификации YA. В некоторых вариантах воплощения изобретения два или более сайта YA, расположенных на 5-конце, 6-конце, 7-конце, 8-конце, 9-конце или 10-конце 5'-конца 5' сайта терминации транскрипции, содержат модификации YA. В некоторых вариантах воплощения изобретения три или более сайта YA, расположенных на 5-конце, 6-конце, 7-конце, 8-конце, 9-конце или 10-конце 5'-конца 5' сайта терминации транскрипции, содержат модификации YA. В некоторых вариантах воплощения изобретения четыре или более сайта YA, расположенных на 5-конце, 6-конце, 7-конце, 8-конце, 9-конце или 10-конце 5'-конца 5' сайта терминации транскрипции, содержат модификации YA. В некоторых вариантах воплощения изобретения пять или более сайтов YA, расположенных на 5-конце, 6-конце, 7-конце, 8-конце, 9-конце или 10-конце 5'-конца 5' сайта терминации транскрипции, содержат модификации YA. Модифицированный YA сайт направляющей области содержит модификацию YA.

[99] В некоторых вариантах воплощения изобретения сайт YA модифицированной направляющей области находится в пределах 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10 или 9 нуклеотидов от 3'-концевого нуклеотида направляющей области. Например, если сайт YA модифицированной направляющей области находится в пределах 10 нуклеотидов от 3'-концевого нуклеотида направляющей области, а длина направляющей области составляет 20 нуклеотидов, то модифицированный нуклеотид сайта YA модифицированной направляющей области расположен в любом из положений 11-20.

В некоторых вариантах воплощения изобретения модификация YA расположена на сайте YA на 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 нуклеотиде от 3'-концевого нуклеотида направляющей области. В некоторых вариантах воплощения изобретения модификация YA расположена на 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 нуклеотиде от 3'-концевого нуклеотида направляющей области.

[100] В некоторых вариантах воплощения изобретения модифицированный сайт YA

направляющей области находится на или после нуклеотида 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или 11 от 5'-конца 5' сайта терминации транскрипции.

[101] В некоторых вариантах воплощения изобретения модифицированный сайт YA направляющей области отличается от модификации 5'-конца. Например, sgРНК может содержать 5'-концевую модификацию, как описано в данной заявке, и дополнительно содержать сайт YA модифицированной направляющей области. Альтернативно, sgРНК может содержать немодифицированный 5'-конец и модифицированный сайт YA направляющей области. Альтернативно sgРНК может содержать модифицированный 5'-конец и немодифицированный сайт YA направляющей области.

[102] В некоторых вариантах воплощения изобретения модифицированный сайт YA направляющей области содержит модификацию, которую не содержит по меньшей мере один нуклеотид, расположенный в 5' от сайта YA направляющей области. Например, если нуклеотиды 1-3 содержат фосфоротиоаты, нуклеотид 4 содержит только 2'-ОМе модификацию, а нуклеотид 5 представляет собой пиримидин сайта YA и содержит фосфоротиоат, то модифицированный сайт YA направляющей области содержит модификацию (фосфоротиоат), которую не содержит по меньшей мере один нуклеотид, расположенный в 5' от участка YA направляющей области (нуклеотид 4).

В другом примере, если нуклеотиды 1-3 содержат фосфоротиоаты, а нуклеотид 4 представляет собой пиримидин сайта YA и включает 2'-ОМе, то модифицированный сайт YA направляющей области содержит модификацию (2'-ОМе), которую не включает по меньшей мере один нуклеотид, расположенный в 5' от направляющей области сайта YA (любой из нуклеотидов 1-3). Это условие также всегда выполняется, если немодифицированный нуклеотид расположен на 5' от сайта YA модифицированной направляющей области.

[103] В некоторых вариантах воплощения изобретения модифицированные сайты YA направляющей области содержат модификации, как описано для сайтов YA выше.

[104] Дополнительные варианты воплощения изобретения модификаций сайта YA направляющей области изложены выше в кратком описании изобретения. Любые варианты воплощения изобретения, изложенные в другом месте в этом раскрытии, могут быть объединены, насколько это возможно, с любым из вышних вариантов воплощения изобретения.

[105] В некоторых вариантах воплощения изобретения sgРНК содержит модификацию сайта YA консервативной области. Сайты 1-10 консервативной области YA показаны на Фиг. 10. В некоторых вариантах воплощения изобретения 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 сайтов YA консервативной области содержат модификации. В некоторых вариантах воплощения изобретения сайты 1, 8 или консервативной области 1 и 8 YA содержат модификации YA.

[106] В некоторых вариантах воплощения изобретения сайты 1, 2, 3, 4 и 10 консервативной области YA содержат модификации YA. В некоторых вариантах воплощения изобретения сайты 2, 3, 4, 8 и 10 YA содержат модификации YA. В некоторых

вариантах воплощения изобретения сайты 1, 2, 3 и 10 консервативной области YA содержат модификации YA. В некоторых вариантах воплощения изобретения сайты 2, 3, 8 и 10 YA содержат модификации YA.

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

[107] В некоторых вариантах воплощения изобретения 1, 2, 3 или 4 сайта YA консервативной области 2, 3, 4 и 10 содержат модификации YA. В некоторых вариантах воплощения изобретения 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 сайтов YA дополнительной консервативной области содержат модификации YA.

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

[109] Дополнительные варианты воплощения изобретения модификаций сайта YA консервативной области изложены в кратком описании изобретения выше.

Любые варианты воплощения изобретения, изложенные в другом месте в этом раскрытии, могут быть объединены, насколько это возможно, с любым из вышних вариантов воплощения изобретения.

[110] В некоторых вариантах воплощения изобретения sgPHK содержит любой из паттернов модификации, показанных выше в Таблице 2 или ниже в Таблице 3, где N, если присутствует, представляет собой любой природный или неприродный нуклеотид, и где совокупность N включает направляющую последовательность LDHA, как описано в данной заявке в Таблице 1.

В Таблице 3 не изображена часть направляющей последовательности sgPHK. Модификации остаются такими, как показано в Таблице 3, несмотря на замену N на нуклеотиды направляющей. То есть, хотя нуклеотиды направляющей заменяют «N», нуклеотиды модифицированы, как показано в Таблице 3. Если направляющая последовательность добавляется к 5'-концу, 5'-конец (или 5' сайт терминации транскрипции) направляющей последовательности может быть модифицирован.

В некоторых вариантах воплощения изобретения модификации содержат 2'-O-Me и/или PS-связи. В некоторых вариантах воплощения изобретения 2'-O-Me и/или PS-связи находятся на первых от 1 до 7, от 1 до 6, от 1 до 5, от 1 до 4 или от 1 до 3 нуклеотидах направляющей последовательности на ее 5'-конце.

[111] Таблица 3: паттерны модификации sgPHK LDHA. Направляющая последовательность не показана и будет добавлена к показанной последовательности на ее 5'-конце.

SEQ ID NO	Название	Последовательность
400	G000262- мод только	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAACUUGAAAAGUmGmGmCmAmCmCmGmAmGm



		UmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
401	G000263- МОД ТОЛЬКО	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
402	G000264- МОД ТОЛЬКО	GUUUUAGAGCUAmGmAmAmAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC mU*mU*mU*U
403	G000265- МОД ТОЛЬКО	GUUUUAGAmGmCmUmAGAAmUmAmGmCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUC GGUGCmU*mU*mU*U
404	G000266- МОД ТОЛЬКО	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCG AGUCGGUGCmU*mU*mU*U
405	G000267- МОД ТОЛЬКО	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCm U*mU*mU*mU
406	G000331- МОД ТОЛЬКО	mGUUUUmAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAm AmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUm GmCmU*mU*mU*mU
407	G000332- МОД ТОЛЬКО	fGfUfUfUfUfAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAm AmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUm GmCmU*mU*mU*mU
408	G000333- МОД ТОЛЬКО	mGfUfUfUfUmAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAA GUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAm AmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGm UmGmCmU*mU*mU*mU
409	G000334- МОД ТОЛЬКО	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUmU mAAAmAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAm AmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGm UmGmCmU*mU*mU*mU
410	G000335-	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUmU

	МОД ТОЛЬКО	mAfAfAmAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmA mAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmG mUmGmCmU*mU*mU*mU
411	G000336- МОД ТОЛЬКО	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUfUm AfAmAfAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAm AmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGm UmGmCmU*mU*mU*mU
412	G000337- МОД ТОЛЬКО	mGUUUUmAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGU mUmAAAmAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmU*mU*mU*mU
413	G000338- МОД ТОЛЬКО	mGUUUUmAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGU mUmAfAfAmAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmG mAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU
414	G000339- МОД ТОЛЬКО	mGUUUUmAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUf UmAfAmAfAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmU*mU*mU*mU
415	G000340- МОД ТОЛЬКО	fGfUfUfUfUfAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGU mUmAAAmAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmU*mU*mU*mU
416	G000341- МОД ТОЛЬКО	fGfUfUfUfUfAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGU mUmAfAfAmAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmG mAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU
417	G000342- МОД ТОЛЬКО	fGfUfUfUfUfAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGU fUmAfAmAfAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmG mAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU
418	G000343- МОД ТОЛЬКО	GUUUUAmGmAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGU UAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAm AmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUm

		GmCmU*mU*mU*mU
419	G000344- МОД ТОЛЬКО	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCmAmAmG mUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAm AmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGm UmGmCmU*mU*mU*mU
420	G000345- МОД ТОЛЬКО	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUfAfUfCfAmAmCmUmUmGmAmAm AmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUm GmCmU*mU*mU*mU
421	G000346- МОД ТОЛЬКО	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAmUmCmAmAmCmUmUmGmAmA mAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmU mGmCmU*mU*mU*mU
422	G000347- МОД ТОЛЬКО	fGfUfUfUfUfAmGmAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCm AmAmGmUmUmAfAfAmAmUAAGGCUAGUCCGUUAmUmCmA mAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
423	G000348- МОД ТОЛЬКО	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAm AmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGm CmUmUmUmU
424	G000349- МОД ТОЛЬКО	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAm AmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGm CmUmU*mU*mU
425	G000350- МОД ТОЛЬКО	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAm AmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGfUfCfGfGfUfGfCfU*fU *fU*mU
426	G000351- МОД ТОЛЬКО	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAfAmCfUmUfGmAfAmAfAmA fGmUfGmGfCmAfCmCfGmAfGmUfCmGfGmUfGmCfU*mU*fU*m U
427	G000352-	mGUUUUmAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGU

	МОД ТОЛЬКО	UAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAm AmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUm GmCmU*mU*mU*mU
428	G000353- МОД ТОЛЬКО	fGfUfUfUfUfAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGU UAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAm AmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUm GmCmU*mU*mU*mU
429	G000354- МОД ТОЛЬКО	mGfUfUfUfUmAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAA GUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAm AmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGm UmGmCmU*mU*mU*mU
430	G000355- МОД ТОЛЬКО	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUmU mAAAmAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAm AmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGm UmGmCmU*mU*mU*mU
431	G000356- МОД ТОЛЬКО	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUmU mAfAfAmAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmA mAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmG mUmGmCmU*mU*mU*mU
432	G000357- МОД ТОЛЬКО	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUfUm AfAmAfAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAm AmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGm UmGmCmU*mU*mU*mU
433	G000358- МОД ТОЛЬКО	mGUUUUmAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGU mUmAAAmAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmU*mU*mU*mU
434	G000359- МОД ТОЛЬКО	mGUUUUmAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGU mUmAfAfAmAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmG mAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU
435	G000360- МОД ТОЛЬКО	mGUUUUmAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUf UmAfAmAfAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGm

		GmUmGmCmU*mU*mU*mU
436	G000361- МОД ТОЛЬКО	fGfUfUfUfUfAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGU mUmAAAmAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmU*mU*mU*mU
437	G000362- МОД ТОЛЬКО	fGfUfUfUfUfAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGU mUmAfAfAmAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmG mAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU
438	G000363- МОД ТОЛЬКО	fGfUfUfUfUfAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGU fUmAfAmAfAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmG mAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmU*mU*mU*mU
439	G000364- МОД ТОЛЬКО	GUUUUAmGmAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGU UAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAm AmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUm GmCmU*mU*mU*mU
440	G000365- МОД ТОЛЬКО	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCmAmAmG mUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAm AmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGm UmGmCmU*mU*mU*mU
441	G000366- МОД ТОЛЬКО	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUfAfUfCfAmAmCmUmUmGmAmAm AmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUm GmCmU*mU*mU*mU
442	G000367- МОД ТОЛЬКО	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAmUmCmAmAmCmUmUmGmAmA mAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmU mGmCmU*mU*mU*mU
443	G000368- МОД ТОЛЬКО	fGfUfUfUfUfAmGmAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCm AmAmGmUmUmAfAfAmAmUAAGGCUAGUCCGUUAmUmCmA mAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
444	G000369-	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUA

	мод только	AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmUmUmUmU
445	G000370- мод только	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmUmU*mU*mU
446	G000371- мод только	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGfUfCfGfGfUfGfCfU*fU*fU*mU
447	G000372- мод только	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAfAmCfUmUfGmAfAmAfAmAfGmUfGmGfCmAfCmCfGmAfGmUfCmGfGmUfGmCfU*mU*fU*mU
448	Иллюстративная - направляющая область мод только	mN*mN*mN*mNNN*N*fN*fN*fN*fNNfNfNNNfNfNNN
449	Иллюстративная - направляющая область мод только	mN*mN*mN*mNNN*N*fN*fN*fN*fNNfNfNNN*fNfNNN
450	Иллюстративная - мод только	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGGCACCGAGUCGG*mU*mG*mC

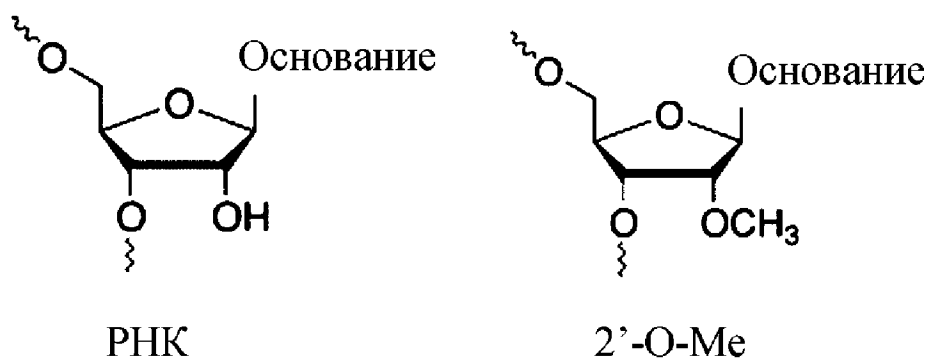
[112] В некоторых вариантах воплощения изобретения модифицированная sgPHK содержит следующую последовательность: mN\*mN\*mN\*mNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU\*mU\*mU\*mU (SEQ ID NO: 300), где «N» может быть любым природным или неприродным нуклеотидом и при этом совокупность N содержит направляющую последовательность LDHA, как описано в Таблице 1. Например, сюда входит SEQ ID NO: 300, где N заменены любой из

направляющих последовательностей, раскрытых в данной заявке в Таблице 1 (SEQ ID NOs: 1-84).

[113] Любая из описанных ниже модификаций может присутствовать в gРНК и иРНК, которые описаны в данной заявке.

[114] Термины «mA», «mC», «mU» или «mG» могут использоваться для обозначения нуклеотида, который был модифицирован 2'-O-Me.

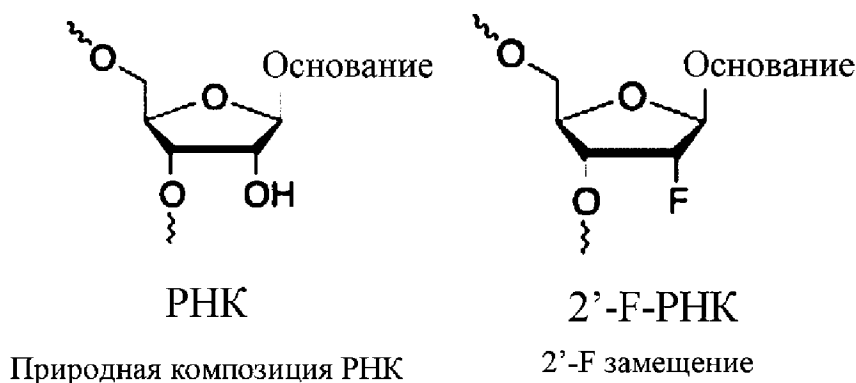
[115] Модификацию 2'-O-метила можно изобразить следующим образом:



[116] Другая химическая модификация, которая, как было показано, влияет на кольца нуклеотидных сахаров является замещением галогена. Например, замещение 2'-фтор (2'-F) в кольцах нуклеотидных сахаров может повысить аффинность связывания олигонуклеотидов и стабильность нуклеаз.

[117] В данной заявке термины «fA», «fC», «fU» или «fG» могут использоваться для обозначения нуклеотида, который был замещен на 2'-F.

[118] Замещение 2'-F может быть изображена следующим образом:

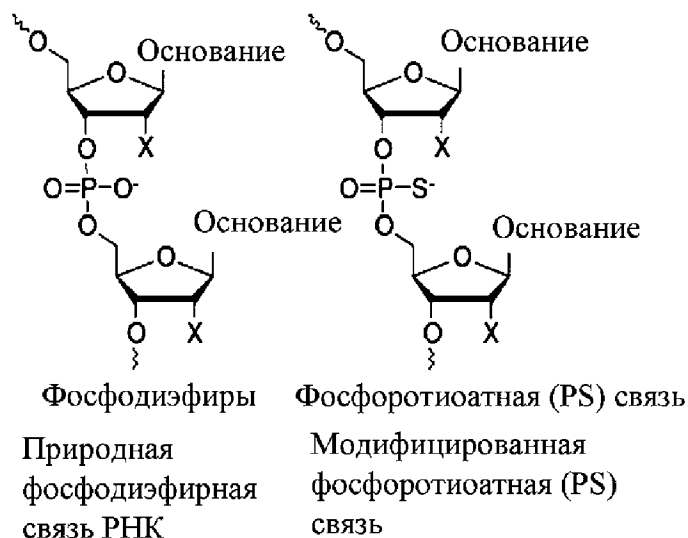


[119] Фосфоротиоатная (PS) связь относится к связи, в которой сера замещена одним немостиковым фосфатным кислородом в сложной фосфодиэфирной связи, например, в связях между нуклеотидными основаниями. Когда фосфоротиоаты используются для создания олигонуклеотидов, модифицированные олигонуклеотиды также могут иметь название S-олиго.

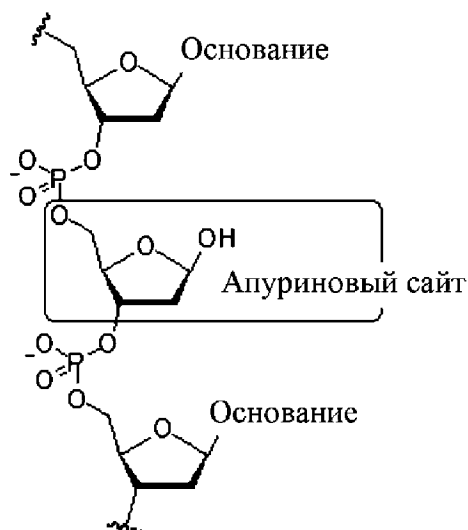
[120] «\*» Может использоваться для обозначения модификации PS. В этой заявке термины A\*, C\*, U\* или G\* могут использоваться для обозначения нуклеотида, который связан со следующим (например, 3') нуклеотидом с помощью связи PS.

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

[122] На диаграмме ниже показано замещение S- на немостиновый фосфатный кислород с образованием связи PS вместо сложной фосфодиэфирной связи:



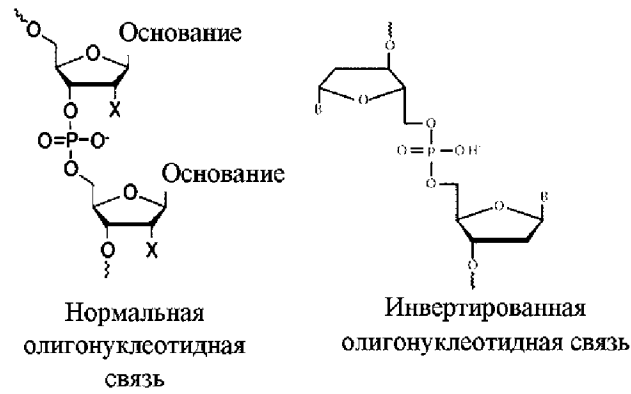
[123] Нуклеотиды с удаленным азотистым основанием относятся к нуклеотидам, в которых отсутствуют азотистые основания. На Фигуре ниже изображен олигонуклеотид с участком с удаленными азотистыми основаниями (также известным как апуриновым), в котором отсутствует основание:



[124] Инвертированные основания относятся к тем, у которых связи инвертированы от нормальной 5' до 3' связи (то есть связи либо от 5' до 5', либо связи от 3' до 3').

Например:





[125] Нуклеотид с удаленным азотистым основанием может быть присоединен с помощью инвертированной связи. Например, нуклеотид с удаленным азотистым основанием может быть присоединен к концевому 5' нуклеотиду посредством связи от 5' до 5' или нуклеотид с удаленным азотистым основанием может быть присоединен к концевому 3' нуклеотиду через 3' до 3' связи. Инвертированный нуклеотид с удаленным азотистым основанием на концевом 5' или 3' нуклеотиде также можно назвать инвертированным концевым колпачком с удаленным азотистым основанием.

[126] В некоторых вариантах воплощения изобретения модифицированными являются один или несколько из первых трех, четырех или пяти нуклеотидов на 5'-сайте терминации транскрипции и один или несколько из последних трех, четырех или пяти нуклеотидов на 3'-сайте терминации транскрипции. В некоторых вариантах воплощения изобретения модификация представляет собой 2'-O-Me, 2'-F, инвертированный нуклеотид с удаленным азотистым основанием, связь PS или другую модификацию нуклеотидов, хорошо известную в данной области для повышения стабильности и/или производительности.

[127] В некоторых вариантах воплощения изобретения первые четыре нуклеотида на 5'-сайте терминации транскрипции и последние четыре нуклеотида на 3'-сайте терминации транскрипции связаны фосфориоатными (PS) связями.

[128] В некоторых вариантах воплощения изобретения первые три нуклеотида на 5'-сайте терминации транскрипции и последние три нуклеотида на 3'-сайте терминации транскрипции содержат 2'-O-метил (2'-O-Me) модифицированный нуклеотид. В некоторых вариантах воплощения изобретения первые три нуклеотида на 5'-сайте терминации транскрипции и последние три нуклеотида на 3'-сайте терминации транскрипции содержат 2'-фтор (2'-F) модифицированный нуклеотид. В некоторых вариантах воплощения изобретения первые три нуклеотида на 5'-сайте терминации транскрипции и последние три нуклеотида на 3'-сайте терминации транскрипции содержат инвертированный нуклеотид с удаленным азотистым основанием.

[129] В некоторых вариантах воплощения изобретения направляющая РНК содержит модифицированную sgРНК. В некоторых вариантах воплощения изобретения sgРНК содержит образец модификации, показанный в SEQ ID NO: 201, 202 или 203, где N представляет собой любой природный или неприродный нуклеотид, и где совокупность N

составляет направляющую последовательность, которая направляет нуклеазу на последовательность-мишень в *LDHA*, например, как показано в Таблице 1.

[130] В некоторых вариантах воплощения изобретения направляющая РНК содержит sgРНК, показанную в любой из SEQ ID NOs: 1001, 1005, 1007, 1008, 1014, 1023, 1027, 1032, 1045, 1048, 1063, 1067, 1069, 1071, 1074, 1076, , 1077, 1078, 1079 и 1081 или их модифицированные версии, как показано, например, в SEQ ID NOs: 2001, 2005, 2007, 2008, 2014, 2023, 2027, 2032, 2045, 2048, 2063, 2067, 2069, 2071, 2074, 2076, 2077, 2078, 2079 и 2081. В некоторых вариантах воплощения изобретения направляющая РНК содержит sgРНК, содержащую любую из направляющих последовательностей SEQ ID №: 1-84 и 100-192 и нуклеотидов SEQ ID №: 201, 202 или 203, где нуклеотиды SEQ ID № 201, 202 или 203 находятся на 3'-конце направляющей последовательности, и при этом sgРНК может быть модифицирована, как показано в Таблице 3 или SEQ ID NO: 300.

[131] Как отмечено выше, в некоторых вариантах воплощения изобретения композиция или состав, раскрытые в данной заявке, содержат иРНК, содержащую открытую рамку считывания (ORF), кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, такой как нуклеаза Cas, как описано в данной заявке. В некоторых вариантах воплощения изобретения иРНК, содержащая ORF, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, такой как нуклеаза Cas, предоставляется, используется или вводится. В некоторых вариантах воплощения изобретения ORF, кодирующая РНК-направляемую ДНК-нуклеазу, представляет собой «ORF модифицированный РНК-направляемый ДНК-связывающий агент» или просто «модифицированную ORF», что используется как сокращение для обозначения того, что ORF модифицирована.

[132] В некоторых вариантах воплощения изобретения модифицированная ORF может содержать модифицированный уридин по меньшей мере на одном, нескольких или всех положениях уридина. В некоторых вариантах воплощения изобретения модифицированный уридин представляет собой уридин, модифицированный в положении 5, например, галогеном, метилом или этилом. В некоторых вариантах воплощения изобретения модифицированный уридин представляет собой псевдоуридин, модифицированный в положении 1, например, галогеном, метилом или этилом. Модифицированный уридин может представлять собой, например, псевдоуридин, N1-метил-псевдоуридин, 5-метоксиуридин, 5-йодуридин или их комбинацию. В некоторых вариантах воплощения изобретения модифицированный уридин представляет собой 5-метоксиуридин. В некоторых вариантах воплощения изобретения модифицированный уридин представляет собой 5-йодуридин. В некоторых вариантах воплощения изобретения модифицированный уридин представляет собой псевдоуридин. В некоторых вариантах воплощения изобретения модифицированный уридин представляет собой N1-метил-псевдоуридин. В некоторых вариантах воплощения изобретения модифицированный уридин представляет собой комбинацию псевдоуридина и N1-метил-псевдоуридина. В некоторых вариантах воплощения изобретения модифицированный уридин представляет собой комбинацию псевдоуридина и 5-метоксиуридина. В некоторых вариантах

воплощения изобретения модифицированный уридин представляет собой комбинацию N1-метил-псевдоуридина и 5-метоксиуридина.

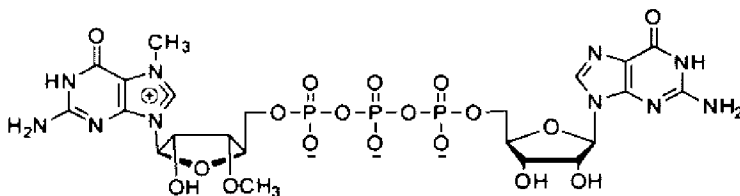
В некоторых вариантах воплощения изобретения модифицированный уридин представляет собой комбинацию 5-йодуридина и N1-метил-псевдоуридина. В некоторых вариантах воплощения изобретения модифицированный уридин представляет собой комбинацию псевдоуридина и 5-йодуридина.

В некоторых вариантах воплощения изобретения модифицированный уридин представляет собой комбинацию 5-йодуридина и 5-метоксиуридина.

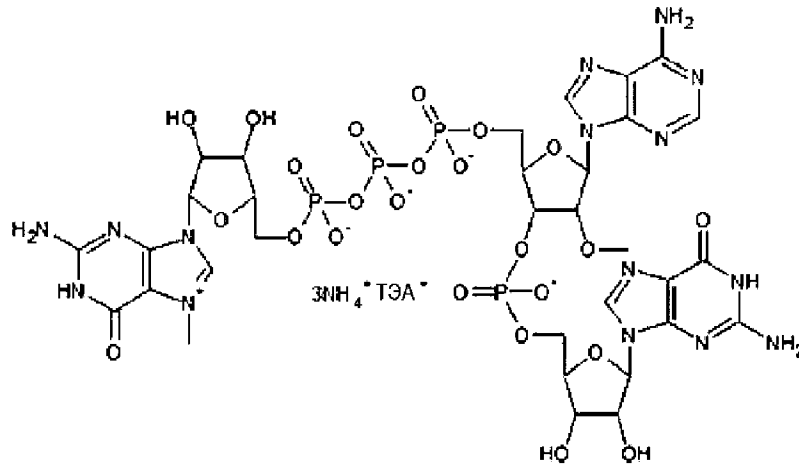
[133] В некоторых вариантах воплощения изобретения иРНК, раскрытая в данной заявке, содержит 5'-кэп, такой как Cap0, Cap1 или Cap2. 5'-кэп обычно представляет собой 7-метилгуанин-рибонуклеотид (который может быть дополнительно модифицирован, как обсуждается ниже, например, в отношении ARCA), связанный через 5'-трифосфат с 5'-положением первого нуклеотида 5'- до- 3'- цепью иРНК, т.е. первый кэп-проксимальный нуклеотид. В Cap0, рибозы первого и второго кэп-проксимальных нуклеотидов иРНК содержат 2'-гидроксил. В Cap1, рибозы первого и второго транскрибируемых нуклеотидов иРНК содержат 2'-метокси и 2'-гидроксил соответственно. В Cap2, рибозы первого и второго кэп-проксимальных нуклеотидов иРНК содержат 2'-метокси. См., например Katibah et al. (2014) *Proc Natl Acad Sci USA* 111(33):12025-30; Abbas et al. (2017) *Proc Natl Acad Sci USA* 114(11):E2106-E2115.

Большинство эндогенных иРНК высших эукариот, включая иРНК млекопитающих, такие как иРНК человека, содержат Cap1 или Cap2. Cap0 и другие кэп-структуры, отличные от Cap1 и Cap2, могут быть иммуногенными у млекопитающих, таких, как люди, из-за распознавания как «чужого» компонентами врожденной иммунной системы, такими как IFIT-1 и IFIT-5, что может привести к повышенному уровню цитокинов, включая интерферон I типа. Компоненты врожденной иммунной системы, такие как IFIT-1 и IFIT-5, также могут конкурировать с eIF4E за связывание иРНК с кэпом, отличным от Cap1 или Cap2, потенциально ингибируя трансляцию иРНК.

[134] Кэп может быть включен со-транскрипционно. Например, ARCA (антиреверсный кэп аналог; Thermo Fisher Scientific кат. № AM8045) представляет собой аналог кэпа, содержащий 7-метилгуанин-3'-метокси-5'-трифосфат, связанный с 5' положением рибонуклеотида гуанина, который может быть включен *in vitro* в транскрипт при инициации. ARCA приводит к кэпу Cap0, в котором 2' положение первого нуклеотида, проксимального к кэпу, является гидроксилом. См., например, Stepinski et al., (2001) "Synthesis и properties of mRNAs containing the novel 'anti-reverse' cap analogs 7-methyl(3'-O-methyl)GpppG и 7-methyl(3'deoxy)GpppG," *RNA* 7: 1486-1495. Структура ARCA показана ниже.



[135] CleanCap™ AG (m7G(5')ppp(5')(2'OMeA)pG; TriLink Biotechnologies кат.№ N-7113) или CleanCap™ GG (m7G(5')ppp(5')(2'OMeG)pG; TriLink Biotechnologies кат.№ N-7133) может быть использован для обеспечения структуры Cap1 сотранскрипционно. 3'-О-метирированные версии CleanCap™ AG и CleanCap™ GG также доступны в TriLink Biotechnologies как кат. № N-7413 и N-7433 соответственно. Структура CleanCap™ AG показана ниже.



[136] Альтернативно, кэп может быть добавлен к РНК посттранскрипционно. Например, коммерчески доступен кэпирующий фермент осповакцины (New Engli Biolabs Кат. No. M2080S) и обладает активностями РНК-трифосфатазы и гуанилилтрансферазы, обеспечиваемой его субъединицей D1, и гуанинметилтрансферазы, обеспечиваемой его субъединицей D12. Таким образом, он может добавлять 7-метилгуанин к РНК, чтобы получить Cap0, в присутствии S-аденозилметионина и GTP. См., Например, Guo, P. и Moss, B. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 4023-4027; Mao, X. и Shuman, S. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 24472-24479.

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

### Г. Рибонуклеопротеиновый комплекс

[138] В некоторых вариантах воплощения изобретения композиция содержит одну или несколько gРНК, содержащих одну или несколько направляющих последовательностей из Таблицы 1 или одну или несколько sgРНК из Таблицы 2 и РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, например, нуклеазу, такую как нуклеаза Cas, например Cas9. В некоторых вариантах воплощения изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент обладает клезазной активностью, которую также можно назвать двухцепочечной эндонуклеазной активностью. В некоторых вариантах воплощения изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит нуклеазу Cas. Примеры нуклеаз Cas9 включают нуклеазы системы CRISPR типа II *S. pyogenes*, *S. aureus* и других прокариот (см.,

пример, список в следующем абзаце), а также их модифицированные (например, сконструированные или мутантные) версии. См., например, US2016/0312198A1; US 2016/0312199A1. Другие примеры нуклеаз Cas включают комплекс Csm или Cmr системы CRISPR типа III или его субъединицу Cas10, CsmI или Cmr2; и каскадный комплекс системы CRISPR типа I или ее субъединицу Cas3.

В некоторых вариантах воплощения изобретения нуклеаза Cas может происходить из системы типа IIA, типа IIB или типа IIC. Обсуждение различных систем CRISPR и нуклеаз Cas см., например, 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).

[139] 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 succinogenes*, *Rhodospirillum rubrum*, *Nocardiopsis dassonvillei*, *Streptomyces pristinaespiralis*, *Streptomyces viridochromogenes*, *Streptomyces viridochromogenes*, *Streptosporangium roseum*, *Streptosporangium roseum*, *Alicyclobacillus acidocaldarius*, *Bacillus pseudomycooides*, *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 beccsii*, *Suidatus Desulforudis*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile*, *Finegoldia magna*, *Natranaerobius thermophilus*, *Pelotomaculum thermopropionicum*, *Acidithiobacillus caldus*, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Allochromatium 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.*, *Petrotoga mobilis*, *Thermosiphon africanus*, *Streptococcus pasteurianus*, *Neisseria cinerea*, *Campylobacter lari*, *Parvibaculum lavamentivorans*, *Corynebacterium diphtheria*, *Acidaminococcus sp.*, бактерии *Lachnospiraceae* ND2006, и *Acaryochloris marina*.

[140] В некоторых вариантах воплощения изобретения нуклеаза Cas представляет собой нуклеазу Cas9 из *Streptococcus pyogenes*. В некоторых вариантах воплощения изобретения нуклеаза Cas представляет собой нуклеазу Cas9 из *Streptococcus thermophilus*. В некоторых вариантах воплощения изобретения нуклеаза Cas представляет собой нуклеазу Cas9 из *Neisseria meningitidis*. В некоторых вариантах воплощения изобретения нуклеаза Cas представляет собой нуклеазу Cas9 из *Staphylococcus aureus*. В некоторых вариантах воплощения изобретения нуклеаза Cas представляет собой нуклеазу Cpf1 из *Francisella novicida*. В некоторых вариантах воплощения изобретения нуклеаза Cas представляет собой

нуклеазу Cpf1 из *Acidaminococcus sp.* В некоторых вариантах воплощения изобретения нуклеаза Cas представляет собой нуклеазу Cpf1 из бактерии *Lachnospiraceae* ND2006. В дополнительных вариантах воплощения изобретения нуклеаза Cas представляет собой нуклеазу Cpf1 из *Francisella tularensis*, *Lachnospiraceae bacterium*, *Butyrivibrio proteoclasticus*, *Peregrinibacteria bacterium*, *Parcubacteria bacterium*, *Smithella*, *Acidaminococcus*, *Cuidatus Methanoplasma termitum*, *Eubacterium eligens*, *Moraxella bovoculi*, *Leptospira inadai*, *Porphyromonas crevioricanis*, *Prevotella disiens* или *Porphyromonas macacae*. В некоторых вариантах воплощения изобретения нуклеаза Cas представляет собой нуклеазу Cpf1 из *Acidaminococcus* или *Lachnospiraceae*.

[141] В некоторых вариантах воплощения изобретения gРНК вместе с РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом, называется рибонуклеопротеиновым комплексом (RNP). В некоторых вариантах воплощения изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент представляет собой нуклеазу Cas. В некоторых вариантах воплощения изобретения gРНК вместе с нуклеазой Cas называется Cas-RNP. В некоторых вариантах воплощения изобретения RNP содержит компоненты типа I, типа II или типа III. В некоторых вариантах воплощения изобретения нуклеаза Cas представляет собой белок Cas9 из системы CRISPR/Cas типа II. В некоторых вариантах воплощения изобретения gРНК вместе с Cas9 называют Cas9 RNP.

[142] Cas9 дикого типа имеет два нуклеазных домена: RuvC и HNH. Домен RuvC расщепляет цепь ДНК, не являющуюся мишенью, а домен HNH расщепляет цепь-мишень ДНК. В некоторых вариантах воплощения изобретения белок Cas9 содержит более одного домена RuvC и/или более одного домена HNH. В некоторых вариантах воплощения изобретения белок Cas9 представляет собой Cas9 дикого типа. В каждом из вариантов композиции, применения и способа Cas индуцирует двухцепочечный разрыв в ДНК-мишени.

[143] В некоторых вариантах воплощения изобретения используются химерные нуклеазы Cas, в которых один домен или область белка заменяется частью другого белка.

В некоторых вариантах воплощения изобретения домен нуклеазы Cas может быть заменен доменом другой нуклеазы, такой как FokI. В некоторых вариантах воплощения изобретения нуклеаза Cas может быть модифицированной нуклеазой.

[144] В других вариантах воплощения изобретения нуклеаза Cas может происходить из системы CRISPR/Cas типа I. В некоторых вариантах воплощения изобретения нуклеаза Cas может быть компонентом комплекса Cascade системы CRISPR/Cas типа I. В некоторых вариантах воплощения изобретения нуклеаза Cas может быть белком Cas3. В некоторых вариантах воплощения изобретения нуклеаза Cas может происходить из системы CRISPR/Cas типа III.

В некоторых вариантах воплощения изобретения нуклеаза Cas может обладать активностью расщепления РНК.

[145] В некоторых вариантах воплощения изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, обладает одноцепочечной нуклеазной активностью, то есть может

разрезать одну цепь ДНК с образованием одноцепочечного разрыва, также известного как «разрыв». В некоторых вариантах воплощения изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит Cas нуклеазу. Нуклеаза - это фермент, который создает разрыв в dsДНК, то есть разрезает одну цепь, но не вторую, двойной спирали ДНК. В некоторых вариантах воплощения изобретения Cas нуклеаза представляет собой версию нуклеазы Cas (например, нуклеазы Cas, обсуждаемой выше), в которой эндонуклеолитический активный сайт инактивирован, например, одним или несколькими изменениями (например, точечными мутациями) в каталитическом домене. См., например, патент США No. US 8,889,356 для обсуждения Cas нуклеазы и иллюстративных изменений каталитических доменов. В некоторых вариантах воплощения изобретения нуклеазы Cas, такая как Cas9, имеет инактивированный домен RuvC или HNH.

[146] В некоторых вариантах воплощения изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, модифицирован таким образом, чтобы он содержал только один функциональный домен нуклеазы. Например, агентный белок может быть модифицирован таким образом, что один из доменов нуклеазы мутирован или полностью или частично удален, чтобы снизить его активность по расщеплению нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах воплощения изобретения используется нуклеаза, имеющая домен RuvC с пониженной активностью. В некоторых вариантах воплощения изобретения используется нуклеаза, имеющая неактивный домен RuvC. В некоторых вариантах воплощения изобретения используется нуклеаза, имеющая домен HNH с пониженной активностью. В некоторых вариантах воплощения изобретения используется нуклеаза, имеющая неактивный домен HNH.

[147] В некоторых вариантах воплощения изобретения консервативная аминокислота в домене нуклеазы белка Cas заменяется для снижения или изменения нуклеазной активности. В некоторых вариантах воплощения изобретения нуклеаза Cas может содержать аминокислотную замену в RuvC или RuvC-подобном нуклеазном домене. Примеры аминокислотных замен 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 воплощения изобретения нуклеаза Cas может содержать аминокислотную замену в HNH- или HNH-подобном нуклеазном домене. Примеры аминокислотных замен 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). Дополнительные примерные аминокислотные замены включают D917A, E1006A и D1255A (на основе последовательности *Francisella novicida* U1\_12\_Cpfl (FnCpfl) (UniProtKB - A0Q7Q2) (CPF1 FRATN)).

[148] В некоторых вариантах воплощения изобретения иРНК, кодирующая нуклеазу, предоставляется в комбинации с парой направляющих РНК, которые комплементарны смысловой и антисмысловой цепям последовательности-мишени, соответственно. В этом варианте воплощения изобретения направляющие РНК направляют нуклеазу к последовательности-мишени и вводят DSB, создавая разрыв на противоположных цепях

последовательности-мишени (то есть двойной разрыв). В некоторых вариантах воплощения изобретения использование двойного надреза может улучшить специфичность и снизить нецелевые эффекты. В некоторых вариантах воплощения изобретения никаза используется вместе с двумя отдельными направляющими РНК, нацеленными на противоположные цепи ДНК, для создания двойного разрыва в целевой ДНК. В некоторых вариантах воплощения изобретения никаза используется вместе с двумя отдельными направляющими РНК, выбранными так, чтобы они находились в непосредственной близости, чтобы образовать двойной разрыв в целевой ДНК.

[149] В некоторых вариантах воплощения изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, не обладает активностью расщепления и никаза. В некоторых вариантах воплощения изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, включает ДНК-связывающий полипептид dCas. Полипептид dCas обладает ДНК-связывающей активностью, но практически лишен каталитической активности (расщепление/никаза). В некоторых вариантах воплощения изобретения полипептид dCas представляет собой полипептид dCas9. В некоторых вариантах воплощения изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, лишенный активности расщепления и никаза или ДНК-связывающий полипептид dCas является версией нуклеазы Cas (например, нуклеазы Cas, обсуждаемой выше), в которой ее эндонуклеолитические активные сайты инактивированы, например одним или несколькими изменениями (например, точечными мутациями) в его каталитических доменах. См., например, US 2014/0186958 A1; US 2015/0166980 A1.

[150] В некоторых вариантах воплощения изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, содержит один или несколько гетерологичных функциональных доменов (например, представляет собой или содержит слитый полипептид).

[151] В некоторых вариантах воплощения изобретения гетерологичный функциональный домен может облегчить транспорт РНК-направляемого ДНК-связывающего агента, в ядро клетки. Например, гетерологичный функциональный домен может быть сигналом ядерной локализации (NLS). В некоторых вариантах воплощения изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, может быть слит с 1-10 NLS.

В некоторых вариантах воплощения изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, может быть слит с 1-5 NLS. В некоторых вариантах воплощения изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, может быть слит с одним NLS. Если используется один NLS, он может быть связан с N-концом или C-концом последовательности ДНК-связывающего агента, управляемой РНК. Он также может быть вставлен в последовательность РНК-направляемого ДНК-связывающего агента. В других вариантах воплощения изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, может быть слит с более чем одним NLS. В некоторых вариантах воплощения изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, может быть слит с 2, 3, 4 или 5 NLS. В некоторых вариантах воплощения изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, может быть слит с двумя NLS. В определенных обстоятельствах два NLS могут быть одинаковыми



(например, два SV40 NLS) или разными. В некоторых вариантах воплощения изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, слит с двумя последовательностями NLS SV40, связанными на карбокси-конце.

В некоторых вариантах воплощения изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, может быть слит с двумя NLS, один связан с N-концом, а другой - с C-концом. В некоторых вариантах воплощения изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, может быть слит с 3 NLS. В некоторых вариантах воплощения изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, может быть слит без NLS. В некоторых вариантах воплощения изобретения NLS может быть одночастной последовательностью, такой как, например, SV40 NLS, PKKKRKV (SEQ ID NO: 600) или PKKKRRV (SEQ ID NO: 601). В некоторых вариантах воплощения изобретения NLS может быть двудольной последовательностью, такой как NLS нуклеоплазмина, KRPAATKKAGQAKKKK (SEQ ID NO: 602).

[152] В конкретном варианте воплощения изобретения одиночный PKKKRKV (SEQ ID NO: 600) NLS может быть связан на C-конце РНК-направляемого ДНК-связывающего агента. Один или несколько линкеров необязательно включены в сайт слияния.

В некоторых вариантах воплощения изобретения гетерологичный функциональный домен может быть способен изменять внутриклеточный период полужизни РНК-направляемого ДНК-связывающего агента. В некоторых вариантах воплощения изобретения может быть увеличен период полужизни РНК-направляемого ДНК-связывающего агента. В некоторых вариантах воплощения изобретения период полужизни РНК-направляемого ДНК-связывающего агента, может быть уменьшен. В некоторых вариантах воплощения изобретения гетерологичный функциональный домен может быть способен повышать стабильность РНК-направляемого ДНК-связывающего агента. В некоторых вариантах воплощения изобретения гетерологичный функциональный домен может снижать стабильность РНК-направляемого ДНК-связывающего агента. В некоторых вариантах воплощения изобретения гетерологичный функциональный домен может действовать как сигнальный пептид для деградации белка. В некоторых вариантах воплощения изобретения деградация белка может быть опосредована протеолитическими ферментами, такими как, например, протеасомы, лизосомальные протеазы или протеазы кальпаина. В некоторых вариантах воплощения изобретения гетерологичный функциональный домен может содержать последовательность PEST. В некоторых вариантах воплощения изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, может быть модифицирован путем добавления убиквитина или полиубиквитиновой цепи. В некоторых вариантах воплощения изобретения убиквитин может быть белком убиквитин-подобный белок (UBL).

Неограничивающие примеры белков убиквитина-подобный белок включают малый модификатор убиквитина-подобный белок (SUMO), белок, перекрестно реагирующий с убиквитином (UCRP, также известный как интерферон-стимулированный ген-15 (ISG15), убиквитин-связанный модификатор-1 (URM1), нейрональные клетки-предшественники

экспрессируются онтогенетически подавленный белок-8 (NEDD8, также называемый Rub1 в *S. cerevisiae*), человеческий лейкоцитарный антиген F-связанный (FAT10), аутофагия-8 (ATG8) и-12 (ATG12), убиквитин Fau-подобный белок (FUB1), закрепленный на мембране UBL (MUB), убиквитиновый модификатор укладки-1 (UFM1) и убиквитин-подобный белок-5 (UBL5).

[153] В некоторых вариантах воплощения изобретения гетерологичный функциональный домен может быть маркерным доменом. Неограничивающие примеры маркерных доменов включают флуоресцентные белки, метки очистки, метки эпитопов и последовательности репортерных генов. В некоторых вариантах воплощения изобретения маркерный домен может быть флуоресцентным белком.

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), голубые 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, mRFPI, DsRed-Express, DsRed2, DsRed-Monomer, HcRed-Tiem, HcRedled1, AsRedberry6, mkRed1, mqRedberry6, eqRedberry6, mStrawberry, Jred) и оранжевые флуоресцентные белки (mOrange, mKO, Kusabira-Orange, Monomeric Kusabira-Orange, mTangerine, tdTomato) или любой другой подходящий флуоресцентный белок. В других вариантах воплощения изобретения маркерный домен может быть меткой очистки и/или меткой эпитопа.

Неограничивающие иллюстративные теги включают глутатион-S-трансферазу (GST), хитинсвязывающий белок (CBP), мальтозосвязывающий белок (MBP), тиоредоксин (TRX), поли (NANP), тег 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, Sl, T7, V5, VSV-G, 6xHis, 8xHis, карбоксильный белок-носитель биотина (BCCP), поли-His и кальмодулин.

Неограничивающие иллюстративные репортерные гены включают глутатион-S-трансферазу (GST), пероксидазу хрена (HRP), хлорамфениколацетилтрансферазу (CAT), бета-галактозидазу, бета-глюкуронидазу, люциферазу или флуоресцентные белки.

[154] В дополнительных вариантах воплощения изобретения гетерологичный функциональный домен может нацеливать РНК-направляемый ДНК-связывающий агент на конкретную органеллу, тип клетки, ткань или орган. В некоторых вариантах воплощения изобретения гетерологичный функциональный домен может нацеливать РНК-направляемый ДНК-связывающий агент в митохондрии.

[155] В дополнительных вариантах воплощения изобретения гетерологичный функциональный домен может быть эффекторным доменом. Когда РНК-направляемый ДНК-связывающий агент направлен на свою последовательность-мишень, например, когда

нуклеаза Cas направлена на последовательность-мишень с помощью gРНК, эффекторный домен может модифицировать или влиять на последовательность-мишень.

В некоторых вариантах воплощения изобретения эффекторный домен может быть выбран из домена связывания нуклеиновой кислоты, домена нуклеазы (например, домена нуклеазы, отличного от Cas), домена эпигенетической модификации, домена активации транскрипции или домена репрессора транскрипции. В некоторых вариантах воплощения изобретения гетерологичный функциональный домен представляет собой нуклеазу, такую как нуклеаза FokI. См., например, патент США No. № 9,023,649. В некоторых вариантах воплощения изобретения гетерологичный функциональный домен представляет собой активатор или репрессор транскрипции. См., например, Qi et al., “Repurposing CRISPR as an РНК-guided platform for sequence-specific control of gene expression,” *Cell* 152:1173-83 (2013); Perez-Pinera et al., “РНК-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors,” *Nat. Methods* 10:973-6 (2013); Mali et al., “CAS9 transcriptional activators for target specificity screening и paired nickases for cooperative genome engineering,” *Nat. Biotechnol.* 31:833-8 (2013); Gilbert et al., “CRISPR-mediated modular РНК-guided regulation of transcription in eukaryotes,” *Cell* 154:442-51 (2013). Таким образом, РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, по существу, становится фактором транскрипции, который может быть направлен на связывание желаемой последовательности-мишени с использованием направляющей РНК.

#### **Д. Определение эффективности gРНК**

[156] В некоторых вариантах воплощения изобретения эффективность gРНК определяется при доставке или экспрессии вместе с другими компонентами, образующими RNP. В некоторых вариантах воплощения изобретения gРНК экспрессируется вместе с агентом связывания ДНК, управляемым РНК, таким как белок Cas, например Cas9.

В некоторых вариантах воплощения изобретения gРНК доставляется или экспрессируется в клеточной линии, которая уже стабильно экспрессирует РНК-направляемую нуклеазу ДНК, такую как нуклеаза Cas или никаза, например нуклеаза или никаза Cas9. В некоторых вариантах воплощения изобретения gРНК доставляется в клетку как часть RNP. В некоторых вариантах воплощения изобретения gРНК доставляется в клетку вместе с иРНК, кодирующей РНК-направляемую нуклеазу ДНК, такую как нуклеаза Cas или никаза, например нуклеаза или никаза Cas9.

[157] Как описано в данной заявке, использование РНК-направляемой ДНК-нуклеазы и направляющей РНК, раскрытых в данной заявке, может приводить к двухцепочечным разрывам в ДНК, которые могут приводить к ошибкам в виде вставок/делений (инсерций) мутаций при репарации клеточным механизмом. Многие мутации из-за инделей изменяют рамку считывания или вводят преждевременные стоп-кодоны и, следовательно, производят нефункциональный белок.

[158] В некоторых вариантах воплощения изобретения эффективность конкретных gРНК определяется на основе моделей *in vitro*. В некоторых вариантах воплощения изобретения модель *in vitro* представляет собой клетки НЕК293, стабильно экспрессирующие Cas9 (НЕК293\_Cas9). В некоторых вариантах воплощения изобретения

модель *in vitro* представляет собой клетки гепатокарциномы человека HUH7. В некоторых вариантах воплощения изобретения модель *in vitro* представляет собой клетки HepG2. В некоторых вариантах воплощения изобретения модель *in vitro* представляет собой первичные гепатоциты человека. В некоторых вариантах воплощения изобретения модель *in vitro* представляет собой первичные гепатоциты яванской макаки. Что касается использования первичных гепатоцитов человека, можно использовать коммерчески доступные первичные гепатоциты человека для обеспечения большей согласованности между экспериментами.

В некоторых вариантах воплощения изобретения количество неспецифических последовательностей в геноме, с которыми может, но не должна связываться направляющая РНК, в которых происходит делеция или вставка, в модели *in vitro* (например, в первичных гепатоцитах человека) определяется, например, путем анализа геномной ДНК из первичных гепатоцитов человека, трансфицированных *in vitro* иРНК Cas9 и направляющей РНК. В некоторых вариантах воплощения изобретения такое определение включает анализ геномной ДНК из первичных гепатоцитов человека, трансфицированных *in vitro* иРНК Cas9, направляющей РНК и донорного олигонуклеотида.

Иллюстративные процедуры для таких определений представлены в рабочих примерах ниже.

[159] В некоторых вариантах воплощения изобретения эффективность конкретных gРНК определяется на множестве клеточных моделей *in vitro* для процесса отбора gРНК.

В некоторых вариантах воплощения изобретения выполняется сравнение данных клеточной линии с выбранными gРНК. В некоторых вариантах воплощения изобретения выполняется перекрестный скрининг на нескольких клеточных моделях.

[160] В некоторых вариантах воплощения изобретения эффективность конкретных gРНК определяется на основе моделей *in vivo*. В некоторых вариантах воплощения изобретения модель *in vivo* представляет собой модель грызуна. В некоторых вариантах воплощения изобретения модель грызуна представляет собой мышь, которая экспрессирует ген *LDHA*. В некоторых вариантах воплощения изобретения модель грызуна представляет собой мышь, которая экспрессирует ген *LDHA* человека. В некоторых вариантах воплощения изобретения модель *in vivo* представляет собой примата, не являющегося человеком, например, яванской макаки.

[161] В некоторых вариантах воплощения изобретения эффективность направляющей РНК измеряется относительным процентом редактирования *LDHA*. В некоторых вариантах воплощения изобретения процент редактирования *LDHA* сравнивается с процентом редактирования, необходимым для достижения нокдауна белка *LDHA*, например, из лизатов цельных клеток в случае модели *in vitro* или в ткани в случае модели *in vivo*.

[162] В некоторых вариантах воплощения изобретения эффективность направляющей РНК измеряется количеством и/или частотой инсерционно-делеционных мутаций на нецелевых последовательностях в геноме целевого типа клетки. В некоторых

вариантах воплощения изобретения предусмотрены эффективные направляющие РНК, которые продуцируют инсерционно-делеционные мутации на сайтах-мишенях с очень низкими частотами (например, меньше 5%) в популяции клеток и/или относительно частоты создания инсерционно-делеционных мутаций на сайте-мишени.

Таким образом, в описании представлены направляющие РНК, которые не проявляют образования инсерционно-делеционных мутаций вне мишени в типе клеток-мишеней (например, гепатоцит) или которые вызывают частоту образования инсерционно-делеционных мутаций вне мишени меньше 5% в популяции клеток и/или относительно частоты создания инсерционно-делеционных мутаций на сайте-мишени. В некоторых вариантах воплощения изобретения в описании представлены направляющие РНК, которые не проявляют никакого образования инсерционно-делеционных мутаций вне мишени в клетках-мишенях (например, гепатоцитах).

В некоторых вариантах воплощения изобретения предусмотрены направляющие РНК, которые образуют инсерционно-делеционные мутации менее чем на 5 сайтах вне мишени, например, при оценке одним или несколькими описанными в данной заявке способами. В некоторых вариантах воплощения изобретения предусмотрены направляющие РНК, которые производят инсерционно-делеционные мутации на уровне, меньшем или равном 4, 3, 2 или 1 неспецифичной последовательности (последовательностям) в геноме, с которой может, но не должна связываться направляющая РНК, например, по оценке одним или несколькими описанными в данной заявке способами. В некоторых вариантах воплощения изобретения неспецифичная последовательность (последовательности) в геноме, с которой может, но не должна связываться направляющая РНК, не встречается в кодирующей белок области в геноме клетки-мишени (например, гепатоцита).

[163] В некоторых вариантах воплощения изобретения для обнаружения событий редактирования генов, таких как образование мутаций вставки/делеции («инсерционно-делеционная мутация») и событий гомологически направленной репарации (HDR) в целевой ДНК, используют линейную амплификацию с меченым праймером и выделение меченых продуктов амплификации (в данной заявке после называется способом «LAM-ПЦР» или «способом линейной амплификации (LA)»).

[164] В некоторых вариантах воплощения изобретения эффективность направляющей РНК измеряется путем измерения уровней гликолата и/или уровней оксалата в образце, таком как жидкость организма, например сыворотка, плазма, кровь или моча. В некоторых вариантах воплощения изобретения эффективность направляющей РНК измеряется путем измерения уровней гликолата в сыворотке или плазме и/или уровней оксалата в моче. Повышение уровня гликолата в сыворотке или плазме и/или снижение уровня оксалата в моче указывает на эффективную направляющую РНК. В некоторых вариантах воплощения изобретения содержание оксалата в моче снижается до уровня ниже 0,7 ммоль/24 часа/1,73 м<sup>2</sup>. В некоторых вариантах воплощения изобретения уровни гликолата и оксалата измеряются с использованием твердофазного иммуноферментного

анализа (ELISA) со средой для культивирования клеток, сывороткой или плазмой.

В некоторых вариантах воплощения изобретения уровни гликолата и оксалата измеряются в одних и тех же системах или моделях *in vitro* или *in vivo*, используемых для измерения редактирования. В некоторых вариантах воплощения изобретения уровни гликолата и оксалата измеряются в клетках, например, в первичных гепатоцитах человека. В некоторых вариантах воплощения изобретения уровни гликолата и оксалата измеряются в клетках HUH7. В некоторых вариантах воплощения изобретения уровни гликолата и оксалата измеряются в клетках HepG2.

### III. Способы лечения

[165] gPНК и связанные с ними способы и композиции, раскрытые в данной заявке, полезны для индукции двухцепочечного разрыва (DSB) в гене *LDHA* и снижения экспрессии гена *LDHA*. gPНК и связанные с ними способы, и композиции, раскрытые в данной заявке, полезны для лечения и профилактики гипероксалурии и предотвращения симптомов гипероксалурии. В некоторых вариантах воплощения изобретения gPНК, раскрытые в данной заявке, полезны для лечения и предотвращения образования оксалата кальция, отложения оксалата кальция в органах, первичной гипероксалурии (включая PH1, PH2 и PH3), оксалоза, включая системный оксалоз, и гематурии.

В некоторых вариантах воплощения изобретения gPНК, раскрытые в данной заявке, полезны для отсрочки или уменьшения потребности в трансплантации почки или печени. В некоторых вариантах воплощения изобретения gPНК, раскрытые в данной заявке, полезны для предотвращения терминальной стадии почечной недостаточности (ESRD).

Введение описанных в данной заявке gPНК увеличивает содержание гликолата в сыворотке или плазме и снижает продукцию или накопление оксалатов, так что с мочой выводится меньше оксалатов. Следовательно, на одном аспекте эффективность лечения/профилактики может быть оценена путем измерения гликолата в сыворотке или плазме, где повышение уровней гликолата указывает на эффективность. В некоторых вариантах воплощения изобретения эффективность лечения/профилактики можно оценить путем измерения оксалата в образце, например оксалата в моче, где снижение оксалата в моче указывает на эффективность.

[166] Нормальная суточная экскреция оксалатов с мочой у здоровых субъектов составляет менее чем приблизительно 45 мг, тогда как концентрации, превышающие приблизительно 45 мг за 24 часа, считаются клинической гипероксалурией (см., например, Bhasin et al., *World J Nephrol* 2015 May 6; 4(2): 235-244; и Cochat P., Rumsby G. (2013). *N Engl J Med* 369:649-658). Соответственно, в некоторых вариантах воплощения изобретения введение gPНК и композиций, раскрытых в данной заявке, полезно для снижения уровней оксалата, так что субъект больше не демонстрирует уровни оксалата в моче, связанные с клинической гипероксалурией. В некоторых вариантах воплощения изобретения введение gPНК и композиций, описанных в данной заявке, снижает содержание оксалата в моче субъекта до менее чем приблизительно 45 или 40 мг за 24-часовой период.

В некоторых вариантах воплощения изобретения введение gPНК и композиций,

описанных в данной заявке, снижает содержание оксалата в моче субъекта до менее чем приблизительно 35, менее чем приблизительно 30, менее чем приблизительно 25, менее чем приблизительно 20, менее чем приблизительно 15 или менее чем приблизительно 10 мг в 24-часовой период.

[167] В некоторых вариантах воплощения изобретения любая одна или несколько гРНК, композиций или фармацевтических составов, описанных в данной заявке, предназначены для использования при приготовлении лекарственного средства для лечения или профилактики заболевания или нарушения у субъекта.

В некоторых вариантах воплощения изобретения лечение и/или профилактика достигается однократной дозой, например, однократным лечением лекарственным средством/композицией. В некоторых вариантах воплощения изобретения заболевание или нарушение представляет собой гипероксалурию.

[168] В некоторых вариантах воплощения данное изобретение включает способ лечения или профилактики заболевания или расстройства у субъекта, включающий введение любой одной или нескольких гРНК, композиций или фармацевтических составов, описанных в данной заявке. В некоторых вариантах воплощения изобретения заболевание или нарушение представляет собой гипероксалурию. В некоторых вариантах воплощения изобретения гРНК, композиции или фармацевтические составы, описанные в данной заявке, вводят в виде разовой дозы, например, за один раз. В некоторых вариантах воплощения изобретения однократная доза обеспечивает длительное лечение и/или профилактику. В некоторых вариантах воплощения изобретения данный способ обеспечивает долговременное лечение и/или профилактику.

Устойчивое лечение и/или профилактика, как используется в данной заявке, включает лечение и/или профилактику, которые продлеваются как по меньшей мере на i) 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 недель; ii) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 18, 24, 30 или 36 месяцев; или iii) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 лет.

В некоторых вариантах воплощения изобретения однократная доза гРНК, композиций или фармацевтических составов, описанных в данной заявке, достаточна для лечения и/или предотвращения любого из показаний, описанных в данной заявке, на протяжении всей жизни субъекта.

[169] В некоторых вариантах воплощения данное изобретение включает способ или использование модификации (например, создание двухпочечного разрыва) ДНК-мишени, включающий введение или доставку любой одной или нескольких гРНК, композиций или фармацевтических составов, описанных в данной заявке. В некоторых вариантах воплощения изобретения ДНК-мишень представляет собой ген *LDHA*. В некоторых вариантах воплощения изобретения ДНК-мишень находится в экзоне гена *LDHA*. В некоторых вариантах воплощения изобретения ДНК-мишень находится в экзоне 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 гена *LDHA*.

[170] В некоторых вариантах воплощения данное изобретение включает способ или применение для модуляции целевого гена, включающие введение или доставку любой

одной или нескольких gРНК, композиций или фармацевтических композиций, описанных в данной заявке. В некоторых вариантах воплощения изобретения модуляция представляет собой редактирование гена-мишени *LDHA*. В некоторых вариантах воплощения изобретения модуляция представляет собой изменение экспрессии белка, кодируемого геном-мишенью *LDHA*.

[171] В некоторых вариантах воплощения изобретения способ или использование приводит к редактированию гена. В некоторых вариантах воплощения изобретения способ или использование приводит к двухцепочечному разрыву в гене-мишени *LDHA*.

В некоторых вариантах воплощения изобретения способ или использование приводит к образованию индел-мутаций во время негомологичного концевое соединения DSB. В некоторых вариантах воплощения изобретения способ или использование приводит к вставке или удалению нуклеотидов в гене-мишени *LDHA*.

В некоторых вариантах воплощения изобретения вставка или удаление нуклеотидов в гене-мишени *LDHA* приводит к мутации сдвига рамки считывания или преждевременному стоп-кодону, что приводит к нефункциональному белку. В некоторых вариантах воплощения изобретения вставка или удаление нуклеотидов в гене-мишени *LDHA* приводит к нокдауну или устранению экспрессии гена-мишени. В некоторых вариантах воплощения изобретения способ или использование включает гомологически направленную репарацию DSB.

[172] В некоторых вариантах воплощения изобретения способ или использование приводит к модуляции гена *LDHA*. В некоторых вариантах воплощения изобретения модуляция гена *LDHA* представляет собой снижение экспрессии гена. В некоторых вариантах воплощения изобретения способ или использование приводит к снижению экспрессии белка, кодируемого геном-мишенью.

[173] В некоторых вариантах воплощения изобретения предложен способ индукции двухцепочечного разрыва (DSB) в гене *LDHA*, включающий введение композиции, содержащей направляющую РНК, содержащую любую одну или несколько направляющих последовательностей SEQ ID NOs: 1-84 или любую одну или больше sgРНК SEQ ID NOs: 1001, 1005, 1007, 1008, 1014, 1023, 1027, 1032, 1045, 1048, 1063, 1067, 1069, 1071, 1074, 1076, 1077, 1078, 1079 и 1081 или их модифицированные версии, как показано, например, в SEQ ID NOs: 2001, 2005, 2007, 2008, 2014, 2023, 2027, 2032, 2045, 2048, 2063, 2067, 2069, 2071, 2074, 2076, 2077, 2078, 2079 и 2081. В некоторых вариантах воплощения изобретения gРНК, содержащие любую одну или несколько направляющих последовательностей SEQ ID NOs: 1-84 и 100-192, вводятся для индукции DSB в гене *LDHA*. Направляющие РНК могут вводиться вместе с РНК-направляемой нуклеазой ДНК, такой как нуклеаза Cas (например, Cas9) или иРНК, или вектором, кодирующим управляемую РНК нуклеазу ДНК, такую как нуклеаза Cas (например, Cas9).

[174] В некоторых вариантах воплощения изобретения предложен способ модификации гена *LDHA*, включающий введение композиции, содержащей направляющую РНК, содержащую любую одну или несколько направляющих последовательностей SEQ ID



NOs: 1-84 или любую одну, или несколько sgРНК из SEQ ID NOs: 1001, 1005, 1007, 1008, 1014, 1023, 1027, 1032, 1045, 1048, 1063, 1067, 1069, 1071, 1074, 1076, 1077, 1078, 1079 и 1081 или их модифицированные версии, как показано, например, в SEQ ID NOs: 2001, 2005, 2007, 2008, 2014, 2023, 2027, 2032, 2045, 2048, 2063, 2067, 2069, 2071, 2074, 2076, 2077, 2078, 2079 и 2081.

В некоторых вариантах воплощения изобретения gРНК, содержащие любую одну или несколько направляющих последовательностей SEQ ID NOs: 1-84 или любую одну, или несколько sgРНК из SEQ ID NOs: 1001, 1005, 1007, 1008, 1014, 1023, 1027, 1032, 1045, 1048, 1063, 1067, 1069, 1071, 1074, 1076, 1077, 1078, 1079 и 1081 или их модифицированные версии, как показано, например, в SEQ ID NOs: 2001, 2005, 2007, 2008, 2014, 2023, 2027, 2032, 2045, 2048, 2063, 2067, 2069, 2071, 2074, 2076, 2077, 2078, 2079 и 2081 вводят для модификации гена *LDHA*.

Направляющие РНК могут вводиться вместе с РНК-направляемой нуклеазой ДНК, такой как нуклеаза Cas (например, Cas9) или иРНК, или вектором, кодирующим управляемую РНК нуклеазу ДНК, такую как нуклеаза Cas (например, Cas9).

[175] В некоторых вариантах воплощения изобретения предложен способ лечения или профилактики гипероксалурии, включающий введение композиции, содержащей направляющую РНК, содержащую любую одну или несколько направляющих последовательностей SEQ ID NOs: 1-84 или любую одну, или несколько sgРНК SEQ ID NOs: 1001, 1005, 1007, 1008, 1014, 1023, 1027, 1032, 1045, 1048, 1063, 1067, 1069, 1071, 1074, 1076, 1077, 1078, 1079 и 1081 или их модифицированные версии, как показано, например, в SEQ ID NOs: 2001, 2005, 2007, 2008, 2014, 2023, 2027, 2032, 2045, 2048, 2063, 2067, 2069, 2071, 2074, 2076, 2077, 2078, 2079 и 2081.

В некоторых вариантах воплощения изобретения gРНК, содержащие любую одну или несколько направляющих последовательностей SEQ ID NOs: 1-84 или любую одну, или несколько sgРНК из SEQ ID NOs: 1001, 1005, 1007, 1008, 1014, 1023, 1027, 1032, 1045, 1048, 1063, 1067, 1069, 1071, 1074, 1076, 1077, 1078, 1079 и 1081 или их модифицированные версии, как показано, например, в SEQ ID NOs: 2001, 2005, 2007, 2008, 2014, 2023, 2027, 2032, 2045, 2048, 2063, 2067, 2069, 2071, 2074, 2076, 2077, 2078, 2079 и 2081 вводят для лечения или предотвращения гипероксалурии. Направляющие РНК могут вводиться вместе с РНК-направляемой нуклеазой ДНК, такой как нуклеаза Cas (например, Cas9) или иРНК, или вектором, кодирующим управляемую РНК нуклеазу ДНК, такую как нуклеаза Cas (например, Cas9).

В некоторых вариантах воплощения изобретения гипероксалурия представляет собой первичную гипероксалурию. В некоторых вариантах воплощения изобретения первичная гипероксалурия относится к типу 1 (PH1), типу 2 (PH2) или типу 3 (PH3). В некоторых вариантах воплощения изобретения гипероксалурия является идиопатической.

[176] В некоторых вариантах воплощения изобретения предоставляется способ уменьшения или устранения выработки и/или отложения оксалата кальция, включающий введение направляющей РНК, содержащей любую одну или несколько направляющих

последовательностей SEQ ID NOs: 1-84 или любую одну, или несколько sgРНК. SEQ ID NOs: 1001, 1005, 1007, 1008, 1014, 1023, 1027, 1032, 1045, 1048, 1063, 1067, 1069, 1071, 1074, 1076, 1077, 1078, 1079 и 1081 или их модифицированные версии, как показано, например, в SEQ ID NOs: 2001, 2005, 2007, 2008, 2014, 2023, 2027, 2032, 2045, 2048, 2063, 2067, 2069, 2071, 2074, 2076, 2077, 2078, 2079 и 2081.

Направляющие РНК можно вводить вместе с РНК-направляемой ДНК-нуклеазой, такой как нуклеаза Cas (например, Cas9) или иРНК, или вектором, кодирующим РНК-направляемую ДНК-нуклеазу, такую как Cas-нуклеаза (например, Cas9).

[177] В некоторых вариантах воплощения изобретения предоставляется способ лечения или профилактики первичной гипероксалурии, включая РН1, РН2 или РН3, включающий введение направляющей РНК, содержащей любую одну или несколько направляющих последовательностей SEQ ID NOs: 1-84 или любую одну или больше sgРНКs SEQ ID NOs: 1001, 1005, 1007, 1008, 1014, 1023, 1027, 1032, 1045, 1048, 1063, 1067, 1069, 1071, 1074, 1076, 1077, 1078, 1079 и 1081 или их модифицированные версии, как показано, например, в SEQ ID NOs: 2001, 2005, 2007, 2008, 2014, 2023, 2027, 2032, 2045, 2048, 2063, 2067, 2069, 2071, 2074, 2076, 2077, 2078, 2079 и 2081. Направляющие РНК могут вводиться вместе с РНК-направляемой нуклеазой ДНК, такой как нуклеаза Cas (например, Cas9) или иРНК, или вектором, кодирующим управляемую РНК нуклеазу ДНК, такую как нуклеаза Cas (например, Cas9).

[178] В некоторых вариантах воплощения изобретения предложен способ лечения или профилактики оксалоза, включающий системный оксалоз, включающий введение направляющей РНК, содержащей любую одну или несколько направляющих последовательностей SEQ ID NOs: 1-84 или любую одну, или несколько sgРНК SEQ ID NOs: 1001, 1005, 1007, 1008, 1014, 1023, 1027, 1032, 1045, 1048, 1063, 1067, 1069, 1071, 1074, 1076, 1077, 1078, 1079 и 1081 или их модифицированные версии, как показано, например, в SEQ ID NOs: 2001, 2005, 2007, 2008, 2014, 2023, 2027, 2032, 2045, 2048, 2063, 2067, 2069, 2071, 2074, 2076, 2077, 2078, 2079 и 2081.

Направляющие РНК можно вводить вместе с РНК-направляемой ДНК-нуклеазой, такой как нуклеаза Cas (например, Cas9) или иРНК, или вектором, кодирующим РНК-направляемую ДНК-нуклеазу, такую как Cas-нуклеаза (например, Cas9).

[179] В некоторых вариантах воплощения изобретения предложен способ лечения или профилактики гематурии, включающий введение направляющей РНК, содержащей любую одну или несколько направляющих последовательностей SEQ ID NOs: 1-84 или любую одну, или несколько sgРНК из SEQ ID NO: 1001, 1005, 1007, 1008, 1014, 1023, 1027, 1032, 1045, 1048, 1063, 1067, 1069, 1071, 1074, 1076, 1077, 1078, 1079 и 1081 или их модифицированные версии, как показано, например, в SEQ ID NOs: 2001, 2005, 2007, 2008, 2014, 2023, 2027, 2032, 2045, 2048, 2063, 2067, 2069, 2071, 2074, 2076, 2077, 2078, 2079 и 2081.

Направляющие РНК можно вводить вместе с РНК-направляемой нуклеазой ДНК, такой как нуклеаза Cas (например, Cas9) или иРНК, или вектором, кодирующим

управляемую РНК нуклеазу ДНК, такую как нуклеаза Cas (например, Cas9).

[180] В некоторых вариантах воплощения изобретения gРНК, содержащие любую одну или несколько направляющих последовательностей SEQ ID NOs: 1-84 и 100-192 или любую одну, или несколько sgРНК из SEQ ID NOs: 1001, 1005, 1007, 1008, 1014, 1023, 1027, 1032, 1045, 1048, 1063, 1067, 1069, 1071, 1074, 1076, 1077, 1078, 1079 и 1081 или их модифицированные версии, как показано, например, в SEQ ID NOs: 2001, 2005, 2007, 2008, 2014, 2023, 2027, 2032, 2045, 2048, 2063, 2067, 2069, 2071, 2074, 2076, 2077, 2078, 2079 и 2081 вводятся для снижения уровня оксалатов в моче. gРНК можно вводить вместе с РНК-направляемой ДНК-нуклеазой, такой как нуклеаза Cas (например, Cas9) или иРНК, или вектором, кодирующим РНК-направляемую ДНК-нуклеазу, такую как Cas-нуклеаза (например, Cas9).

[181] В некоторых вариантах воплощения изобретения gРНК, содержащие любую одну или несколько направляющих последовательностей SEQ ID NOs: 1-84 и 100-192 или любую одну, или несколько sgРНК из SEQ ID NOs: 1001, 1005, 1007, 1008, 1014, 1023, 1027, 1032, 1045, 1048, 1063, 1067, 1069, 1071, 1074, 1076, 1077, 1078, 1079 и 1081 или их модифицированные версии, как показано, например, в SEQ ID NOs: 2001, 2005, 2007, 2008, 2014, 2023, 2027, 2032, 2045, 2048, 2063, 2067, 2069, 2071, 2074, 2076, 2077, 2078, 2079 и 2081 вводят для увеличения содержания гликолата сыворотки в сыворотке или плазме. gРНК можно вводить вместе с РНК-направляемой ДНК-нуклеазой, такой как нуклеаза Cas (например, Cas9) или иРНК, или вектором, кодирующим РНК-направляемую ДНК-нуклеазу, такую как нуклеаза Cas (например, Cas9).

[182] В некоторых вариантах воплощения изобретения gРНК, содержащие направляющие последовательности из Таблицы 1 вместе с РНК-направляемой ДНК-нуклеазой, такой как нуклеаза Cas, индуцируют DSB, а негомологичное соединение концов (NHEJ) во время репарации приводит к мутации в гене *LDHA*. В некоторых вариантах воплощения изобретения NHEJ приводит к делеции или вставке нуклеотида (ов), что вызывает сдвиг рамки считывания или нонсенс-мутацию в гене *LDHA*.

[183] В некоторых вариантах воплощения изобретения введение направляющих РНК в соответствии с данным изобретением (например, в композиции, представленной в данной заявке) увеличивает уровни (например, уровни в сыворотке или плазме) гликолата у субъекта и, следовательно, предотвращает накопление оксалата.

[184] В некоторых вариантах воплощения изобретения увеличение содержания гликолата в сыворотке приводит к снижению оксалата в моче. В некоторых вариантах воплощения изобретения уменьшение оксалата в моче снижает или устраняет образование и отложение оксалата кальция в органах.

[185] В некоторых вариантах воплощения изобретения субъект является млекопитающим. В некоторых вариантах воплощения изобретения субъект является человеком. В некоторых вариантах воплощения изобретения субъектом является корова, свинья, обезьяна, овца, собака, кошка, рыба или домашняя птица.

[186] В некоторых вариантах воплощения изобретения использование

направляющих РНК, содержащих любую одну или несколько направляющих последовательностей в Таблице 1 или одну или несколько sgРНК из Таблицы 2 (например, в композиции, представленной в данной заявке), предусмотрено для приготовления лекарственного средства для лечения человека, страдающего гипероксалурией.

[187] В некоторых вариантах воплощения изобретения направляющие РНК, композиции и составы вводят внутривенно. В некоторых вариантах воплощения изобретения направляющие РНК, композиции и составы вводят в печеночный кровоток.

[188] В некоторых вариантах воплощения изобретения однократного введения композиции, содержащей направляющую РНК, представленную в данной заявке, достаточно для подавления экспрессии мутантного белка. В других вариантах воплощения изобретения более, чем однократного введения композиции, содержащей направляющую РНК, представленную в данной заявке, может быть полезным для максимизации терапевтических эффектов.

[189] В некоторых вариантах воплощения изобретения лечение замедляет или останавливает прогрессирование гипероксалурии.

[190] В некоторых вариантах воплощения изобретения лечение замедляет или останавливает прогрессирование терминальной стадии почечной недостаточности (ESRD). В некоторых вариантах воплощения изобретения лечение замедляет или устраняет потребность в трансплантации почки и/или печени. В некоторых вариантах воплощения изобретения лечение приводит к улучшению, стабилизации или замедлению изменения симптомов гипероксалурии.

#### **А. Комбинированная терапия**

[191] В некоторых вариантах воплощения данное изобретение включает комбинированную терапию, включающую любую из gРНК, содержащих любую одну или несколько направляющих последовательностей, раскрытых в Таблице 1 (например, в композиции, представленной в данной заявке), вместе с дополнительной терапией, подходящей для облегчения гипероксалурии и ее симптомов, как описано выше.

[192] В некоторых вариантах воплощения изобретения дополнительная терапия гипероксалурии представляет собой витамин В6, гидратацию, почечный диализ или трансплантацию печени или почки. В некоторых вариантах воплощения изобретения дополнительная терапия представляет собой другой агент, который разрушает ген *LDHA*, такой как, например, siРНК, направленная на ген *LDHA*. В некоторых вариантах воплощения изобретения siРНК, направленная на ген *LDHA*, представляет собой DCR-РНХС. В некоторых вариантах воплощения, например, когда гипероксалурия вызвана РН1, дополнительная терапия представляет собой средство, разрушающее ген *HAO1*, такое как, например, siРНК, направленная на ген *HAO1*. В некоторых вариантах воплощения изобретения siРНК *HAO1* представляет собой люмасиран (ALN-GO1; Alynlam).

[193] В некоторых вариантах воплощения изобретения комбинированная терапия включает любую одну из gРНК, содержащих любую одну или несколько направляющих последовательностей, раскрытых в Таблице 1, вместе с siРНК, которая нацелена на *HAO1*

или *LDHA*. В некоторых вариантах воплощения изобретения siРНК представляет собой любую siРНК, способную дополнительно снижать или устранять экспрессию *LDHA*. В некоторых вариантах воплощения изобретения siРНК вводят после любой из gРНК, содержащей любую одну или несколько направляющих последовательностей, раскрытых в Таблице 1 (например, в композиции, представленной в данной заявке).

В некоторых вариантах воплощения изобретения siРНК вводят на регулярной основе после лечения любой из композиций gРНК, представленных в данной заявке.

[194] В некоторых вариантах воплощения изобретения комбинированная терапия включает любую одну из gРНК, содержащих любую одну или несколько направляющих последовательностей, раскрытых в Таблице 1 (например, в композиции, представленной в данной заявке), вместе с антисмысловым нуклеотидом, нацеленным на *LDHA*. В некоторых вариантах воплощения изобретения антисмысловой нуклеотид представляет собой любой антисмысловой нуклеотид, способный дополнительно снижать или устранять экспрессию *LDHA*. В некоторых вариантах воплощения изобретения антисмысловой нуклеотид вводят после любой одной из gРНК, содержащей любую одну или несколько направляющих последовательностей, раскрытых в Таблице 1 (например, в композиции, представленной в данной заявке).

В некоторых вариантах воплощения изобретения антисмысловой нуклеотид вводят на регулярной основе после лечения любой из композиций gРНК, представленных в данной заявке.

#### **Б. Доставка композиций gРНК**

[195] Липидные наночастицы (LNP) представляют собой хорошо известные средства доставки нуклеотидного и белкового груза, и их можно использовать для доставки направляющих РНК, композиций или фармацевтических составов, описанных в данной заявке. В некоторых вариантах воплощения изобретения LNP доставляют нуклеиновую кислоту, белок или нуклеиновую кислоту вместе с белком.

[196] В некоторых вариантах воплощения данное изобретение включает способ доставки субъекту любой из gРНК, раскрытых в данной заявке, при этом gРНК связана с LNP. В некоторых вариантах воплощения изобретения gРНК/LNP также связана с Cas9 или иРНК, кодирующей Cas9.

[197] В некоторых вариантах воплощения данное изобретение включает композицию, содержащую любую из описанных gРНК и LNP. В некоторых вариантах воплощения изобретения композиция дополнительно содержит Cas9 или иРНК, кодирующую Cas9.

[198] В некоторых вариантах воплощения изобретения LNP содержат катионные липиды.

В некоторых вариантах воплощения изобретения LNP содержат  
(9Z,12Z)-3-((4,4-бис(октилокси)бутаноил)окси)-2-(((3-(диэтиламино)пропокси)карбонил)окси)метил)пропилотдаека-9,12-диеноат, также называемый 3-((4,4-бис(октилокси)бутаноил)окси)-2-(((3-(диэтиламино)пропокси)

карбонил)окси)метил)пропил(9Z,12Z)-октадека-9,12-диеноат) или другой ионизируемый липид. См., например, липиды в WO/2017/173054 и ссылки, описанные в ней. В некоторых вариантах воплощения изобретения LNP содержат молярные отношения катионного липидного амина к фосфату РНК (N:P) приблизительно 4,5, 5,0, 5,5, 6,0 или 6,5.

В некоторых вариантах воплощения изобретения термин «катионный» и «ионизируемый» в контексте липидов LNP является взаимозаменяемым, например, там, где ионизируемые липиды являются катионными в зависимости от pH.

[199] В некоторых вариантах воплощения изобретения LNP, связанные с gРНК, раскрытыми в данной заявке, используются для приготовления лекарственного средства для лечения заболевания или нарушения.

[200] Электропорация является известным средством доставки карго и любая методология электропорации может быть использована для доставки любой из описанных в данной заявке gРНК. В некоторых вариантах воплощения изобретения может использоваться электропорация для доставки любой из описанных в данной заявке gРНК и Cas9 или иРНК, кодирующей Cas9.

[201] В некоторых вариантах воплощения данное изобретение включает способ доставки любой из описанных в данной заявке gРНК в клетку *ex vivo*, где gРНК связана с LNP или не связана с LNP. В некоторых вариантах воплощения изобретения gРНК/LNP или gРНК также связаны с Cas9 или иРНК, кодирующими Cas9.

[202] В некоторых вариантах воплощения изобретения описанные в данной заявке композиции направляющей РНК, отдельно или закодированные на одном или нескольких векторах, составлены или вводятся через липидную наночастицу; см., например, WO/2017/173054, поданную 30 марта 2017 г. и опубликованную 10 мая 2017 г. под названием «ЛИПИДНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ ДЛЯ КОМПОНЕНТОВ CRISPR/CAS», содержание которой полностью включено в данную заявку посредством ссылки.

[203] В определенных вариантах воплощения данное изобретение включает векторы ДНК или РНК, кодирующие любую из направляющих РНК, содержащих любую одну или несколько направляющих последовательностей, описанных в данной заявке.

В некоторых вариантах воплощения изобретения, помимо последовательностей направляющих РНК, векторы дополнительно содержат нуклеиновые кислоты, которые не кодируют направляющие РНК. Нуклеиновые кислоты, которые не кодируют направляющую РНК, включают, но не ограничиваются приведенным, промоторы, энхансеры, регуляторные последовательности и нуклеиновые кислоты, кодирующие РНК-направляемую ДНК-нуклеазу, которая может быть нуклеазой, такой как Cas9. В некоторых вариантах воплощения изобретения вектор содержит одну или несколько нуклеотидных последовательностей, кодирующих sgРНК, trРНК или crРНК и trРНК. В некоторых вариантах воплощения изобретения вектор содержит одну или несколько нуклеотидных последовательностей, кодирующих sgРНК и иРНК, кодирующих РНК-направляемую ДНК-нуклеазу, которая может быть нуклеазой Cas, такой как Cas9 или Cpf1.

В некоторых вариантах воплощения изобретения вектор содержит одну или

несколько нуклеотидных последовательностей, кодирующих crРНК, trРНК и иРНК, кодирующую РНК-направляемую ДНК-нуклеазу, которая может быть белком Cas, например Cas9. На одном варианте воплощения изобретения Cas9 происходит из *Streptococcus pyogenes* (т.е. Spy Cas9).

В некоторых вариантах воплощения изобретения нуклеотидная последовательность, кодирующая crРНК, trРНК или crРНК и trРНК (которая может быть sgРНК), включает или состоит из направляющей последовательности, фланкированной всей или частью повторяющейся последовательности из естественной системы CRISPR/Cas. Нуклеиновая кислота, содержащая crРНК, trРНК или crРНК и trРНК или состоящая из них, может дополнительно содержать векторную последовательность, в которой векторная последовательность содержит или состоит из нуклеиновых кислот, которые в природе не встречаются, вместе с crРНК, trРНК или crРНК и trРНК.

[204] Данное описание и иллюстративные варианты воплощения изобретения не следует рассматривать как ограничивающие. Для целей данного описания и прилагаемой формулы изобретения, если не о иное, все числа, выражающие количества, проценты или пропорции, а также другие числовые значения, используемые в описании и формуле изобретения, следует понимать как модифицированные во всех случаях термином «приблизительно» в той степени, в которой они еще не были таким образом модифицированы.

Соответственно, если не о иное, числовые параметры, изложенные в нижеследующем описании и прилагаемой формуле изобретения, являются приблизительными, которые могут варьироваться в зависимости от желаемых свойств, которые должны быть получены. По меньшей мере, а не как попытка ограничить применение доктрины эквивалентов к объему формулы изобретения, каждый числовой параметр должен, по меньшей мере, толковаться ввиду количества сообщенных значащих цифр и с применением обычных способов округления.

[205] Следует отметить, что, как используется в данном описании и прилагаемой формуле изобретения, формы единственного числа, а также любое использование любого слова в единственном числе, включают ссылки на множественное число, если явно и недвусмысленно не ограничиваются одной ссылкой. Используемый в данной заявке термин «включать» и его грамматические варианты не предназначены для ограничения, так что перечисление элементов в списке не исключает других подобных элементов, которые могут быть заменены или добавлены к перечисленным элементам.

### **ПРИМЕРЫ**

[206] Следующие ниже примеры представлены для иллюстрации определенных раскрытых вариантов воплощения изобретения и никоим образом не должны истолковываться как ограничивающие объем этого раскрытия.

[207] Пример 1 - Материалы и способы

[208] Транскрипция *in vitro* («IVT») иРНК нуклеазы

[209] Кэпированная и полиаденилированная иРНК *Streptococcus pyogenes* («Spy»)

Cas9, содержащая N1-метилпсевдо-U, была получена транскрипцией *in vitro* с использованием линейризованной плазмидной ДНК-матрицы и РНК-полимеразы T7. Плазмидную ДНК, содержащую промотор T7 и последовательность для транскрипции (для получения иРНК, содержащей иРНК, описанную в данной заявке (см. SEQ ID NO: 501-515 в Таблице 24 ниже для примеров открытых рамок считывания), линейризовали путем инкубации при 37°C для полного расщепления с XbaI при следующих условиях: 200 нг/мкл плазмиды, 2 ед./мкл XbaI (NEB) и 1x реакционный буфер. XbaI инактивировали нагреванием реакционной смеси при 65° С в течение 20 минут.

Линейризованную плазмиду очищали от ферментов и буферных солей с использованием спин-колонки с силикагелем (Epoch Life Sciences) и анализировали с помощью агарозного геля для подтверждения линейризации. Реакцию IVT для генерации модифицированной иРНК Cas9 инкубировали при 37°C в течение 4 часов в следующих условиях: 50 нг/мкл линейризованной плазмиды; по 2 мМ каждого из GTP, ATP, CTP и N1-метилпсевдо-UTP (Trilink); 10 мМ ARCA (Trilink); 5 ед./мкл РНК-полимеразы T7 (NEB); 1 ед./мкл ингибитора мышинной РНКазы (NEB); 0,004 ед./мкл неорганической пирофосфатазы *E. coli* (NEB); и 1x реакционный буфер. После 4-часовой инкубации добавляли TURBO ДНКазу (ThermoFisher) до конечной концентрации 0,01 ед./мкл, и реакционную смесь инкубировали в течение дополнительных 30 минут для удаления матрицы ДНК. иРНК Cas9 очищали от фермента и нуклеотидов с использованием набора для очистки MegaClear Transcription Clean-up в соответствии с протоколом производителя (ThermoFisher). Альтернативно иРНК Cas9 очищали способом осаждения LiCl, за которым в некоторых случаях следовала дополнительная очистка фильтрацией в тангенциальном потоке. Концентрацию транскрипта определяли путем измерения поглощения света при 260 нм (Nanodrop), а транскрипт анализировали капиллярным электрофорезом с помощью Bioanalyzer (Agilent).

[210] Последовательность для транскрипции иРНК Cas9, используемая в Примерах, включала последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 501-515, как показано в Таблице 24.

[211] **Таблица 24:** Иллюстративные последовательности Cas9 иРНК

SEQ ID NO	Последовательность
501	GGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTTCGTGTGTGTGTCGT TGCAGGCCTTATTCGGATCCGCCACCATGGACAAGAAGTACAGCATCGG ACTGGACATCGGAACAAACAGCGTCCGGATGGGCAGTCATCACAGACGA ATACAAGGTCCCGAGCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAAACACAGACAG ACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTCGACAGCGGA GAAACAGCAGAAGCAACAAGACTGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGATAC ACAAGAAGAAAGAACAGAATCTGCTACCTGCAGGAAATCTTCAGCAACG



AAATGGCAAAGGTCGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAAAGCTT  
CCTGGTCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGATCTTCGGAAA  
CATCGTCGACGAAGTCGCATACCACGAAAAGTACCCGACAATCTACCAC  
CTGAGAAAGAAGCTGGTCGACAGCACAGACAAGGCAGACCTGAGACTG  
ATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCAAGTTCAGAGGACACTTCCTGAT  
CGAAGGAGACCTGAACCCGGACAACAGCGACGTCGACAAGCTGTTCATC  
CAGCTGGTCCAGACATAACAACCAGCTGTTCGAAGAAAACCCGATCAACG  
CAAGCGGAGTCGACGCAAAGGCAATCCTGAGCGCAAGACTGAGCAAGA  
GCAGAAGACTGGAAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGAAAAGAAGA  
ACGGACTGTTCGGAAACCTGATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACCGAA  
CTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCAGAAGACGCAAAGCTGCAGCTGAGC  
AAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCACAGATCGGA  
GACCAGTACGCAGACCTGTTCTGGCAGCAAAGAACCTGAGCGACGCAA  
TCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCAACACAGAAATCACAAAGGCACC  
GCTGAGCGCAAGCATGATCAAGAGATACGACGAACACCACCAGGACCT  
GACACTGCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGAAAAGTACAA  
GGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGATACGCAGGATACATCGAC  
GGAGGAGCAAGCCAGGAAGAATTCTACAAGTTCATCAAGCCGATCCTGG  
AAAAGATGGACGGAACAGAAGAAGTCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAG  
ACCTGCTGAGAAAGCAGAGAACATTCGACAACGGAAGCATCCCGCACCA  
GATCCACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAGACAGGAAGACTTC  
TACCCGTTCTGAAGGACAACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGACAT  
TCAGAATCCCGTACTACGTCGGACCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATT  
CGCATGGATGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAATCACACCGTGGAACTT  
CGAAGAAGTCGTCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAG  
AATGACAAACTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAAAGGTCCTGCCGAAG  
CACAGCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTCTACAACGAACTGACAAAGG  
TCAAGTACGTCACAGAAGGAATGAGAAAGCCGGCATTCTGAGCGGAG  
AACAGAAGAAGGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGG  
TCACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATCGAATGCTT  
CGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGATTCAACGCAAGCCTG  
GGAACATAACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGG  
ACAACGAAGAAAACGAAGACATCCTGGAAGACATCGTCCTGACACTGAC  
ACTGTTCGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACGC  
ACACCTGTTCGACGACAAGGTCATGAAGCAGCTGAAGAGAAGAAGATA

CACAGGATGGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGAATCAGAGA  
CAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGACGGATTC  
GCAAACAGAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACATTCA  
AGGAAGACATCCAGAAGGCACAGGTCAGCGGACAGGGAGACAGCCTGC  
ACGAACACATCGCAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCAATCAAGAAGGGAA  
TCCTGCAGACAGTCAAGGTCGTCGACGAACTGGTCAAGGTCATGGGAAG  
ACACAAGCCGGAAAACATCGTCATCGAAATGGCAAGAGAAAACCAGAC  
AACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAAGAATGAAGAGAATCG  
AAGAAGGAATCAAGGAACTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGG  
TCGAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCA  
GAACGGAAGAGACATGTACGTCGACCAGGAACTGGACATCAACAGACT  
GAGCGACTACGACGTCGACCACATCGTCCCGCAGAGCTTCCTGAAGGAC  
GACAGCATCGACAACAAGGTCCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGA  
AAGAGCGACAACGTCCCGAGCGAAGAAGTCGTCAAGAAGATGAAGAAC  
TACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAAGCTGATCACACAGAGAAAGTTCC  
ACAACCTGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACTGAGCGAACTGGACAAGG  
CAGGATTCATCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAGACAGATCACAAAGC  
ACGTCGCACAGATCCTGGACAGCAGAATGAACACAAAGTACGACGAAA  
ACGACAAGCTGATCAGAGAAGTCAAGGTCATCACACTGAAGAGCAAGCT  
GGTCAGCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTCAGAGAAATC  
AACAACTACCACCACGCACACGACGCATACCTGAACGCAGTCGTCGGAA  
CAGCACTGATCAAGAAGTACCCGAAGCTGGAAAGCGAATTCGTCTACGG  
AGACTACAAGGTCTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAGAGCGAACA  
GGAAATCGGAAAGGCAACAGCAAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATG  
AACTTCTTCAAGACAGAAATCACACTGGCAAACGGAGAAATCAGAAAG  
AGACCGCTGATCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGAC  
AAGGGAAGAGACTTCGCAACAGTCAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGCAG  
GTCAACATCGTCAAGAAGACAGAAGTCCAGACAGGAGGATTCAGCAAG  
GAAAGCATCCTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCTGATCGCAAGAAAG  
AAGGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGATTCGACAGCCCGACAGTC  
GCATACAGCGTCCTGGTCGTCGCAAAGGTCGAAAAGGGAAAGAGCAAG  
AAGCTGAAGAGCGTCAAGGAACTGCTGGGAATCACAAATCATGGAAAGA  
AGCAGCTTCGAAAAGAACCCGATCGACTTCCTGGAAGCAAAGGGATACA  
AGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCTGTT  
CGAACTGGAAAACGGAAGAAAGAGAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACT

	<p>GCAGAAGGGAAACGAACTGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCCTG  TACCTGGCAAGCCACTACGAAAAGCTGAAGGGAAGCCCGGAAGACAAC  GAACAGAAGCAGCTGTTCGTTCGAACAGCACAAGCACTACCTGGACGAAA  TCATCGAACAGATCAGCGAATTCAGCAAGAGAGTTCATCCTGGCAGACGC  AAACCTGGACAAGGTCCTGAGCGCATAACAAGCACAGAGACAAGCC  GATCAGAGAACAGGCAGAAAACATCATCCACCTGTTTCACTGACAAAC  CTGGGAGCACCCGGCAGCATTCAAGTACTTCGACACAACAATCGACAGAA  AGAGATACACAAGCACAAAGGAAGTCTGGACGCAACACTGATCCACC  AGAGCATCACAGGACTGTACGAAACAAGAATCGACCTGAGCCAGCTGG  GAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGTCTAGCTAG  CCATCACATTTAAAAGCATCTCAGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAGAA  AATGAAGATCAATAGCTTATTCATCTCTTTTTCTTTTTCTGTTGGTGTAAG  CCAACACCCTGTCTAAAAAACATAAATTTCTTTAATCATTTTGCCTCTTTT  CTCTGTGCTTCAATTAATAAAAAATGGAAAGAACCTCGAG</p>
502	<p>AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGACAUCGGAACAAACAGCGU  CGGAUUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUACAAGGUCCCGAGCAAGAAGU  UCAAGGUCCUGGGAAACACAGACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGA  UCGGAGCACUGCUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGAC  UGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGAUACACAAGAAGAAGAACAGAAUC  UGC UACCUGCAGGAAAUCUUCAGCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGAC  AGCUUCUCCACAGACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAA  GAAGCACGAAAGACACCCGAUCUUCGGAAACAUCGUCGACGAAGUCGC  AUACCACGAAAAGUACCCGACAAUCUACCACCUGAGAAAGAAGCUGGU  CGACAGCACAGACAAGGCAGACCUGAGACUGAUCUACCUGGCACUGGC  ACACAUGAUCAAGUUCAGAGGACACUUCUGAUCGAAGGAGACCUGA  ACCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUCAUCCAGCUGGUCCAGA  CAUACAACCAGCUGUUCGAAGAAAACCCGAUCAACGCAAGCGGAGUCG  ACGCAAAGGCAAUCCUGAGCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUG  GAAAACCUGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACUGUU  CGGAAACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACACCCGAACUUCAAGAG  CAACUUCGACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACAC  AUACGACGACGACCUGGACAACCUGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGUA  CGCAGACCUGUUCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUCCUGCU  GAGCGACAUCCUGAGAGUCAACACAGAAAUCACAAAGGCACCGCUGAG  CGCAAGCAUGAUCAAGAGAUACGACGAACACCACCAGGACCUGACACU</p>

GCUGAAGGCACUGGUCAGACAGCAGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAA  
UCUUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGAUACGCAGGAUACAUCGACGGAG  
GAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAGUUCAUCAAGCCGAUCCUGGAA  
AAGAUGGACGGAACAGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAGA  
CCUGCUGAGAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGAAGCAUCCCGCACCA  
GAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAGACAGGAAGACUU  
CUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAGAAAAGAUUCGAAAAGAUCCUGAC  
AUUCAGAAUCCCGUACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAACAGCAG  
AUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAUCACACCGUGGA  
ACUUCGAAGAAGUCGUCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCG  
AAAGAAUGACAAACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGC  
CGAAGCACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACUGA  
CAAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAAUGAGAAAGCCGGCAUCCUG  
AGCGGAGAACAGAAGAAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUUCAAGACAAA  
CAGAAAGGUCACAGUCAAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUCAAGAAGA  
UCGAAUGCUUCGACAGCGUCGAAAUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUUC  
AACGCAAGCCUGGGAACAUACCACGACCUGCUGAAGAUCAUCAAGGAC  
AAGGACUUCUGGACAACGAAGAAAACGAAGACAUCCUGGAAGACAU  
CGUCCUGACACUGACACUGUUCGAAGACAGAGAAAUGAUCGAAGAAA  
GACUGAAGACAUACGCACACCUGUUCGACGACAAGGUCAUGAAGCAGC  
UGAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAGCAGAAAGCUG  
AUCAACGGAAUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUGGACUU  
CCUGAAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAUGCAGCUGAUCCA  
CGACGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGACAUCCAGAAGGCACAGGUCAG  
CGGACAGGGAGACAGCCUGCACGAACACAUCGCAAACCUGGCAGGAAG  
CCCGGCAAUCAAGAAGGGAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGA  
ACUGGUCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAUCGUCAUCG  
AAAUGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGC  
AGAGAAAGAAUGAAGAGAAUUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAG  
CCAGAUCCUGAAGGAACACCCGGUCGAAAACACACAGCUGCAGAACGA  
AAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGAAGAGACAUGUACGUCG  
ACCAGGAACUGGACAUCAACAGACUGAGCGACUACGACGUCGACCACA  
UCGUCCCGCAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGACAACAAGGUCC  
UGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAACGUCCCGAGC  
GAAGAAGUCGUCAAGAAGAUGAAGAACUACUGGAGACAGCUGCUGAA

	<p>CGCAAAGCUGAUCACACAGAGAAAGUUCGACAACCUGACAAAGGCAGA  GAGAGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAGAGAC  AGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCACAAAGCACGUCGCACAGAUCUCCUGG  ACAGCAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUCAGA  GAAGUCAAGGUCAUCACACUGAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUCAG  AAAGGACUUCAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUACCACCA  CGCACACGACGCAUACCUGAACGCAGUCGUCGGAACAGCACUGAUCAA  GAAGUACCCGAAGCUGGAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGG  UCUACGACGUCAGAAAGAUGAUCGCAAAGAGCGAACAGGAAAUCGGA  AAGGCAACAGCAAAGUACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUCUUC  AAGACAGAAAUCACACUGGCAAACGGAGAAAUCAGAAAGAGACCGCU  GAUCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAAUCGUCUGGGACAAGGGAA  GAGACUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCAUGCCGCAGGUCAACA  UCGUCAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAAGGAAAGC  AUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUGAUCGCAAGAAAGAAGGA  CUGGGACCCGAAGAAGUACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUA  CAGCGUCCUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGC  UGAAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUCAUGGAAAGAAGC  AGCUUCGAAAAGAACCCGAUCGACUUCUCCUGGAAGCAAAGGGAUACAA  GGAAGUCAAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGU  UCGAACUGGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGCGCAGGAGAA  CUGCAGAAGGGAAACGAACUGGCACUGCCGAGCAAGUACGUCAACUUC  CUGUACCUGGCAAGCCACUACGAAAAGCUGAAGGGAAAGCCCGGAAGAC  AACGAACAGAAGCAGCUGUUCGUCGAACAGCACAAGCACUACCUGGAC  GAAAUCAUCGAACAGAUACGCGAAUUCAGCAAGAGAGUCAUCCUGGC  AGACGCAAACCUGGACAAGGUCCUGAGCGCAUACAACAAGCACAGAGA  CAAGCCGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUCCACCUGUUCACACU  GACAAACCUGGGAGCACCGGCAGCAUUCAAGUACUUCGACACAACAAU  CGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUGGACGCAACACU  GAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUACGAAACAAGAAUCGACCUGAG  CCAGCUGGGAGGAGACUAG</p>
503	<p>GACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGACAUCGGAACAAACAGCGUCGG  AUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUACAAGGUCCCGAGCAAGAAGUUCA  AGGUCCUGGGAAACACAGACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCG  GAGCACUGCUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACUG</p>

AAGAGAACAGCAAGAAGAAGAUACACAAGAAGAAAGAACAGAAUCUG  
CUACCUGCAGGAAAUCUUCAGCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAG  
CUUCUUCCACAGACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAGA  
AGCACGAAAGACACCCGAUCUUCGAAACAUCGUCGACGAAGUCGCAU  
ACCACGAAAAGUACCCGACAAUCUACCACCUGAGAAAGAAGCUGGUCG  
ACAGCACAGACAAGGCAGACCUGAGACUGAUCUACCUGGCACUGGCAC  
ACAUGAUCAAGUUCAGAGGACACUUCCUGAUCGAAGGAGACCUGAACC  
CGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUCAUCCAGCUGGUCCAGACAU  
ACAACCAGCUGUUCGAAGAAAACCCGAUCAACGCAAGCGGAGUCGACG  
CAAAGGCAAUCCUGAGCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUGGAA  
AACCUGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACUGUUCGG  
AAACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACACCGAACUUCAAGAGCAA  
CUUCGACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUA  
CGACGACGACCUGGACAACCUGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGUACGC  
AGACCUGUUCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUCCUGCUGAG  
CGACAUCCUGAGAGUCAACACAGAAAUCACAAAGGCACCGCUGAGCGC  
AAGCAUGAUCAAGAGAUACGACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCU  
GAAGGCACUGGUCAGACAGCAGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUCU  
UCUUCGACCAGAGCAAGAACGGAUACGCAGGAUACAUCGACGGAGGA  
GCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAGUUCAUCAAAGCCGAUCCUGGAAAA  
GAUGGACGGAACAGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAGACC  
UGCUGAGAAAGCAGAGAACAUCGACAACGGAAGCAUCCCGCACCAGA  
UCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAGACAGGAAGACUUCU  
ACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAGAAAAGAU CGAAAAGAUCCUGACA  
UUCAGAAUCCCGUACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAACAGCAGA  
UUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAUCACACCGUGGAA  
CUUCGAAGAAGUCGUCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGA  
AAGAAUGACAAACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCC  
GAAGCACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACUGAC  
AAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAAUGAGAAAGCCGGCAUUCUGA  
GCGGAGAACAGAAGAAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUUCAAGACAAAC  
AGAAAGGUCACAGUCAAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUCAAGAAGAU  
CGAAUGCUUCGACAGCGUCGAAAUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUUCA  
ACGCAAGCCUGGGAACAUACCACGACCUGCUGAAGAUCAUCAAGGACA  
AGGACUUCUGGACAACGAAGAAAACGAAGACAUCCUGGAAGACAUC

GUCCUGACACUGACACUGUUCGAAGACAGAGAAAUGAUCGAAGAAAG  
ACUGAAGACAUACGCACACCCUGUUCGACGACAAGGUCAUGAAGCAGCU  
GAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUUGGGGAAGACUGAGCAGAAAGCUGA  
UCAACGGAAUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUGGACUUC  
UGAAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAUGCAGCUGAUCCACG  
ACGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGACAUCCAGAAGGCACAGGUCAGCG  
GACAGGGAGACAGCCUGCACGAACACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCC  
CGGCAAUCAAGAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAAC  
UGGUCAAGGUCAUGGGAAAGACACAAGCCGGAAAACAUCGUCAUCGAA  
AUGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAG  
AGAAAGAAUGAAGAGAAUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAAGCC  
AGAUCCUGAAGGAACACCCGGUCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAA  
AGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGAAGAGACAUGUACGUCGACC  
AGGAACUGGACAUCAACAGACUGAGCGACUACGACGUCGACCACAUCG  
UCCCGCAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGACAACAAGGUCCUGA  
CAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAACGUCCCGAGCGAA  
GAAGUCGUCAAGAAGAUGAAGAACUACUGGAGACAGCUGCUGAACGC  
AAAGCUGAUCACACAGAGAAAGUUCGACAACCUGACAAAGGCAGAGA  
GAGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAGAGACAG  
CUGGUCGAAACAAGACAGAUCACAAAGCACGUCGCACAGA UCCUGGAC  
AGCAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUCAGAGA  
AGUCAAGGUCAUCACACUGAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAA  
AGGACUUC CAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUACCACCAG  
CACACGACGCAUACCUGAACGCAGUCGUCGGAACAGCACUGAUCAAGA  
AGUACCCGAAGCUGGAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGUC  
UACGACGUCAGAAAGAUGAUCGCAAAGAGCGAACAGGAAAUCGGAAA  
GGCAACAGCAAAGUACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUCUCAA  
GACAGAAAUCACACUGGCAAACGGAGAAAUCAGAAAGAGACCGCUGA  
UCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAAUCGUCUGGGACAAGGGAAGA  
GACUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCAUGCCGCAGGUCAACAUC  
GUCAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAAGGAAAGCAU  
CCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUGAUCGCAAGAAAGAAGGACU  
GGGACCCGAAGAAGUACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUACA  
GCGUCCUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCUG  
AAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUCAUGGAAAGAAGCAG

	<p>CUUCGAAAAGAACCCGAUCGACUUCUGGAAGCAAAGGGAUACAAGG  AAGUCAAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCG  AACUGGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGCGCAGGAGAACUG  CAGAAGGGAAACGAACUGGCACUGCCGAGCAAGUACGUCAACUUCUG  UACCUGGCAAGCCACUACGAAAAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACAAC  GAACAGAAGCAGCUGUUCGUCGAACAGCACAAGCACUACCUGGACGAA  AUCAUCGAACAGAUCAGCGAAUUCAGCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGAC  GCAAACCUGGACAAGGUCCUGAGCGCAUACAACAAGCACAGAGACAAG  CCGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUCCACCUGUUCACACUGACA  AACCUGGGAGCACCGGCAGCAUUCAAGUACUUCGACACAACAUCGAC  AGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUGGACGCAACACUGAU  CCACCAGAGCAUCACAGGACUGUACGAAACAAGAAUCGACCUGAGCCA  GCUGGGAGGAGAC</p>
504	<p>AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGACAUCGGAACAAACAGCGU  CGGAUUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUACAAGGUCCCAGCAAGAAGU  UCAAGGUCCUGGGAAACACAGACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGA  UCGGAGCACUGCUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGAC  UGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGAUACACAAGAAGAAAGAACAGAAUC  UGC UACCUGCAGGAAAUCUUCAGCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGAC  AGCUUCUCCACAGACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAA  GAAGCACGAAAGACACCCGAUCUUCGGAAACAUCGUCGACGAAGUCGC  AUACCACGAAAAGUACCCGACAUCUACCACCUGAGAAAGAAGCUGGU  CGACAGCACAGACAAGGCAGACCUGAGACUGAUCUACCUGGCACUGGC  ACACAUGAUCAAGUUCAGAGGACACUCCUGAUCGAAGGAGACCUGA  ACCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUCAUCCAGCUGGUCCAGA  CAUACAACCAGCUGUUCGAAGAAAACCCGAUCAACGCAAGCGGAGUCG  ACGCAAAGGCAAUCCUGAGCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUG  GAAAACCUGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACUGUU  CGGAAACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACACCCGAACUUCAAGAG  CAACUUCGACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACAC  AUACGACGACGACCUGGACAACCUGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGUA  CGCAGACCUGUUCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUCCUGCU  GAGCGACAUCUGAGAGUCAACACAGAAAUCACAAAGGCACCGCUGAG  CGCAAGCAUGAUCAAGAGAUACGACGAACACCACCAGGACCUGACACU  GCUGAAGGCACUGGUCAGACAGCAGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAA</p>



UCUUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGAUACGCAGGAUACAUCGACGGAG  
GAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAGUUCAUCAAGCCGAUCCUGGAA  
AAGAUGGACGGAACAGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAGA  
CCUGCUGAGAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGAAGCAUCCCGCACCA  
GAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAGACAGGAAGACUU  
CUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAGAAAAGAUCGAAAAGAUCUGAC  
AUUCAGAAUCCCGUACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAACAGCAG  
AUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAUCACACCGUGGA  
ACUUCGAAGAAGUCGUCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCG  
AAAGAAUGACAAACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGC  
CGAAGCACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACUGA  
CAAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAAUGAGAAAGCCGGCAUCCUG  
AGCGGAGAACAGAAGAAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUUCAAGACAAA  
CAGAAAGGUCACAGUCAAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUCAAGAAGA  
UCGAAUGCUUCGACAGCGUCGAAAUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUUC  
AACGCAAGCCUGGGAACAUACCACGACCUGCUGAAGAUCAUCAAGGAC  
AAGGACUUCUGGACAACGAAGAAAACGAAGACAUCCUGGAAGACAU  
CGUCCUGACACUGACACUGUUCGAAGACAGAGAAAUGAUCGAAGAAA  
GACUGAAGACAUAACGCACACCUGUUCGACGACAAGGUCAUGAAGCAGC  
UGAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAGCAGAAAGCUG  
AUCAACGGAAUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUGGACUU  
CCUGAAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAUGCAGCUGAUCCA  
CGACGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGACAUCCAGAAGGCACAGGUCAG  
CGGACAGGGAGACAGCCUGCACGAACACAUCGCAAACCUGGCAGGAAG  
CCCGGCAAUCAAGAAGGGAUCCUGCAGACAGUCAAGGUUCGUCGACGA  
ACUGGUCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAAACAUCGUCAUCG  
AAAUGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGC  
AGAGAAAGAAUGAAGAGAAUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAG  
CCAGAUCUGAAGGAACACCCGGUCGAAAACACACAGCUCGAGAACGA  
AAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGAAGAGACAUGUACGUCG  
ACCAGGAACUGGACAUCAACAGACUGAGCGACUACGACGUCGACCACA  
UCGUCCCGCAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGACAACAAGGUCC  
UGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAACGUCCCGAGC  
GAAGAAGUCGUCAAGAAGAUGAAGAACUACUGGAGACAGCUCUGAA  
CGCAAAGCUGAUCACACAGAGAAAGUUCGACAACCUGACAAAGGCAGA

	<p>GAGAGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAGAGAC  AGCUGGUCGAAACAAGACAGAUACAAAGCACGUCGCACAGAUCCUGG  ACAGCAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUCAGA  GAAGUCAAGGUCAUCACACUGAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUCAG  AAAGGACUCCAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUACCACCA  CGCACACGACGCAUACCUGAACGCAGUCGUCGGAACAGCACUGAUCAA  GAAGUACCCGAAGCUGGAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGG  UCUACGACGUCAGAAAGAUGAUCGCAAAGAGCGAACAGGAAAUCGGA  AAGGCAACAGCAAAGUACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUCUUC  AAGACAGAAAUCACACUGGCAAACGGAGAAAUCAGAAAGAGACCGCU  GAUCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAAUCGUCUGGGACAAGGGAA  GAGACUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCAUGCCGCAGGUCAACA  UCGUCAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAAGGAAAGC  AUCCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUGAUCGCAAGAAAGAAGGA  CUGGGACCCGAAGAAGUACGGAGGAUUCGACAGCCCAGAGUCGCAUA  CAGCGUCCUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGC  UGAAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUCAUGGAAAGAAGC  AGCUUCGAAAAGAACCCGAUCGACUUCUGGAAGCAAAGGGAUACAA  GGAAGUCAAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGU  UCGAACUGGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGCGCAGGAGAA  CUGCAGAAGGGAAACGAACUGGCACUGCCGAGCAAGUACGUCAACUUC  CUGUACCUGGCAAGCCACUACGAAAAGCUGAAGGGAAAGCCCAGGAAAGC  AACGAACAGAAGCAGCUGUUCGUCGAAACAGCACAAAGCACUACCUGGAC  GAAAUCAUCGAACAGAUACAGCGAAUUCAGCAAGAGAGUCAUCCUGGC  AGACGCAAACCUGGACAAGGUCCUGAGCGCAUACAACAAGCACAGAGA  CAAGCCGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUCCACCUGUUCACACU  GACAAACCUGGGAGCACCGGCAGCAUUCAAGUACUUCGACACAACAAU  CGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAAGGAAGUCCUGGACGCAACACU  GAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUACGAAACAAGAAUCGACCUGAG  CCAGCUGGGAGGAGACGGAAGCGGAAGCCCAGAAAGAAGAGAAAGG  UCGACGGAAGCCCAGAAAGAAGAGAAAGGUCGACAGCGGAUAG</p>
505	<p>GACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGACAUCGGAACAAACAGCGUCGG  AUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUACAAGGUCCCAGCAAGAAGUUCA  AGGUCCUGGGAAACACAGACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCG  GAGCACUGCUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACUG</p>

AAGAGAACAGCAAGAAGAAGAUACACAAGAAGAAAGAACAGAAUCUG  
CUACCUGCAGGAAAUCUUCAGCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAG  
CUUCUUCCACAGACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAGA  
AGCACGAAAGACACCCGAUCUUCGAAACAUCGUCGACGAAGUCGCAU  
ACCACGAAAAGUACCCGACAAUCUACCACCUGAGAAAGAAGCUGGUCG  
ACAGCACAGACAAGGCAGACCUGAGACUGAUCUACCUGGCACUGGCAC  
ACAUGAUCAAGUUCAGAGGACACUUCCUGAUCGAAGGAGACCUGAACC  
CGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUCAUCCAGCUGGUCCAGACAU  
ACAACCAGCUGUUCGAAGAAAACCCGAUCAACGCAAGCGGAGUCGACG  
CAAAGGCAAUCCUGAGCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUGGAA  
AACCUGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACUGUUCGG  
AAACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACACCGAACUUCAAGAGCAA  
CUUCGACCUGGCAGAAGACGCAAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUA  
CGACGACGACCUGGACAACCUGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGUACGC  
AGACCUGUUCUCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCAAUCCUGCUGAG  
CGACAUCCUGAGAGUCAACACAGAAAUCACAAAGGCACCGCUGAGCGC  
AAGCAUGAUCAAGAGAUACGACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCU  
GAAGGCACUGGUCAGACAGCAGCUGCCGGAAAAGUACAAGGAAAUCU  
UCUUCGACCAGAGCAAGAACGGAUACGCAGGAUACAUCGACGGAGGA  
GCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAGUUCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAA  
GAUGGACGGAACAGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAGACC  
UGCUGAGAAAGCAGAGAACAUCGACAACGGAAGCAUCCCGCACCAGA  
UCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAGACAGGAAGACUUCU  
ACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAGAAAAGAU CGAAAAGAUCCUGACA  
UUCAGAAUCCCGUACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAACAGCAGA  
UUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAUCACACCGUGGAA  
CUUCGAAGAAGUCGUCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGA  
AAGAAUGACAAACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCC  
GAAGCACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACGAACUGAC  
AAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAAUGAGAAAGCCGGCAUUCUGA  
GCGGAGAACAGAAGAAGGCAAUCGUCGACCUGCUGUUCAAGACAAAC  
AGAAAGGUCACAGUCAAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUCAAGAAGAU  
CGAAUGCUUCGACAGCGUCGAAAUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUUCA  
ACGCAAGCCUGGGAACAUAACCACGACCUGCUGAAGAUCAUCAAGGACA  
AGGACUUCUCCUGGACAACGAAGAAAACGAAGACAUCCUGGAAGACAUC

GUCCUGACACUGACACUGUUCGAAGACAGAGAAAUGAUCGAAGAAAG  
ACUGAAGACAUACGCACACCCUGUUCGACGACAAGGUCAUGAAGCAGCU  
GAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUUGGGGAAGACUGAGCAGAAAGCUGA  
UCAACGGAAUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUGGACUUC  
UGAAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAUGCAGCUGAUCCACG  
ACGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGACAUCCAGAAGGCACAGGUCAGCG  
GACAGGGAGACAGCCUGCACGAACACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCC  
CGGCAAUCAAGAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAAC  
UGGUCAAGGUCAUGGGAAAGACACAAGCCGGAAAACAUCGUCAUCGAA  
AUGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAG  
AGAAAGAAUGAAGAGAAUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAAGCC  
AGAUCCUGAAGGAACACCCGGUCGAAAACACACAGCUGCAGAACGAAA  
AGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGAAGAGACAUGUACGUCGACC  
AGGAACUGGACAUCAACAGACUGAGCGACUACGACGUCGACCACAUCG  
UCCCGCAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGACAACAAGGUCCUGA  
CAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAACGUCCCGAGCGAA  
GAAGUCGUCAAGAAGAUGAAGAACUACUGGAGACAGCUGCUGAACGC  
AAAGCUGAUCACACAGAGAAAGUUCGACAACCUGACAAAGGCAGAGA  
GAGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAGAGACAG  
CUGGUCGAAACAAGACAGAUCAAAAGCACGUCGCACAGAUCCUGGAC  
AGCAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUCAGAGA  
AGUCAAGGUCAUCACACUGAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAA  
AGGACUUC CAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAACUACCACCACG  
CACACGACGCAUACCUGAACGCAGUCGUCGGAACAGCACUGAUCAAGA  
AGUACCCGAAGCUGGAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGUC  
UACGACGUCAGAAAGAUGAUCGCAAAGAGCGAACAGGAAAUCGGAAA  
GGCAACAGCAAAGUACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUCUCAA  
GACAGAAAUCACACUGGCAAACGGAGAAAUCAGAAAGAGACCGCUGA  
UCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAAUCGUCUGGGACAAGGGGAAGA  
GACUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCAUGCCGCAGGUCAACAUC  
GUCAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAAGGAAAGCAU  
CCUGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUGAUCGCAAGAAAGAAGGACU  
GGGACCCGAAGAAGUACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUACA  
GCGUCCUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCUG  
AAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAAUCACAAUCAUGGAAAGAAGCAG

	<p>CUUCGAAAAGAACCCGAUCGACUUCUGGAAGCAAAGGGAUACAAGG  AAGUCAAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCCUGUUCG  AACUGGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGCAAGCGCAGGAGAACUG  CAGAAGGGAAACGAACUGGCACUGCCGAGCAAGUACGUCAACUUCUG  UACCUGGCAAGCCACUACGAAAAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACAAC  GAACAGAAGCAGCUGUUCGUCGAACAGCACAAGCACUACCUGGACGAA  AUCAUCGAACAGAUACAGCGAAUUCAGCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGAC  GCAAACCUGGACAAGGUCCUGAGCGCAUACAACAAGCACAGAGACAAG  CCGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUCCACCUGUUCACACUGACA  AACCUGGGAGCACCGGCAGCAUUCAAGUACUUCGACACAACAAUCGAC  AGAAAGAGAUACACAAGCACAAGGAAGUCCUGGACGCAACACUGAU  CCACCAGAGCAUCACAGGACUGUACGAAACAAGAAUCGACCUGAGCCA  GCUGGGAGGAGACGGAAGCGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGUCG  ACGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGUUCGACAGCGGA</p>
506	<p>GGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTTCGTGTGTGTGTCGT  TGCAGGCCTTATTCGGATCCATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGA  CATCGGAACAAACAGCGTCCGATGGGCAGTCATCACAGACGAATACAA  GGTCCCGAGCAAGAAGTTCAAGGTCTTGGGAAACACAGACAGACACAG  CATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTTCGACAGCGGAGAAACA  GCAGAAGCAACAAGACTGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGATACACAAGA  AGAAAGAACAGAATCTGCTACCTGCAGGAAATCTTCAGCAACGAAATGG  CAAAGGTCGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAAAGCTTCTTGGT  CGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGATCTTCGGAAACATCGT  CGACGAAGTCGCATACCACGAAAAGTACCCGACAATCTACCACCTGAGA  AAGAAGCTGGTCGACAGCACAGACAAGGCAGACCTGAGACTGATCTACC  TGGCACTGGCACACATGATCAAGTTCAGAGGACACTTCTGATCGAAGG  AGACCTGAACCCGGACAACAGCGACGTCGACAAGCTGTTCATCCAGCTG  GTCCAGACATAACCAGCTGTTTGAAGAAAACCCGATCAACGCAAGCG  GAGTCGACGCAAAGGCAATCCTGAGCGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAA  GACTGGAAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGAC  TGTTTCGGAAACCTGATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACCGAACTTCAA  GAGCAACTTCGACCTGGCAGAAGACGCAAAGCTGCAGCTGAGCAAGGA  CACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCACAGATCGGAGACCAG  TACGCAGACCTGTTCCTGGCAGCAAAGAACCTGAGCGACGCAATCCTGC  TGAGCGACATCCTGAGAGTCAACACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAG</p>

CGCAAGCATGATCAAGAGATACGACGAACACCACCAGGACCTGACACTG  
CTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGAAAAGTACAAGGAAATCT  
TCTTCGACCAGAGCAAGAACGGATACGCAGGATACATCGACGGAGGAG  
CAAGCCAGGAAGAATTCTACAAGTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGAT  
GGACGGAACAGAAGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGACCTGCT  
GAGAAAGCAGAGAACATTCGACAACGGAAGCATCCCGCACCAGATCCA  
CCTGGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAGACAGGAAGACTTCTACCCG  
TTCCTGAAGGACAACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGACATTCAGAA  
TCCCGTACTACGTCGGACCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTCGCATG  
GATGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAATCACACCGTGGAACCTTCGAAGA  
AGTCGTCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGAATGAC  
AAACTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAAAGGTCCTGCCGAAGCACAGC  
CTGCTGTACGAATACTTCACAGTCTACAACGAACTGACAAAGGTCAAGT  
ACGTCACAGAAGGAATGAGAAAGCCGGCATTCTGAGCGGAGAACAGA  
AGAAGGCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTCACAGT  
CAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATCGAATGCTTCGACAGC  
GTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGATTCAACGCAAGCCTGGGAACAT  
ACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCTGGAACAACGA  
AGAAAACGAAGACATCCTGGAAGACATCGTCCTGACACTGACACTGTTC  
GAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATACGCACACCTG  
TTCGACGACAAGGTCATGAAGCAGCTGAAGAGAAGAAGATACACAGGA  
TGGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGAATCAGAGACAAGCAG  
AGCGGAAAGACAATCCTGGACTTCTGAAGAGCGACGGATTCGCAAACA  
GAAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACATTCAAGGAAGA  
CATCCAGAAGGCACAGGTCAGCGGACAGGGAGACAGCCTGCACGAACA  
CATCGCAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCAATCAAGAAGGGAATCCTGCA  
GACAGTCAAGGTCGTCGACGAACTGGTCAAGGTCATGGGAAGACACAA  
GCCGAAAACATCGTCATCGAAATGGCAAGAGAAAACCAGACAACACA  
GAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAATGAAGAGAATCGAAGAAG  
GAATCAAGGAACTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCGAAA  
ACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGG  
AAGAGACATGTACGTCGACCAGGAACTGGACATCAACAGACTGAGCGA  
CTACGACGTCGACCACATCGTCCCGCAGAGCTTCTGAAGGACGACAGC  
ATCGACAACAAGGTCCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGC  
GACAACGTCCCGAGCGAAGAAGTCGTCAAGAAGATGAAGAACTACTGG

AGACAGCTGCTGAACGCAAAGCTGATCACACAGAGAAAGTTCGACAACC  
TGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACTGAGCGAACTGGACAAGGCAGGAT  
TCATCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAGACAGATCACAAAGCACGTCGC  
ACAGATCCTGGACAGCAGAATGAACACAAAGTACGACGAAAACGACAA  
GCTGATCAGAGAAGTCAAGGTCATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGC  
GACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTCAGAGAAATCAACAAC  
ACCACCACGCACACGACGCATACCTGAACGCAGTCGTCGGAACAGCACT  
GATCAAGAAGTACCCGAAGCTGGAAAGCGAATTCGTCTACGGAGACTAC  
AAGGTCTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAGAGCGAACAGGAAATC  
GGAAAGGCAACAGCAAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTCT  
TCAAGACAGAAATCACACTGGCAAACGGAGAAATCAGAAAGAGACCGC  
TGATCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAGGGAA  
GAGACTTCGCAACAGTCAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGCAGGTCAACAT  
CGTCAAGAAGACAGAAGTCCAGACAGGAGGATTCAGCAAGGAAAGCAT  
CCTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCTGATCGCAAGAAAGAAGGACTG  
GGACCCGAAGAAGTACGGAGGATTCGACAGCCCGACAGTCGCATACAG  
CGTCTGGTCGTCGCAAAGGTCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTGAA  
GAGCGTCAAGGAACTGCTGGGAATCACAATCATGGAAAGAAGCAGCTTC  
GAAAAGAACCCGATCGACTTCTGGAAGCAAAGGGATACAAGGAAGTC  
AAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCTGTTCGAACTGG  
AAAACGGAAGAAAGAGAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGAAGG  
GAAACGAACTGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCTGTACCTGGC  
AAGCCACTACGAAAAGCTGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAA  
GCAGCTGTTCGTCGAACAGCACAAGCACTACCTGGACGAAATCATCGAA  
CAGATCAGCGAATTCAGCAAGAGAGTCATCCTGGCAGACGCAAACCTGG  
ACAAGGTCCTGAGCGCATAACAACAAGCACAGAGACAAGCCGATCAGAG  
AACAGGCAGAAAACATCATCCACCTGTTCACACTGACAAACCTGGGAGC  
ACCGGCAGCATTCAAGTACTTCGACACAACAATCGACAGAAAGAGATAC  
ACAAGCACAAAGGAAGTCCTGGACGCAACACTGATCCACCAGAGCATCA  
CAGGACTGTACGAAACAAGAATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACG  
GAGGAGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGTCTAGCTAGCCATCACAT  
TTAAAAGCATCTCAGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAGAAAATGAAGAT  
CAATAGCTTATTCATCTCTTTTTCTTTTTTCGTTGGTGTAAGCCAACACCC  
TGTCTAAAAAACATAAATTTCTTTAATCATTTTGCCTCTTTTCTCTGTGCT  
TCAATTAATAAAAAATGGAAAGAACCTCGAG

507

ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAAACAGCGTC  
GGATGGGCAGTCATCACAGACGAATACAAGGTCCCGAGCAAGAAGTTCA  
AGGTCCTGGGAAACACAGACAGACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCG  
GAGCACTGCTGTTTCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACTGA  
AGAGAACAGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAAGAACAGAATCTGCT  
ACCTGCAGGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAAAGGTCGACGACAGCTT  
CTTCCACcggCTGGAAGAAAGCTTCTGGTTCGAAGAAGACAAGAAGCACG  
AAAGACACCCGATCTTCGGAAACATCGTCGACGAAGTCGCATACCACGA  
AAAGTACCCGACAATCTACCACCTGAGAAAGAAGCTGGTCGACAGCACA  
GACAAGGCAGACCTGAGACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCA  
AGTTCAGAGGACACTTCTGATCGAAGGAGACCTGAACCCGGACAACAG  
CGACGTCGACAAGCTGTTCATCCAGCTGGTCCAGACATAACAACCAGCTG  
TTCGAAGAAAACCCGATCAACGCAAGCGGAGTCGACGCAAAGGCAATC  
CTGAGCGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAGACTGGAAAACCTGATCGCA  
CAGCTGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACTGTTTCGGAAACCTGATCGCA  
CTGAGCCTGGGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCAG  
AAGACGCAAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACATACGACGACGACCTGG  
ACAACCTGCTGGCACAGATCGGAGACCAGTACGCAGACCTGTTCTGGC  
AGCAAAGAACCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTC  
AACACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATGATCAAGAGA  
TACGACGAACACCACCAGGACCTGACACTGCTGAAGGCACTGGTCAGAC  
AGCAGCTGCCGGAAAAGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAA  
CGGATACGCAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAATTCTA  
CAAGTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAACAGAAGAACT  
GCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGACCTGCTGAGAAAGCAGAGAACATT  
CGACAACGGAAGCATCCCGCACCAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCA  
ATCCTGAGAAGACAGGAAGACTTCTACCCGTTCTGAAGGACAACAGAG  
AAAAGATCGAAAAGATCCTGACATTCAGAATCCCGTACTACGTCGGACC  
GCTGGCAAGAGGAAACAGCAGATTCGCATGGATGACAAGAAAGAGCGA  
AGAAACAATCACACCGTGGA ACTTCGAAGAAGTCGTCGACAAGGGAGC  
AAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGAATGACAAACTTCGACAAGAACCTG  
CCGAACGAAAAGGTCCTGCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTCA  
CAGTCTACAACGAACTGACAAAGGTCAAGTACGTACAGAAAGGAATGA  
GAAAGCCGGCATTCTGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAATCGTCGACC  
TGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTCACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAG



ACTACTTCAAGAAGATCGAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGT  
CGAAGACAGATTCAACGCAAGCCTGGGAACATAACCACGACCTGCTGAAG  
ATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAAGAAAACGAAGACATC  
CTGGAAGACATCGTCCTGACACTGACACTGTTTCGAAGACAGAGAAATGA  
TCGAAGAAAGACTGAAGACATACGCACACCTGTTTCGACGACAAGGTCAT  
GAAGCAGCTGAAGAGAAGAAGATACACAGGATGGGGAAGACTGAGCAG  
AAAGCTGATCAACGGAATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAATCCT  
GGACTTCCTGAAGAGCGACGGATTTCGAAACAGAACTTCATGCAGCTG  
ATCCACGACGACAGCCTGACATTCAAGGAAGACATCCAGAAGGCACAG  
GTCAGCGGACAGGGAGACAGCCTGCACGAACACATCGCAAACCTGGCA  
GGAAGCCC GGCAATCAAGAAGGGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCGTC  
GACGAACTGGTCAAGGTCATGGGAAGACACAAGCCGGAAAACATCGTC  
ATCGAAATGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAAC  
AGCAGAGAAAGAATGAAGAGAATCGAAGAAGGAATCAAGGAACTGGGA  
AGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCGAAAACACACAGCTGCAGAAC  
GAAAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAaAACGGAAGAGACATGTACGTCG  
ACCAGGAACTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGACCACAT  
CGTCCCGCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAACAAGGTCCTG  
ACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAACGTCCCGAGCGAA  
GAAGTCGTCAAGAAGATGAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCA  
AAGCTGATCACACAGAGAAAGTTCGACAACCTGACAAAGGCAGAGAGA  
GGAGGACTGAGCGAACTGGACAAGGCAGGATTCATCAAGAGACAGCTG  
GTCGAAACAAGACAGATCACAAAGCACGTCGCACAGATCCTGGACAGC  
AGAATGAACACAAAGTACGACGAAAACGACAAGCTGATCAGAGAAGTC  
AAGGTCATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGCGACTTCAGAAAGGACT  
TCCAGTTCTACAAGGTCAGAGAAATCAACAACCTACCACCACGCACACGA  
CGCATACTGAACGCAGTCGTCGGAACAGCACTGATCAAGAAGTACCCG  
AAGCTGGAAAGCGAATTCGTCTACGGAGACTACAAGGTCTACGACGTCA  
GAAAGATGATCGCAAAGAGCGAACAGGAAATCGGAAAGGCAACAGCAA  
AGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTCTTCAAGACAGAAATCACA  
CTGGCAAACGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAAACGGA  
GAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAGGGAAGAGACTTCGCAACAGTC  
AGAAAGGTCTGAGCATGCCGACAGGTCAACATCGTCAAGAAGACAGAA  
GTCCAGACAGGAGGATTCAGCAAGGAAAGCATCCTGCCGAAGAGAAAC  
AGCGACAAGCTGATCGCAAGAAAGAAGGACTGGGACCCGAAGAAGTAC

	<p>GGAGGATTCGACAGCCCGACAGTCGCATACAGCGTCCTGGTCGTCGCAA  AGGTCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTCAAGGAACTGC  TGGGAATCACAAATCATGGAAAGAAGCAGCTTCGAAAAGAACCCGATCG  ACTTCCTGGAAGCAAAGGGATAACAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCAT  CAAGCTGCCGAAGTACAGCCTGTTTCGAACTGGAAAACGGAAGAAAGAG  AATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCAGAAGGGAAACGAACTGGCACT  GCCGAGCAAGTACGTCAACTTCCTGTACCTGGCAAGCCACTACGAAAAG  CTGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCTGTTTCGTCGAA  CAGCACAAGCACTACCTGGACGAAATCATCGAACAGATCAGCGAATTCA  GCAAGAGAGTCATCCTGGCAGACGCAAACCTGGACAAGGTCCTGAGCGC  ATACAACAAGCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGAAAACAT  CATCCACCTGTTACACTGACAAACCTGGGAGCACCGGCAGCATTCAAG  TACTTCGACACAACAATCGACAGAAAGAGATACACAAGCACAAAGGAA  GTCCTGGACGCAACACTGATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAA  CAAGAATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGA  AGAAGAAGAGAAAGGTCTAG</p>
508	<p>ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACAGCGTGG  GCTGGGCCGTGATCACCGACGAGTACAAGGTGCCAGCAAGAAGTTCAA  GGTGCTGGGCAACACCGACAGACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGG  CGCCCTGCTGTTTCGACAGCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCAGACTGAAG  AGAACCGCCAGAAGAAGATACACCAGAAGAAAGAACAGAATCTGCTAC  CTGCAGGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAGCTTCT  TCCACAGACTGGAGGAGAGCTTCCTGGTGGAGGAGGACAAGAAGCACG  AGAGACACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGA  GAAGTACCCACCATCTACCACCTGAGAAAGAAGCTGGTGGACAGCACC  GACAAGGCCGACCTGAGACTGATCTACCTGGCCCTGGCCACATGATCA  AGTTCAGAGGCCACTTCCTGATCGAGGGCGACCTGAACCCCGACAACAG  CGACGTGGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTGCAGACCTACAACCAGCTG  TTCGAGGAGAACCCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCCAAGGCCATCC  TGAGCGCCAGACTGAGCAAGAGCAGAAGACTGGAGAACCTGATCGCCC  AGCTGCCCGGCGAGAAGAAGAACGGCCTGTTTCGGCAACCTGATCGCCCT  GAGCCTGGGCCTGACCCCAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAG  GACGCCAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGAC  AACCTGCTGGCCAGATCGGCGACCAGTACGCCGACCTGTTTCCTGGCCG  CCAAGAACCTGAGCGACGCCATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTGAA</p>

CACCGAGATCACCAAGGCCCCCTGAGCGCCAGCATGATCAAGAGATAC  
GACGAGCACCACCAGGACCTGACCCTGCTGAAGGCCCTGGTGAGACAGC  
AGCTGCCCCGAGAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGG  
CTACGCCGGCTACATCGACGGCGGCCAGCCAGGAGGAGTTCTACAAG  
TTCATCAAGCCCATCCTGGAGAAGATGGACGGCACCGAGGAGCTGCTGG  
TGAAGCTGAACAGAGAGGACCTGCTGAGAAAGCAGAGAACCTTCGACA  
ACGGCAGCATCCCCACCAGATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCT  
GAGAAGACAGGAGGACTTCTACCCCTTCCTGAAGGACAACAGAGAGAA  
GATCGAGAAGATCCTGACCTTCAGAATCCCCTACTACGTGGGCCCCCTG  
GCCAGAGGCAACAGCAGATTCGCCTGGATGACCAGAAAGAGCGAGGAG  
ACCATCACCCCTGGAACCTCGAGGAGGTGGTGGACAAGGGCGCCAGCG  
CCCAGAGCTTCATCGAGAGAATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCCAA  
CGAGAAGGTGCTGCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTG  
TACAACGAGCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCATGAGAAAG  
CCCGCCTTCCTGAGCGGCGAGCAGAAGAAGGCCATCGTGACCTGCTGT  
TCAAGACCAACAGAAAGGTGACCGTGAAGCAGCTGAAGGAGGACTACT  
TCAAGAAGATCGAGTGCTTCGACAGCGTGGAGATCAGCGGCGTGGAGGA  
CAGATTC AACGCCAGCCTGGGCACCTACCACGACCTGCTGAAGATCATC  
AAGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAG  
GACATCGTGCTGACCCTGACCCTGTTCGAGGACAGAGAGATGATCGAGG  
AGAGACTGAAGACCTACGCCACCTGTTCGACGACAAGGTGATGAAGCA  
GCTGAAGAGAAGAAGATACACCGGCTGGGGCAGACTGAGCAGAAAGCT  
GATCAACGGCATCAGAGACAAGCAGAGCGGCAAGACCATCCTGGACTTC  
CTGAAGAGCGACGGCTTCGCCAACAGAACTTCATGCAGCTGATCCACG  
ACGACAGCCTGACCTTCAAGGAGGACATCCAGAAGGCCAGGTGAGCG  
GCCAGGGCGACAGCCTGCACGAGCACATCGCCAACCTGGCCGGCAGCCC  
CGCCATCAAGAAGGGCATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACGAGCTG  
GTGAAGGTGATGGGCAGACACAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAGATG  
GCCAGAGAGAACCAGACCACCAGAAGGGCCAGAAGAACAGCAGAGAG  
AGAATGAAGAGAATCGAGGAGGGCATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATC  
CTGAAGGAGCACCCCGTGGAGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTG  
TACCTGTACTACCTGCAGAACGGCAGAGACATGTACGTGGACCAGGAGC  
TGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTGGACCACATCGTGCCCCA  
GAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAACAAGGTGCTGACCAGAAGC  
GACAAGAACAGAGGCAAGAGCGACAACGTGCCAGCGAGGAGGTGGTG

	<p>AAGAAGATGAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATC  ACCCAGAGAAAGTTTCGACAACCTGACCAAGGCCGAGAGAGGGCGGCCTG  AGCGAGCTGGACAAGGCCGGCTTCATCAAGAGACAGCTGGTGGAGACC  AGACAGATCACCAAGCACGTGGCCCAGATCCTGGACAGCAGAATGAAC  ACCAAGTACGACGAGAACGACAAGCTGATCAGAGAGGTGAAGGTGATC  ACCCTGAAGAGCAAGCTGGTGGAGCGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCT  ACAAGGTGAGAGAGATCAACAACCTACCACCACGCCACGACGCCTACCT  GAACGCCGTGGTGGGCACCGCCCTGATCAAGAAGTACCCCAAGCTGGAG  AGCGAGTTCGTGTACGGCGACTACAAGGTGTACGACGTGAGAAAGATGA  TCGCCAAGAGCGAGCAGGAGATCGGCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTT  CTACAGCAACATCATGAACTTCTTCAAGACCGAGATCACCTGGCCAAC  GGCGAGATCAGAAAGAGACCCCTGATCGAGACCAACGGCGAGACCGGC  GAGATCGTGTGGGACAAGGGCAGAGACTTCGCCACCGTGAGAAAGGTG  CTGAGCATGCCCCAGGTGAACATCGTGAAGAAGACCGAGGTGCAGACCG  GCGGCTTCAGCAAGGAGAGCATCCTGCCAAGAGAAACAGCGACAAGC  TGATCGCCAGAAAGAAGGACTGGGACCCCAAGAAGTACGGCGGCTTCG  ACAGCCCCACCGTGGCCTACAGCGTGCTGGTGGTGGCCAAGGTGGAGAA  GGGCAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTGAAGGAGCTGCTGGGCATCAC  CATCATGGAGAGAAGCAGCTTCGAGAAGAACCCCATCGACTTCCTGGAG  GCCAAGGGCTACAAGGAGGTGAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCC  AAGTACAGCCTGTTTCGAGCTGGAGAACGGCAGAAAGAGAATGCTGGCC  AGCGCCGGCGAGCTGCAGAAGGGCAACGAGCTGGCCCTGCCAGCAAG  TACGTGAACTTCCTGTACCTGGCCAGCCACTACGAGAAGCTGAAGGGCA  GCCCCGAGGACAACGAGCAGAAGCAGCTGTTCGTGGAGCAGCACAAGC  ACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCAGCGAGTTCAGCAAGAGAGT  GATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGGTGCTGAGCGCCTACAACAAG  CACAGAGACAAGCCCATCAGAGAGCAGGCCGAGAACATCATCCACCTGT  TCACCCTGACCAACCTGGGCGCCCCCGCCGCCTTCAAGTACTTCGACACC  ACCATCGACAGAAAGAGATACACCAGCACCAAGGAGGTGCTGGACGCC  ACCCTGATCCACCAGAGCATCACCGGCCTGTACGAGACCAGAATCGACC  TGAGCCAGCTGGGCGGCGACGGCGGCGGCAGCCCCAAGAAGAAGAGAA  AGGTGTGA</p>
509	<p>GGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCGTGTGTGTGTCGT  TGCAGGCCTTATTCGGATCCGCCACCATGGACAAGAAGTACAGCATCGG  CCTGGACATCGGCACCAACAGCGTGGGCTGGGCCGTGATCACCGACGAG</p>

TACAAGGTGCCAGCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACAGAC  
ACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGCGCCCTGCTGTTTCGACAGCGGCGA  
GACCGCCGAGGCCACCAGACTGAAGAGAACCGCCAGAAGAAGATACAC  
CAGAAGAAAGAACAGAATCTGCTACCTGCAGGAGATCTTCAGCAACGAG  
ATGGCCAAGGTGGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAGGAGAGCTTCC  
TGGTGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGAGACACCCCATCTTCGGCAACA  
TCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCACCATCTACCACCT  
GAGAAAGAAGCTGGTGGACAGCACCGACAAGGCCGACCTGAGACTGAT  
CTACCTGGCCCTGGCCACATGATCAAGTTCAGAGGCCACTTCTGATCG  
AGGGCGACCTGAACCCCGACAACAGCGACGTGGACAAGCTGTTTCATCCA  
GCTGGTGCAGACCTACAACCAGCTGTTTCGAGGAGAACCCCATCAACGCC  
AGCGGCGTGGACGCCAAGGCCATCCTGAGCGCCAGACTGAGCAAGAGC  
AGAAGACTGGAGAACCTGATCGCCAGCTGCCCGGCGAGAAGAAGAAC  
GGCCTGTTTCGGCAACCTGATCGCCCTGAGCCTGGGCCTGACCCCAACTT  
CAAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAGGACGCCAAGCTGCAGCTGAGCAAG  
GACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCCCAGATCGGCGACC  
AGTACGCCGACCTGTTCTGGCCGCCAAGAACCTGAGCGACGCCATCCT  
GCTGAGCGACATCCTGAGAGTGAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCTG  
AGCGCCAGCATGATCAAGAGATACGACGAGCACCACCAGGACCTGACCC  
TGCTGAAGGCCCTGGTGGAGACAGCAGCTGCCCGAGAAGTACAAGGAGAT  
CTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGCTACGCCGGCTACATCGACGGCGGC  
GCCAGCCAGGAGGAGTTCTACAAGTTCATCAAGCCCATCCTGGAGAAGA  
TGGACGGCACCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACAGAGAGGACCTGCT  
GAGAAAGCAGAGAACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCACCAGATCCAC  
CTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGAGAAGACAGGAGGACTTCTACCCCT  
TCCTGAAGGACAACAGAGAGAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCAGAAT  
CCCCTACTACGTGGGCCCCCTGGCCAGAGGCAACAGCAGATTCGCCTGG  
ATGACCAGAAAGAGCGAGGAGACCATCACCCCTGGAACCTTCGAGGAG  
GTGGTGGACAAGGGCGCCAGCGCCAGAGCTTCATCGAGAGAATGACCA  
ACTTCGACAAGAACCTGCCCAACGAGAAGGTGCTGCCCAAGCACAGCCT  
GCTGTACGAGTACTTCACCGTGTACAACGAGCTGACCAAGGTGAAGTAC  
GTGACCGAGGGCATGAGAAAGCCCGCCTTCTGAGCGGCGAGCAGAAG  
AAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAACAGAAAGGTGACCGTGA  
AGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAGTGCTTCGACAGCGT  
GGAGATCAGCGGCGTGGAGGACAGATTCAACGCCAGCCTGGGCACCTAC

CACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAGG  
AGAACGAGGACATCCTGGAGGACATCGTGCTGACCCTGACCCTGTTCGA  
GGACAGAGAGATGATCGAGGAGAGACTGAAGACCTACGCCACCTGTTC  
GACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGAGAAGAAGATACACCGGCTGG  
GGCAGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGCATCAGAGACAAGCAGAGC  
GGCAAGACCATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGACGGCTTCGCCAACAGAA  
ACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTCAAGGAGGACAT  
CCAGAAGGCCAGGTGAGCGGCCAGGGCGACAGCCTGCACGAGCACAT  
CGCCAACCTGGCCGGCAGCCCCGCCATCAAGAAGGGCATCCTGCAGACC  
GTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTGATGGGCAGACACAAGCCC  
GAGAACATCGTGATCGAGATGGCCAGAGAGAACCAGACCACCAGAAG  
GGCCAGAAGAACAGCAGAGAGAGAATGAAGAGAATCGAGGAGGGCATC  
AAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAGGAGCACCCCGTGGAGAACC  
CAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGCAGAG  
ACATGTACGTGGACCAGGAGCTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGA  
CGTGGACCACATCGTGCCCCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGAC  
AACAAAGGTGCTGACCAGAAGCGACAAGAACAGAGGCAAGAGCGACAAC  
GTGCCAGCGAGGAGGTGGTGAAGAAGATGAAGAATACTGGAGACAG  
CTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCCAGAGAAAGTTCGACAACCTGACCA  
AGGCCGAGAGAGGGCGGCCTGAGCGAGCTGGACAAGGCCGGCTTCATCA  
AGAGACAGCTGGTGGAGACCAGACAGATCACCAAGCACGTGGCCCAGA  
TCCTGGACAGCAGAATGAACACCAAGTACGACGAGAACGACAAGCTGA  
TCAGAGAGGTGAAGGTGATCACCTGAAGAGCAAGCTGGTGGAGCGACTT  
CAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTGAGAGAGATCAACAACCTACCAC  
CACGCCACGACGCCTACCTGAACGCCGTGGTGGGCACCGCCCTGATCA  
AGAAGTACCCCAAGCTGGAGAGCGAGTTCGTGTACGGCGACTACAAGGT  
GTACGACGTGAGAAAGATGATCGCCAAGAGCGAGCAGGAGATCGGCAA  
GGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTCTTCAAGA  
CCGAGATCACCTGGCCAACGGCGAGATCAGAAAGAGACCCCTGATCGA  
GACCAACGGCGAGACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAGGGCAGAGACTT  
CGCCACCGTGAGAAAGGTGCTGAGCATGCCCCAGGTGAACATCGTGAAG  
AAGACCGAGGTGCAGACCGGCGGCTTCAGCAAGGAGAGCATCCTGCCCA  
AGAGAAACAGCGACAAGCTGATCGCCAGAAAGAAGGACTGGGACCCCA  
AGAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCTACAGCGTGCTGGT  
GGTGGCCAAGGTGGAGAAGGGCAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGTGAA

	<p>GGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGAGAAGCAGCTTCGAGAAGAAC  CCCATCGACTTCCTGGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTGAAGAAGGACC  TGATCATCAAGCTGCCCAAGTACAGCCTGTTCGAGCTGGAGAACGGCAG  AAAGAGAATGCTGGCCAGCGCCGGCGAGCTGCAGAAGGGCAACGAGCT  GGCCCTGCCAGCAAGTACGTGAACTTCCTGTACCTGGCCAGCCACTAC  GAGAAGCTGAAGGGCAGCCCCGAGGACAACGAGCAGAAGCAGCTGTTC  GTGGAGCAGCACAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCAGCG  AGTTCAGCAAGAGAGTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGGACAAGGTGCT  GAGCGCCTACAACAAGCACAGAGACAAGCCCATCAGAGAGCAGGCCGA  GAACATCATCCACCTGTTCACCCTGACCAACCTGGGCGCCCCCGCCGCCT  TCAAGTACTTCGACACCACCATCGACAGAAAGAGATACACCAGCACCAA  GGAGGTGCTGGACGCCACCCTGATCCACCAGAGCATCACCGGCCTGTAC  GAGACCAGAATCGACCTGAGCCAGCTGGGCGGGCAGCGGCGGGCAGC  CCCAAGAAGAAGAGAAAGGTGTGACTAGCCATCACATTTAAAAGCATCT  CAGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAGAAAATGAAGATCAATAGCTTATT  CATCTCTTTTTCTTTTTCGTTGGTGTAAGCCAACACCCTGTCTAAAAAAC  ATAAATTTCTTTAATCATTTTGCCTCTTTTCTCTGTGCTTCAATTAATAAA  AAATGGAAAGAACCTCGAG</p>
510	<p>ATGGACAAGAAGTACTCTATCGGTTTGGACATCGGTACCAACTCTGTCTG  GTTGGGCCGTCATCACCGACGAATAACAAGGTCCCATCTAAGAAGTTCAA  GGTCTTGGGTAACACCGACAGACACTCTATCAAGAAGAAGTTGATCGGT  GCCTTGTTGTTGACTCTGGTGAAACCGCCGAAGCCACCAGATTGAAGA  GAACCGCCAGAAGAAGATACACCAGAAGAAAGAACAGAATCTGCTACT  TGCAAGAAATCTTCTCTAACGAAATGGCCAAGGTCGACGACTCTTTCTTC  CACAGATTGGAAGAATCTTTCTTGGTTCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAA  GACACCCAATCTTCGGTAACATCGTCGACGAAGTCGCCTACCACGAAAA  GTACCCAACCATCTACCACTTGAGAAAGAAGTTGGTTCGACTCTACCGAC  AAGGCCGACTTGAGATTGATCTACTTGGCCTTGGCCACATGATCAAGTT  CAGAGGTCACTTCTTGATCGAAGGTGACTTGAACCCAGACAACCTCTGAC  GTCGACAAGTTGTTTCATCCAATTGGTCCAAACCTACAACCAATTGTTTCGA  AGAAAACCCAATCAACGCCTCTGGTGTCGACGCCAAGGCCATCTTGTCT  GCCAGATTGTCTAAGAGCAGAAGATTGGAAAACCTGATCGCCCAATTGC  CAGGTGAAAAGAAGAACGGTTTGTTCGGTAACTTGATCGCCTTGTCTTTG  GGTTTGACCCCAAACCTCAAGTCTAACTTCGACTTGGCCGAAGACGCCA  AGTTGCAATTGTCTAAGGACACCTACGACGACGACTTGGACAACCTTGTT</p>

GGCCCAAATCGGTGACCAATACGCCGACTTGTTCTTGGCCGCCAAGAAC  
TTGTCTGACGCCATCTTGTTGTCTGACATCTTGAGAGTCAACACCGAAAT  
CACCAAGGCCCCATTGTCTGCCTCTATGATCAAGAGATACGACGAACAC  
CACCAAGACTTGACCTTGTTGAAGGCCTTGGTCAGACAACAATTGCCAG  
AAAAGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAATCTAAGAACGGTTACGCCGG  
TTACATCGACGGTGGTGCCTCTCAAGAAGAATTCTACAAGTTCATCAAGC  
CAATCTTGAAAAGATGGACGGTACCGAAGAATTGTTGGTCAAGTTGAA  
CAGAGAAGACTTGTTGAGAAAGCAAAGAACCTTCGACAACGGTCTATC  
CCACACCAAATCCACTTGGGTGAATTGCACGCCATCTTGAGAAGACAAG  
AAGACTTCTACCCATTCTTGAAGGACAACAGAGAAAAGATCGAAAAGAT  
CTTGACCTTCAGAATCCATACTACGTCGGTCCATTGGCCAGAGGTAACA  
GCAGATTCGCCTGGATGACCAGAAAGTCTGAAGAAACCATCACCCCATG  
GAACTTCGAAGAAGTCGTCGACAAGGGTGCCTCTGCCCAATCTTTCATCG  
AAAGAATGACCAACTTCGACAAGAACTTGCCAAACGAAAAGGTCTTGCC  
AAAGCACTCTTTGTTGTACGAATACTTCACCGTCTACAACGAATTGACCA  
AGGTCAAGTACGTCACCGAAGGTATGAGAAAGCCAGCCTTCTTGTCTGG  
TGAACAAAAGAAGGCCATCGTCGACTTGTTGTTCAAGACCAACAGAAAG  
GTCACCGTCAAGCAATTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATCGAATGCT  
TCGACTCTGTGCAAATCTCTGGTGTGCAAGACAGATTCAACGCCTCTTGG  
GGTACCTACCACGACTTGTTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCTTGG  
ACAACGAAGAAAACGAAGACATCTTGGAAGACATCGTCTTGACCTTGAC  
CTTGTTTCGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGATTGAAGACCTACGCC  
CACTTGTTTCGACGACAAGGTCATGAAGCAATTGAAGAGAAGAAGATACA  
CCGGTTGGGGTAGATTGAGCAGAAAGTTGATCAACGGTATCAGAGACAA  
GCAATCTGGTAAGACCATCTTGGACTTCTTGAAGTCTGACGGTTTCGCCA  
ACAGAACTTCATGCAATTGATCCACGACGACTCTTGGACCTTCAAGGA  
AGACATCCAAAAGGCCCAAGTCTCTGGTCAAGGTGACTCTTTGCACGAA  
CACATCGCCAACTTGGCCGGTTCTCCAGCCATCAAGAAGGGTATCTTGCA  
AACCGTCAAGGTCGTCGACGAATTGGTCAAGGTCATGGGTAGACACAAG  
CCAGAAAACATCGTCATCGAAATGGCCAGAGAAAACCAAACCACCCAA  
AAGGGTCAAAGAACAGCAGAGAAAGAATGAAGAGAATCGAAGAAGGT  
ATCAAGGAATTGGGTTCTCAAATCTTGAAGGAACACCCAGTCGAAAACA  
CCCAATTGCAAAAACGAAAAGTTGTACTTGTACTACTTGCAAAACGGTAG  
AGACATGTACGTCGACCAAGAATTGGACATCAACAGATTGTCTGACTAC  
GACGTCGACCACATCGTCCCACAATCTTCTTGAAGGACGACTCTATCGA



	<p>CAACAAGGTCTTGACCAGATCTGACAAGAACAGAGGTAAGTCTGACAAC  GTCCCATCTGAAGAAGTCGTCAAGAAGATGAAGAATACTGGAGACAAT  TGTTGAACGCCAAGTTGATCACCCAAAGAAAGTTCGACAACCTTGACCAA  GGCCGAAAGAGGTGGTTTGTCTGAATTGGACAAGGCCGGTTTCATCAAG  AGACAATTGGTCGAAACCAGACAAATCACCAAGCACGTCGCCCAAATCT  TGGACAGCAGAATGAACACCAAGTACGACGAAAACGACAAGTTGATCA  GAGAAGTCAAGGTCATCACCTTGAAGTCTAAGTTGGTCTCTGACTTCAGA  AAGGACTTCCAATTCTACAAGGTCAGAGAAATCAACAATACTACCACCAG  CCCACGACGCCTACTTGAACGCCGTCGTCGGTACCGCCTTGATCAAGAA  GTACCCAAAGTTGGAATCTGAATTCGTCTACGGTGACTACAAGGTCTAC  GACGTCAGAAAGATGATCGCCAAGTCTGAACAAGAAATCGGTAAGGCC  ACCGCCAAGTACTTCTTCTACTCTAACATCATGAACTTCTTCAAGACCGA  AATCACCTTGGCCAACGGTGAAATCAGAAAGAGACCATTGATCGAAACC  AACGGTGAAACCGGTGAAATCGTCTGGGACAAGGGTAGAGACTTCGCCA  CCGTCAGAAAGGTCTTGTCTATGCCACAAGTCAACATCGTCAAGAAGAC  CGAAGTCCAAACCGGTGGTTTCTCTAAGGAATCTATCTTGCCAAAGAGA  AACTCTGACAAGTTGATCGCCAGAAAGAAGGACTGGGACCCAAAGAAG  TACGGTGGTTTCGACTCTCCAACCGTCGCCTACTCTGTCTTGGTCGTCGC  CAAGGTCGAAAAGGGTAAGTCTAAGAAGTTGAAGTCTGTCAAGGAATTG  TTGGGTATCACCATCATGGAAAGATCTTCTTTCGAAAAGAACCCAATCG  ACTTCTTGGAAGCCAAGGGTTACAAGGAAGTCAAGAAGGACTTGATCAT  CAAGTTGCCAAAGTACTCTTTGTTCGAATTGGAAAACGGTAGAAAGAGA  ATGTTGGCCTCTGCCGGTGAATTGCAAAAAGGGTAACGAATTGGCCTTGC  CATCTAAGTACGTCAACTTCTTGTACTTGGCCTCTCACTACGAAAAGTTG  AAGGGTTCCTCAGAAGACAACGAACAAAAGCAATTGTTTCGTCGAACAAC  ACAAGCACTACTTGGACGAAATCATCGAACAAATCTCTGAATTCTCTAA  GAGAGTCATCTTGGCCGACGCCAACTTGGACAAGGTCTTGTCTGCCTACA  ACAAGCACAGAGACAAGCCAATCAGAGAACAAAGCCGAAAACATCATCC  ACTTGTTACCTTGACCAACTTGGGTGCCCCAGCCGCCTTCAAGTACTTC  GACACCACCATCGACAGAAAGAGATACACCTCTACCAAGGAAGTCTTGG  ACGCCACCTTGATCCACCAATCTATCACCGGTTTGTACGAAACCAGAATC  GACTTGTCTCAATTGGGTGGTGACGGTGGTGGTTCTCCAAGAAGAAGA  GAAAGGTCTAA</p>
511	<p>ATGGACAAGAAGTACTCCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACTCCGTGG  GCTGGGCCGTGATCACCGACGAGTACAAGGTGCCCTCCAAGAAGTTCAA</p>

GGTGCTGGGCAACACCGACCGGCACTCCATCAAGAAGAACCTGATCGGC  
GCCCTGCTGTTGACTCCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCCGGCTGAAGC  
GGACCGCCCGGCGGGCGGTACACCCGGCGGAAGAACCGGATCTGCTACCT  
GCAGGAGATCTTCTCCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACTCCTTCTTC  
CACCGGCTGGAGGAGTCCTTCTGGTGGAGGAGGACAAGAAGCACGAG  
CGGCACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGA  
AGTACCCACCATCTACCACCTGCGGAAGAAGCTGGTGGACTCCACCGA  
CAAGGCCGACCTGCGGCTGATCTACCTGGCCCTGGCCACATGATCAAG  
TTCCGGGGCCACTTCTGATCGAGGGCGACCTGAACCCCGACAACCTCCG  
ACGTGGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTGCAGACCTACAACCAGCTGTT  
CGAGGAGAACCCCATCAACGCCTCCGGCGTGGACGCCAAGGCCATCCTG  
TCCGCCCCGGCTGTCCAAGTCCCGGGCGGCTGGAGAACCTGATCGCCCAGC  
TGCCCGGCGAGAAGAAGAACGGCCTGTTTCGGCAACCTGATCGCCCTGTC  
CCTGGGCTGACCCCAACTTCAAGTCCAACCTTCGACCTGGCCGAGGAC  
GCCAAGCTGCAGCTGTCCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACC  
TGCTGGCCCAGATCGGCGACCAGTACGCCGACCTGTTCTGGCCGCCAA  
GAACCTGTCCGACGCCATCCTGCTGTCCGACATCCTGCGGGTGAACACC  
GAGATACCAAGGCCCCCTGTCCGCCTCCATGATCAAGCGGTACGACG  
AGCACACCAGGACCTGACCCTGCTGAAGGCCCTGGTGCGGCAGCAGCT  
GCCCGAGAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGTCCAAGAACGGCTAC  
GCCGGCTACATCGACGGCGGCGCCTCCAGGAGGAGTTCTACAAGTTCA  
TCAAGCCCATCCTGGAGAAGATGGACGGCACCGAGGAGCTGCTGGTGAA  
GCTGAACCGGGAGGACCTGCTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGC  
TCCATCCCCACCAGATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGC  
GGCAGGAGGACTTCTACCCCTTCTGAAGGACAACCGGGAGAAGATCGA  
GAAGATCCTGACCTTCCGGATCCCCTACTACGTGGGCCCCCTGGCCCGGG  
GCAACTCCCGTTTCGCCTGGATGACCCGGAAGTCCGAGGAGACCATCAC  
CCCCTGGAACCTTCGAGGAGGTGGTGGACAAGGGCGCCTCCGCCCAGTCC  
TTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCCAACGAGAAGG  
TGCTGCCCAAGCACTCCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTACAACGAG  
CTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCATGCGGAAGCCCGCCTTCC  
TGTCGGGCGAGCAGAAGAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAA  
CCGGAAGGTGACCGTGAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAGAT  
CGAGTGCTTCGACTCCGTGGAGATCTCCGGCGTGGAGGACCGGTTCAAC  
GCCTCCCTGGGCACCTACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGG

ACTTCCTGGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAGGACATCGTGCT  
GACCCTGACCCTGTTCGAGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAG  
ACCTACGCCCACCTGTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGC  
GGCGGTACACCGGCTGGGGCCGGCTGTCCCGGAAGCTGATCAACGGCAT  
CCGGGACAAGCAGTCCGGCAAGACCATCCTGGACTTCTGAAGTCCGAC  
GGCTTCGCCAACCGGAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACTCCCTGA  
CCTTCAAGGAGGACATCCAGAAGGCCAGGTGTCCGGCCAGGGCGACTC  
CCTGCACGAGCACATCGCCAACCTGGCCGGCTCCCCGCCATCAAGAAG  
GGCATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTGATGG  
GCCGGCACAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAGATGGCCCGGGAGAACC  
AGACCACCAGAAGGGCCAGAAGAACTCCCGGAGCGGATGAAGCGGA  
TCGAGGAGGGCATCAAGGAGCTGGGCTCCAGATCCTGAAGGAGCACCC  
CGTGGAGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTG  
CAGAACGGCCGGGACATGTACGTGGACCAGGAGCTGGACATCAACCGG  
CTGTCCGACTACGACGTGGACCACATCGTGCCCCAGTCCTTCTGAAGGA  
CGACTCCATCGACAACAAGGTGCTGACCCGGTCCGACAAGAACCGGGGC  
AAGTCCGACAACGTGCCCTCCGAGGAGGTGGTGAAGAAGATGAAGAAC  
TACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCCAGCGGAAGTTCG  
ACAACCTGACCAAGGCCGAGCGGGGCGGCCTGTCCGAGCTGGACAAGG  
CCGGCTTCATCAAGCGGCAGCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCA  
CGTGGCCCAGATCCTGGACTCCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAAC  
GACAAGCTGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCACCTGAAGTCCAAGCTGG  
TGTCCGACTTCCGGAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTGCGGGAGATCAA  
CAACTACCACCACGCCACGACGCCTACCTGAACGCCGTGGTGGGCACC  
GCCCTGATCAAGAAGTACCCCAAGCTGGAGTCCGAGTTCGTGTACGGCG  
ACTACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGTCCGAGCAGGA  
GATCGGCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTACTCCAACATCATGAACT  
TCTTCAAGACCGAGATCACCTGGCCAACGGCGAGATCCGGAAGCGGCC  
CCTGATCGAGACCAACGGCGAGACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAGGG  
CCGGGACTTCGCCACCGTGCAGGAAGGTGCTGTCCATGCCCCAGGTGAAC  
ATCGTGAAGAAGACCGAGGTGCAGACCGGCGGCTTCTCCAAGGAGTCCA  
TCCTGCCCAAGCGGAACTCCGACAAGCTGATCGCCCGGAAGAAGGACTG  
GGACCCCAAGAAGTACGGCGGCTTCGACTCCCCACCGTGGCCTACTCC  
GTGCTGGTGGTGGCCAAGGTGGAGAAGGGCAAGTCCAAGAAGCTGAAG  
TCCGTGAAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGCGGTCTCTCTCG

	<p>AGAAGAACCCCATCGACTTCCTGGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTGA  AGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCCAAGTACTCCCTGTTCGAGCTGGA  GAACGGCCGGAAGCGGATGCTGGCCTCCGCCGGCGAGCTGCAGAAGGG  CAACGAGCTGGCCCTGCCCTCCAAGTACGTGAACTTCTGTACCTGGCCT  CCCCTACGAGAAGCTGAAGGGCTCCCCGAGGACAACGAGCAGAAGC  AGCTGTTCGTGGAGCAGCACAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCA  GATCTCCGAGTTCTCCAAGCGGGTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGGAC  AAGGTGCTGTCCGCCTACAACAAGCACCGGGACAAGCCATCCGGGAGC  AGGCCGAGAACATCATCCACCTGTTCACCCTGACCAACCTGGGCGCCCC  CGCCGCCTTCAAGTACTTCGACACCACCATCGACCGGAAGCGGTACACC  TCCACCAAGGAGGTGCTGGACGCCACCCTGATCCACCAGTCCATCACCG  GCCTGTACGAGACCCGGATCGACCTGTCCCAGCTGGGCGGGCGACGGCGG  CGGCTCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGTGA</p>
512	<p>ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACAGCGTGG  GCTGGGCCGTGATCACCGACGAGTACAAGGTGCCCAGCAAGAAGTTCAA  GGTGTGGGCAACACCGACCGGCACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGC  GCCCTGCTGTTCGACAGCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCCGGCTGAAGC  GGACCGCCCGGCGGCGGTACACCCGGCGGAAGAACCGGATCTGCTACCT  GCAGGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAGCTTCTTC  CACCGGCTGGAGGAGAGCTTCTGGTGGAGGAGGACAAGAAGCACGAG  CGGCACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGA  AGTACCCACCATCTACCACCTGCGGAAGAAGCTGGTGGACAGCACCGA  CAAGGCCGACCTGCGGCTGATCTACCTGGCCCTGGCCACATGATCAAG  TTCCGGGGCCACTTCTGATCGAGGGCGACCTGAACCCCGACAACAGCG  ACGTGGACAAGCTGTTCATCCAGCTGGTGCAGACCTACAACCAGCTGTT  CGAGGAGAACCCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCCAAGGCCATCCTG  AGCGCCCGGCTGAGCAAGAGCCGGCGGCTGGAGAACCTGATCGCCAGC  TGCCCGGCGAGAAGAAGAACGGCCTGTTCGGCAACCTGATCGCCCTGAG  CCTGGGCTGACCCCAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAGGAC  GCCAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACC  TGCTGGCCAGATCGGCGACCAGTACGCCGACCTGTTCTGGCCGCCAA  GAACCTGAGCGACGCCATCCTGCTGAGCGACATCCTGCGGGTGAACACC  GAGATACCAAGGCCCCCTGAGCGCCAGCATGATCAAGCGGTACGACG  AGCACACCAGGACCTGACCCTGCTGAAGGCCCTGGTGCGGCAGCAGCT  GCCCGAGAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGCTAC</p>

GCCGGCTACATCGACGGCGGCCAGCCAGGAGGAGTTCTACAAGTTCA  
TCAAGCCCATCCTGGAGAAGATGGACGGCACCGAGGAGCTGCTGGTGAA  
GCTGAACCGGGAGGACCTGCTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGC  
AGCATCCCCACCAGATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGC  
GGCAGGAGGACTTCTACCCCTTCTGAAGGACAACCGGGAGAAGATCGA  
GAAGATCCTGACCTTCCGGATCCCCTACTACGTGGGCCCCCTGGCCCGGG  
GCAACAGCCGGTTCGCCTGGATGACCCGGAAGAGCGAGGAGACCATCAC  
CCCCTGGAACTTCGAGGAGGTGGTGGACAAGGGCGCCAGCGCCAGAGC  
TTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCCAACGAGAAGG  
TGCTGCCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTACAACGA  
GCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCATGCGGAAGCCCGCCTTC  
CTGAGCGGCGAGCAGAAGAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCA  
ACCGGAAGGTGACCGTGAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAGA  
TCGAGTGCTTCGACAGCGTGGAGATCAGCGGCGTGGAGGACCGGTTCAA  
CGCCAGCCTGGGCACCTACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAG  
GACTTCCTGGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAGGACATCGTGC  
TGACCCTGACCCTGTTTCGAGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAA  
GACCTACGCCACCTGTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGG  
CGGCGGTACACCGGCTGGGGCCGGCTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCA  
TCCGGGACAAGCAGAGCGGCAAGACCATCCTGGACTTCTGAAGAGCGA  
CGGCTTCGCCAACCGGAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTG  
ACCTTCAAGGAGGACATCCAGAAGGCCAGGTGAGCGGCCAGGGCGAC  
AGCCTGCACGAGCACATCGCCAACCTGGCCGGCAGCCCCGCCATCAAGA  
AGGGCATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTGAT  
GGGCCGGCACAAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAGATGGCCCGGGAGAA  
CCAGACCACCAGAAGGGCCAGAAGAACAGCCGGGAGCGGATGAAGCG  
GATCGAGGAGGGCATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAGGAGCA  
CCCCGTGGAGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTAC  
CTGCAGAACGGCCGGGACATGTACGTGGACCAGGAGCTGGACATCAACC  
GGCTGAGCGACTACGACGTGGACCACATCGTGCCCCAGAGCTTCTGAA  
GGACGACAGCATCGACAACAAGGTGCTGACCCGGAGCGACAAGAACCG  
GGGCAAGAGCGACAACGTGCCAGCGAGGAGGTGGTGAAGAAGATGAA  
GAACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCCAGCGGAAG  
TTCGACAACCTGACCAAGGCCGAGCGGGGCGGCCTGAGCGAGCTGGACA  
AGGCCGGCTTCATCAAGCGGCAGCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAA

	<p>GCACGTGGCCCAGATCCTGGACAGCCGGATGAACACCAAGTACGACGAG  AACGACAAGCTGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCACCTGAAGAGCAAG  CTGGTGAGCGACTTCCGGAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTGCGGGAGA  TCAACAACCTACCACCACGCCACGACGCCTACCTGAACGCCGTGGTGGG  CACCGCCCTGATCAAGAAGTACCCCAAGCTGGAGAGCGAGTTCGTGTAC  GGCGACTACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGAGCGAG  CAGGAGATCGGCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCA  TGAACCTTCTCAAGACCGAGATCACCTGGCCAACGGCGAGATCCGGAA  GCGGCCCTGATCGAGACCAACGGCGAGACCGGCGAGATCGTGTGGGAC  AAGGGCCGGGACTTCGCCACCGTGCGGAAGGTGCTGAGCATGCCCCAGG  TGAACATCGTGAAGAAGACCGAGGTGCAGACCGGCGGCTTCAGCAAGG  AGAGCATCCTGCCAAGCGGAACAGCGACAAGCTGATCGCCCCGGAAGA  AGGACTGGGACCCCAAGAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGC  CTACAGCGTGCTGGTGGTGGCCAAGGTGGAGAAGGGCAAGAGCAAGAA  GCTGAAGAGCGTGAAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGCGGAGC  AGCTTCGAGAAGAACCCCATCGACTTCTGGAGGCCAAGGGCTACAAGG  AGGTGAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCAAGTACAGCCTGTTCGA  GCTGGAGAACGGCCGGAAGCGGATGCTGGCCAGCGCCGGCGAGCTGCA  GAAGGGCAACGAGCTGGCCCTGCCAGCAAGTACGTGAACTTCCTGTAC  CTGGCCAGCCACTACGAGAAGCTGAAGGGCAGCCCCGAGGACAACGAG  CAGAAGCAGCTGTTCGTGGAGCAGCACAAGCACTACCTGGACGAGATCA  TCGAGCAGATCAGCGAGTTCAGCAAGCGGGTGATCCTGGCCGACGCCAA  CCTGGACAAGGTGCTGAGCGCCTACAACAAGCACCGGGACAAGCCCATC  CGGGAGCAGGCCGAGAACATCATCCACCTGTTCACCCTGACCAACCTGG  GCGCCCCCGCCGCCTTCAAGTACTTCGACACCACCATCGACCGGAAGCG  GTACACCAGCACCAAGGAGGTGCTGGACGCCACCCTGATCCACCAGAGC  ATCACCGGCCTGTACGAGACCCGGATCGACCTGAGCCAGCTGGGCGGGC  ACGGCGGGCGGAGCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGTGA</p>
513	<p>ATGGACAAGAAGTACTCCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACTCCGTGG  GCTGGGCCGTGATCACCGACGAGTACAAGGTGCCCTCCAAGAAGTTCAA  GGTGCTGGGCAACACCGACCGGCACTCCATCAAGAAGAACCTGATCGGC  GCCCTGCTGTTCGACTCCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCCGGCTGAAGC  GGACCGCCCGGCGGCGGTACACCCGGCGGAAGAACCGGATCTGCTACCT  GCAGGAGATCTTCTCCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACTCCTTCTTC  CACCGGCTGGAGGAGTCCTTCTGGTGGAGGAGGACAAGAAGCACGAG</p>

CGGCACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGA  
AGTACCCACCATCTACCACCTGCGGAAGAAGCTGGTGGACTCCACCGA  
CAAGGCCGACCTGCGGCTGATCTACCTGGCCCTGGCCCACATGATCAAG  
TTCCGGGGCCACTTCCTGATCGAGGGCGACCTGAACCCCGACAACCTCCG  
ACGTGGACAAGCTGTTCATCCAGCTGGTGCAGACCTACAACCAGCTGTT  
CGAGGAGAACCCCATCAACGCCTCCGGCGTGGACGCCAAGGCCATCCTG  
TCCGCCC GGCTGTCCAAGTCCCGGGCGGCTGGAGAACCTGATCGCCCAGC  
TGCCCGGCGAGAAGAAGAACGGCCTGTTCCGGCAACCTGATCGCCCTGTC  
CCTGGGCCTGACCCCAACTTCAAGTCCAACCTTCGACCTGGCCGAGGAC  
GCCAAGCTGCAGCTGTCCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACC  
TGCTGGCCAGATCGGCGACCAGTACGCCGACCTGTTCTGACCAGTCCAA  
GAACCTGTCCGACGCCATCCTGCTGTCCGACATCCTGCGGGTGAACACC  
GAGATCACCAAGGCCCCCTGTCCGCCTCCATGATCAAGCGGTACGACG  
AGCACACCAGGACCTGACCCTGCTGAAGGCCCTGGTGCGGCAGCAGCT  
GCCCGAGAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGTCCAAGAACGGCTAC  
GCCGGCTACATCGACGGCGGCCTCCAGGAGGAGTTCTACAAGTTCA  
TCAAGCCCATCCTGGAGAAGATGGACGGCACCGAGGAGCTGCTGGTGAA  
GCTGAACCGGGAGGACCTGCTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGC  
TCCATCCCCACCAGATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGC  
GGCAGGAGGACTTCTACCCCTTCTGAAGGACAACCGGGAGAAGATCGA  
GAAGATCCTGACCTTCCGGATCCCCTACTACGTGGGCCCCCTGGCCC GG  
GCAACTCCCGGTTTCGCTGGATGACCCGGAAGTCCGAGGAGACCATCAC  
CCCCTGGAACCTTCGAGGAGGTGGTGGACAAGGGCGCCTCCGCCCAGTCC  
TTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCCAACGAGAAGG  
TGCTGCCCAAGCACTCCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTACAACGAG  
CTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCATGCGGAAGCCCGCCTTCC  
TGTCGGGCGAGCAGAAGAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCAA  
CCGGAAGGTGACCGTGAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAGAT  
CGAGTGCTTCGACTCCGTGGAGATCTCCGGCGTGGAGGACCGGTTCAAC  
GCCTCCCTGGGCACCTACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGG  
ACTTCTGGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAGGACATCGTGCT  
GACCTGACCTGTTCGAGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAAG  
ACCTACGCCACCTGTTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGC  
GGCGGTACACCGGCTGGGGCCGGCTGTCCCGGAAGCTGATCAACGGCAT  
CCGGGACAAGCAGTCCGGCAAGACCATCCTGGACTTCTGAAGTCCGAC

GGCTTCGCCAACCGGAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACTCCCTGA  
CCTTCAAGGAGGACATCCAGAAGGCCAGGTGTCCGGCCAGGGCGACTC  
CCTGCACGAGCACATCGCCAACCTGGCCGGCTCCCCGCCATCAAGAAG  
GGCATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTGATGG  
GCCGGCACAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAGATGGCCCGGGAGAACC  
AGACCACCCAGAAGGGCCAGAAGAACTCCCGGGAGCGGATGAAGCGGA  
TCGAGGAGGGCATCAAGGAGCTGGGCTCCAGATCCTGAAGGAGCACCC  
CGTGGAGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTG  
CAGAACGGCCGGGACATGTACGTGGACCAGGAGCTGGACATCAACCGG  
CTGTCCGACTACGACGTGGACCACATCGTGCCCCAGTCCTTCCTGAAGGA  
CGACTCCATCGACAACAAGGTGCTGACCCGGTCCGACAAGAACCGGGGC  
AAGTCCGACAACGTGCCCTCCGAGGAGGTGGTGAAGAAGATGAAGAAC  
TACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCCAGCGGAAGTTCG  
ACAACCTGACCAAGGCCGAGCGGGGCGGCCTGTCCGAGCTGGACAAGG  
CCGGCTTCATCAAGCGGCAGCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAAGCA  
CGTGGCCCAGATCCTGGACTCCCGGATGAACACCAAGTACGACGAGAAC  
GACAAGCTGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCACCTGAAGTCCAAGCTGG  
TGTCGACTTCCGGAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTGCGGGAGATCAA  
CAACTACCACCACGCCACGACGCCTACCTGAACGCCGTGGTGGGCACC  
GCCCTGATCAAGAAGTACCCCAAGCTGGAGTCCGAGTTCGTGTACGGCG  
ACTACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGTCCGAGCAGGA  
GATCGGCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTACTCCAACATCATGAACT  
TCTTCAAGACCGAGATCACCTGGCCAACGGCGAGATCCGGAAGCGGCC  
CCTGATCGAGACCAACGGCGAGACCGGCGAGATCGTGTGGGACAAGGG  
CCGGGACTTCGCCACCGTGCGGAAGGTGCTGTCCATGCCCCAGGTGAAC  
ATCGTGAAGAAGACCGAGGTGCAGACCGGCGGCTTCTCCAAGGAGTCCA  
TCTTGCCCAAGCGGAACTCCGACAAGCTGATCGCCCGGAAGAAGGACTG  
GGACCCCAAGAAGTACGGCGGCTTCGACTCCCCACCGTGGCCTACTCC  
GTGCTGGTGGTGGCCAAGGTGGAGAAGGGCAAGTCCAAGAAGCTGAAG  
TCCGTGAAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGCGGTCCCTCCTTCG  
AGAAGAACCCCATCGACTTCTGGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTGA  
AGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCAAGTACTCCCTGTTCGAGCTGGA  
GAACGGCCGGAAGCGGATGCTGGCCTCCGCCGGCGAGCTGCAGAAGGG  
CAACGAGCTGGCCCTGCCCTCCAAGTACGTGAACTTCTGTACCTGGCCT  
CCCACTACGAGAAGCTGAAGGGCTCCCCGAGGACAACGAGCAGAAGC



	<p>AGCTGTTCGTGGAGCAGCACAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCA  GATCTCCGAGTTCTCCAAGCGGGTGATCCTGGCCGACGCCAACCTGGAC  AAGGTGCTGTCCGCCTACAACAAGCACCGGGACAAGCCCATCCGGGAGC  AGGCCGAGAACATCATCCACCTGTTCACCCTGACCAACCTGGGCGCCCC  CGCCGCCTTCAAGTACTTCGACACCACCATCGACCGGAAGCGGTACACC  TCCACCAAGGAGGTGCTGGACGCCACCCTGATCCACCAGTCCATCACCG  GCCTGTACGAGACCCGGATCGACCTGTCCCAGCTGGGCGGCGACGGCTC  CGGCTCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGACGGCTCCCCAAGAAGAA  GCGGAAGGTGGACTCCGGCTGA</p>
514	<p>ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACAGCGTGG  GCTGGGCCGTGATCACCGACGAGTACAAGGTGCCAGCAAGAAGTTCAA  GGTGCTGGGCAACACCGACCGGCACAGCATCAAGAAGAACCCTGATCGGC  GCCCTGCTGTTTCGACAGCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCCGGCTGAAGC  GGACCGCCCGGCGGCGGTACACCCGGCGGAAGAACCGGATCTGCTACCT  GCAGGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAGCTTCTTC  CACCGGCTGGAGGAGAGCTTCTGGTGGAGGAGGACAAGAAGCACGAG  CGGCACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGA  AGTACCCACCATCTACCACCTGCGGAAGAAGCTGGTGGACAGCACCGA  CAAGGCCGACCTGCGGCTGATCTACCTGGCCCTGGCCACATGATCAAG  TTCCGGGGCCACTTCTGATCGAGGGCGACCTGAACCCCGACAACAGCG  ACGTGGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTGCAGACCTACAACCAGCTGTT  CGAGGAGAACCCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCCAAGGCCATCCTG  AGCGCCCGGCTGAGCAAGAGCCGGCGGCTGGAGAACCTGATCGCCAGC  TGCCCGGCGAGAAGAAGAACGGCCTGTTTCGGCAACCTGATCGCCCTGAG  CCTGGGCTGACCCCAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAGGAC  GCCAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACC  TGCTGGCCAGATCGGCGACCAGTACGCCGACCTGTTCTGGCCGCCAA  GAACCTGAGCGACGCCATCCTGCTGAGCGACATCCTGCGGGTGAACACC  GAGATACCAAGGCCCCCTGAGCGCCAGCATGATCAAGCGGTACGACG  AGCACACCAGGACCTGACCCTGCTGAAGGCCCTGGTGCGGCAGCAGCT  GCCCGAGAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGCTAC  GCCGGCTACATCGACGGCGGCCAGCCAGGAGGAGTTCTACAAGTTCA  TCAAGCCCATCCTGGAGAAGATGGACGGCACCGAGGAGCTGCTGGTGAA  GCTGAACCGGGAGGACCTGCTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGC  AGCATCCCCACCAGATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGC</p>

GGCAGGAGGACTTCTACCCCTTCTGAAGGACAACCGGGAGAAGATCGA  
GAAGATCCTGACCTTCCGGATCCCCTACTACGTGGGCCCCCTGGCCCCGGG  
GCAACAGCCGGTTCGCCTGGATGACCCGGAAGAGCGAGGAGACCATCAC  
CCCCTGGAACTTCGAGGAGGTGGTGGACAAGGGCGCCAGCGCCCAGAGC  
TTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCCAACGAGAAGG  
TGCTGCCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTACAACGA  
GCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCATGCGGAAGCCCGCCTTC  
CTGAGCGGCGAGCAGAAGAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCA  
ACCGGAAGGTGACCGTGAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAGA  
TCGAGTGCTTCGACAGCGTGGAGATCAGCGGCGTGGAGGACCGGTTCAA  
CGCCAGCCTGGGCACCTACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAG  
GACTTCCTGGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAGGACATCGTGC  
TGACCCTGACCCTGTTTCGAGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAA  
GACCTACGCCACCTGTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGG  
CGGCGGTACACCGGCTGGGGCCGGCTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCA  
TCCGGGACAAGCAGAGCGGCAAGACCATCCTGGACTTCTGAAGAGCGA  
CGGCTTCGCCAACCGGAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTG  
ACCTTCAAGGAGGACATCCAGAAGGCCAGGTGAGCGGCCAGGGCGAC  
AGCCTGCACGAGCACATCGCCAACCTGGCCGGCAGCCCCGCCATCAAGA  
AGGGCATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTGAT  
GGGCCGGCACAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAGATGGCCCCGGGAGAA  
CCAGACCACCAGAAGGGCCAGAAGAACAGCCGGGAGCGGATGAAGCG  
GATCGAGGAGGGCATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAGGAGCA  
CCCCGTGGAGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTAC  
CTGCAGAACGGCCGGGACATGTACGTGGACCAGGAGCTGGACATCAACC  
GGCTGAGCGACTACGACGTGGACCACATCGTGCCCCAGAGCTTCTGAA  
GGACGACAGCATCGACAACAAGGTGCTGACCCGGAGCGACAAGAACCG  
GGGCAAGAGCGACAACGTGCCAGCGAGGAGGTGGTGAAGAAGATGAA  
GAACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCCAGCGGAAG  
TTCGACAACCTGACCAAGGCCGAGCGGGGCGGCCTGAGCGAGCTGGACA  
AGGCCGGCTTCATCAAGCGGCAGCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAA  
GCACGTGGCCCAGATCCTGGACAGCCGGATGAACACCAAGTACGACGAG  
AACGACAAGCTGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCACCTGAAGAGCAAG  
CTGGTGAGCGACTTCCGGAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTGCGGGAGA  
TCAACAACCTACCACCACGCCACGACGCCTACCTGAACGCCGTGGTGGG

	<p> CACCGCCCTGATCAAGAAGTACCCCAAGCTGGAGAGCGAGTTCGTGTAC  GGCGACTACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGAGCGAG  CAGGAGATCGGCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCA  TGA ACTTCTTCAAGACCGAGATCACCTGGCCAACGGCGAGATCCGGAA  GCGGCCCTGATCGAGACCAACGGCGAGACCGGGCGAGATCGTGTGGGAC  AAGGGCCGGGACTTCGCCACCGTGCGGAAGGTGCTGAGCATGCCCCAGG  TGAACATCGTGAAGAAGACCGAGGTGCAGACCGGGCGGCTTCAGCAAGG  AGAGCATCCTGCCAAGCGGAACAGCGACAAGCTGATCGCCCGGAAGA  AGGACTGGGACCCCAAGAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGC  CTACAGCGTGCTGGTGGTGGCCAAGGTGGAGAAGGGCAAGAGCAAGAA  GCTGAAGAGCGTGAAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGCGGAGC  AGCTTCGAGAAGAACCCCATCGACTTCTGGAGGCCAAGGGCTACAAGG  AGGTGAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCCAAGTACAGCCTGTTCGA  GCTGGAGAACGGCCGGAAGCGGATGCTGGCCAGCGCCGGCGAGCTGCA  GAAGGGCAACGAGCTGGCCCTGCCAGCAAGTACGTGAACTTCTGTAC  CTGGCCAGCCACTACGAGAAGCTGAAGGGCAGCCCCGAGGACAACGAG  CAGAAGCAGCTGTTCGTGGAGCAGCACAAGCACTACCTGGACGAGATCA  TCGAGCAGATCAGCGAGTTCAGCAAGCGGGTGATCCTGGCCGACGCCAA  CCTGGACAAGGTGCTGAGCGCCTACAACAAGCACCGGGACAAGCCCATC  CGGGAGCAGGCCGAGAACATCATCCACCTGTTACCCTGACCAACCTGG  GCGCCCCCGCCGCCTTCAAGTACTTCGACACCACCATCGACCGGAAGCG  GTACACCAGCACCAAGGAGGTGCTGGACGCCACCCTGATCCACCAGAGC  ATCACCGGCCTGTACGAGACCCGGATCGACCTGAGCCAGCTGGGCGGGC  ACGGCAGCGGCAGCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGGACGGCAGCCCCA  AGAAGAAGCGGAAGGTGGACAGCGGCTGA </p>
515	<p> ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACAGCGTGG  GCTGGGCCGTGATCACCGACGAGTACAAGGTGCCCAGCAAGAAGTTCAA  GGTGCTGGGCAACACCGACCGGCACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGC  GCCCTGCTGTTTCGACAGCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCCGGCTGAAGC  GGACCGCCCCGGCGGGCGGTACACCCGGCGGAAGAACCGGATCTGCTACCT  GCAGGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAGCTTCTTC  CACCGGCTGGAGGAGAGCTTCTGGTGGAGGAGGACAAGAAGCACGAG  CGGCACCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGA  AGTACCCACCATCTACCACCTGCGGAAGAAGCTGGTGGACAGCACCGA  CAAGGCCGACCTGCGGCTGATCTACCTGGCCCTGGCCACATGATCAAG </p>

TTCCGGGGCCACTTCCTGATCGAGGGCGACCTGAACCCCGACAACAGCG  
ACGTGGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTGCAGACCTACAACCAGCTGTT  
CGAGGAGAACCCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCCAAGGCCATCCTG  
AGCGCCCGGCTGAGCAAGAGCCGGCGGCTGGAGAACCTGATCGCCAGC  
TGCCCGGGCGAGAAGAAGAACGGCCTGTTTCGGCAACCTGATCGCCCTGAG  
CCTGGGCCTGACCCCAACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAGGAC  
GCCAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACC  
TGCTGGCCAGATCGGCGACCAGTACGCCGACCTGTTCTGGCCGCCAA  
GAACCTGAGCGACGCCATCCTGCTGAGCGACATCCTGCGGGTGAACACC  
GAGATCACCAAGGCCCCCTGAGCGCCAGCATGATCAAGCGGTACGACG  
AGCACCACCAGGACCTGACCCTGCTGAAGGCCCTGGTGCGGCAGCAGCT  
GCCCGAGAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGCTAC  
GCCGGCTACATCGACGGCGGCCAGCCAGGAGGAGTTCTACAAGTTCA  
TCAAGCCCATCCTGGAGAAGATGGACGGCACCGAGGAGCTGCTGGTGAA  
GCTGAACCGGGAGGACCTGCTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGC  
AGCATCCCCACCAGATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCATCCTGCGGC  
GGCAGGAGGACTTCTACCCCTTCTGAAGGACAACCGGGAGAAGATCGA  
GAAGATCCTGACCTTCCGGATCCCCTACTACGTGGGCCCCCTGGCCCGG  
GCAACAGCCGGTTCGCCTGGATGACCCGGAAGAGCGAGGAGACCATCAC  
CCCCTGGAACCTTCGAGGAGGTGGTGGACAAGGGCGCCAGCGCCCAGAGC  
TTCATCGAGCGGATGACCAACTTCGACAAGAACCTGCCCAACGAGAAGG  
TGCTGCCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTACAACGA  
GCTGACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCATGCGGAAGCCCGCCTTC  
CTGAGCGGCGAGCAGAAGAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGACCA  
ACCGGAAGGTGACCGTGAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAGA  
TCGAGTGCTTCGACAGCGTGGAGATCAGCGGCGTGGAGGACCGGTTCAA  
CGCCAGCCTGGGCACCTACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAG  
GACTTCCTGGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAGGACATCGTGC  
TGACCCTGACCCTGTTTCGAGGACCGGGAGATGATCGAGGAGCGGCTGAA  
GACCTACGCCACCTGTTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAGCGG  
CGGCGGTACACCGGCTGGGGCCGGCTGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCA  
TCCGGGACAAGCAGAGCGGCAAGACCATCCTGGACTTCTGAAGAGCGA  
CGGCTTCGCCAACCGGAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTG  
ACCTTCAAGGAGGACATCCAGAAGGCCAGGTGAGCGGCCAGGGCGAC  
AGCCTGCACGAGCACATCGCCAACCTGGCCGGCAGCCCCGCCATCAAGA

AGGGCATCCTGCAGACCGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTGAT  
GGGCCGGCACAAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAGATGGCCCGGGAGAA  
CCAGACCACCCAGAAGGGCCAGAAGAACAGCCGGGAGCGGATGAAGCG  
GATCGAGGAGGGCATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAGGAGCA  
CCCCGTGGAGAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTAC  
CTGCAGAACGGCCGGGACATGTACGTGGACCAGGAGCTGGACATCAACC  
GGCTGAGCGACTACGACGTGGACCACATCGTGCCCCAGAGCTTCCTGAA  
GGACGACAGCATCGACAACAAGGTGCTGACCCGGAGCGACAAGAACCG  
GGGCAAGAGCGACAACGTGCCAGCGAGGAGGTGGTGAAGAAGATGAA  
GAACTACTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCCAGCGGAAG  
TTCGACAACCTGACCAAGGCCGAGCGGGGCGGCCTGAGCGAGCTGGACA  
AGGCCGGCTTCATCAAGCGGCAGCTGGTGGAGACCCGGCAGATCACCAA  
GCACGTGGCCCAGATCCTGGACAGCCGGATGAACACCAAGTACGACGAG  
AACGACAAGCTGATCCGGGAGGTGAAGGTGATCACCTGAAGAGCAAG  
CTGGTGAAGCGACTTCCGGAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTGCGGGAGA  
TCAACAACCTACCACCACGCCACGACGCCTACCTGAACGCCGTGGTGGG  
CACCGCCCTGATCAAGAAGTACCCCAAGCTGGAGAGCGAGTTCGTGTAC  
GGCGACTACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGAGCGAG  
CAGGAGATCGGCAAGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCA  
TGAACTTCTTCAAGACCGAGATCACCTGGCCAACGGCGAGATCCGGAA  
GCGGCCCTGATCGAGACCAACGGCGAGACCGGCGAGATCGTGTGGGAC  
AAGGGCCGGGACTTCGCCACCGTGCGGAAGGTGCTGAGCATGCCCCAGG  
TGAACATCGTGAAGAAGACCGAGGTGCAGACCGGCGGCTTCAGCAAGG  
AGAGCATCCTGCCAAGCGGAACAGCGACAAGCTGATCGCCCGGAAGA  
AGGACTGGGACCCCAAGAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGC  
CTACAGCGTGCTGGTGGTGGCCAAGGTGGAGAAGGGCAAGAGCAAGAA  
GCTGAAGAGCGTGAAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGCGGAGC  
AGCTTCGAGAAGAACCCCATCGACTTCTGGAGGCCAAGGGCTACAAGG  
AGGTGAAGAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCCAAGTACAGCCTGTTCGA  
GCTGGAGAACGGCCGGAAGCGGATGCTGGCCAGCGCCGGCGAGCTGCA  
GAAGGGCAACGAGCTGGCCCTGCCAGCAAGTACGTGAACTTCCTGTAC  
CTGGCCAGCCACTACGAGAAGCTGAAGGGCAGCCCCGAGGACAACGAG  
CAGAAGCAGCTGTTCGTGGAGCAGCACAAGCACTACCTGGACGAGATCA  
TCGAGCAGATCAGCGAGTTCAGCAAGCGGGTGATCCTGGCCGACGCCAA  
CCTGGACAAGGTGCTGAGCGCCTACAACAAGCACCGGGACAAGCCCATC

	CGGGAGCAGGCCGAGAACATCATCCACCTGTTCCACCTGACCAACCTGG GCGCCCCCGCCGCCTTCAAGTACTTCGACACCACCATCGACCGGAAGCG GTACACCAGCACCAAGGAGGTGCTGGACGCCACCCTGATCCACCAGAGC ATCACCGGCCTGTACGAGACCCGGATCGACCTGAGCCAGCTGGGCGGCG ACTGA
--	---

[212] Состав липидных наночастиц (LNP)

[213] В общем, компоненты липидных наночастиц растворяли в 100% этаноле при различных молярных соотношениях. РНК-карго (например, иРНК Cas9 и sgРНК) растворяли в 25 мМ цитрата, 100 мМ NaCl, pH 5,0, в результате чего концентрация РНК-карго составляла приблизительно 0,45 мг/мл. LNP, использованные в Примерах 2-4, содержали ионизируемый липид ((9Z, 12Z)-3-((4,4-бис(октилокси)бутаноил)окси)-2-(((3-(диэтиламино)пропокси)карбонил)окси)метил)пропил-октадека-9,12-диеноат, также называемый 3-((4,4-бис(октилокси)бутаноил)окси)-2-(((3-(диэтиламино)пропокси)карбонил)окси)метил)пропил (9Z,12Z)-октадека-9,12-диеноат), холестерин, DSPC и PEG2k-DMG в молярном соотношении 50:38:9:3, соответственно. LNP были составлены с молярным отношением липидного амина к фосфату РНК (N:P) приблизительно 6 и соотношением gРНК к иРНК 1:1 по массе.

[214] LNP были приготовлены с использованием способа перекрестного потока с использованием смешивания падающих струй липида в этаноле с двумя объемами растворов РНК и одним объемом воды. Липид в этаноле смешивали путем перекрестного смешивания с двумя объемами раствора РНК. Четвертый поток воды был смешан с выходным потоком перекрестного смешивания через линейный тройник (см. W02016010840, Фиг. 2). LNP выдерживали в течение 1 часа при комнатной температуре, а затем разбавляли водой (приблизительно 1:1 об./об.). Разбавленные LNP концентрировали с использованием фильтрации в тангенциальном потоке на плоском картридже (Sartorius, 100 кДа MWCO), а затем заменяли буфер с использованием обессоливающих колонок PD-10 (GE) на 50 мМ Трис, 45 мМ NaCl, 5% (мас./об.) сахарозы, pH 7,5 (TSS). Затем полученную смесь фильтровали, используя стерильный фильтр 0,2 мкм. Конечный LNP хранили при 4° С или -80°С до дальнейшего использования.

[215] Дизайн направляющих LDHA человека и дизайн направляющих гомологии LDHA яванской макаки

[216] Первоначальный отбор направляющих проводился *in silico* с использованием эталонного генома человека (например, hg38) и определенных пользователем рассматриваемых геномных областей (например, экзонов, кодирующих белок *LDHA*), для идентификации РАМ в рассматриваемых областях. Для каждого идентифицированного РАМ были выполнены анализы и представлены статистические данные. Молекулы gРНК были дополнительно отобраны и ранжированы на основе ряда критериев, известных в данной области (например, содержание GC, прогнозируемая целевая активность и потенциальная нецелевая активность).

[217] В общей сложности 84 направляющих РНК были сконструированы в отношении *LDHA* человека (ENSG00000134333), нацеленного на экзонные кодирующие области белка. Направляющие и соответствующие геномные координаты приведены выше (Таблица 1). Сорок направляющих РНК имеют 100% гомологию с *LDHA* яванской макаки.

[218] Дополнительные направляющие были разработаны на основе транскрипта *LDHA de novo* яванских макаков. Исходные данные были получены в результате опубликованного транскриптомного секвенирования образца печени самки яванской макаки маврикийского происхождения (NCBI SRA ID: SRR1758956; Peng et al. (2015), *Nucleic Acids Research*, Volume 43, Issue D1, Pages D737-D742).

Транскриптомную сборку *de novo* проводили с использованием Trinity (v2.8.4; Grabherr et al. (2011), *Nature Biotechnology*, 29: 644-652) и SPAdes (v3.13.0; Bankevich et al. (2012), *Journal of Computational Biology*, 19:5). Оба способа позволили собрать транскрипты *LDHA*, которые были идентифицированы путем сравнения их последовательностей с белком *LDHA* (UniProt ID: Q9BE24) with BLAST (Altschul et al. (1990), *Journal of Molecular Biology*, 215:3, 403-410). Cas9 (иРНК/белок) и направляющая доставка РНК *in vitro*.

[219] Первичные гепатоциты печени человека (PHH) (Gibco, партия № Hu8298 или Hu8296) и первичные гепатоциты печени яванской макаки (PCH) (Gibco, партия № Cy367 или In Vitro ADMET Laboratories, Inc. партия № 10281011) размораживали и ресуспендировали в среде для размораживания гепатоцитов с добавками (Gibco, Кат. CM7500) с последующим центрифугированием. Супернатант удаляли, а осажденные клетки ресуспендировали в среде для посева гепатоцитов с добавкой (Invitrogen, Кат. A1217601 и CM3000). Клетки подсчитывали и высевали на 96-луночные планшеты, покрытые коллагеном I Bio-coat (ThermoFisher, Кат. 877272) при плотности 33 000 клеток/лунка для PHH и 50 000 клеток/лунка для PCH. Высевным клеткам давали возможность осесть и прикрепиться в течение 5 часов в инкубаторе для культур тканей при 37 ° C и 5% атмосфере CO<sub>2</sub>. После инкубации клетки проверяли на образование монослоя и один раз промывали культуральной гепатоцитарной средой (Takara, Кат. Y20020 и/или Invitrogen, Кат. A1217601 и CM4000).

[220] Для исследований с использованием dgРНК индивидуальные sgРНК и trРНК предварительно отжигали путем смешивания эквивалентных количеств реагента и инкубирования при 95° C в течение 2 минут и охлаждения до комнатной температуры.

Двойную направляющую (dgРНК), состоящую из предварительно гибридных sgРНК и trРНК, инкубировали с белком Spu Cas9 с образованием комплекса рибонуклеопротеина (RNP). Клетки трансфицировали Lipofectamine RNAiMAX (ThermoFisher, Кат. 13778150) в соответствии с протоколом производителя. Клетки трансфицировали с помощью RNP, содержащим Spu Cas9 (10 нМ), индивидуальную направляющую гид (10 нМ), индикаторную РНК (10 нМ), липофектамин RNAiMAX (1,0 мкл/лунка) и OptiMem.

[221] Для исследований с использованием sgРНКs направляющие инкубировали с белком Spu Cas9 для образования комплекса рибонуклеопротеидов (RNP). В исследованиях

с использованием трансфекции RNP клетки трансфицировали липофектамином RNAiMAX (ThermoFisher, Кат. 13778150) в соответствии с протоколом производителя. Клетки трансфицировали с помощью RNP, содержащим Spy Cas9 (10 нМ), sgРНК (10 нМ), липофектамин RNAiMAX (1,0 мкл/лунка) и OptiMem. В исследованиях с использованием электропорации клетки подвергали электропорации с помощью RNP, содержащего Spy Cas9 (2 мкМ) и sgРНК (4 мкМ), с использованием Lonza 4D-Nucleofector Core Unit (Кат. AAF-1002X), 96-луночное челночное устройство (кат. ААМ 10015) и набор первичных клеток Р3 (кат. V4XP-3960).

[222] Первичные гепатоциты человека и гепатоциты яванских макак также обрабатывали LNP, как описано ниже. Клетки инкубировали при 37° С, 5% CO<sub>2</sub> в течение 48 часов перед обработкой LNP. LNP инкубировали в среде, содержащей 3% сыворотки яванской макаки, при 37° С в течение 10 минут и вводили в клетки в количестве, как дополнительно представлено в данной заявке.

[223] Для липофекции иРНК Cas9 и gРНК использовались предварительно смешанные липидные составы, в которых липидные компоненты были восстановлены в 100% этаноле при молярном соотношении 50% липида А, 9% DSPC, 38% холестерина и 3% PEG2k-DMG. Затем липидную смесь смешивали с РНК карго (например, иРНК и gРНК Cas9) при молярном соотношении липидного амина к РНК-фосфату (N:P) приблизительно 6,0. Липофекции выполняли с 6% сывороткой яванских макак и соотношением gРНК к иРНК 1:1 по массе.

[224] Выделение геномной ДНК

[225] Клетки, трансфицированные РНН и РСН, собирали после трансфекции через 72 или 96 часов. gДНК экстрагировали из каждой лунки 96-луночного планшета, используя 50 мкл/лунка раствора для экстракции ДНК BaccalAmp (Epicenter, Кат. QE09050) согласно протоколу производителя. Все образцы ДНК были подвергнуты ПЦР и последующему NGS-анализу, как описано в данной заявке.

[226] Секвенирование нового поколения (NGS) и анализ эффективности нецелевого расщепления

[227] Чтобы количественно определить эффективность редактирования в целевом участке генома, было использовано глубокое секвенирование для выявления присутствия вставок и делеций, внесенных редактированием гена. Праймеры для ПЦР были сконструированы вокруг целевого сайта в пределах рассматриваемого гена (например, *LDHA*), и рассматриваемая область генома была амплифицирована. Дизайн последовательности праймеров был выполнен как стандарт в полевых условиях.

[228] Дополнительную ПЦР выполняли в соответствии с протоколами производителя (Illumina) для добавления химии для секвенирования. Ампликоны секвенировали на приборе Illumina MiSeq. Считывания были сопоставлены с эталонным геномом (например, hg38) после исключения тех, которые имели низкие баллы качества. Полученные в результате файлы, содержащие чтения, картировали относительно эталонного генома (файлы BAM), где были выбраны чтения, которые перекрывали



рассматриваемую целевую область, и было рассчитано количество чтений дикого типа по сравнению с числом чтений, содержащих вставку или удаление («инсерционно-делеционная мутация»).

[229] Процент редактирования (например, «эффективность редактирования» или «процент редактирования») определяется как общее количество считываний последовательности со вставками или удалениями («инсерционно-делеционная мутация») по сравнению с общим количеством считываний последовательностей, включая дикий тип.

[230] Анализ Вестерн-блоттинг белка лактатдегидрогеназы А (LDHA)

[231] Первичные гепатоциты человека обрабатывали LNP, составленным с использованием выбранных направляющих из Таблицы 1, как дополнительно описано в Примере 3. LNP инкубировали в средах (Takara, Кат. Y20020), содержащих 3% сыворотки яванской макаки, при 37 ° С в течение 10 минут. После инкубации LNP добавляли к гепатоцитам человека. Через 21 день после трансфекции среду удаляли и клетки лизировали 50 мкл/лунка буфера RIPA (Boston Bio Products, Кат. BP-115) плюс смесь недавно добавленных ингибиторов протеазы, состоящая из полной смеси ингибиторов протеаз (Sigma, Кат. 11697498001), 1 мМ DTT и 250 ед./мл бензоазы (EMD Millipore, Кат. 71206-3). Клетки держали на льду в течение 30 минут, после чего добавляли NaCl (конечная концентрация 1 М). Лизаты клеток тщательно перемешивали и оставляли на льду в течение 30 минут. Экстракты цельных клеток («WCE») переносили в планшет для ПЦР и центрифугировали для осаждения дебриса. Анализ Брэдфорда (Bio-Rad, Кат. 500-0001) использовали для оценки содержания белка в лизатах. Процедура анализа Брэдфорда была завершена в соответствии с протоколом производителя. Перед использованием экстракты хранили при -20° С.

[232] Мышей с дефицитом AGT лечили LNP, приготовленным с использованием выбранных препаратов, как дополнительно описано в Примере 4. У мышей после обработки собирали печень, и для экстракции белка использовали порции по 60 мг. Образцы помещали в пробирки с шариками (MP Biomedical, Кат. 6925-500) и лизировали 600 мкл/образец буфера RIPA (Boston Bio Products, Кат. BP-1 15) плюс смесь недавно добавленных ингибиторов протеазы, состоящая из полной смеси ингибиторов протеаз (Sigma, Кат. 116974500) и гомогенизованная со скоростью 5,0 м/сек. Затем образцы центрифугировали при 14000 об./мин. в течение 10 мин. при 4° С, и жидкость переносили в новую пробирку. Заключительное центрифугирование выполняли при 14000 об./мин в течение 10 мин. и образцы были количественно определены с использованием анализа Брэдфорда, как описано выше.

[233] Был проведен анализ Вестерн-блоттинг для оценки уровней белка LDHA. Лизаты смешивали с буфером Лэммли и денатурировали при 95° С в течение 10 минут. Блоттинг запускали с использованием системы NuPage на 10% гелях Bis-Tris (Thermo Fisher Scientific, Кат. NP0302BOX) согласно протоколу производителя с последующим влажным переносом на 0,45 мкм нитроцеллюлозную мембрану (Bio-Rad, Кат. 1620115).

После того, как блоттинг-мембрана была тщательно промыта водой и окрашена

раствором Ponceau S (Boston Bio Products, Кат. ST-180) для подтверждения полной и равномерной передачи. Блоттинг блокировали с использованием 5% сухого молока в TBS в течение 30 минут на лабораторном встряхивателе при комнатной температуре. Блот промывали TBST и зондировали поликлональным анти  $\alpha$ -LDHA кроличим антителом (Sigma, Кат. SAB2108638 для клеточного лизата или Genetex, кат. GTX101416 для лизата печени мыши) при 1:1000 в TBST. Для блотов с лизатом клеток *in vitro* в качестве контроля загрузки использовали бета-актин (Novus, Кат. NB600-501) при 1:1000 в TBST и инкубировали одновременно с первичным антителом LDHA. Для блотов с экстрактами печени мышей *in vivo* GAPDH использовали в качестве контроля загрузки (Abeam, ab8245) при 1:1000 в TBST и инкубировали одновременно с первичным антителом LDHA. Блот запечатали в пакет и хранили в течение ночи при 4° C на лабораторной качалке. После инкубации блот промывали 3 раза по 5 минут каждый в TBST и зондировали вторичными антителами к мышам и кроликам (Thermo Fisher Scientific, Кат. PI35518 и PISA535571) при 1:12 500 каждый в TBST в течение 30 минут при комнатной температуре. После инкубации блот промывали 3 раза по 5 минут каждый в TBST и 2 раза в PBS. Блот визуализировали и анализировали с использованием системы Licor Odyssey.

[234] Анализ белка лактатдегидрогеназы А (LDHA) иммуногистохимическим окрашиванием

[235] Для визуального анализа белка LDHA в печени мышей стандартное иммуногистохимическое окрашивание проводили на приборе Lecia Bond Rxm. Для извлечения антигена (HIER) предметные стекла нагревали в буфере на основе ЭДТА с pH 9 в течение 25 минут при 94° C с последующей 30-минутной инкубацией антител при 1:500 (Abeam Кат. Ab52488). Связывание антител детектировали с использованием вторичного полимера, конъюгированного с HRP, с последующей хромогенной визуализацией с помощью диаминобензидина.

[236] Измерение активности LDH в мышцах и печени мышей

[237] Биохимический способ (например, Wood KD et al., Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis. 2019 Sep 1;1865(9):2203-2209; PMC6613992) использовали для определения активности лактатдегидрогеназы. Для измерения активности лактатдегидрогеназы ткань гомогенизировали в ледяном холодном буфере для лизиса (25 mM HEPES, pH 7,3, 0,1% Triton-X-100) с обработкой ультразвуком зонда с получением лизата 10% мас./об. Активность LDH измеряли по увеличению поглощения при 340 нм при восстановлении NAD до NADH в присутствии лактата. Активность LDG от лактата к пирувату измеряли с помощью 20 mM лактата, 100 mM трис-HCL, pH 9,0, 2 mM NAD<sup>+</sup>, 0,01% лизата печени. Набор для анализа белка Coomassie Plus (Pierce, Rockford, IL) с бычьим сывороточным альбумином (BSA) в качестве стандарта использовали для определения концентрации белка в лизатах тканей.

[238] Измерение оксалата, креатинина, пирувата и лактата в образцах мышей

[239] Для определения оксалатов часть собранной мочи подкисляли до pH от 1 до 2 с помощью HCl перед хранением при -80° C, чтобы предотвратить любую возможную

кристаллизацию оксалата, которая может произойти при хранении в холодильнике и/или оксалогене, связанном с подщелачиванием. Оставшуюся неподкисленную мочу замораживали при  $-80^{\circ}\text{C}$  для измерения креатинина. Препараты плазмы фильтровали через центробежные фильтры Nano-sep (VWR International, Batavia, IL) с номинальным пределом молекулярной массы 10 000 для удаления макромолекул перед ионной хроматографией в сочетании с масс-спектрометрией или ICMS (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA). Центробежные фильтры промывали 10 мМ HCl перед фильтрацией образца для удаления любых загрязняющих следов органических кислот, захваченных фильтрующим устройством. Ткань печени экстрагировали 10% (масс./об.) трихлоруксусной кислотой (TCA) для анализа органических кислот. Эти органические кислоты измеряли с помощью ICMS после удаления TCA путем интенсивного встряхивания с равным объемом 1,1,2-трихлортрифторэтан(фреон)-триоктиламина (3:1, об./об.; Aldrich, Milwaukee, WI), центрифугирования при  $4^{\circ}\text{C}$  для ускорения разделения фаз и сбора верхнего водного слоя для анализа. Креатинин мочи измеряли на химическом анализаторе, а оксалат мочи - с помощью ICMS, как описано выше.

[240] Для количественного определения лактата (SIM 89,0, 35 В) и 13С3-лактата (SIM 92,0, 35 В) использовали мониторинг выбранных ионов (SIM) при следующих соотношениях масса/заряд и напряжениях конуса. Пируват измеряли с помощью IC/MS с анионообменной колонкой AS11-НС 4 мкм,  $2 \times 150$  мм при контролируемой температуре  $30^{\circ}\text{C}$  и Dionex™ ERS™ 500 анионным электролитически регенерируемым подавителем. Для разделения анионов образца использовали градиент КОН от 0,5 до 80 мМ в течение 60 мин при скорости потока 0,38 мл/мин. Масс-спектрометр (MSQ-PLUS) работал в отрицательном режиме ESI, напряжение на игле 1,5 В, температура источника  $500^{\circ}\text{C}$ , элюент колонки был смешан с 50% ацетонитрилом со скоростью 0,38 мл/мин с использованием смесительного тройника с нулевым мертвым объемом перед вводом в MSQ. Мониторинг выбранных ионов (SIM) при следующих соотношениях масса/заряд и напряжениях конуса использовался для пирувата (SIM 87,0, 30 В).

[241] Пример 2 - Проверка и квалификация направляющей

[242] Перекрестный скрининг направляющих LDHA в первичных гепатоцитах

[243] Направляющие, нацеленные на человеческий *LDHA* и гомологичные у яванской макаки, трансфицировали в первичные гепатоциты человека (посредством трансфекции RNP) и яванской макаки (посредством RNP-электропорации), как описано в Примере 1.

Процент редактирования определяли для sgPHK, содержащих каждую направляющую последовательность для каждого типа клеток. Данные скрининга направляющих последовательностей в Таблице 1 в обеих клеточных линиях перечислены ниже (Таблицы 4-5).

[244] Таблица 4 показывает среднее и стандартное отклонение повторяющихся образцов для % редактирования, % вставки (Ins) и % делеции (Del) для *LDHA*, трансфицированных как RNP в первичные гепатоциты человека. N=2.

Таблица 4: данные редактирования <i>LDHA</i> для sgРНК, доставленных в первичные человеческие гепатоциты посредством RNP трансфекции						
<b>НАПРАВЛЯЮЩАЯ ID</b>	Ср. % редактирован ия	Ст. откл % редактирован ия	Ср. % Ins	Ст. откл % Ins	Ср. % Del	Ст. откл % Del
G009440	9,50	4,10	2,45	0,92	7,05	3,18
G012089	38,15	3,18	12,10	0,14	26,00	3,25
G012090	11,85	3,89	1,45	0,49	10,60	3,39
G012092	22,75	2,76	4,00	0,14	19,65	2,62
G012093	34,60	0,28	8,95	0,21	25,60	0,42
G012094	20,50	0,42	14,30	0,85	6,35	1,34
G012095	28,45	2,33	3,50	0,71	25,00	2,97
G012096	32,30	0,42	0,70	0,00	31,75	0,49
G012097	24,65	1,34	3,95	1,06	20,75	2,33
G012098	6,25	1,77	2,10	0,57	4,30	1,13
G012099	12,20	1,84	5,10	0,85	7,10	0,99
G012100	9,40	1,13	6,95	0,78	2,45	0,35
G012101	3,60	0,85	1,45	0,35	2,15	0,49
G012103	34,90	3,11	2,30	0,00	32,70	3,25
G012104	5,85	2,33	0,25	0,21	5,60	2,12
G012105	23,45	0,78	8,45	0,49	15,15	1,34
G012106	5,80	1,56	1,60	0,14	4,20	1,41
G012107	2,85	0,21	0,75	0,21	2,20	0,28
G012108	14,50	0,57	0,80	0,14	13,75	0,64
G012109	12,40	0,71	0,65	0,07	11,80	0,71
G012110	12,00	1,98	3,85	0,49	8,35	1,48
G012111	27,20	0,28	16,40	0,14	10,85	0,07
G012112	3,85	1,34	0,95	0,35	2,95	1,06
G012113	9,45	2,62	2,05	1,06	7,40	1,56
G012114	7,05	0,78	1,95	0,07	5,10	0,85
G012115	31,10	7,64	12,40	3,25	18,90	4,24
G012116	12,55	1,34	4,85	0,07	7,80	1,41
G012117	10,40	1,41	3,40	0,00	7,40	1,56
G012118	21,95	3,32	2,35	0,35	19,60	2,97

G012119	15,50	3,68	0,50	0,14	14,95	3,46
G012120	22,05	4,88	1,70	0,71	20,45	4,31
G012121	10,90	0,28	3,45	0,21	7,65	0,64
G012122	2,60	0,28	0,40	0,00	2,20	0,28
G012123	6,80	0,85	1,90	0,14	4,90	0,71
G012124	10,90	2,40	1,30	0,14	9,70	2,26
G012125	6,10	0,42	0,85	0,21	5,35	0,64
G012126	1,85	0,21	0,50	0,00	1,35	0,21
G012127	10,05	1,20	0,85	0,21	9,30	1,41
G012128	6,20	0,14	1,05	0,21	5,20	0,28
G012129	6,40	0,71	0,45	0,07	6,00	0,57
G012130	1,00	0,14	0,55	0,07	0,55	0,07
G012131	3,15	0,21	0,70	0,28	2,55	0,35
G012132	17,90	1,84	11,50	2,12	6,45	0,21
G012133	23,45	0,64	6,70	0,14	16,75	0,49
G012134	4,45	0,07	1,70	0,00	2,85	0,07
G012135	16,80	0,71	4,30	0,42	12,60	0,42
G012136	38,65	0,92	0,90	0,00	37,80	0,99
G012137	1,10	0,28	0,30	0,14	0,80	0,14
G012138	17,35	3,75	4,70	0,99	12,85	2,76
G012139	6,30	0,57	0,45	0,35	5,85	0,21
G012140	14,65	2,33	4,30	1,84	10,45	0,49
G012141	0,95	0,07	0,35	0,07	0,65	0,07
G012142	32,35	0,92	30,85	1,06	19,55	0,64
G012143	3,35	0,07	1,75	0,07	1,60	0,00
G012149	17,65	0,35	1,50	0,57	16,20	0,14
G012150	12,65	0,64	9,50	0,85	3,20	0,14
G012151	12,90	0,14	6,70	0,14	6,25	0,21
G012152	4,80	0,14	0,80	0,14	4,10	0,00
G012154	11,45	2,90	4,85	1,06	6,65	1,91
G012156	7,85	1,34	3,70	0,42	4,30	0,85
G012158	10,90	1,56	2,20	0,57	8,70	0,99
G012159	11,35	0,49	2,35	0,07	9,10	0,57
G012160	10,40	0,42	2,00	0,28	8,45	0,07

G012162	3,95	0,49	1,75	0,35	2,30	0,14
G012165	27,95	3,04	1,40	0,71	26,55	2,47
G012167	27,95	1,06	18,70	0,57	9,35	0,49
G012168	9,90	1,27	0,50	0,28	9,50	0,99
G012169	20,20	2,97	4,05	0,78	16,30	2,12
G012171	19,15	1,34	2,90	0,71	16,40	0,57
G012172	15,85	2,47	2,15	0,35	13,85	2,19
G012173	11,10	0,14	6,60	0,14	4,55	0,07

[245] Таблица 5 показывает среднее и стандартное отклонение для % редактирования, % вставки (Ins), и % делеции (Del) для протестированных *LDHA* sgРНК, электропорированных с RNP в первичных гепатоцитах яванских макак. N=2.

<b>Таблица 5: данные редактирования LDHA для sgРНК, доставленных в первичные гепатоциты яванских макак посредством RNP электропорации</b>						
<b>НАПРАВЛЯЮЩАЯ ID</b>	<b>Ср. % редактирование</b>	<b>Ст. откл % редактирование</b>	<b>Ср. % Ins</b>	<b>Ст. откл % Ins</b>	<b>Ср. % Del</b>	<b>Ст.откл % Del</b>
G012090	11,40	8,34	0,20	0,14	11,30	8,20
G012143	4,75	0,92	2,25	0,07	2,60	0,85
G012145	4,10	1,70	0,15	0,07	3,95	1,63
G012146	9,60	2,69	3,50	1,70	6,20	1,13
G012147	0,20	0,00	0,00	0,00	0,15	0,07
G012148	36,30	1,70	12,80	0,28	23,90	1,56
G012149	31,00	3,82	1,30	0,00	29,65	3,75
G012150	30,35	19,16	18,60	14,00	11,95	5,16
G012151	65,05	4,45	36,60	2,26	28,50	2,12
G012152	19,50	0,14	0,55	0,21	19,05	0,21
G012153	0,90	0,42	0,05	0,07	0,85	0,35
G012154	47,50	0,99	28,60	3,68	19,00	2,55
G012155	65,55	3,32	2,25	0,21	63,65	3,18
G012156	17,60	9,05	3,05	0,92	14,55	8,27
G012157	42,80	6,36	7,70	0,28	35,10	6,65
G012158	31,95	17,47	4,35	3,04	27,70	14,57
G012159	44,70	1,41	3,60	0,28	41,10	1,13
G012160	34,70	1,70	7,55	0,78	27,20	2,40

G012161	25,75	6,58	5,75	3,18	20,20	3,39
G012162	14,50	3,82	6,55	0,35	8,10	3,54
G012163	28,30	4,53	0,40	0,00	28,00	4,53
G012164	57,85	2,33	3,65	0,35	54,20	2,69
G012165	42,75	14,07	1,30	0,14	41,45	13,93
G012166	57,55	5,30	39,70	3,11	17,90	2,12
G012167	47,95	12,94	23,50	6,65	24,70	6,08
G012168	21,80	N/A	0,10	N/A	21,80	N/A
G012169	58,25	5,73	2,50	0,57	55,85	5,30
G012170	17,55	4,60	5,40	0,42	12,15	4,17
G012171	49,25	9,83	6,75	3,04	42,55	6,86
G012172	19,10	3,68	1,45	0,35	17,65	3,32
G012173	21,35	8,27	7,75	3,18	13,65	5,16

[246] Таблица 6 показывает среднее и стандартное отклонение для % редактирования по множественным хромосомальным положениям для протестированных *LDHA* sgРНК в первичных гепатоцитах яванских макаков при 30 нМ концентрации sgРНК. N=2.

<b>Таблица 6: данные редактирования LDHA для sgРНК, доставленных в первичные гепатоциты яванских макаков</b>						
<b>Направляющая ID</b>	<b>Chr12 Ср.</b>	<b>Chr12 Ст.</b>	<b>Chr14 Ср.</b>	<b>Chr14 Ст.</b>	<b>Chr17 Ср.</b>	<b>Chr17 Ст.</b>
	<b>% редактирования</b>	<b>% откл редактирования</b>	<b>% редактирования</b>	<b>% откл редактирования</b>	<b>% редактирования</b>	<b>% откл редактирования</b>
G015538	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
G015539	0,0	0,0	19,4	3,5	0,0	0,0
G015540	0,0	0,0	34,6	0,5	0,0	0,0
G015541	59,3	6,7	0,0	0,0	59,3	5,4
G015542	0,0	0,0	0,0	0,0	31,7	1,1
G015543	0,0	0,0	27,0	1,6	0,0	0,0
G015544	0,0	0,0	7,6	0,8	0,0	0,0
G015545	0,0	0,0	9,3	1,7	0,0	0,0
G015546	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
G015547	0,0	0,0	58,6	4,2	0,0	0,0
G015548	0,0	0,0	32,5	4,0	0,0	0,0
G015549	0,0	0,0	9,4	5,1	0,0	0,0

G015550	15,0	4,2	0,0	0,0	15,9	4,3
G015551	0,0	0,0	6,7	3,5	0,0	0,0
G015552	25,7	16,6	0,0	0,0	26,7	16,0
G015553	21,6	0,0	0,0	0,0	25,1	9,7
G015554	0,0	0,0	20,4	7,4	0,0	0,0
G015555	0,0	0,0	32,3	14,0	0,0	0,0
G015556	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
G015557	0,0	0,0	8,6	5,3	4,0	0,0
G015558	0,0	0,0	15,9	11,2	0,0	0,0
G015559	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
G015560	0,0	0,0	36,7	0,0	0,0	0,0
G015561	0,0	0,0	42,1	0,0	0,0	0,0
G015562	51,6	0,0	0,0	0,0	43,8	0,0
G015563	37,2	0,0	0,0	0,0	38,3	0,0
G015564	44,9	0,0	0,0	0,0	40,2	0,0
G015565	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
G015566	35,6	0,0	0,0	0,0	36,5	0,0
G015567	0,0	0,0	3,6	0,0	0,0	0,0
G015568	0,0	0,0	10,3	3,0	0,0	0,0
G015569	0,0	0,0	22,6	0,9	0,0	0,0
G015570	0,0	0,0	17,4	1,0	0,0	0,0
G015571	0,0	0,0	98,0	0,2	0,0	0,0
G015572	0,0	0,0	14,7	0,7	0,0	0,0
G015573	0,0	0,0	7,6	2,0	0,0	0,0
G015574	0,0	0,0	15,8	3,8	0,0	0,0
G015575	0,0	0,0	0,0	0,0	27,0	4,2
G015576	0,0	0,0	0,0	0,0	16,5	2,5
G015577	0,0	0,0	0,0	0,0	27,8	5,4
G015578	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
G015579	41,4	1,0	0,0	0,0	42,2	1,9
G015580	17,4	0,0	0,0	0,0	24,2	1,6
G015581	6,2	0,5	0,0	0,0	6,3	0,1
G015582	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
G015583	0,0	0,0	27,8	2,2	0,0	0,0



G015584	0,0	0,0	6,5	0,0	0,0	0,0
G015585	0,0	0,0	4,3	1,3	0,0	0,0
G015586	0,0	0,0	20,5	0,8	15,0	1,1
G015587	0,0	0,0	40,6	3,2	0,0	0,0
G015588	0,0	0,0	21,2	1,2	0,0	0,0
G015589	0,0	0,0	22,4	0,8	0,0	0,0
G015590	0,0	0,0	29,3	4,3	0,0	0,0
G015591	0,0	0,0	38,8	2,3	0,0	0,0
G015592	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
G015593	0,0	0,0	9,8	1,3	0,0	0,0
G015594	0,0	0,0	41,4	6,4	0,0	0,0
G015595	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
G015596	0,0	0,0	5,1	2,7	0,0	0,0
G015597	0,0	0,0	12,1	2,2	0,0	0,0
G015598	0,0	0,0	25,6	3,5	0,0	0,0
G015599	0,0	0,0	25,6	1,8	0,0	0,0
G015600	35,9	4,7	0,0	0,0	38,4	7,6
G015601	23,6	0,6	0,0	0,0	24,1	1,1
G015602	0,0	0,0	37,6	1,7	0,0	0,0
G015603	0,0	0,0	17,7	0,3	0,0	0,0
G015604	53,5	7,2	0,0	0,0	72,6	2,5
G015605	12,3	2,8	0,0	0,0	13,5	1,2
G015606	30,5	0,8	0,0	0,0	27,3	1,6
G015607	10,9	2,9	0,0	0,0	11,5	0,5
G015608	0,0	0,0	0,0	0,0	20,3	1,5
G015609	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
G015610	0,0	0,0	29,5	0,3	0,0	0,0
G015611	0,0	0,0	14,8	1,0	0,0	0,0
G015612	0,00	0,00	2,00	0,00	22,90	0,00
G015613	0,00	0,00	32,90	0,85	33,90	2,55
G015614	0,00	0,00	0,00	0,00	12,25	0,64
G015615	0,00	0,00	0,00	0,00	30,05	1,91
G015616	0,00	0,00	0,00	0,00	5,25	0,21
G015617	0,00	0,00	0,00	0,00	36,15	0,64

G015618	0,00	0,00	0,00	0,00	8,75	0,92
G015619	2,45	0,35	0,00	0,00	3,85	0,49
G015620	0,00	0,00	0,00	0,00	18,25	2,90
G015621	0,00	0,00	0,00	0,00	46,70	0,71
G015622	41,60	2,83	3,05	1,06	0,00	0,00
G015623	15,60	0,42	1,15	0,35	0,00	0,00
G015624	0,00	0,00	1,70	0,57	0,00	0,00
G015625	0,00	0,00	0,00	0,00	22,50	1,70
G015626	0,00	0,00	0,00	0,00	50,45	1,48
G015627	0,00	0,00	0,00	0,00	24,60	0,85
G015628	0,00	0,00	0,00	0,00	8,70	1,27
G015629	0,00	0,00	0,00	0,00	50,55	0,07
G015630	17,10	0,28	0,00	0,00	0,00	0,00

[247] На основании данных редактирования первичных человеческих гепатоцитов и первичных гепатоцитов яванских макак, дополнительно оценивали субпопуляцию направляющих последовательностей. Данная субпопуляция представлена в Таблицах 7 и 8, с соответствующими данными редактирования из воспроизведенных скринингов первичных гепатоцитов.

**Таблица 7: данные редактирования LDHA для sgРНК в первичных человеческих гепатоцитах, выбранных для дополнительного анализа в РНН**

GUIDE ID	% редактирования (из Таблицы 4 выше)
G012089	38,15
G012093	34,60
G012095	28,45
G012096	32,30
G012103	34,90
G012111	27,20
G012115	31,10
G012120	22,05
G012133	23,45
G012136	38,65

**Таблица 8: Данные редактирования LDHA для sgРНК в первичных гепатоцитах яванских макак для дополнительного анализа в РСН**

GUIDE ID	% редактирования (из Таблицы 5 выше)
G012151	65,05

G012155	65,55
G012157	42,8
G012159	44,7
G012162	14,5
G012164	57,85
G012165	42,75
G012166	57,55
G012167	47,95
G012169	58,25

[248] Ненаправленный анализ направляющих LDHA

[249] Биохимический способ (см., например, Cameron et al., *Nature Methods*. 6, 600-606; 2017) был использован для определения потенциальных нецелевых геномных сайтов, расщепляемых Cas9, направленных на *LDHA*. В этом эксперименте 10 модифицированных sgРНК, направленных на человеческий *LDHA* (и две контрольные направляющие с известными нецелевыми профилями) были подвергнуты скринингу с использованием выделенной геномной ДНК НЕК293, и потенциальные нецелевые результаты были представлены на Фигуре 1. Анализ выявил потенциальные нецелевые сайты для тестируемых sgРНК.

[250] Целевое секвенирование для валидации потенциальных нецелевых сайтов

[251] В известных анализах нецелевого обнаружения, таких как биохимический способ, использованный выше, большое количество потенциальных нецелевых сайтов, обычно восстанавливается по дизайну, чтобы «создать широкую сеть» для потенциальных сайтов, которые могут быть проверены в других контекстах, например, в рассматриваемой первичной клетке.

Например, биохимический способ обычно превышает количество потенциальных нецелевых сайтов, поскольку в анализе используется очищенная высокомолекулярная геномная ДНК, свободная от клеточного окружения, и зависит от используемой дозы Cas9 RNP. Соответственно, потенциальные нецелевые сайты, идентифицированные этими способами, могут быть подтверждены с использованием целевого секвенирования идентифицированных потенциальных нецелевых сайтов.

[252] На одном подходе первичные гепатоциты обрабатывают LNP, содержащими иРНК Cas9 и рассматриваемую sgРНК (например, sgРНК, имеющую потенциальные нецелевые сайты для оценки). Затем первичные гепатоциты лизируются и праймеры, фланкирующие потенциальный(-ые) нецелевой(-ые) сайт(-ы), используются для создания ампликона для анализа NGS. Идентификация инсерционно-делеционных мутаций на определенном уровне может подтвердить потенциальный нецелевой сайт, тогда как отсутствие инсерционно-делеционных мутаций, обнаруженных на потенциальном нецелевом сайте, может указывать на ложноположительный результат в использованном

нецелевом анализе.

[253] Перекрестный скрининг препаратов липидных наночастиц (LNP), содержащих иРНК и sgРНК Spу Cas9, в первичных гепатоцитах человека и яванских макак

[254] Препараты липидных наночастиц (LNP) модифицированных sgРНК, направленных на человеческий *LDHA* и гомологичные у яванских макак, тестировали на первичных гепатоцитах человека и первичных гепатоцитах яванских мака в анализе доза-ответ. LNP были составлены, как описано в Примере 1. Первичные гепатоциты человека и яванской макаки высевали, как описано в Примере 1. Обе клеточные линии инкубировали при 37° С, 5% CO<sub>2</sub> в течение 48 часов перед обработкой LNP. LNP инкубировали в среде, содержащей 6% сыворотку яванской макаки, при 37° С в течение 10 минут. После инкубации LNP добавляли к гепатоцитам человека или яванской макаки по 8-балльной 3-кратной кривой доза-ответ, начиная с 300 нг иРНК Cas9. Клетки лизировали через 96 часов после обработки для анализа NGS, как описано в Примере 1.

Данные кривой доза-ответ для направляющих последовательностей в обеих клеточных линиях показаны на Фиг. 2 и 3. Процент редактирования при концентрации 22 нМ ниже в Таблицах 9 и 10.

[255] В Таблице 9 показано среднее и стандартное отклонение для % редактирования, % вставки (Ins) и % делеции (Del) для протестированных sgРНК *LDHA* в концентрации 22 нМ, доставленных с Spу Cas9 через LNP в первичных гепатоцитах человека. Эти образцы были продублированы.

<b>Таблица 9: данные редактирования LDHA для sgРНК/Cas9 и РНК, доставленных в первичные человеческие гепатоциты посредством LNP при 22 нМ (в отношении концентрации sgРНК карго)</b>							
Направляющая ID	Avg % редактирования	Стд отн % редактирования	Ср% Ins	Стд отн % Ins	Ср % Del	Стд отн % Del	EC50
G012089	69,10	4,95	22,65	3,04	46,50	1,98	90,93
G012093	89,30	0,99	20,75	0,64	68,65	1,48	30,85
G012095	76,75	2,19	8,70	0,14	68,20	2,40	71,83

G012096	82,00	2,55	1,90	0,42	80,10	2,12	53,27
G012103	84,30	0,00	5,65	1,20	78,75	1,20	8,73
G012111	67,80	2,83	32,95	2,62	34,90	0,14	63,84
G012115	80,05	3,46	34,65	1,91	45,55	1,48	50,98
G012120	74,15	1,91	5,20	1,27	69,00	0,71	48,93
G012133	75,25	1,20	24,55	1,20	50,75	2,33	55,54
G012136	86,50	0,71	1,45	0,07	85,10	0,85	18,54

[256] В Таблице 10 показаны среднее значение и стандартное отклонение для % редактирования, % вставки (Ins) и % делеции (Del) для протестированных sgРНК *LDHA* в концентрации 22 нМ, доставленных с Spу Cas9 через LNP в первичные гепатоциты яванской макаки. Эти образцы были созданы в трех экземплярах.

**Таблицы 10: данные реактирования LDHA для sgРНК/Cas9 иРНК, доставленных в первичные человеческие гепатоциты посредством LNP при 22 нМ (относительно концентрации sgРНК карго)**

Направляющая ID	Ср% редактирование	Отн откл % редактирования	Ср% Ins	Ст Откл% Ins	Ср % Del	Ст откл % Del	EC50
G012151	94,87	0,12	78,50	1,39	16,77	1,33	0,599
G012155	96,93	0,23	7,17	0,15	90,83	0,31	0,255
G012157	77,43	3,33	31,77	1,76	46,80	2,17	1,111
G012159	87,73	1,02	20,47	3,37	67,93	3,11	0,950

G012162	95,17	0,64	28,77	0,25	67,17	0,99	0,801
G012164	78,80	0,17	10,17	0,31	69,10	0,20	0,637
G012165	83,40	2,20	14,87	0,83	69,27	2,72	0,953
G012166	97,47	0,38	82,00	2,07	16,03	2,15	0,250
G012167	96,63	0,29	70,37	0,90	27,87	1,29	0,297
G012169	95,13	1,29	19,77	2,15	75,97	1,06	0,438

[257] Перекрестный скрининг иРНК и sgРНК Spy Cas9 в первичных гепатоцитах яванской макаки с использованием липофекции. Модифицированные sgРНК, нацеленные на *LDHA*, тестировали на первичных гепатоцитах яванской макаки в анализе доза-ответ. Образцы липофекции получали, как описано в Примере 1. Первичные гепатоциты яванской макаки высевали, как описано в Примере 1. Клетки инкубировали при 37° С, 5% CO<sub>2</sub> в течение 48 часов перед липофекцией. Образцы липофекции инкубировали в среде, содержащей 6% сыворотку яванской макаки, при 37° С в течение 10 минут. После инкубации образцы липофекции добавляли к гепатоцитам яванской макаки по 8-балльной 3-кратной кривой доза-ответ, начиная с 53 нМ sgРНК (n=2). Клетки лизировали через 96 часов после обработки для анализа NGS, как описано в Примере 1. Данные кривой доза-ответ для направляющих последовательностей показаны на Фиг. 12А-12С. % редактирования при концентрации 53 нМ приведен ниже в Таблице 11.

[0258]

**Таблица 11: данные редактирования LDHA для sgРНК, доставленных в первичные гепатоциты яванских макаков посредством липофекции при 53 нМ sgРНК**

Направляющая ID	Chr12 Cp % редактирование	Ст. Откл Chr 12 Cp % редактирования	Chr12 EC50	Chr14 Cp% редактирования	Ст. Откл Cp Chr14 % редактирования	Chr 14 EC50	Chr17 Cp % редактирования	Ст Откл Chr17 Cp% редактирования	Chr 17 EC50
G012113	60,0	8,9	5,1	61,5	16,5	5,9	70,1	6,6	4,6
G015541	75,4	14,4	4,4	NA	NA	NA	85,4	8,7	4,0
G015547	69,8	5,7	6,8	76,0	1,1	7,5	76,2	3,5	7,6
G015561	NA	NA	NA	58,3	7,0	6,5	60,3	4,7	7,1
G015571	52,3	9,1	14,7	NA	NA	NA	68,1	6,6	10,2
G015587	70,8	8,5	9,2	78,0	9,2	9,3	80,3	8,1	8,7
G015591	74,6	1,1	8,3	72,3	2,8	8,6	77,9	1,1	6,9
G015594	51,3	3,5	6,8	67,2	6,6	6,1	70,2	5,4	6,7
G015622	66,3	6,9	4,5	4,9	0,3	5,0	NA	NA	NA

[259] Пример 3. Фенотипический анализ

[260] Вестерн-блоттинг анализ внутриклеточной лактатдегидрогеназы А

[261] Составы липидных наночастиц (LNP) модифицированных sgРНК, направленных на *LDHA* человека, вводили в первичные гепатоциты человека для получения образцов для Вестерн-блоттинга. LNP были составлены, как описано в Примере 1. Первичные гепатоциты человека высевали, как описано в Примере 1. Клетки инкубировали при 37° С, 5% CO<sub>2</sub> в течение 48 часов перед обработкой LNP. LNP инкубировали в среде, содержащей 6% сыворотку яванской макаки, при 37°С в течение 10 минут. После инкубации LNP добавляли к гепатоцитам человека в концентрации 25 нМ sgРНК на образец. Через 96 часов после трансфекции часть клеток собирали и обрабатывали для секвенирования NGS, как описано в Примере 1. Оставшиеся клетки собирали через двадцать один день после трансфекции, получали экстракты цельных клеток (WCE) и подвергали их анализу с помощью Вестерн-блоттинга, как описано в Примере 1.

[262] Данные редактирования для этих клеток представлены в Таблице 12.

<b>Таблица 12: данные редактирования LDHA для sgРНК, доставленной в первичные человеческие гепатоциты</b>	
<b>Направляющая ID</b>	<b>Частота редактирования в РНН</b>
G012089	0,871
G012093	0,961
G012095	0,926
G012096	0,93
G012103	0,882
G012111	0,886
G012115	0,933
G012120	0,895
G012133	0,915
G012136	0,895

[263] WCE анализировали с помощью Вестерн-блоттинга на предмет снижения уровня белка LDHA. Полноразмерный белок LDHA состоит из 332 аминокислот и с прогнозируемой молекулярной массы 36,6 кДа. Полоса с этой молекулярной массой наблюдалась на контрольном треке (необработанные клетки), но не на каком-либо из обработанных треков (Фиг. 4).

[264] Анализ транскрипта лактатдегидрогеназы А

[265] Отобранные модифицированные sgРНК, нацеленные на *LDHA*, вводили в первичные гепатоциты человека и яванской макаки липофекцией для получения образцов для количественной ПЦР. Образцы липофекции были составлены, как описано в Примере 1.



Первичные гепатоциты высевали, как описано в Примере 1. Клетки инкубировали при 37° С, 5% CO<sub>2</sub> в течение 48 часов перед обработкой липидными пакетами. Образцы липофекции инкубировали в среде, содержащей 6% сыворотку яванской макаки, при 37°С в течение 10 минут. После инкубации липидные пакеты добавляли к гепатоцитам в многократных концентрациях. Через 96 часов после липофекции клетки собирали и обрабатывали на РНК, как описано в Примере 1. Среднее снижение транскрипта LDHA в первичных гепатоцитах человека и яванской макаки через 15 часов содержится в Таблице 13 ниже, а полные данные доза-реакция показаны на Фиг. 13А-13В.

**Таблица 13: Среднее относительное снижение LDHA в первичных человеческих гепатоцитах и гепатоцитах яванской макаки при 15нМ sgРНК**

Направляющая ID	Первичные человеческие гепатоциты		Первичные гепатоциты яванской макаки	
	Ср. относительное снижение экспрессии LDHA	Ст. откл. ср. относительного снижения экспрессии LDHA	Ср. относительное снижение экспрессии LDHA	Ст. отн. откл. относительного снижения экспрессии LDHA
G012113	0,55	0,03	0,82	0
G012115	0,76	0,01	0,88	0,01
G012120	0,73	0	0,72	0,03
G012133	0,61	0,01	0,55	0,03
G015541	0,7	0,01	0,88	0,03
G015547	NA	NA	0,79	0,02
G015561	0,56	0,01	0,85	0,01
G015622	NA	NA	0,82	0,01

[266] Пример 4. Редактирование *in Vivo Ldha* в мышинной модели PH1

[267] В этом исследовании использовали мышей как дикого типа, так и мышей с дефицитом AGT (*Agxt1<sup>-/-</sup>*), например, нуль-мутантные мыши, лишённые иРНК и белка AGXT печени. Мыши с дефицитом AGT проявляют гипероксалурию и кристаллурию и, таким образом, представляют собой фенотипическую модель PH1, как ранее описано Salido et al., Proc Natl Acad Sci USA. 2006 Nov 28;103(48):18249-54. Мышей дикого типа использовали для определения состава для тестирования на AGT-дефицитных мышах.

[268] Перед составлением LNP, RNP, содержащие dgРНК, нацеленные на мышинные *Ldha*, подвергали скринингу на эффективность редактирования аналогично тому, как описано в Примере 2 для gРНК человека и яванской макаки, направленных на LDHA. После идентификации активных gРНК из скрининга dgРНК, меньший набор модифицированных sgРНК на основе этих gРНК был синтезирован для дальнейшей оценки *in vivo*.

[269] Животных взвешивали и группировали в соответствии с массой тела для приготовления дозируемых растворов на основе средней массы группы. LNP, содержащие модифицированные sgРНК, нацеленные на мышинный *Ldha* (см. Таблицу 14 ниже), вводили через боковую хвостовую вену в объеме 0,2 мл на животное (приблизительно 10 мл на килограмм массы тела). LNP были составлены, как описано в Примере 1. Через одну неделю после обработки мышей дикого типа умерщвляли и собирали ткань печени для экстракции ДНК и анализа редактирования *Ldha* мышцы. Как показано в Таблице 14 ниже, у обработанных мышей наблюдали дозозависимые уровни редактирования.

**Таблица 14: данные редактирования LDHA для sgРНК направленных мышинных *Ldha***

Направл яющая ID	sgРНК последовательность (* = PS связь; 'm' = 2'-O-Me нуклеотид)	Доза, общее РНК карго)	Ср. % редакт ирован ие	Ст. откл. % редакти рования	n
G009438	mG*mU*mU*CACGCGCUGAGCU GUCAGUUUUAGAmGmCmUmAm GmAmAmAmUmAmGmCAAGUUA AAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUmGmAmAmAmAm AmGmUmGmGmCmAmCmCmGmA mGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU *mU*mU (SEQ ID NO:86)	0,3	19,20	7,01	5
		1	59,08	9,83	5
		3	74,54	0,74	5
G009439	mG*mG*mG*GGCCCGUCAGCAA GAGGGUUUUAGAmGmCmUmAm GmAmAmAmUmAmGmCAAGUUA AAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUmGmAmAmAmAm AmGmUmGmGmCmAmCmCmGmA mGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU *mU*mU (SEQ ID NO:87)	0,3	9,40	2,75	5
		1	37,56	9,30	5
		3	65,94	5,37	5
G009442	mG*mU*mU*GCAAUCUGGAUUC AGCGGUUUUAGAmGmCmUmAm GmAmAmAmUmAmGmCAAGUUA AAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUmGmAmAmAmAm AmGmUmGmGmCmAmCmCmGmA	0,3	15,90	1,74	5
		1	49,98	7,41	5
		3	68,40	3,85	5

	mGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU *mU*mU (SEQ ID NO:88)				
G009445	mG*mU*mC*AUGGAAGACAAAC UCAAGUUUUAGAmGmCmUmAm GmAmAmAmUmAmGmCAAGUUA AAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUmGmAmAmAmAm AmGmUmGmGmCmAmCmCmGmA mGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU *mU*mU (SEQ ID NO:89)	0,3	12,40	4,60	5
		1	47,62	10,11	5
		3	62,10	4,06	5
G009447	mA*mC*mU*GGGCACUGACGCA GACAGUUUUAGAmGmCmUmAm GmAmAmAmUmAmGmCAAGUUA AAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUmGmAmAmAmAm AmGmUmGmGmCmAmCmCmGmA mGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU *mU*mU (SEQ ID NO:90)	0,3	9,48	4,78	5
		1	40,88	11,07	5
		3	66,10	4,69	5

[270] Установив, что LNP могут редактировать ген *Ldha* мыши *in vivo*, LNP, содержащий G009439, вводили AGT-дефицитным мышам в зависимости от дозы (0, 0,25, 0,5, 1 и 2 мг/кг) по отношению к общему иРНК карго. Этим мышам содержали в метаболических клетках, и мочу собирали для определения уровней оксалатов в различные моменты времени, например, как описано Liebow et al., J Am Soc Nephrol. 2017 Feb;28(2):494-503. Было показано, что редактирование гена *Ldha* и секреция оксалата увеличиваются и уменьшаются, соответственно, с увеличением доз LNP. % редактирования и мкг оксалата мочи/мг выделенного креатинина содержатся в Таблице 15 ниже и показаны на Фиг. 14А-14С.

**Таблица 15: % редактирования и мкг оксалата в моче/мг выделенного креатинина после введения LNP, содержащего G009439 AGT-дефицитным мышам.**

Лечение	Ср. редактирования %	Ст. откл. ср. редактирования %	Ср. мкг оксалата в моче/мг креатинина	Ст. откл. ср. оксалата в моче/мг креатинина	п
TSS	0,0	0,0	357,3	63,4	3
0,25 мг/кг <i>Ldha</i>	28,7	10,7	287,2	45,0	3

0,5 мг/кг Ldha	62,5	2,0	176,4	4,9	3
1 мг/кг Ldha	81,6	3,8	117,3	13,4	3
2 мг/кг Ldha	85,5	0,2	122,2	11,5	2

[271] Установив, что LNP могут снижать секрецию оксалата *in vivo*, LNP, содержащий G009439, вводили AGT-дефицитным мышам в дозе 2 мг/кг относительно общего груза иРНК (n=4). Как показано на Фиг. 5, уровни оксалата в моче снижались через одну неделю после лечения, и этот уровень снижения сохранялся по меньшей мере до 5 недель после введения дозы, после чего исследование было прекращено. У контрольных животных (которым вводили PBS) (n=4) снижения не наблюдалось. Процент изменения для каждого обработанного животного представлен в Таблице 16, а процентное снижение содержания оксалата в моче показано на каждой неделе после лечения в Таблице 18.

[272] В том же исследовании мышам с дефицитом AGT также вводили LNP (в дозе 2 мг/кг (n=4)), содержащую sgРНК (G000723), которая нацелена на мышинный *Haol*. Как также показано на Фиг. 5 и в Таблице 17, уровни оксалатов снижались через одну неделю после лечения LNP, содержащим эту gРНК, и этот уровень снижения сохранялся по меньшей мере до 5 недель после введения дозы.

[273]

G000723:

mC\*mA\*mC\*GUGAGCCAUGCACUGCAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmA  
mGmCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAm  
GmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU\*mU\*mU\*mU

(SEQ ID NO:85) \* = PS связь; 'm' = 2'-O-Me нуклеотид

**Таблица 16: результаты редактирования от AGXT -/- мышей, обработанных LNP, содержащим LDHA направленным gРНК (G009439) при 2 мг/кг**

Мышь #	% редактирования	% вставки	% делеции
1	90,8	1,1	89,7
2	86,1	1,3	84,8
3	90,5	1,1	89,4
4	90,3	1,2	89,2

**Таблица 17: результаты редактирования от AGXT -/- мышей, обработанных LNP, содержащим HAO1, направленный на gРНК (G000723) при 2мг/кг**

Мышь #	% редактирования	% вставки	% делеции
1	71,1	47,7	23,4
2	83,1	56	27,1
3	81,5	52,8	28,7
4	83,7	54,9	28,8

**Таблица 18: Средние уровни оксалата и % уменьшения от исходных данных у AGXT -/- мышей, обработанных LNP, содержащим LDHA, направленный на gРНК**

<b>(G009439) при 2мг/кг (общего РНК карго) в течение 5 недель. N=4</b>		
<b>Дата забора</b>	<b>Ср мкг оксалата/мг креатинина</b>	<b>Ср % снижение мкг оксалата/мг креатинина</b>
Исходные данные	407	0,00
Неделя 1	272	33,18
Неделя 2	182	55,25
Неделя 3	168	58,59
Неделя 4	146	64,11
Неделя 5	142	65,11

[274] Продемонстрировав устойчивое снижение содержания оксалата в моче у мышей с дефицитом AGT в течение 5 недель после лечения LNP, было проведено дополнительное исследование для отслеживания оксалата в моче в течение 15 недель после введения дозы. LNP, содержащий G009439, вводили AGT-дефицитным мышам в дозах 0,3 мг/кг (n=4) и 1 мг/кг (n=4). Этих мышей содержали в метаболических клетках, и мочу собирали в различные моменты времени для определения уровней оксалатов, как описано выше. В Таблице 19 показаны результаты редактирования для мышей с дефицитом AGT. Средний % редактирования, достигнутый при дозе 0,3 мг/кг, составил 33,42, ср. откл. 11,95. Средний % редактирования, достигнутый при дозе 1 мг/кг, составил 75,68, ср. откл. 7,35. Как показано на Фиг. 6, уровни оксалата в моче снизились после лечения, и этот уровень снижения сохранялся до 15 недель после введения дозы, после чего исследование было прекращено. Данные, представленные на Фиг. 6, представлены в Таблице 20. У контрольных (введенных PBS) животных (n=3) снижения не наблюдалось (данные не показаны).

[275] Образцы печени обработанных мышей обрабатывали и анализировали при помощи Вестерн-блоттинг, как описано в Примере 1. Процент снижения белка LDHA рассчитывали с использованием программного обеспечения Licor Odyssey Image Studio Ver 5.2. GAPDH использовали в качестве контроля нагрузки и исследовали одновременно с LDHA. Отношение было вычислено для значений денситометрии для GAPDH в каждом образце по сравнению с общей областью, охватывающей полосу для LDHA. Процент снижения белка LDHA определяли после того, как соотношения были нормализованы к полосам отрицательного контроля. Результаты показаны в Таблице 19 и изображены на Фиг.7.

[276] Белок LDHA у обработанных и необработанных мышей дополнительно охарактеризовали посредством иммуногистохимического окрашивания, как описано в Примере 1 и показано на Фиг. 8. Постепенное снижение окрашивания LDHA наблюдалось у мышей, которым вводили дозу 0,3 мг/кг, и мышей, получавших 1 мг/кг, по сравнению с контрольными мышами. На Фиг. 9 показана корреляция со значением R<sup>2</sup> 0,95 между редактированием и уровнями белка в Таблице 19.

**Таблица 19. Данные редактирования Agxt1<sup>-/-</sup> мышинной модели и данные по белку, 15-недельное исследование**

Мышь #	мг/кг G009439	% редактирова ния	% вставки	% делеции	LDHA оставшийся белок (относительно негативного контроля)
1	0,3	27,2	0,3	26,9	0,67
2	0,3	37,2	0,5	36,7	0,47
3	0,3	48,3	0,7	47,7	0,53
4	0,3	21,0	0,5	20,6	0,71
5	1	81,6	1,2	80,5	0,13
6	1	72,0	1,0	71,1	0,11
7	1	67,1	0,8	66,3	0,22
8	1	82,0	1,2	80,8	0,21

**Таблица 20. Ср. оксалат в моче Agxt1<sup>-/-</sup> мышинной модели (n=4 для каждой дозы)**

Неделя	Доза G009439 (мг/кг)	Ср оксалат в моче (мг/г креатинина/24 ч)	Ст. откл. ср. оксалат в моче
0	TSS	377,47	58,22
5	TSS	413,72	77,33
9	TSS	354,77	43,75
15	TSS	345,95	88,18
0	0.3	352,09	39,77
5	0.3	304,78	68,34
9	0.3	255,69	53,17
15	0.3	270,24	37,08
0	1.0	390,46	68,06
5	1.0	123,26	8,94
9	1.0	174,33	25,01
15	1.0	145,91	15,46

[277] Образцы печени и мышц обработанных мышей обрабатывали на активность LDH, как описано в Примере 1. Снижение активности LDH наблюдалось в образцах печени мышей, получавших 1 мг/кг *Ldha* LNP. Удельная активность (мкмоль/мин/мг белка) у обработанных и контрольных мышей содержится в Таблице 21 ниже, а данные представлены на фиг. 15A-15B.

**Таблица 21: Удельная активность LDH в печени и мышцах**

Обработка	Ср. удельная	Ст. откл. ср.	Ср. удельная	Ст. откл. ср.	n
-----------	--------------	---------------	--------------	---------------	---

	<b>активность (мкмоль/мин/ мг белка) - печень</b>	<b>удельной активности (мкмоль/мин/ мг белка) - печень</b>	<b>активность (мкмоль/мин/ мг белка) - мышцы</b>	<b>удельной активности (мкмоль/мин/ мг белка) - мышцы</b>	
TSS	0,8	0,1	1,9	0,2	3,0
Нег. контр. направляющ ая	0,8	0,1	1,8	0,2	3,0
0,3 мг/кг Ldha направляющ ая	0,7	0,2	1,6	0,5	4,0
1 мг/кг Ldha направляющ ая	0,2	0,1	1,8	0,1	4,0

[278] Образцы печени и плазмы обработанных мышей также анализировали на пируват, как описано в Примере 1. Пируват представляет собой метаболит, превращаемый в лактат лактатдегидрогеназой (Urbańska K et al, Int J Mol Sci. 2019 Apr 27;20(9)). Доказано, что концентрации пирувата были повышены в образцах печени мышей, получавших 1 мг/кг, но между обработанными и контрольными мышами наблюдались небольшие различия в концентрациях пирувата в плазме. Эти данные содержатся в Таблице 22 и показаны на Фиг. 16А-16В.

<b>Обработка</b>	<b>Ср. пируват в печени (нмоль/г ткани)</b>	<b>Ст. откл. ср. пирувата в печени (нмоль/г ткани)</b>	<b>Ср. пируват в плазме (мкМ)</b>	<b>Ст. откл. ср. пирувата в плазме (мкМ)</b>	<b>n</b>
TSS	17,40	1,76	41,64	14,29	3
Нег. контр. направляющая	25,12	8,17	48,76	16,47	3
0,3 мг/кг Ldha направляющая	19,11	3,58	71,64	10,20	4
1 мг/кг Ldha	85,46	35,30	61,32	33,82	4

направляющая					
--------------	--	--	--	--	--

[279] Продемонстрировав устойчивое снижение содержания оксалата в моче у мышей с дефицитом AGT в течение до 15 недель после лечения LNP, было проведено дополнительное исследование для определения способности мышей с нарушенной функцией почек выводить лактат после нокдауна LDHA.

Мышей-самцов C51B16, перенесших нефрэктомия 5/6 или фиктивную операцию, получали из лаборатории Джексона (Jackson Laboratory) (Bar Harbor, ME).

Через одну неделю после операции у животных брали кровь для определения исходного уровня лактата, как описано в Примере 1. Затем животным вводили дозу LNP, содержащую G009439, в дозе 2 мкг/кг (n=6). Через две недели после введения дозы животным вводили лактатную контрольную дозу, состоящую из 2 г/кг лактата натрия, растворенного в фосфатно-солевом буфере (концентрация 200 мг/мл, ~ 18 мМ) pH 7,4, вводимого внутривенно. У животных брали кровь из хвоста перед контрольным заражением, а затем через 15, 30, 60 и 180 минут после контрольного заражения. Образцы крови анализировали на уровень лактата, как описано в Примере 1. Не наблюдалось значительных различий в клиренсе лактата у мышей, перенесших операцию по удалению нефрэктомии и LDHA LNP, по сравнению с мышами, получавшими плацебо-хирургию и мышами, получавшими носитель. В Таблице 23 ниже приведены данные о среднем уровне пирувата в плазме по группам животных, что также показано на Фиг. 17.

<b>Таблица 23: Исследование клиренса лактата плазмы при нефрэктомии</b>								
Время (мин)	Плацебо-хирургия - TSS основа ктрл (n=5)		Плацебо-хирургия - Ldha 1 мг/кг (n=6)		5/6 нефрэктомия - TSS основа контр. (n=5)		5/6 нефрэктомия - Ldha 1 мг/кг (n=5)	
	Ср. лактат в плазме (мМ)	Ст. Откл. Ср. лактат а в плазме (мМ)	Ср. лактат в плазме (мМ)	Ст. Откл. Ср. лактат а в плазме (мМ)	Ср. лактат в плазме (мМ)	Ст. Откл. Ср. лактат а в плазме (мМ)	Ср. лактат в плазме (мМ)	Ст. Откл. Ср. лактат а в плазме (мМ)
0	7,2	2,9	5,9	2,0	9,0	2,3	6,5	2,8
15	24,5	10,3	23,3	4,6	24,2	8,1	21,7	9,1
30	20,4	8,2	17,2	3,7	18,7	4,3	18,1	7,7
60	11,7	4,9	9,4	3,1	12,2	4,5	11,1	4,7
180	6,6	2,6	6,3	2,9	8,4	2,7	5,5	2,8



**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Способ индуцирования двухцепочечного разрыва (DSB) или одноцепочечного разрыва (SSB) внутри гена *LDHA*, включающий доставку в клетку композиции, содержащей:

направляющую РНК, содержащую

направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NOs:1-84 и 100-192; или по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID NOs:1-84 и 100-192; или

направляющую последовательность, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NOs:1-84 и 100-192; или

направляющую последовательность, содержащую любую из SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 27, 32, 45, 48, 62, 66, 68, 70, 73, 75, 76, 77, 78, и 80; или

направляющую последовательность, содержащую любую из SEQ ID No: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 27, 32, 45 и 48; или

направляющую последовательность, содержащую любую из SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 25, 27, 32, 45, 48, 62, 66, 68, 70, 73, 75, 76, 77, 78, 80, 103, 109, 123, 133, 149, 153, 156 и 184; или

направляющую последовательность, содержащую любую из SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 25, 27, 32, 45, 48, 103 и 123; и необязательно

РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

2. Способ снижения экспрессии гена *LDHA*, включающий доставку в клетку композиции, содержащей:

направляющую РНК, содержащую

направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NOs:1-84 и 100-192; или по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID NOs:1-84 и 100-192; или

направляющую последовательность, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NOs:1-84 и 100-192; или

направляющую последовательность, содержащую любую из SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 27, 32, 45, 48, 62, 66, 68, 70, 73, 75, 76, 77, 78 и 80; или

направляющую последовательность, содержащую любую из SEQ ID No: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 27, 32, 45 и 48; или

направляющую последовательность, содержащую любую из SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 25, 27, 32, 45, 48, 62, 66, 68, 70, 73, 75, 76, 77, 78, 80, 103, 109, 123, 133, 149, 153, 156 и 184; или

направляющую последовательность, содержащую любую из SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 25, 27, 32, 45, 48, 103 и 123; и необязательно

РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

3. Способ лечения или профилактики гипероксалурии, включающий введение композиции субъекту, нуждающемуся в этом, в котором композиция содержит:

направляющую РНК, содержащую

направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NOs:1-84 и 100-192; или

по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID NOs:1-84 и 100-192; или

направляющую последовательность, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NOs:1-84 и 100-192; или

направляющую последовательность, содержащую любую из SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 27, 32, 45, 48, 62, 66, 68, 70, 73, 75, 76, 77, 78 и 80; или

направляющую последовательность, содержащую любую из SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 27, 32, 45 и 48; или

направляющую последовательность, содержащую любую из SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 25, 27, 32, 45, 48, 62, 66, 68, 70, 73, 75, 76, 77, 78, 80, 103, 109, 123, 133, 149, 153, 156 и 184; или

направляющую последовательность, содержащую любую из SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 25, 27, 32, 45, 48, 103 и 123; и необязательно

РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент,

таким образом производя лечение или профилактику гипероксалурии.

4. Способ лечения или профилактики терминальной стадии почечной недостаточности (ESRD), вызванной гипероксалурией, включающий введение композиции субъекту, нуждающемуся в этом, в котором композиция содержит:

направляющую РНК, содержащую

направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NOs:1-84 и 100-192; или

по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID NOs:1-84 и 100-192; или

направляющую последовательность, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NOs:1-84 и 100-192; или

направляющую последовательность, содержащую любую из SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 27, 32, 45, 48, 62, 66, 68, 70, 73, 75, 76, 77, 78 и 80; или

направляющую последовательность, содержащую любую из SEQ ID No: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 27, 32, 45 и 48; или

направляющую последовательность, содержащую любую из SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 25, 27, 32, 45, 48, 62, 66, 68, 70, 73, 75, 76, 77, 78, 80, 103, 109, 123, 133, 149, 153, 156 и 184; или

направляющую последовательность, содержащую любую из SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 25, 27, 32, 45, 48, 103 и 123; и необязательно

РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент,

таким образом производя лечение или профилактику (ESRD), вызванной гипероксалурией.

5. Способ лечения или профилактики любого из следующего: выработки и отложения оксалата кальция, первичной гипероксалурии, оксалоза, гематурии и отсрочки или уменьшения необходимости в трансплантации почек или печени, включающий введение композиции субъекту, нуждающемуся в этом, в котором композиция содержит:

направляющую РНК, содержащую

направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NOs:1-84 и 100-192; или по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID NOs:1-84 и 100-192; или

направляющую последовательность, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NOs:1-84 и 100-192; или

направляющую последовательность, содержащую любую из SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 27, 32, 45, 48, 62, 66, 68, 70, 73, 75, 76, 77, 78 и 80; или

направляющую последовательность, содержащую любую из SEQ ID No: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 27, 32, 45 и 48; или

направляющую последовательность, содержащую любую из SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 25, 27, 32, 45, 48, 62, 66, 68, 70, 73, 75, 76, 77, 78, 80, 103, 109, 123, 133, 149, 153, 156 и 184; или

направляющую последовательность, содержащую любую из SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 25, 27, 32, 45, 48, 103 и 123; и необязательно

РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент,

таким образом производя лечение или профилактику любого из следующего: выработки и отложения оксалата кальция, первичной гипероксалурии, оксалоза, гематурии и отсрочку или уменьшение необходимости в трансплантации почек или печени.

6. Способ увеличения концентрации гликолята в сыворотке, включающий введение композиции субъекту, нуждающемуся в этом, в котором композиция содержит:

направляющую РНК, содержащую

направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NOs:1-84 и 100-192; или по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID NOs:1-84 и 100-192; или

направляющую последовательность, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NOs:1-84 и 100-192; или

направляющую последовательность, содержащую любую из SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 27, 32, 45, 48, 62, 66, 68, 70, 73, 75, 76, 77, 78 и 80; или

направляющую последовательность, содержащую любую из SEQ ID Nos: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 27, 32, 45 и 48; или

направляющую последовательность, содержащую любую из SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 25, 27, 32, 45, 48, 62, 66, 68, 70, 73, 75, 76, 77, 78, 80, 103, 109, 123, 133, 149, 153, 156 и 184; или

направляющую последовательность, содержащую любую из SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 25, 27, 32, 45, 48, 103 и 123; и необязательно

РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, таким образом повышая концентрацию гликолята в сыворотке.

7. Способ уменьшения оксалата в моче у субъекта, включающий введение композиции субъекту, нуждающемуся в этом, в котором композиция содержит:

направляющую РНК, содержащую

направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NOs:1-84 и 100-192; или по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID NOs:1-84 и 100-192; или

направляющую последовательность, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NOs:1-84 и 100-192; или

направляющую последовательность, содержащую любую из SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 27, 32, 45, 48, 62, 66, 68, 70, 73, 75, 76, 77, 78 и 80; или

направляющую последовательность, содержащую любую из SEQ ID No: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 27, 32, 45 и 48; или

направляющую последовательность, содержащую любую из SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 25, 27, 32, 45, 48, 62, 66, 68, 70, 73, 75, 76, 77, 78, 80, 103, 109, 123, 133, 149, 153, 156 и 184; или

направляющую последовательность, содержащую любую из SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 25, 27, 32, 45, 48, 103 и 123; и необязательно

РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент,

таким образом уменьшая количество оксалата в моче субъекта.

8. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что вводят РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

9. Композиция, содержащая:

направляющую РНК, содержащую

направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NOs:1-84 и 100-192; или по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности,

выбранной из SEQ ID NOs:1-84 и 100-192; или

направляющую последовательность, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NOs:1-84 и 100-192; или

направляющую последовательность, содержащую любую из SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 27, 32, 45, 48, 62, 66, 68, 70, 73, 75, 76, 77, 78 и 80; или

направляющую последовательность, содержащую любую из SEQ ID No: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 27, 32, 45 и 48; или

направляющую последовательность, содержащую любую из SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 25, 27, 32, 45, 48, 62, 66, 68, 70, 73, 75, 76, 77, 78, 80, 103, 109, 123, 133, 149, 153, 156 и 184; или

направляющую последовательность, содержащую любую из SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 25, 27, 32, 45, 48, 103 и 123; и необязательно

РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

10. Композиция, содержащая короткоцепочную направляющую РНК (короткую-sgРНК), содержащую:

направляющую последовательность, содержащую:

1) любую из направляющих последовательностей, выбранных из SEQ ID NOs:1-84 и 100-192; или

2) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов любой из направляющих последовательностей, выбранных из SEQ ID NOs:1-84 и 100-192; или

3) по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NOs:1-84 и 100-192; или

4) любую из SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 27, 32, 45, 48, 62, 66, 68, 70, 73, 75, 76, 77, 78 и 80; или

5) любую из SEQ ID No: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 27, 32, 45 и 48; или

6) любую из SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 25, 27, 32, 45, 48, 62, 66, 68, 70, 73, 75, 76, 77, 78, 80, 103, 109, 123, 133, 149, 153, 156 и 184; или

7) любую из SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 25, 27, 32, 45, 48, 103 и 123; и

консервативную часть sgРНК, содержащую область шпильки отличающаяся тем, что при этом в области шпильки отсутствуют по меньшей мере 5-10 нуклеотидов, и где необязательно короткая-sgРНК содержит одну или более из модификации 5'-конца и модификации 3'-конца.

11. Композиция по п. 10, отличающаяся тем, что содержит последовательность SEQ ID NO: 202.

12. Композиция по п. 10 или п. 11, отличающаяся тем, что содержит модификацию 5'-конца.

13. Композиция по любому из пп. 10-12, отличающаяся тем, что короткая-sgРНК содержит модификацию 3'-конца.

14. Композиция по любому из пп. 10-13, отличающаяся тем, что короткая-sgРНК содержит модификацию 5'-конца и модификацию 3'-конца.

15. Композиция по любому из пп. 10-14, отличающаяся тем, что короткая-sgРНК содержит 3' хвост.

16. Композиция по п. 15, отличающаяся тем, что 3' хвост содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов.

17. Композиция по п. 15, отличающаяся тем, что 3' хвост содержит приблизительно 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-7, 1-10, по меньшей мере 1-2, по меньшей мере 1-3, по меньшей мере 1-4, по меньшей мере 1-5, по меньшей мере 1-7 или по меньшей мере 1-10 нуклеотидов.

18. Композиция по любому из пп. 10-17, отличающаяся тем, что короткая-sgРНК не содержит 3' хвост.

19. Композиция по любому из пп. 10-18, отличающаяся тем, что содержит модификацию в области шпильки.

20. Композиция по любому из пп. 10-19, отличающаяся тем, что содержит модификацию 3'-конца и модификацию в области шпильки.

21. Композиция по любому из пп. 10-20, отличающаяся тем, что содержит модификацию 3'-конца, модификацию в области шпильки и модификацию 5'-конца.

22. Композиция по любому из пп. 10-21, отличающаяся тем, что содержит модификацию 5'-конца и модификацию в области шпильки.

23. Композиция по любому из пп. 10-22, отличающаяся тем, что в области шпильки отсутствуют по меньшей мере 5 последовательных нуклеотидов.

24. Композиция по любому из пп. 10-23, отличающаяся тем, что по меньшей мере 5-10 отсутствующих нуклеотидов:

находятся внутри шпильки 1;

находятся внутри шпильки 1 и "N" между шпилькой 1 и шпилькой 2;

находятся внутри шпильки 1 и два нуклеотида находятся непосредственно на 3' шпильки 1;

включают по меньшей мере часть шпильки 1;

находятся внутри шпильки 2;

включают по меньшей мере часть шпильки 2;

находятся внутри шпильки 1 и шпильки 2;

включают по меньшей мере часть шпильки 1 и включают "N" между шпилькой 1 и шпилькой 2;

включают по меньшей мере часть шпильки 2 и включают "N" между шпилькой 1 и шпилькой 2;

включают по меньшей мере часть шпильки 1, включают "N" между шпилькой 1 и шпилькой 2 и включают по меньшей мере часть шпильки 2;

находятся внутри шпильки 1 или шпильки 2, необязательно включая "N" между шпилькой 1 и шпилькой 2;

являются последовательными;

являются последовательными и включают “N” между шпилькой 1 и шпилькой 2;  
являются смежными и охватывают по меньшей мере часть шпильки 1 и часть шпильки 2;

являются смежными и охватывают по меньшей мере часть шпильки 1 и “N” между шпилькой 1 и шпилькой 2;

являются смежными и охватывают по меньшей мере часть шпильки 1 и два нуклеотида непосредственно на 3’ шпильки 1;

состоят из 5-10 нуклеотидов;

состоят из 6-10 нуклеотидов;

состоят из 5-10 последовательных нуклеотидов;

состоят из 6-10 последовательных нуклеотидов; или

состоят из нуклеотидов 54-58 последовательности SEQ ID NO:400.

25. Композиция по любому из пп. 10-24, отличающаяся тем, что содержит консервативную часть sgРНК, содержащую область некнуса, при этом в области некнуса отсутствует по меньшей мере один нуклеотид.

26. Композиция по п. 25, отличающаяся тем, что нуклеотиды, отсутствующие в области некнуса, включают один или более из:

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

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

каждый нуклеотид в области некнуса.

27. Композиция, содержащая модифицированную одиночную направляющую РНК (sgРНК), содержащую

направляющую последовательность, содержащую:

1) любую из направляющих последовательностей, выбранных из SEQ ID NOs:1-84 и 100-192; или

2) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов любой из направляющих последовательностей, выбранных из SEQ ID NOs:1-84 и 100-192; или

3) по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NOs:1-84 и 100-192; или

4) любую из SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 27, 32, 45, 48, 62, 66, 68, 70, 73, 75, 76, 77, 78 и 80; или

5) любую из SEQ ID No: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 27, 32, 45 и 48; или

6) любую из SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 25, 27, 32, 45, 48, 62, 66, 68, 70, 73, 75, 76, 77, 78, 80, 103, 109, 123, 133, 149, 153, 156 и 184; или

7) любую из SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 25, 27, 32, 45, 48, 103 и 123; и дополнительно содержащую

одну или несколько модификаций, выбранных из:

1) YA модификации в одном или более YA сайтах направляющей области;

- 2) YA модификации в одном или более YA сайтах консервативной области;
- 3) YA модификации в одном или более YA сайтов направляющей области и в одном или более YA сайтов консервативной области;
- 4) i) YA модификации в двух или более YA сайтах направляющей области;  
ii) YA модификации в одном или более YA сайтах 2, 3, 4 и 10 консервативной области; и  
iii) YA модификации в одном или более YA сайтах консервативной области 1 и 8;  
или
- 5) i) YA модификации в одном или более YA сайтах направляющей области, где YA сайт направляющей области находится на или после нуклеотида 8 от 5'-конца 5' сайта терминации транскрипции;  
ii) YA модификации в одном или более YA сайтах 2, 3, 4 и 10 консервативной области; и необязательно;  
iii) YA модификации в одном или более YA сайтах 1 и 8 консервативной области;  
или
- 6) i) YA модификации в одном или более YA сайтах направляющей области, где YA сайт направляющей области находится в пределах 13 нуклеотидов 3'-концевого нуклеотида направляющей области;  
ii) YA модификации в одном или более YA сайтах 2, 3, 4 и 10 консервативной области; и  
iii) YA модификации в одном или более YA сайтах 1 и 8 консервативной области;  
или
- 7) i) модификации 5'-конца и модификации 3'-конца;  
ii) YA модификации в одном или более YA сайтах 2, 3, 4 и 10 консервативной области; и  
iii) YA модификации в одном или более YA сайтах 1 и 8 консервативной области;  
или
- 8) i) YA модификации в YA сайте направляющей области, где модификация YA сайта направляющей области содержит модификацию, которая не содержит по меньшей мере один нуклеотид расположенный на 5' YA сайте направляющей области;  
ii) YA модификации в одном или более YA сайтах 2, 3, 4 и 10 консервативной области; и  
iii) YA модификации в одном или более YA сайтах 1 и 8 консервативной области;  
или
- 9) i) YA модификации в одном или более YA сайтах 2, 3, 4 и 10 консервативной области; и  
ii) YA модификации в YA сайтах 1 и 8 консервативной области; или
- 10) i) YA модификации в одном или более YA сайтах направляющей области, где YA сайт расположен на или после нуклеотида 8 от 5'-конца;  
ii) YA модификации в одном или более YA сайтах 2, 3, 4 и 10 консервативной



области; и

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

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

12) i) модификации, такой как YA модификация, на одном или более нуклеотидов, расположенных на или после нуклеотида 6 от 5'-конца;

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

iii) модификации на одном или более из B3, B4 и B5, где B6 не содержит 2'-ОМе модификации или содержит модификацию, отличающуюся от 2'-ОМе;

iv) модификации при LS10, где LS10 содержит модификацию, отличающуюся от 2'-фтор; и/или

v) модификации при N2, N3, N4, N5, N6, N7, N10 или N11; и где по меньшей мере одно из приведенного ниже является верным:

YA модификации в одном или более YA сайтах направляющей области;

YA модификации в одном или более YA сайтах консервативной области;

YA модификации в одном или более YA сайтах направляющей области и в одном или более YA сайтах консервативной области;

по меньшей мере один из нуклеотидов 8-11, 13, 14, 17 или 18 из 5'-конца 5' сайта терминации транскрипции не содержит 2'-фтор-модификации;

по меньшей мере один из нуклеотидов 6-10 из 5'-конца 5' сайта терминации транскрипции не содержит фосфоротиоатной связи;

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

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

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

H1-1 содержит модификацию;

H2-1 содержит модификацию; или

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

28. Композиция по п. 27, отличающаяся тем, что содержит SEQ ID NO: 450.

29. Композиция по любому из пп. 9-28 для применения при индуцировании двухцепочечного разрыва (DSB) или одноцепочечного разрыва (SSB) внутри гена *LDHA* в клетке или у субъекта.

30. Композиция по любому из пп. 9-28 для применения при снижении экспрессии гена *LDHA* в клетке или у субъекта.

31. Композиция по любому из пп. 9-28 для применения при лечении или профилактике гипероксалурии у субъекта.

32. Композиция по любому из пп. 9-28 для применения при увеличении концентрации гликолята в сыворотке и/или в плазме у субъекта.

33. Композиция по любому из пп. 9-28 для применения при снижении концентрации оксалата в моче у субъекта.

34. Композиция по любому из пп. 9-28 для применения при лечении или профилактике выработки оксалата, отложения оксалата кальция в органах, первичной гипероксалурии, оксалоза, включая системный оксалоз, гематурии, терминальной стадии почечной недостаточности (ESRD) и/или отсрочке, или уменьшении необходимости в трансплантации почек или печени.

35. Способ по любому из пп. 1-8, отличающийся тем, что дополнительно включает: индуцирование двухцепочечного разрыва (DSB) внутри гена *LDHA* в клетке или у субъекта;

снижение экспрессии гена *LDHA* в клетке или у субъекта;

лечение или профилактику гипероксалурии у субъекта;

лечение или профилактику первичной гипероксалурии у субъекта;

лечение или профилактику PH1, PH2 и/или PH3 у субъекта;

лечение или профилактику кишечной гипероксалурии у субъекта;

лечение или профилактику гипероксалурии, связанной с употреблением пищи с высоким содержанием оксалатов, у субъекта;

увеличение концентрации гликолята в сыворотке и/или плазме у субъекта;

снижение концентрации оксалата в моче у субъекта;

снижение выработки оксалата;

снижение отложений оксалата кальция в органах;

снижение гипероксалурии;

лечение или профилактику оксалоза, включая системный оксалоз;

лечение или профилактику гематурии;

профилактику терминальной стадии почечной недостаточности (ESRD); и/или отсрочку или уменьшение необходимости в трансплантации почек или печени.

36. Способ или композиция для применения по любому из пунктов 1-8 или 29-35, отличающиеся тем, что композиция повышает уровни гликолята в сыворотке и/или плазме.

37. Способ или композиция для применения по любому из пунктов 1-8 или 29-35, отличающиеся тем, что композиция приводит к редактированию гена *LDHA*.

38. Способ или композиция для применения по пункту 37, отличающиеся тем, что редактирование рассчитывают как процент популяции, который редактируют (процент редактирования).

39. Способ или композиция для применения по пункту 38, отличающиеся тем, что процент редактирования находится между 30 и 99% популяции.

40. Способ или композиция для применения по пункту 38, отличающиеся тем, что процент редактирования находится между 30 и 35%, 35 и 40%, 40 и 45%, 45 и 50%, 50 и 55%, 55 и 60%, 60 и 65%, 65 и 70%, 70 и 75%, 75 и 80%, 80 и 85%, 85 и 90%, 90 и 95% или

95 и 99% популяции.

41. Способ или композиция для применения по любому из пунктов 1-8 или 29-35, отличающиеся тем, что композиция снижает концентрацию оксалата в моче.

42. Способ или композиция для применения по пункту 41, отличающиеся тем, что снижение оксалата в моче приводит к уменьшению количества камней в почках и/или отложения оксалата кальция в почках, печени, мочевом пузыре, сердце, коже или глазах.

43. Способ или композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающиеся тем, что направляющая последовательность выбрана из

SEQ ID NOs: 1-84 и 100-192;

SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 27, 32, 45, 48, 62, 66, 68, 70, 73, 75, 76, 77, 78 и 80;

SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 27, 32, 45 и 48;

SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 25, 27, 32, 45, 48, 62, 66, 68, 70, 73, 75, 76, 77, 78, 80, 103, 109, 123, 133, 149, 153, 156 и 184; и

SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 25, 27, 32, 45, 48, 103 и 123.

44. Способ или композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающиеся тем, что композиция содержит а sgРНК, содержащую

любую из SEQ ID NOs: 1001, 1005, 1007, 1008, 1014, 1023, 1027, 1032, 1045, 1048, 1063, 1067, 1069, 1071, 1074, 1076, 1077, 1078, 1079 и 1081; или

любую из SEQ ID NOs: 2001, 2005, 2007, 2008, 2014, 2023, 2027, 2032, 2045, 2048, 2063, 2067, 2069, 2071, 2074, 2076, 2077, 2078, 2079 и 2081; или

направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 27, 32, 45, 48, 62, 66, 68, 70, 73, 75, 76, 77, 78 и 80; или

направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 27, 32, 45 и 48;

направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 25, 27, 32, 45, 48, 62, 66, 68, 70, 73, 75, 76, 77, 78, 80, 103, 109, 123, 133, 149, 153, 156 и 184; и

направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 25, 27, 32, 45, 48, 103 и 123.

45. Способ или композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающиеся тем, что последовательность-мишень находится в любом из экзонов 1- 8 человеческого гена *LDHA*.

46. Способ или композиция по пункту 45, отличающиеся тем, что последовательность-мишень находится в экзоне 1 или 2 человеческого гена *LDHA*.

47. Способ или композиция по пункту 45, отличающиеся тем, что последовательность-мишень находится в экзоне 3 человеческого гена *LDHA*.

48. Способ или композиция по пункту 45, отличающиеся тем, что последовательность-мишень находится в экзоне 4 человеческого гена *LDHA*.

49. Способ или композиция по пункту 45, отличающиеся тем, что последовательность-мишень находится в экзоне 5 или 6 человеческого гена *LDHA*.

50. Способ или композиция по пункту 45, отличающиеся тем, что

последовательность-мишень находится в экзоне 7 или 8 человеческого гена *LDHA*.

51. Способ или композиция по любому из пунктов 1-50, отличающиеся тем, что направляющая последовательность комплементарна последовательности-мишени в положительной цепи *LDHA*.

52. Способ или композиция по любому из пунктов 1-50, отличающиеся тем, что направляющая последовательность комплементарна последовательности-мишени в отрицательной цепи *LDHA*.

53. Способ или композиция по любому из пунктов 1-50, отличающиеся тем, что первая направляющая последовательность комплементарна первой последовательности-мишени в положительной цепи гена *LDHA* и отличающаяся тем, что композиция дополнительно содержит вторую направляющую последовательности, которая комплементарна второй последовательности-мишени в отрицательной цепи гена *LDHA*.

54. Способ или композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающиеся тем, что направляющая РНК содержит направляющую последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NOs: 1-84 и 100-192, и дополнительно содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 200, при этом нуклеотиды SEQ ID NO: 200 расположены после направляющей последовательности на ее 3'-конце.

55. Способ или композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающиеся тем, что направляющая РНК содержит направляющую последовательность, выбранную из любой из SEQ ID NOs: 1-84 и 100-192 и дополнительно содержит нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 201, SEQ ID NO: 202, SEQ ID NO: 203 или любую из SEQ ID NO: 400-450, при этом нуклеотиды SEQ ID NO: 201 расположены после направляющей последовательности на ее 3'-конце.

56. Способ или композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающиеся тем, что направляющая РНК является одиночной направляющей (sgРНК).

57. Способ или композиция по пункту 56, отличающиеся тем, что sgРНК содержит направляющую последовательность, содержащую любую из SEQ ID NOs: 1001, 1005, 1007, 1008, 1014, 1023, 1027, 1032, 1045, 1048, 1063, 1067, 1069, 1071, 1074, 1076, 1077, 1078, 1079 и 1081.

58. Способ или композиция по пункту 56, отличающиеся тем, что sgРНК содержит любую из SEQ ID NOs: 1001, 1005, 1007, 1008, 1014, 1023, 1027, 1032, 1045, 1048, 1063, 1067, 1069, 1071, 1074, 1076, 1077, 1078, 1079 и 1081 или их модифицированных вариантов, где необязательно модифицированные варианты содержат SEQ ID NOs: 2001, 2005, 2007, 2008, 2014, 2023, 2027, 2032, 2045, 2048, 2063, 2067, 2069, 2071, 2074, 2076, 2077, 2078, 2079 и 2081.

59. Способ или композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающиеся тем, что направляющая РНК модифицирована в соответствии с SEQ ID NO: 300, где N вместе представляют собой любую из направляющих последовательностей из Таблицы 1 (SEQ ID NOs: 1-84 и 100-192).

60. Способ или композиция по пункту 59, отличающиеся тем, что каждый N в SEQ

ID NO: 300 представляет собой любой природный или неприродный нуклеотид, при этом N образуют направляющую последовательность, а направляющая последовательность нацеливает Cas9 на ген *LDHA*.

61. Способ или композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающиеся тем, что sgРНК содержит любую из направляющих последовательностей SEQ ID NOs:1-84 и 100-192 и нуклеотидов SEQ ID NO: 201, SEQ ID NO: 202 или SEQ ID NO: 203.

62. Способ или композиция по любому из пунктов 56-61, отличающиеся тем, что sgРНК содержит направляющую последовательность, которая по меньшей мере на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91% или 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NOs: 1-84 и 100-192.

63. Способ или композиция по пункту 62, отличающиеся тем, что sgРНК содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 27, 32, 45, 48, 62, 66, 68, 70, 73, 75, 76, 77, 78, 80, 1001, 1005, 1007, 1008, 1014, 1023, 1027, 1032, 1045, 1048, 1063, 1067, 1069, 1071, 1074, 1076, 1077, 1078, 1079, 1081, 2001, 2005, 2007, 2008, 2014, 2023, 2027, 2032, 2045, 2048, 2063, 2067, 2069, 2071, 2074, 2076, 2077, 2078, 2079 и 2081.

64. Способ или композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающиеся тем, что направляющая РНК содержит по меньшей мере одну модификацию.

65. Способ или композиция по пункту 64, отличающиеся тем, что по меньшей мере одна модификация включает 2'-О-метил (2'-О-Ме) модифицированный нуклеотид.

66. Способ или композиция по пункту 64 или 65, отличающиеся тем, что содержат фосфоротиоатную (PS) связь между нуклеотидами.

67. Способ или композиция по любому из пунктов 64-66, отличающиеся тем, что содержат 2'-фтор (2'-F) модифицированный нуклеотид.

68. Способ или композиция по любому из пунктов 64-67, содержащие модификацию на одном или более из первых пяти нуклеотидов на 5'-конце направляющей РНК.

69. Способ или композиция по любому из пунктов 64-68, отличающиеся тем, что содержат модификацию на одном или более из последних пяти нуклеотидов на 3'-конце направляющей РНК.

70. Способ или композиция по любому из пунктов 64-69, отличающиеся тем, что содержат PS связь между первыми четырьмя нуклеотидами направляющей РНК.

71. Способ или композиция по любому из пунктов 64-70, отличающиеся тем, что содержат PS связь между последними четырьмя нуклеотидами направляющей РНК.

72. Способ или композиция по любому из пунктов 64-71, отличающиеся тем, что содержат 2'-О-Ме-модифицированный нуклеотид на первых трех нуклеотидах на 5'-конце направляющей РНК.

73. Способ или композиция по любому из пунктов 64-72, отличающиеся тем, что содержат 2'-О-Ме-модифицированный нуклеотид на последних трех нуклеотидах на 3'-конце направляющей РНК.

74. Способ или композиция по любому из пунктов 64-73, отличающиеся тем, что направляющая РНК содержит модифицированные нуклеотиды SEQ ID NO: 300.

75. Способ или композиция по любому из пунктов 1-74, отличающиеся тем, что композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый эксципиент.

76. Способ или композиция по любому из пунктов 1-75, отличающиеся тем, что направляющая РНК связана с липидной наночастицей (LNP).

77. Способ или композиция по пункту 76, отличающиеся тем, что LNP содержит катионный липид.

78. Способ или композиция по пункту 77, отличающиеся тем, что катионный липид представляет собой (9Z,12Z)-3-((4,4-бис(октилокси)бутаноил)окси)-2-(((3-(диэтиламино)пропокси)карбонил)окси)метил)пропил октадека-9,12-диеноат, также называемый 3-((4,4-бис(октилокси)бутаноил)окси)-2-(((3-(диэтиламино)пропокси)карбонил)окси)метил)пропил (9Z,12Z)-октадека-9,12-диеноат.

79. Способ или композиция по любому из пунктов 76-78, отличающиеся тем, что LNP содержит нейтральный липид.

80. Способ или композиция по пункту 79, отличающиеся тем, что нейтральный липид представляет собой DSPC.

81. Способ или композиция по любому из пунктов 76-80, отличающиеся тем, что LNP содержит липид-хелпер.

82. Способ или композиция по пункту 81, отличающиеся тем, что липид-хелпер представляет собой холестерин.

83. Способ или композиция по любому из пунктов 76-82, отличающиеся тем, что LNP содержит липид-невидимку.

84. Способ или композиция по пункту 83, отличающиеся тем, что липид-невидимка представляет собой PEG2k-DMG.

85. Способ или композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающиеся тем, что композиция дополнительно содержит РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

86. Способ или композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающиеся тем, что композиция дополнительно содержит иРНК, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

87. Способ или композиция по пункту 85 или 86, отличающиеся тем, что РНК-направляемый ДНК-связывающий агент представляет собой Cas9.

88. Способ или композиция по любому из предшествующих пунктов, отличающиеся тем, что композиция представляет собой фармацевтическую композицию и дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель.

89. Способ или композиция по любому из пунктов 1-88, отличающиеся тем, что последовательность, выбранная из SEQ ID NOs: 1-84 и 100-192, представляет собой SEQ ID NO: 1.

90. Способ или композиция по любому из пунктов 1-88, отличающиеся тем, что последовательность, выбранная из SEQ ID NOs: 1-84 и 100-192, представляет собой SEQ ID NO: 2.















171. Способ или композиция по любому из пунктов 1-88, отличающиеся тем, что последовательность, выбранная из SEQ ID NOs: 1-84 и 100-192, представляет собой SEQ ID NO: 83.

172. Способ или композиция по любому из пунктов 1-88, отличающиеся тем, что последовательность, выбранная из SEQ ID NOs: 1-84 и 100-192, представляет собой SEQ ID NO: 84.

173. Способ или композиция по любому из пунктов 1-88, отличающиеся тем, что последовательность, выбранная из SEQ ID NOs: 1-84 и 100-192, представляет собой SEQ ID NO: 103.

174. Способ или композиция по любому из пунктов 1-88, отличающиеся тем, что последовательность, выбранная из SEQ ID NOs: 1-84 и 100-192, представляет собой SEQ ID NO: 109.

175. Способ или композиция по любому из пунктов 1-88, отличающиеся тем, что последовательность, выбранная из SEQ ID NOs: 1-84 и 100-192, представляет собой SEQ ID NO: 123.

176. Способ или композиция по любому из пунктов 1-88, отличающиеся тем, что последовательность, выбранная из SEQ ID NOs: 1-84 и 100-192, представляет собой SEQ ID NO: 133.

177. Способ или композиция по любому из пунктов 1-88, отличающиеся тем, что последовательность, выбранная из SEQ ID NOs: 1-84 и 100-192, представляет собой SEQ ID NO: 149.

178. Способ или композиция по любому из пунктов 1-88, отличающиеся тем, что последовательность, выбранная из SEQ ID NOs: 1-84 и 100-192, представляет собой SEQ ID NO: 156.

179. Способ или композиция по любому из пунктов 1-88, отличающиеся тем, что последовательность, выбранная из SEQ ID NOs: 1-84 и 100-192, представляет собой SEQ ID NO: 166.

180. Способ или композиция по любому из пунктов 1-88, отличающиеся тем, что направляющая последовательность содержит любую из SEQ ID NOs: 2, 9, 13, 16, 22, 24, 25, 27, 30, 31, 32, 33, 35, 36, 40, 44, 45, 53, 55, 57, 60, 61-63, 65, 67, 69, 70, 71, 73, 76, 78, 79, 80, 82-84, 103, 109, 123, 133, 149, 156 и 166.

181. Способ или композиция по любому из пунктов 1-88, отличающиеся тем, что направляющая последовательность содержит любую из SEQ ID NOs: 100-102, 104-108, 110-122, 124-132, 134-148, 150-155, 157-165 и 167-192.

182. Способ или композиция по любому из пунктов 1-88, отличающиеся тем, что направляющая последовательность содержит любую из SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 25, 27, 32, 45, 48, 62, 66, 68, 70, 73, 75, 76, 77, 78, 80, 103, 109, 123, 133, 149, 153, 156 и 184.

183. Способ или композиция по любому из пунктов 1-88, отличающиеся тем, что направляющая последовательность содержит любую из SEQ ID NOs: 1, 5, 7, 8, 14, 23, 25, 27, 32, 45, 48, 103 и 123.



204. Способ или композиция по любому из пунктов 1-88, отличающиеся тем, что направляющая РНК представляет собой sgРНК, содержащую SEQ ID NO: 1079 или 2079.

205. Способ или композиция по любому из пунктов 1-88, отличающиеся тем, что направляющая РНК представляет собой sgРНК, содержащую SEQ ID NO: 1081 или 2081.

206. Способ или композиция по любому из пунктов 1-205, отличающиеся тем, что композицию вводят в виде однократной дозы.

207. Способ или композиция по любому из пунктов 1-206, отличающиеся тем, что композицию вводят однократно.

208. Способ или композиция по любому из пунктов 206 или 207, отличающиеся тем, что однократная доза или однократное введение:

индуцирует DSB; и/или

снижает экспрессию гена LDHA; и/или

лечит или предотвращает гипероксалурию; и/или

лечит или предотвращает ESRD, вызванную гипероксалурией; и/или

лечит или предотвращает выработку и отложение оксалата кальция; и/или

лечит или предотвращает первичную гипероксалурию (включая PH1, PH2 и PH3);

и/или

лечит или предотвращает оксалоз; и/или

лечит или предотвращает гематурию; и/или

лечит или предотвращает желудочную гипероксалурию; и/или

лечит или предотвращает гипероксалурию, связанную с употреблением пищи с высоким содержанием оксалатов; и/или

дает отсрочку или уменьшает потребность в трансплантации почки или печени;

и/или

увеличивает концентрацию гликолята в сыворотке; и/или

уменьшает концентрацию оксалата в моче.

209. Способ или композиция по пункту 208, отличающиеся тем, что однократная доза или однократное введение обеспечивает любое одно или более из а) - н) в течение 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 недель.

210. Способ или композиция по пункту 208, отличающиеся тем, что однократная доза или однократное введение обеспечивает достижение пролонгированного действия.

211. Способ или композиция по любому из пунктов 1-208, отличающиеся тем, что дополнительно включают достижение пролонгированного действия.

212. Способ или композиция по пункту 210 или 211, отличающиеся тем, что пролонгированное действие продолжается по меньшей мере 1 месяц, по меньшей мере 3 месяца, по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере один год или по меньшей мере 5 лет.

213. Способ или композиция по любому из пунктов 1-212, отличающиеся тем, что введение композиции приводит к терапевтически релевантному снижению концентрации оксалата в моче.

214. Способ или композиция по любому из пунктов 1-213, отличающиеся тем, что

введение композиции приводит к образованию уровней оксалата в пределах терапевтического диапазона.

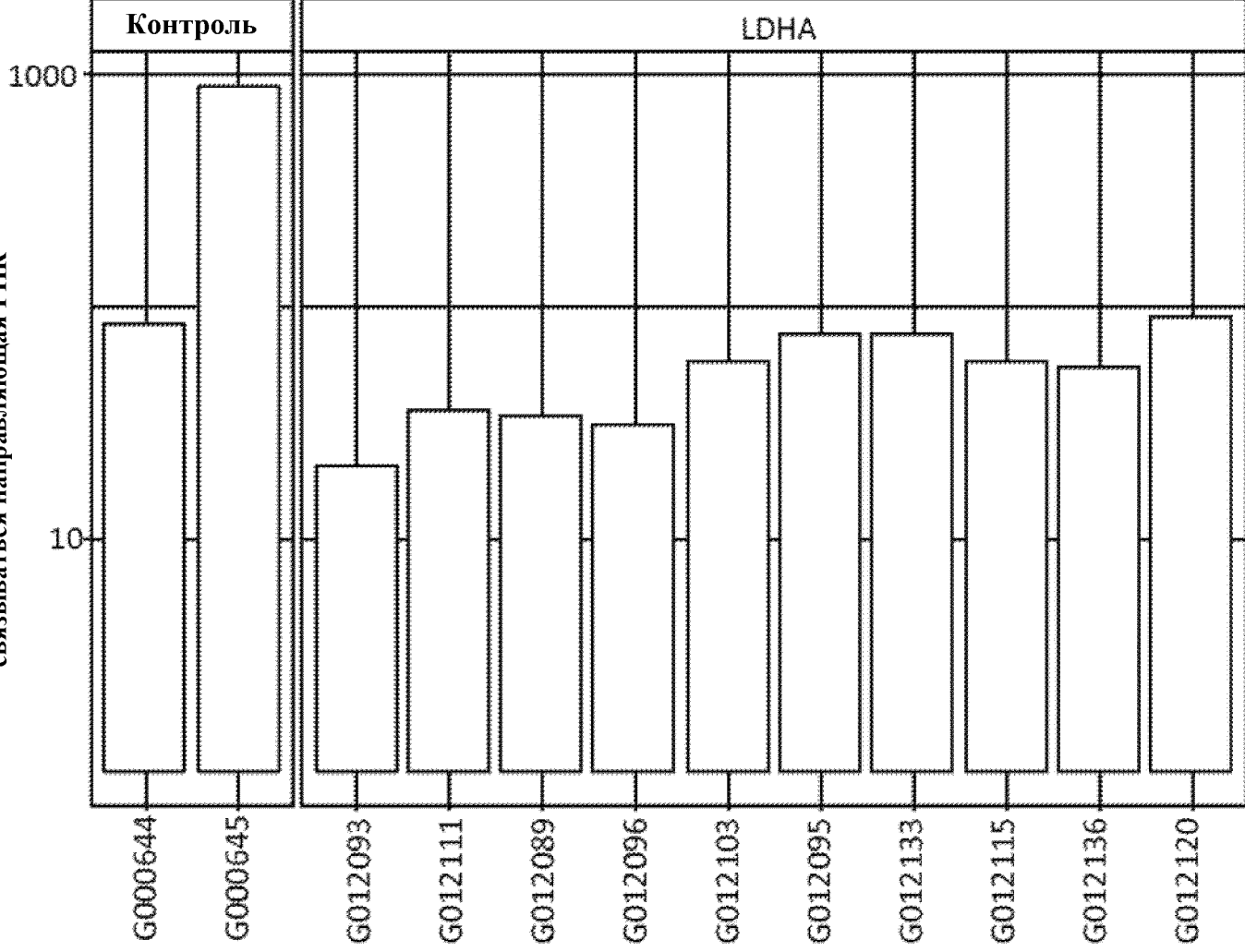
215. Способ или композиция по любому из пунктов 1-214, отличающиеся тем, что введение композиции приводит к образованию уровней оксалата в пределах 100, 120 или 150% нормального диапазона.

216. Применение композиции или состава по любому из пунктов 9-215 для получения медикамента для лечения субъекта-человека, имеющего гипероксалурию.

По доверенности

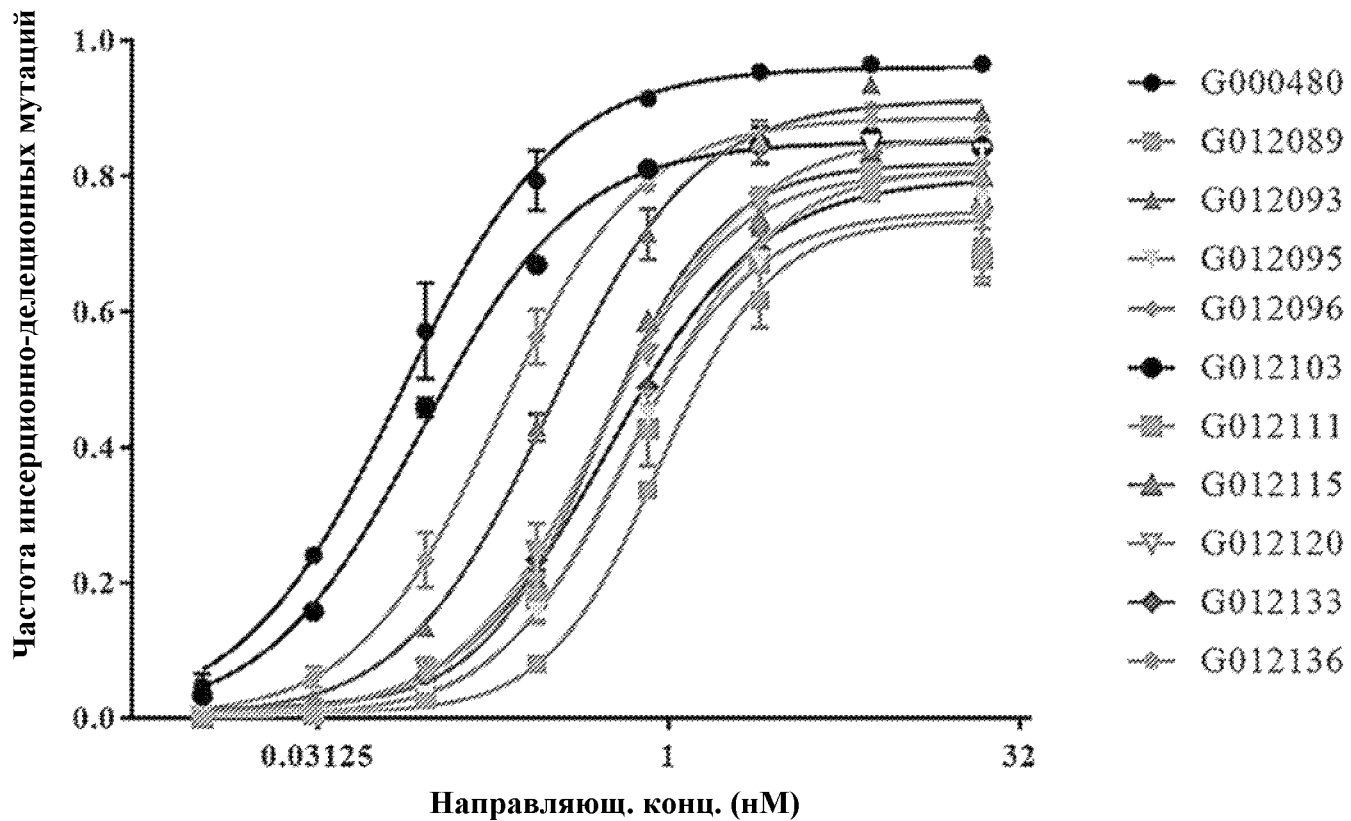


№ неспецифичных последовательностей в геноме, с которой может, но не должна связываться направляющая РНК



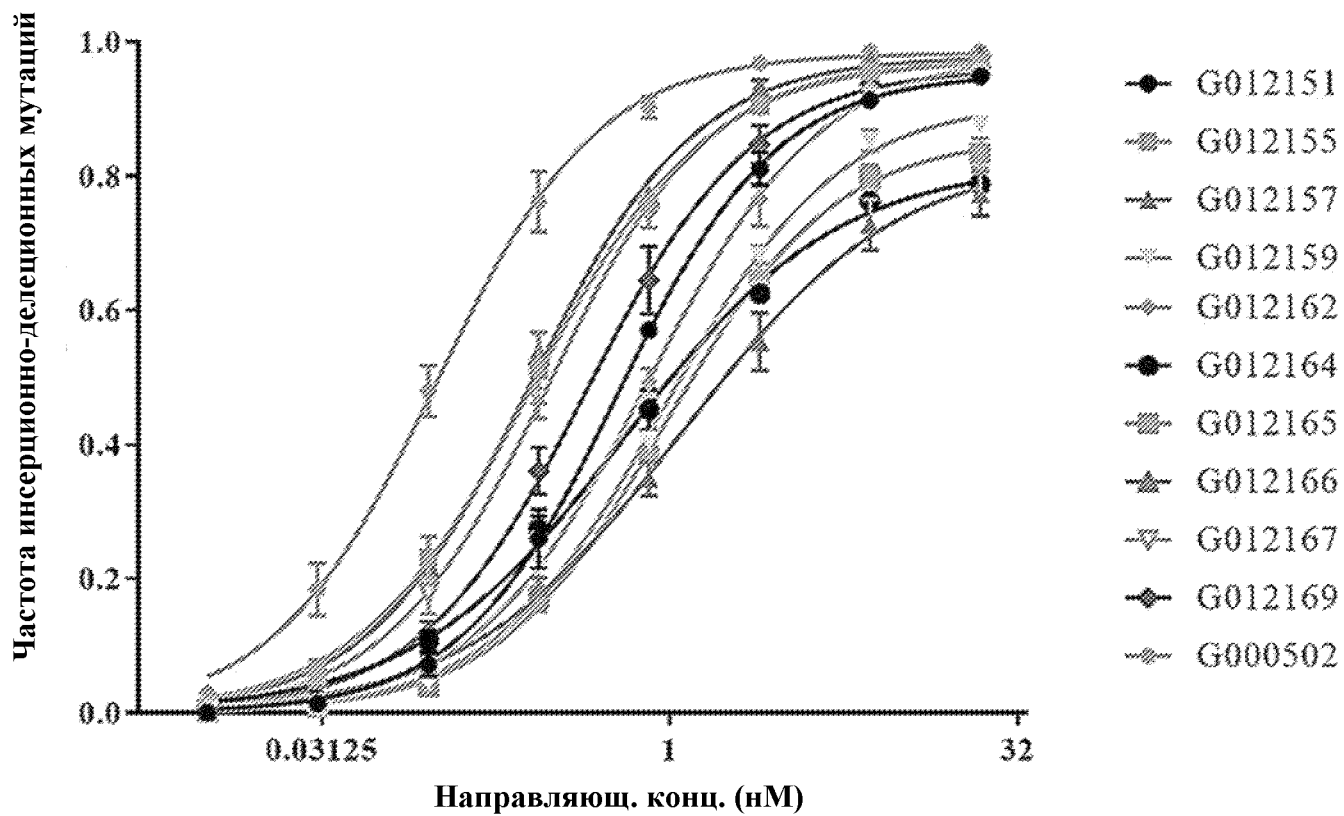
ФИГ. 1

## LDHRA LNP в первичных человеческих гепатоцитах

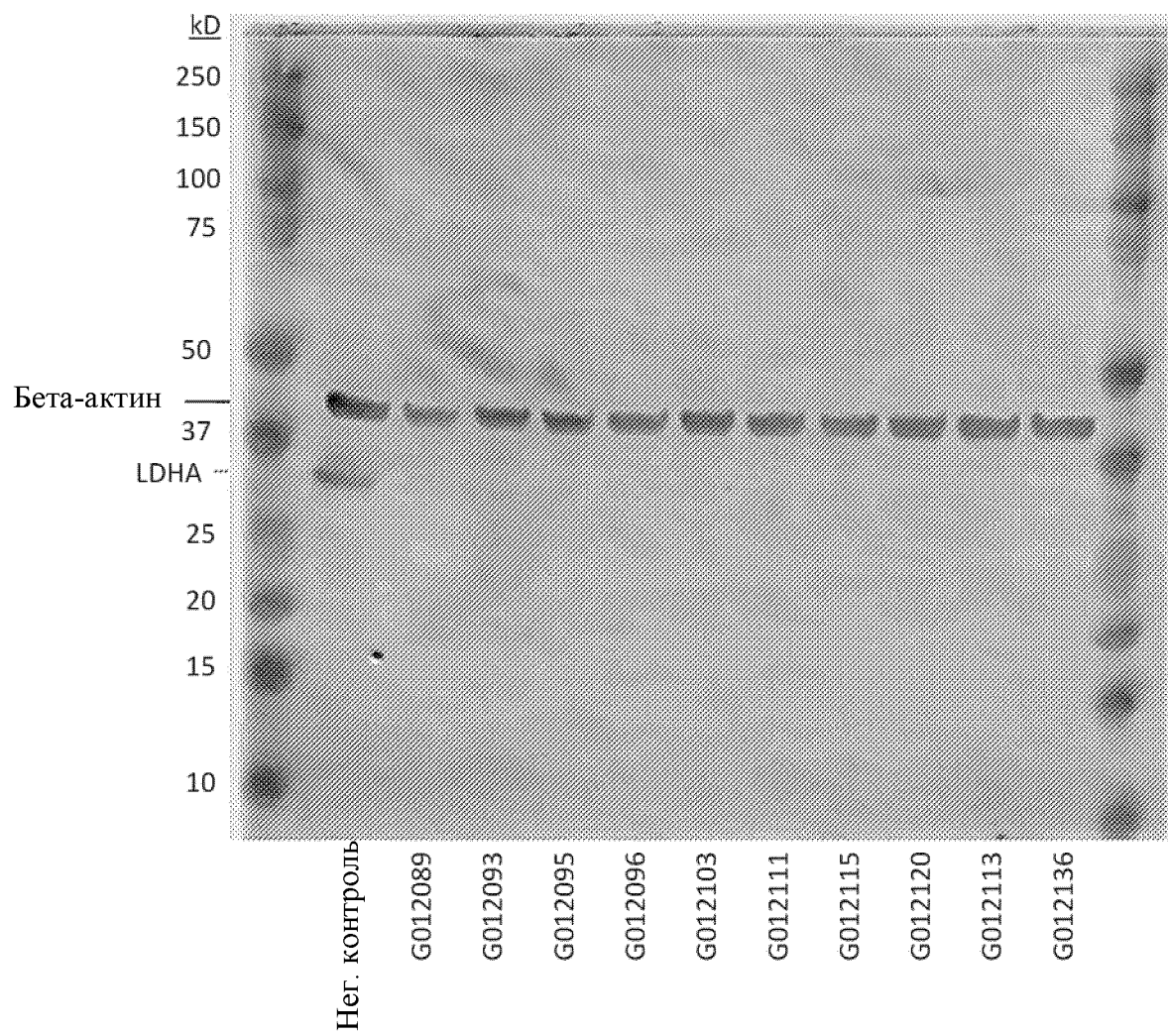


ФИГ. 2

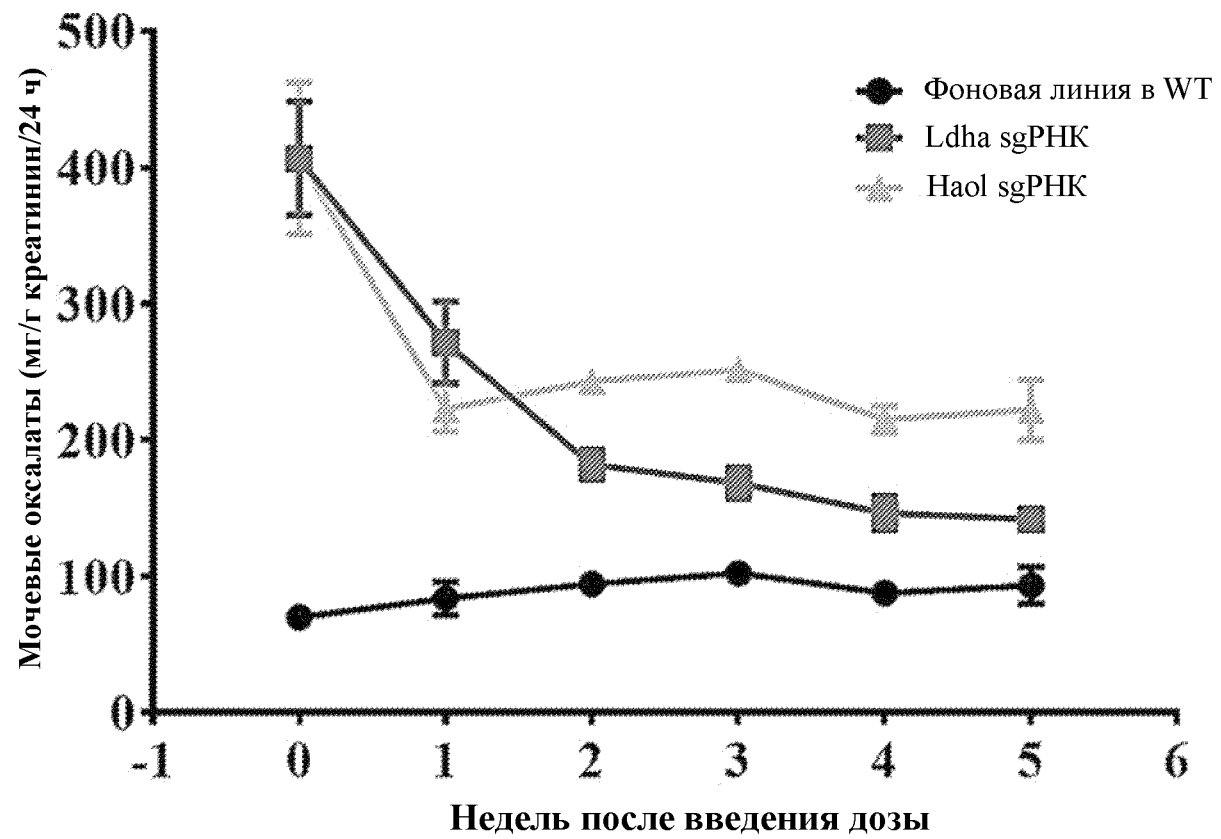
### LDHРА LNP в первичных гепатоцитах яванских макак



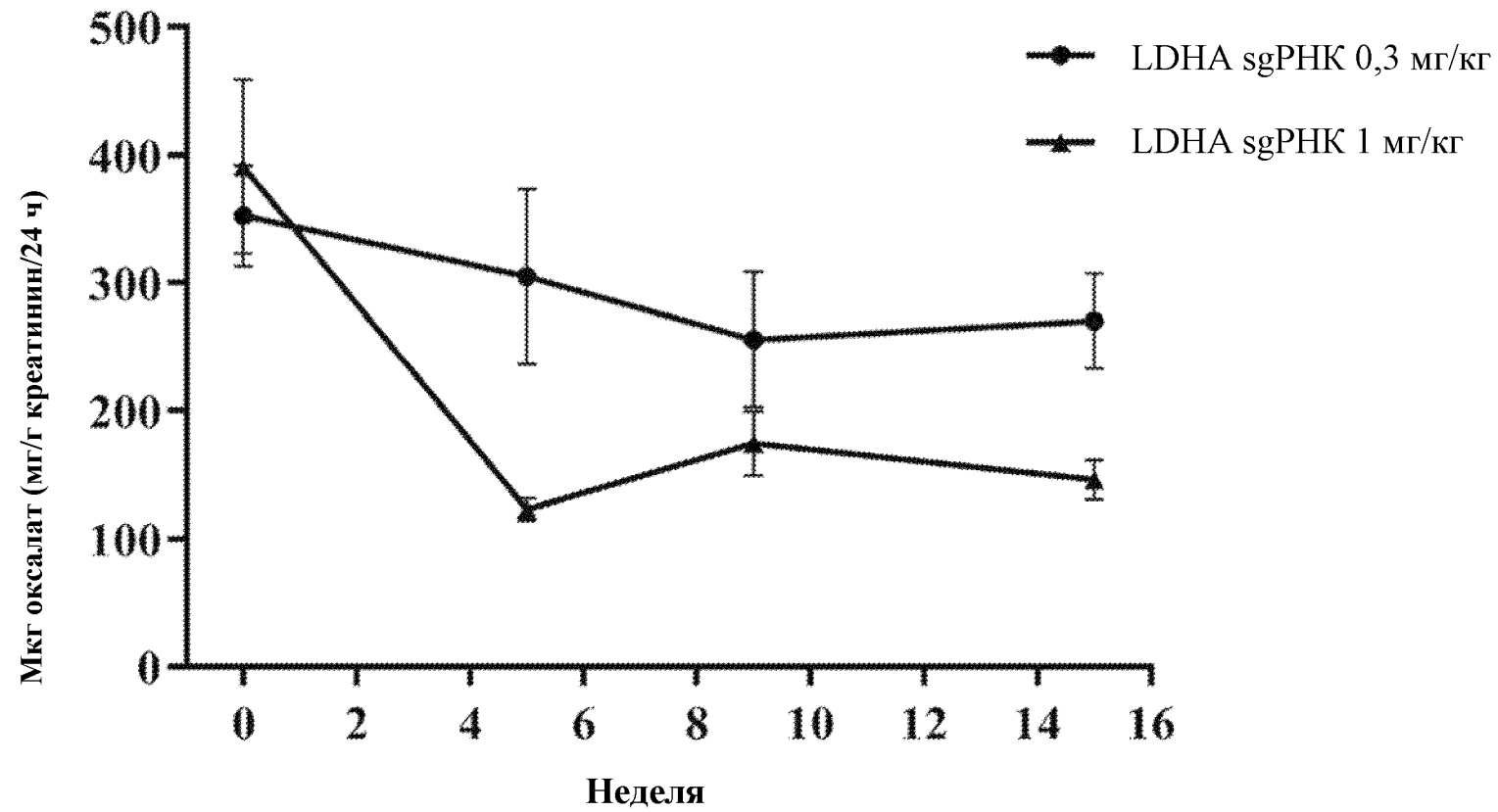
ФИГ. 3



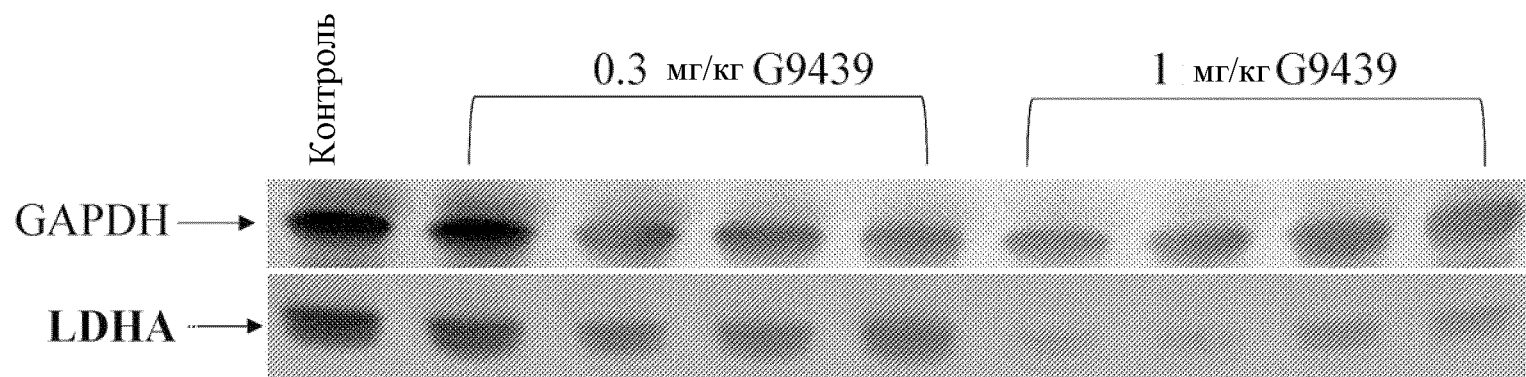
**ФИГ. 4**



ФИГ. 5



ФИГ. 6

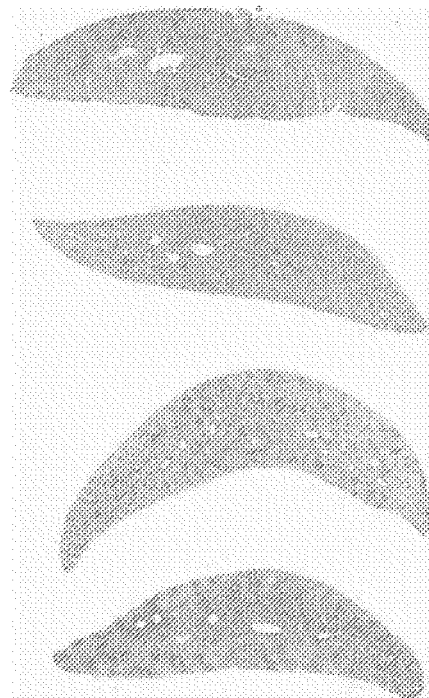


**ФИГ. 7**

**Контроль**



**0.3 мг/кг G9439**



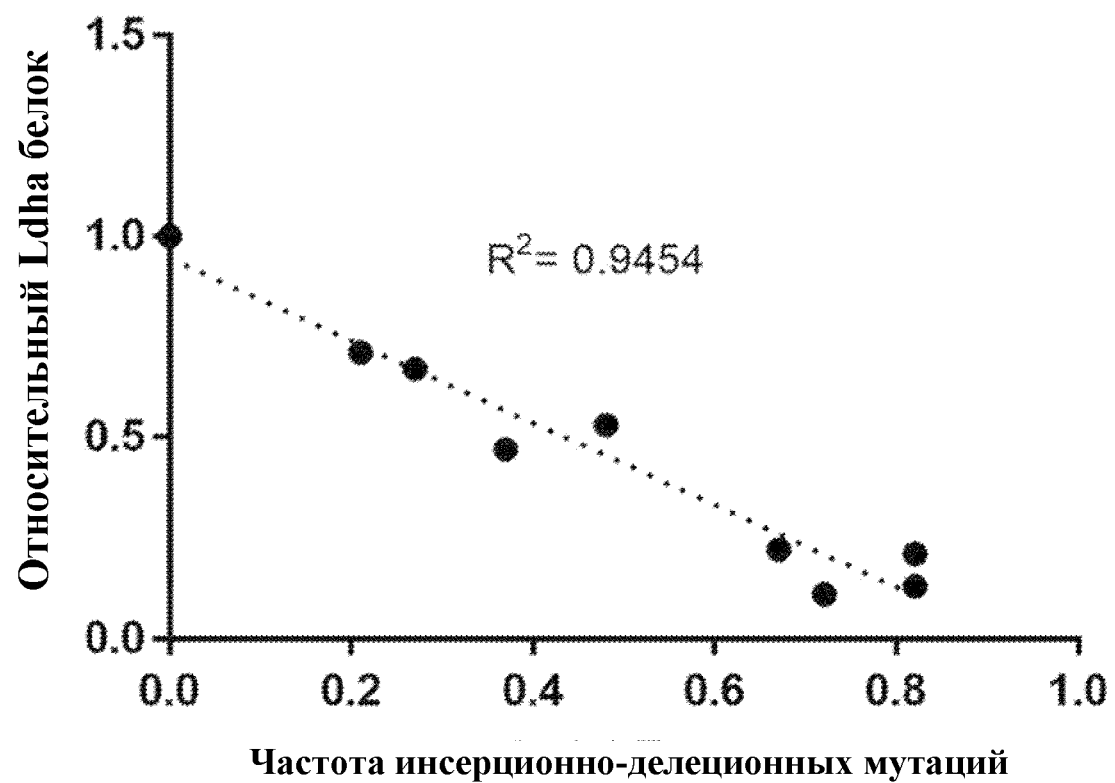
**1 мг/кг G9439**



**ФИГ. 8**

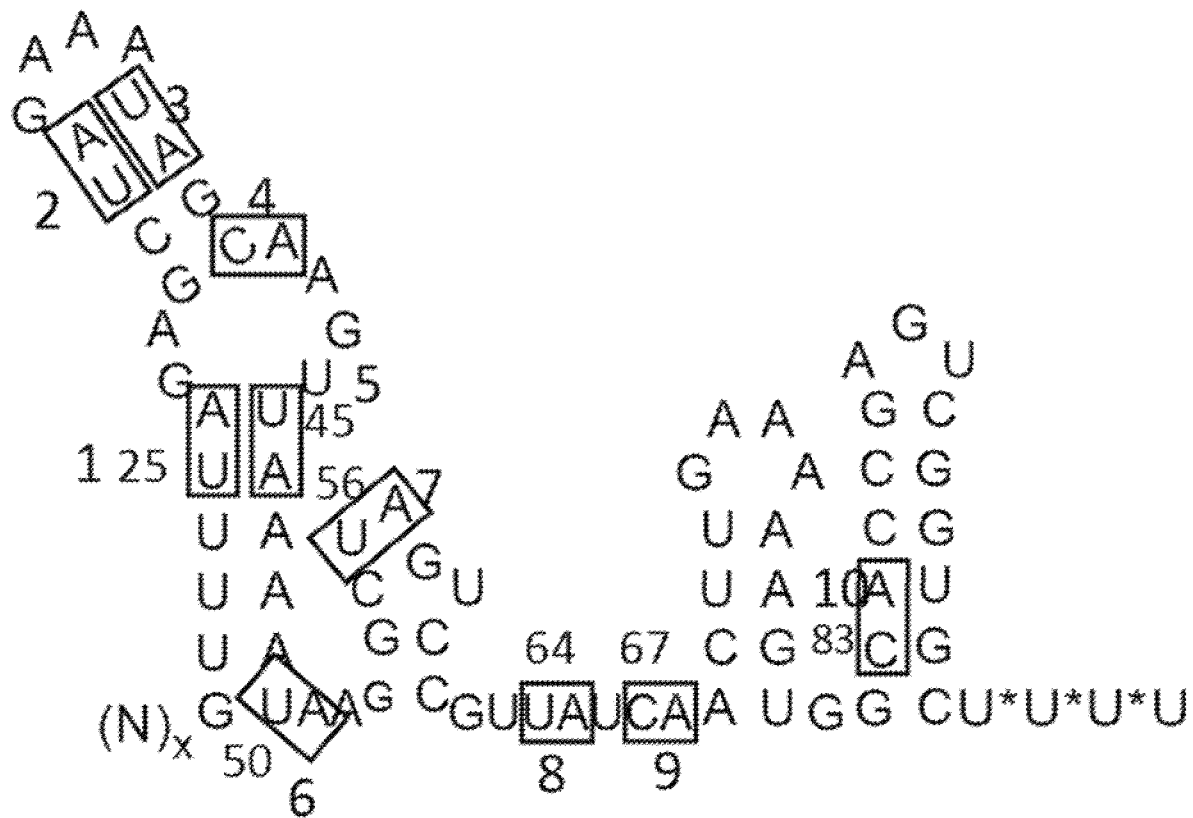


### Ldha белок KD

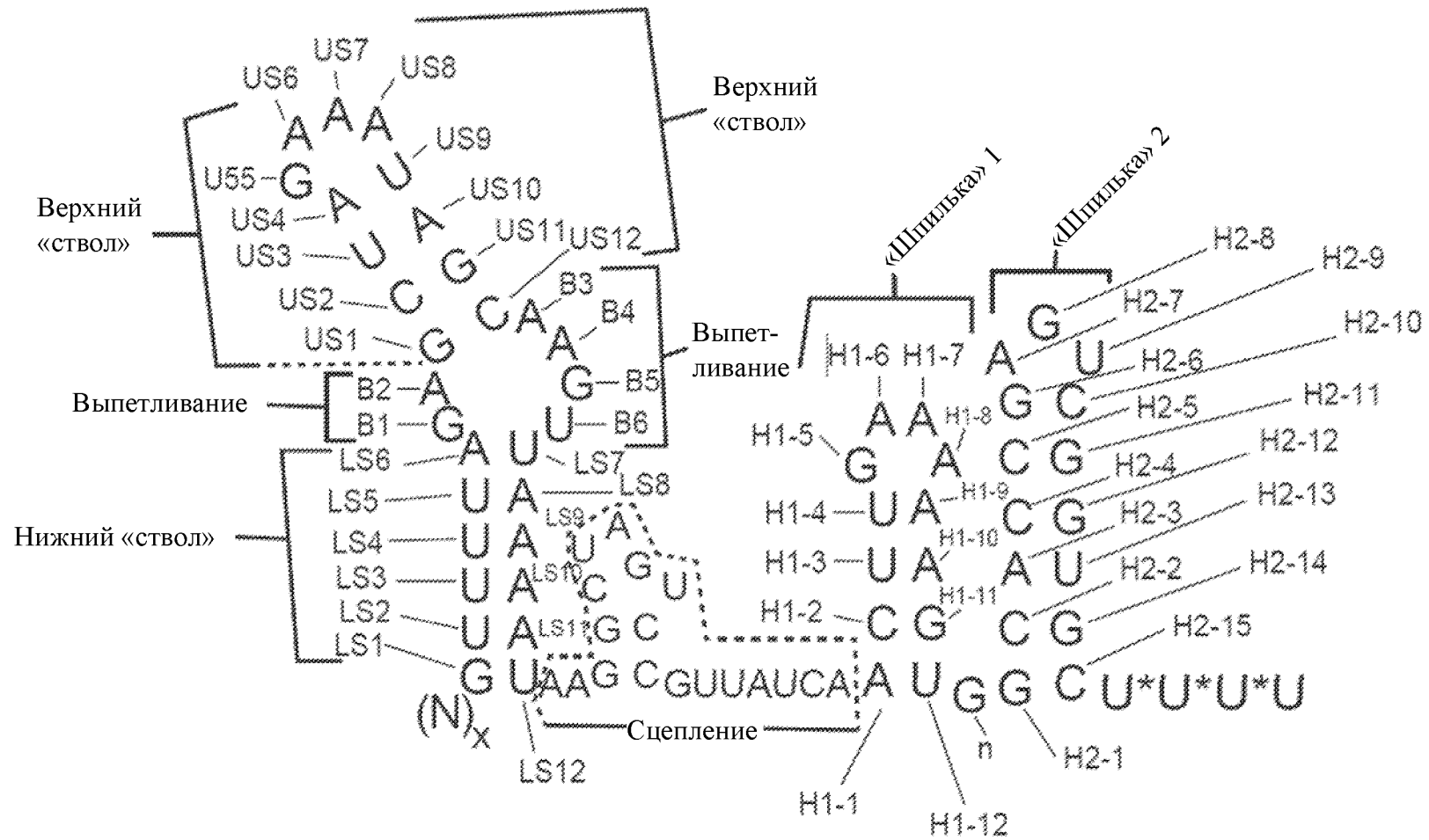


ФИГ. 9

# "Скаффолд" У/А

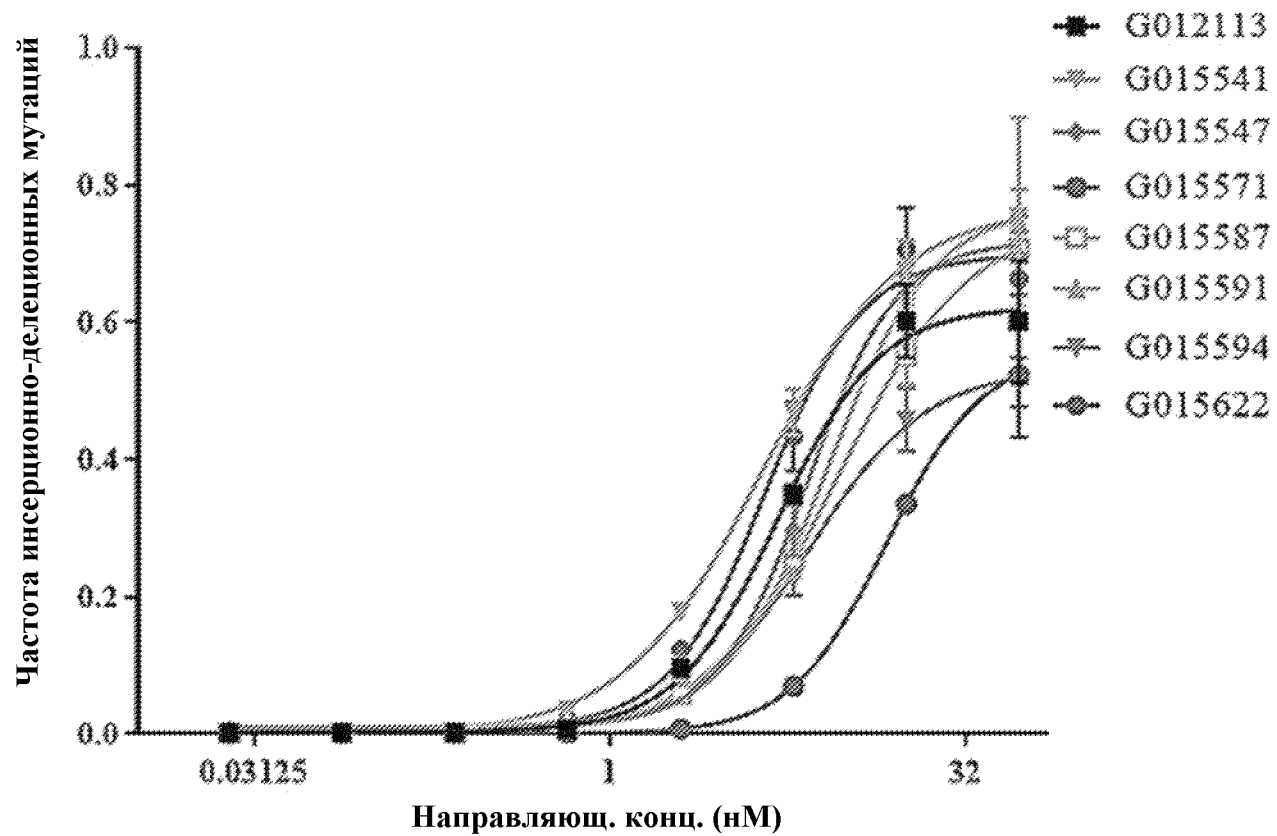


ФИГ. 10



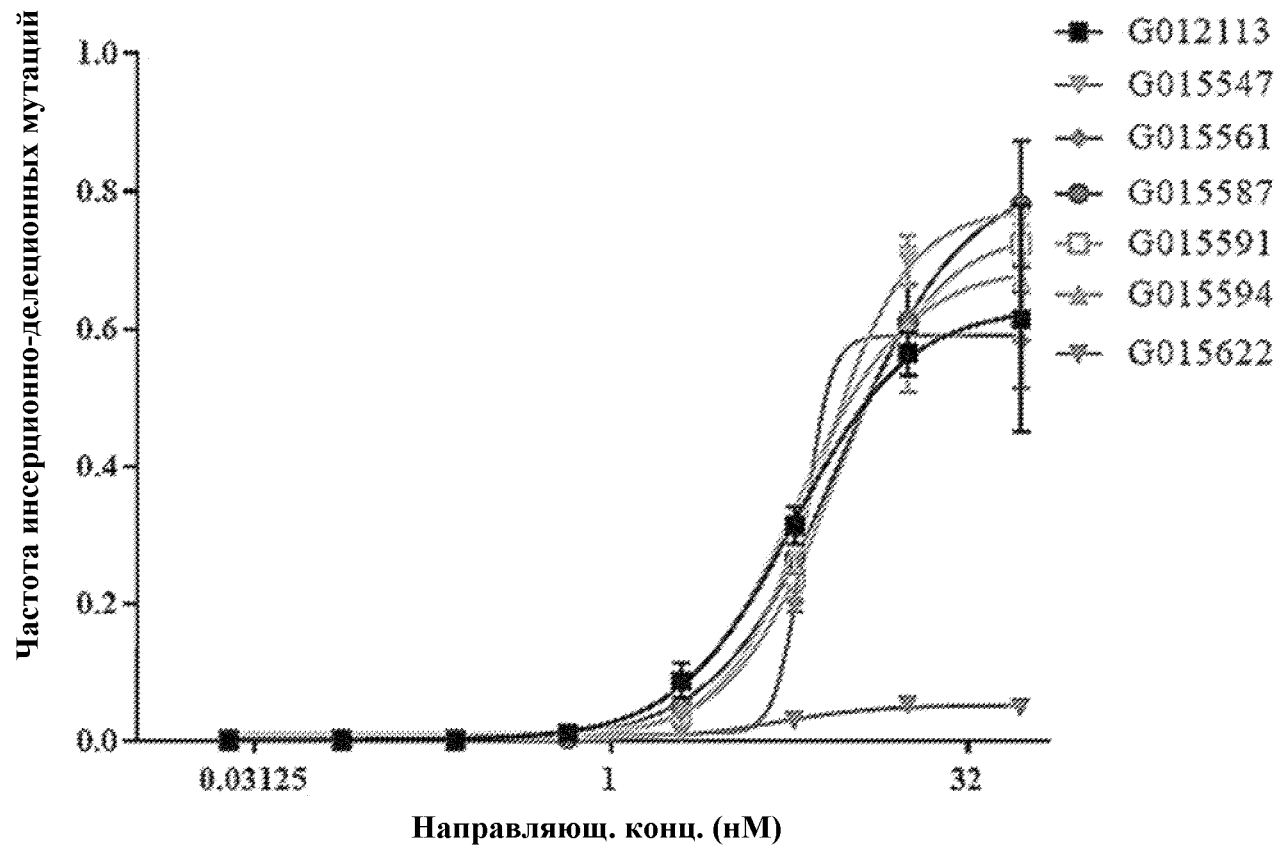
ФИГ. 11

### Частота инсерционно-делеционных мутаций хромосомы 12



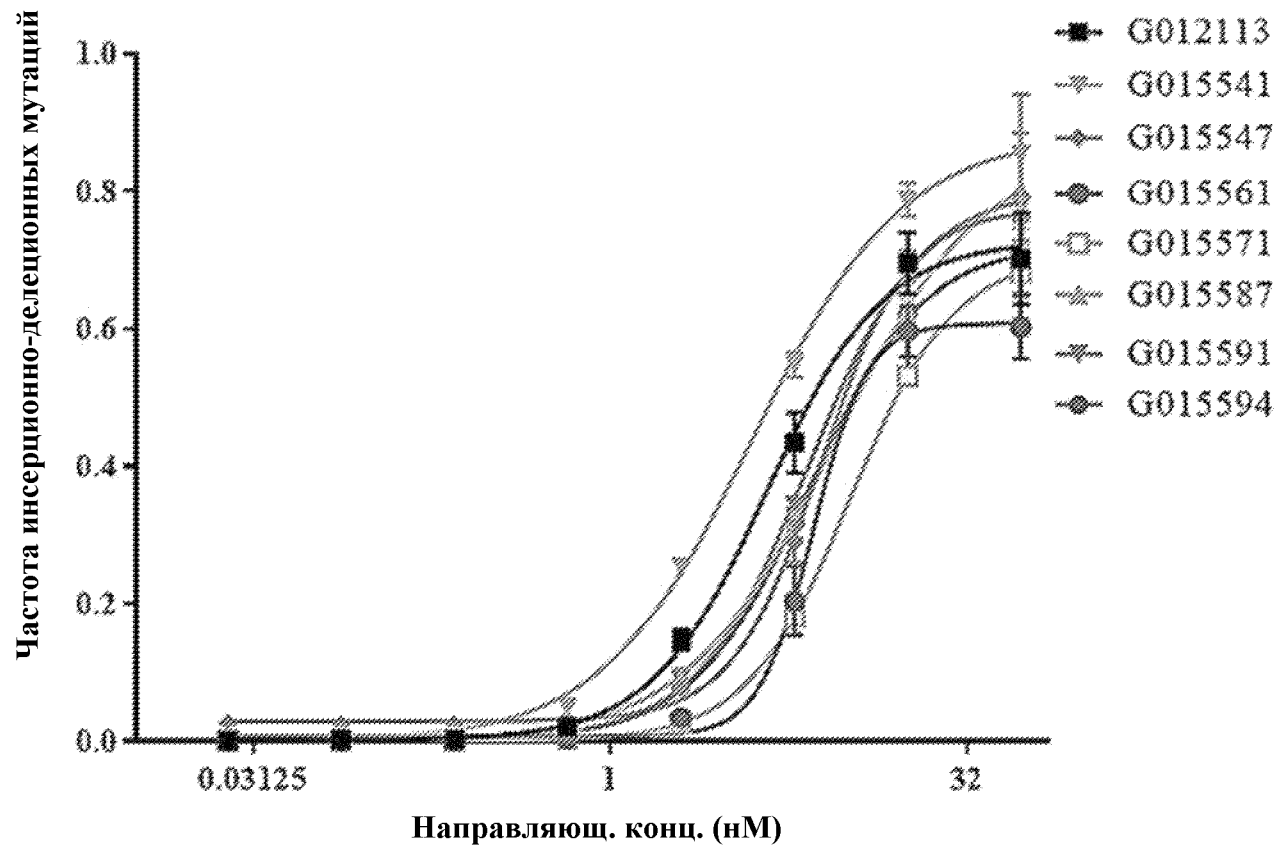
ФИГ. 12А

### Частота инсерционно-делеционных мутаций хромосомы 14



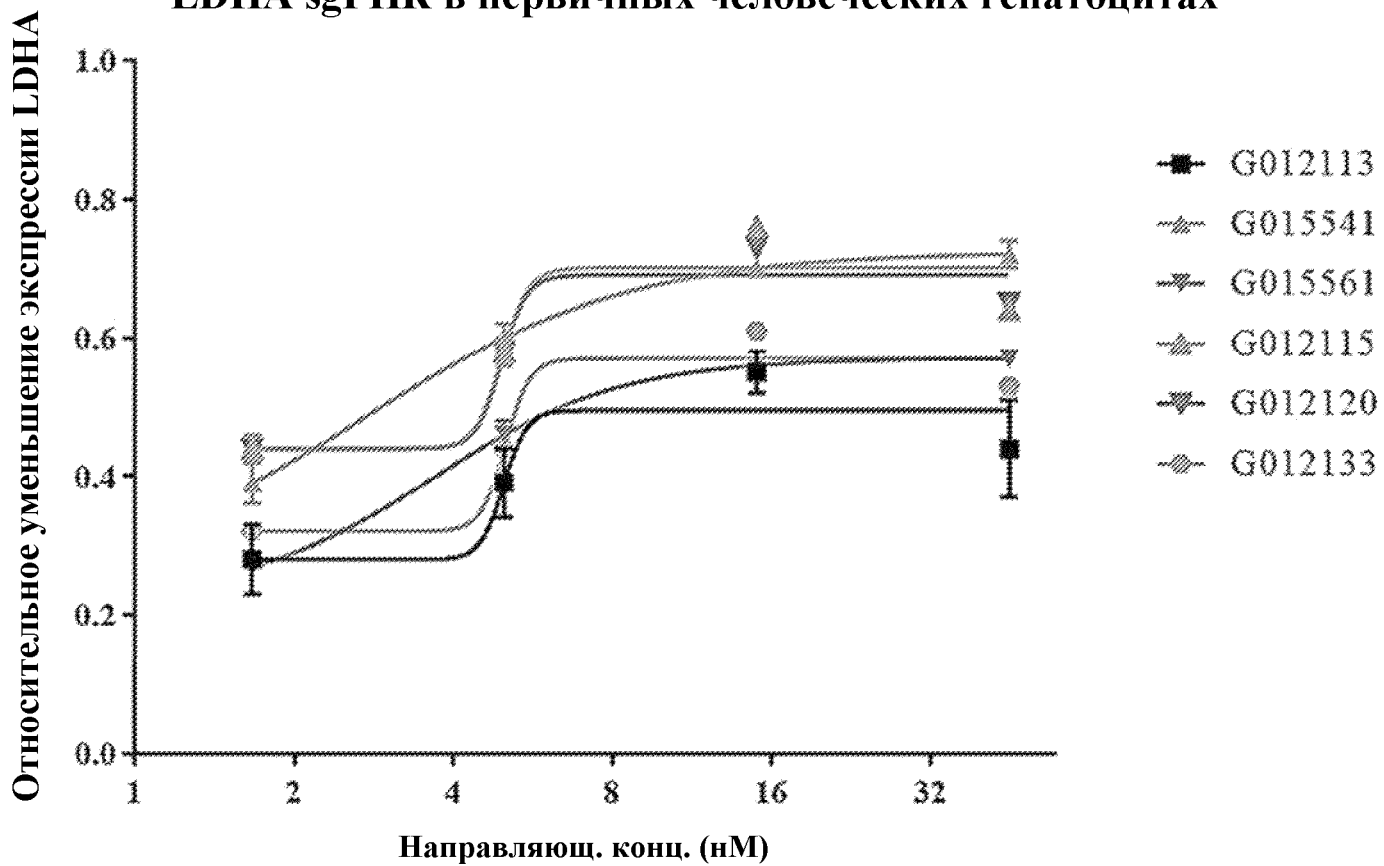
ФИГ. 12В

### Частота инсерционно-делеционных мутаций хромосомы 17



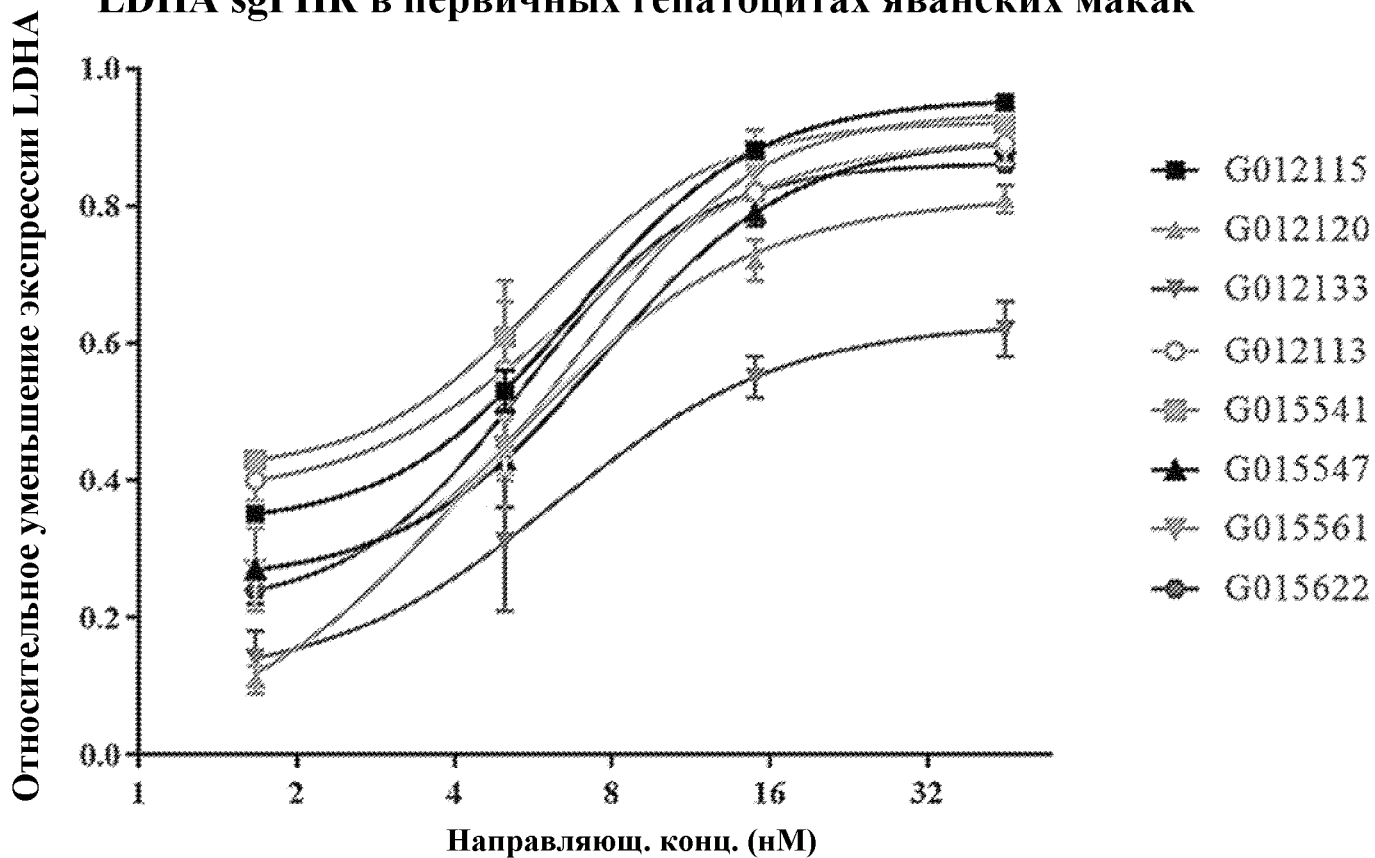
ФИГ. 12С

### LDHA sgРНК в первичных человеческих гепатоцитах



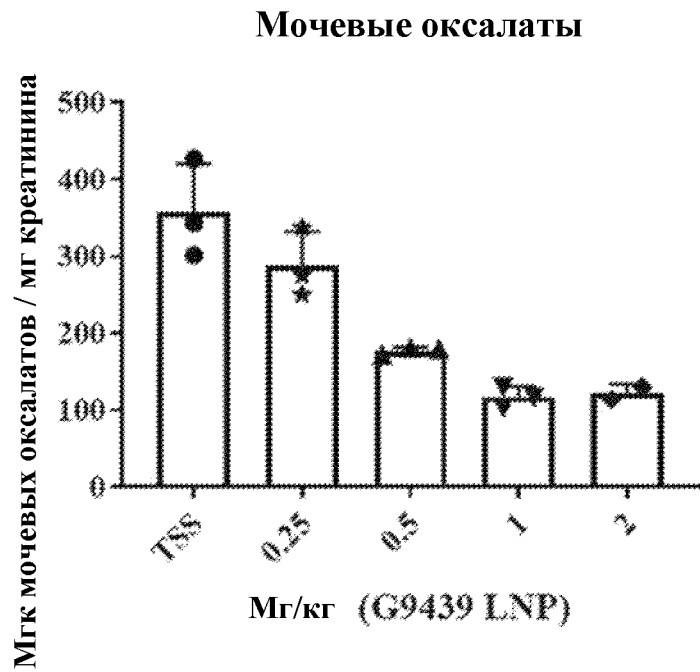
ФИГ. 13А

LDHA sgРНК в первичных гепатоцитах яванских макак

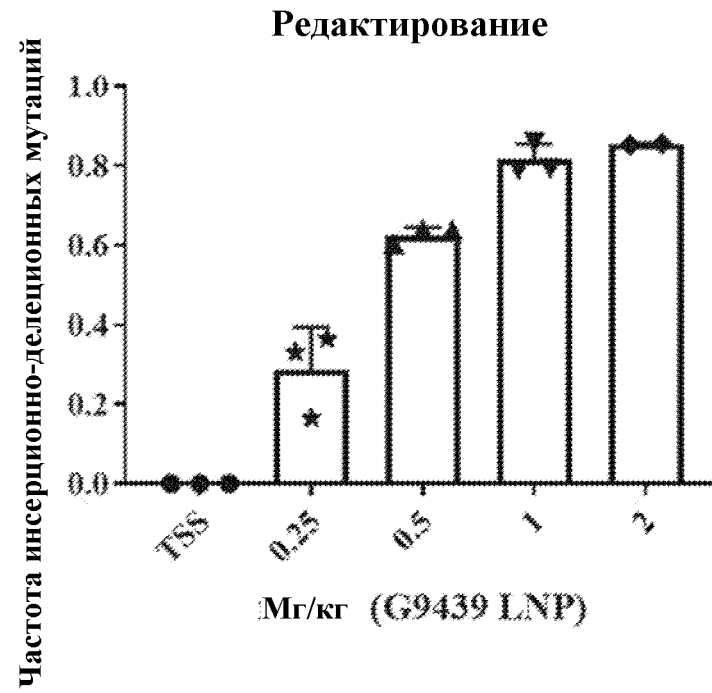


ФИГ. 13В



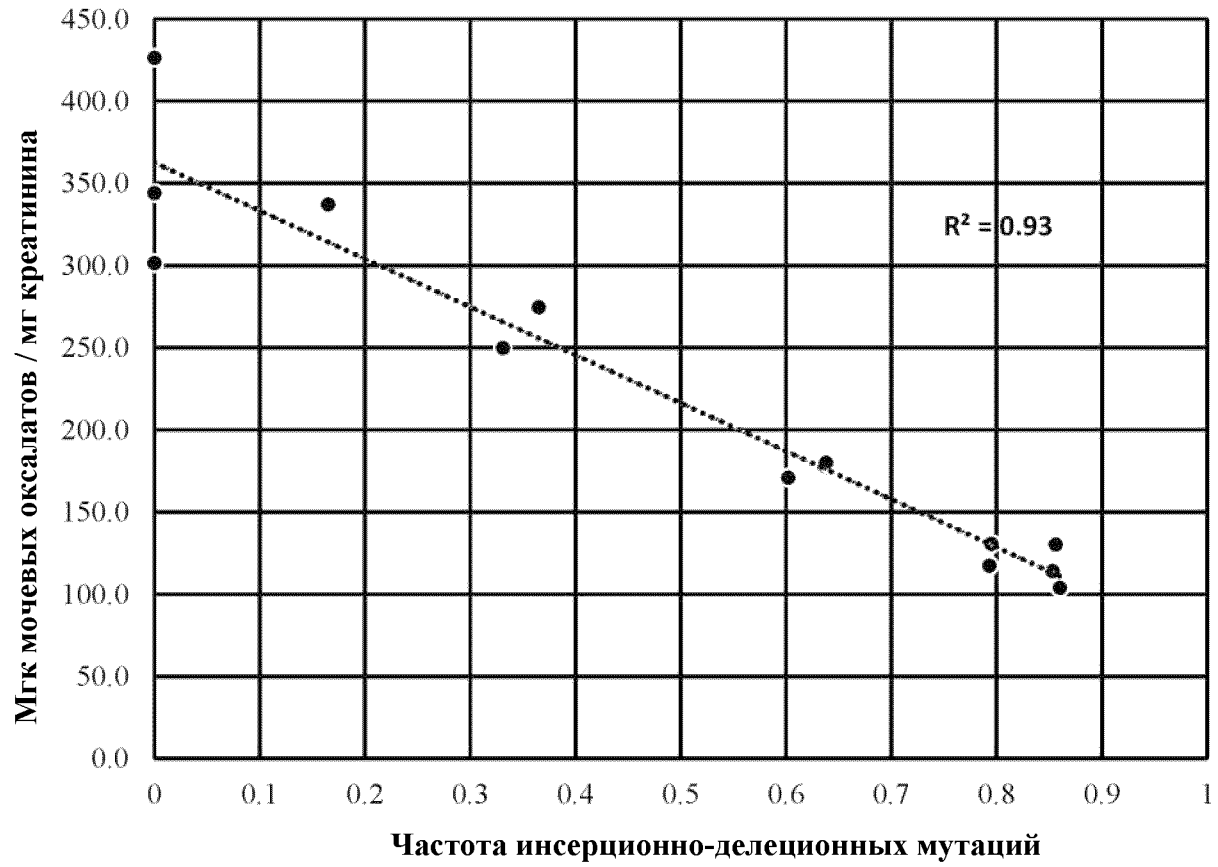


**ФИГ. 14А**

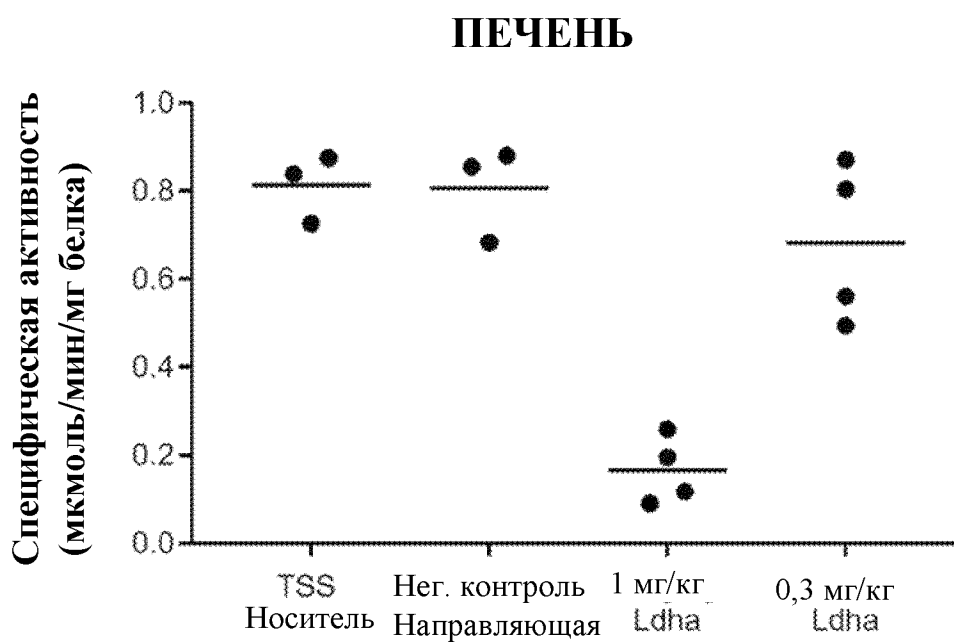


**ФИГ. 14В**

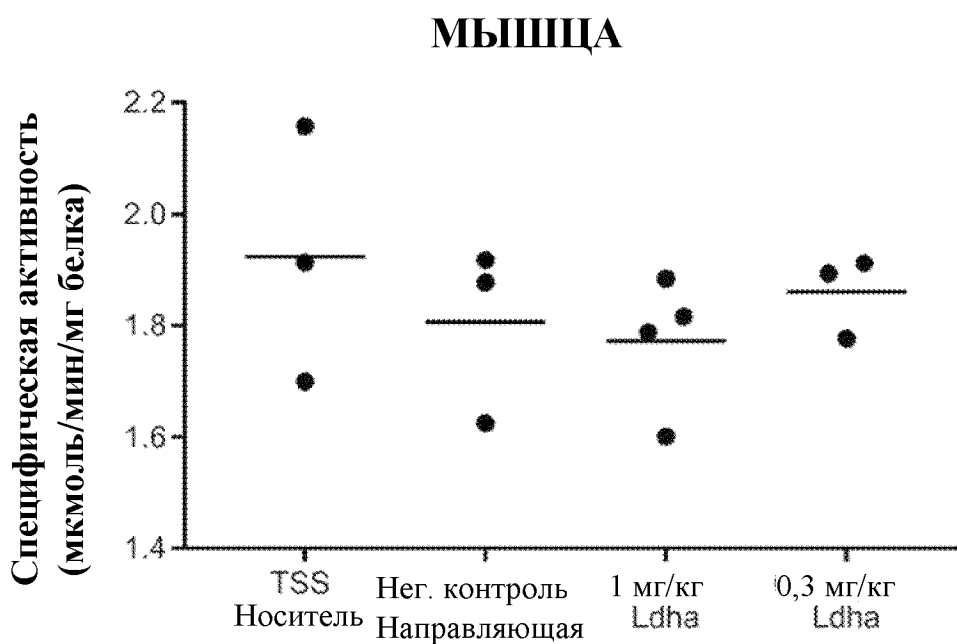
### Корреляция



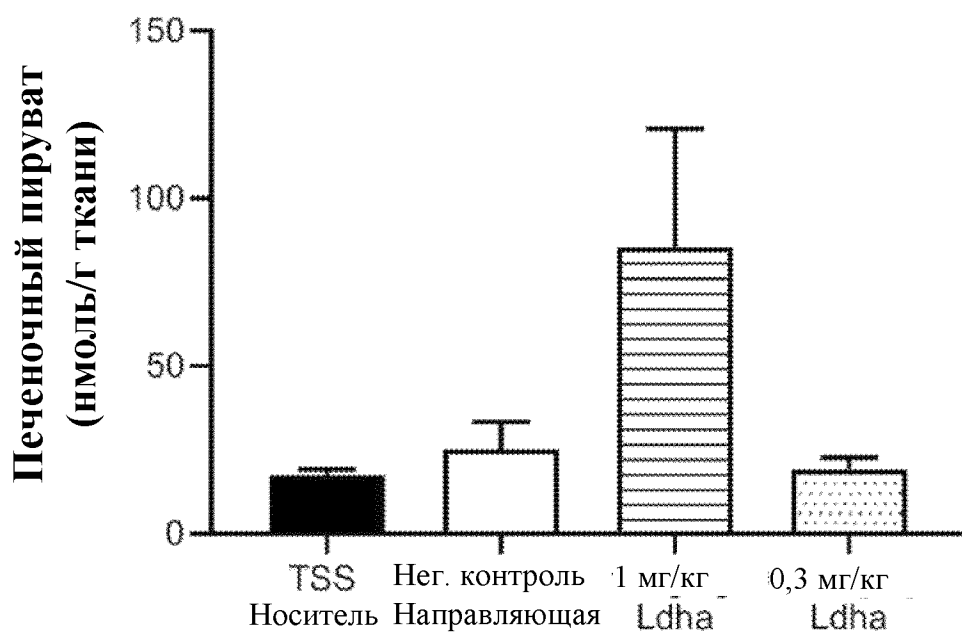
ФИГ. 14С



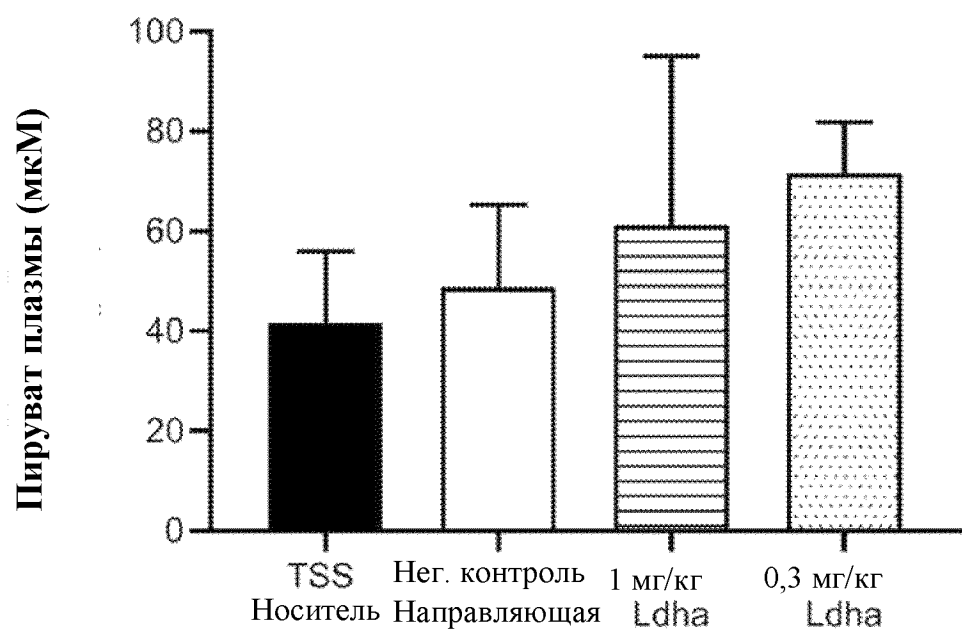
ФИГ. 15А



ФИГ. 15В

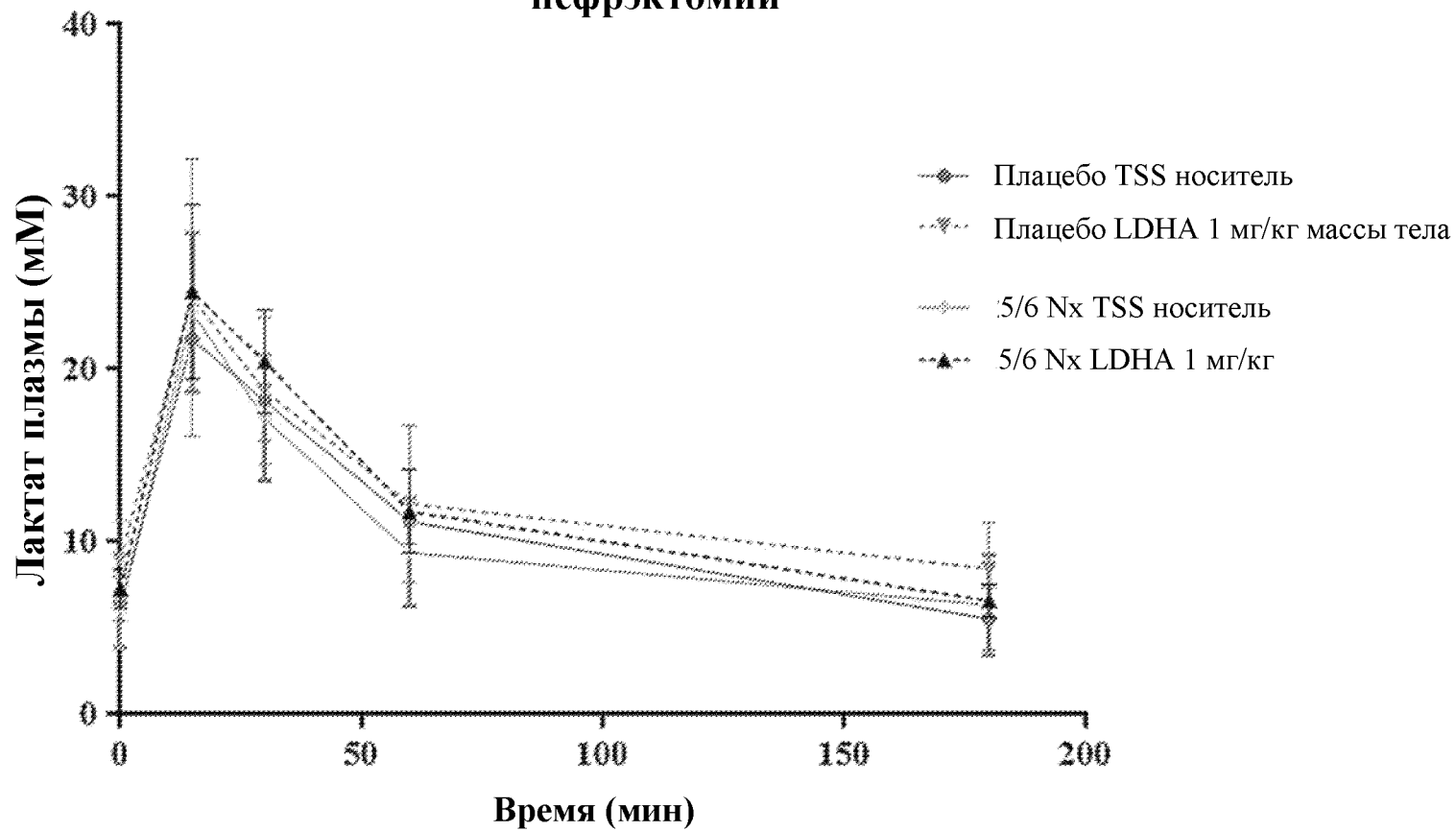


ФИГ. 16А



ФИГ. 16В

**5/6 провокационная проба с лактатом при нефрэктомии**



**ФИГ. 17**