

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **046927**

(13) **B1**

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

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2024.05.13**

**(51)** Int. Cl. *C12N 15/113* (2010.01)

**(21)** Номер заявки  
**201991369**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2017.12.08**

---

**(54) МОДИФИЦИРОВАННЫЕ НАПРАВЛЯЮЩИЕ РНК**

---

**(31)** 62/431,756

**(32)** 2016.12.08

**(33)** US

**(43)** 2019.12.30

**(86)** PCT/US2017/065306

**(87)** WO 2018/107028 2018.06.14

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**ИНТЕЛЛИА ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.**  
**(US)**

**(72)** Изобретатель:  
**Смит Эми Мэдисон Роден, Моррисси**  
**Дэвид В., Стрэппс Уолтер (US)**

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

**(56)** WO-A1-2016089433

WO-A1-2016164356

AYAL HENDEL ET AL: "Chemically modified guide RNAs enhance CRISPR-Cas genome editing in human primary cells", NATURE BIOTECHNOLOGY (ADVANCE ONLINE PUBLICATION), vol. 33, no. 9, 29 June 2015 [2015-06-29], pages 985-989, XP055233915, ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/nbt.3290 the whole document

MING WANG ET AL: "Efficient delivery of genome-editing proteins using bioreducible lipid nanoparticles", PROCEEDINGS NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES PNAS, vol. 113, no. 11, 29 February 2016 (2016-02-29), pages 2868-2873, XP055452122, US ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1520244113 the whole document

HAO YIN ET AL: "Therapeutic genome editing by combined viral and non-viral delivery of CRISPR system components in vivo", NATURE BIOTECHNOLOGY (ADVANCE ONLINE PUBLICATION), vol. 34, no. 3, 1 February 2016 (2016-02-01), pages 328-333, XP055382113, ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/nbt.3471 the whole document

WO-A2-2017004279

WO-A1-2017068377

WO-A1-2017136794

WO-A1-2017173054

YU XIN ET AL: "Improved delivery of Cas9 protein/gRNA complexes using lipofectamine CRISPRMAX", BIOTECHNOLOGY LETTERS, SPRINGER NETHERLANDS, NL, vol. 38, no. 6, 18 February 2016 (2016-02-18), pages 919-929, XP035901439, ISSN: 0141-5492, DOI: 10.1007/S10529-016-2064-9 [retrieved on 2016-02-18] the whole document

---

**(57)** Настоящее изобретение имеет отношение к модифицированным одиночным и двойным направляющим РНК, обладающим улучшенной активностью *in vitro* и *in vivo* в способах редактирования генов.

---

**B1**

**046927**

**046927 B1**

### Перечень последовательностей

Настоящая заявка содержит перечень последовательностей, представленный в электронном виде в формате ASCII и полностью включенный в настоящий документ посредством ссылки. Имя указанной ASCII-копии, созданной 7 декабря 2017 г., -01155-0004-00PCT\_SeqList.txt, а ее размер составляет 118 877 байт.

Настоящая заявка испрашивает приоритет предварительной заявки США № 62/431756, поданной 8 декабря 2016 г., которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

Настоящее изобретение относится к области редактирования генов с использованием системы CRISPR/Cas, входящей в состав иммунной системы прокариот, распознающей и разрезающей экзогенные генетические элементы. Система CRISPR/Cas основана на единственной нуклеазе, называемой CRISPR-ассоциированным белком 9 (Cas9), индуцирующей сайт-специфические разрывы в ДНК. Cas9 оказывает воздействие на специфические ДНК-последовательности за счет малых молекул РНК, называемых направляющими РНК (gРНК). Направляющая РНК содержит trРНК (также известные как tracrРНК) и crisprРНК (crРНК). trРНК и crРНК могут содержаться в одиночной направляющей РНК (sgРНК) или в двух различных молекулах РНК двойной направляющей РНК (dgРНК). Cas9 в комбинации с trРНК и crРНК или sgРНК называют рибонуклеопротеиновым (РНП) комплексом Cas9.

Олигонуклеотиды и, в частности РНК, иногда разрушаются в клетках и сыворотке за счет эндонуклеазного или экзонуклеазного гидролиза. Усовершенствованные способы и композиции для предотвращения такого разрушения, повышения стабильности gРНК и эффективности редактирования генов являются желательными, особенно для терапевтического применения.

### Раскрытие изобретения

В некоторых вариантах воплощения предложены терапевтические инструменты для редактирования генома, включающие модифицированные направляющие РНК. Модифицированные направляющие РНК, описанные в настоящем документе, могут улучшить стабильность направляющей РНК и комплекса направляющая РНК/Cas9, а также активность Cas9 (например, SpyCas9 и ее эквивалентов) при расщеплении ДНК-мишени. В некоторых вариантах воплощения направляющая РНК является sgРНК. В некоторых вариантах воплощения направляющая РНК является dgРНК. В некоторых вариантах воплощения направляющая РНК является tracrРНК. В некоторых вариантах воплощения направляющая РНК является crРНК.

Направляющие РНК, описанные в настоящем документе, содержат по меньшей мере один модифицированный нуклеотид. Модификации могут включать 2'-О-метил (2'-О-Ме), 2'-О-(2-метоксиэтил) (2'-О-томе), 2'-фтор (2'-F), фосфоротиоатную (PS) связь между нуклеотидами, заместители G-C и инвертированные связи, не содержащие оснований, между нуклеотидами и их эквиваленты.

Варианты воплощения настоящего изобретения включают: некоторые варианты воплощения включают одиночную направляющую РНК (sgРНК), содержащую модификацию по 5'-концу и одну или более из модификаций в одной или более из: области верхнего стебля; области шпильки 1; и области шпильки 2, причем модификация по 5'-концу включает по меньшей мере две фосфоротиоатных связи в пределах первых семи нуклеотидов на 5'-конце 5'-концевой области. В некоторых случаях указанная модификация является 2'-О-метил (2'-О-Ме)-модифицированным нуклеотидом. В некоторых вариантах воплощения указанная модификация является 2'-фтор (2'-F)-модифицированным нуклеотидом.

В некоторых вариантах воплощения sgРНК содержит модификации в положениях US1-US12 и/или модификацию в положении H1-1 и/или модификацию в положении H2-1. В некоторых вариантах воплощения sgРНК содержит модификации в положениях H1-1-H1-12 и/или H2-1-H2-15. В некоторых вариантах воплощения sgРНК содержит одну или более модификации в каждой из области верхнего стебля, области шпильки 1 и области шпильки 2. В некоторых вариантах воплощения sgРНК содержит модифицированный нуклеотид между областями шпильки 1 и шпильки 2. В некоторых вариантах воплощения sgРНК содержит модификацию в области нижнего стебля.

В некоторых вариантах воплощения sgРНК содержит модификацию в 5'-концевой области и/или 3'-концевой области. В некоторых вариантах воплощения sgРНК содержит 3'-концевую модификацию в 3'-концевой области. В некоторых вариантах воплощения sgРНК содержит модификации в по меньшей мере двух из последних четырех нуклеотидов на 3'-конце 3'-концевой области. В некоторых вариантах воплощения sgРНК содержит 5'-концевую модификацию в 5'-концевой области. В некоторых вариантах воплощения sgРНК содержит модификации в по меньшей мере двух из первых четырех нуклеотидов на 5'-конце 5'-концевой области. В некоторых вариантах воплощения sgРНК содержит 3'-концевую модификацию в 3'-концевой области и 5'-концевую модификацию в 5'-концевой области. В некоторых вариантах воплощения sgРНК содержит модификации в по меньшей мере двух из последних четырех нуклеотидов на 3'-конце 3'-концевой области и в по меньшей мере двух из первых четырех нуклеотидов на 5'-конце 5'-концевой области. В некоторых случаях эти модификации являются 2'-О-Ме, 2'-F, 2'-О-томе или фосфоротиоатными (PS) связями, соединяющими нуклеотиды. В некоторых вариантах воплощения sgРНК содержит PS-связи между по меньшей мере двумя из последних четырех нуклеотидов на 3'-конце 3'-концевой области и/или по меньшей мере двумя из первых четырех нуклеотидов на 5'-конце 5'-концевой области. В некоторых случаях sgРНК содержит 5'-концевую область и 3'-концевую область с

более чем одной модификацией, описанной в настоящем документе, например, с PS-связями и 2'-О-Ме модификациями.

В некоторых вариантах воплощения sgРНК содержит модификацию в области расширения. В некоторых вариантах воплощения 50% нуклеотидов в области расширения являются модифицированными, причем модификация является 2'-О-Ме или 2'-F.

В некоторых вариантах воплощения sgРНК содержит модификацию в области связки. В некоторых вариантах воплощения sgРНК содержит модификации в положениях N15, N16, N17 и/или N18 в области связки, причем указанные модификации являются 2'-О-Ме или 2'-F. В некоторых случаях N16, N17 и N18 связаны PS-связями.

В некоторых вариантах воплощения sgРНК содержит по меньшей мере первые три нуклеотида на 5'-конце 5'-концевой области и последние три нуклеотида на 3'-конце 3'-концевой области, которые являются модифицированными.

В некоторых вариантах воплощения sgРНК содержит модификации в 3'-концевой области и/или 5'-концевой области. В некоторых случаях первые четыре нуклеотида на 5'-конце 5'-концевой области и последние четыре нуклеотида на 3'-конце 3'-концевой области связаны фосфоротиоатными (PS) связями. В некоторых вариантах воплощения 5'- и 3'-модификации содержат 2'-О-Ме или 2'-О-мие. В некоторых вариантах воплощения 5'- и 3'-модификации содержат 2'-F. В некоторых вариантах воплощения 5'- и/или 3'-модификации содержат PS связи между нуклеотидами. В некоторых вариантах воплощения 5'- и/или 3'-модификации содержат один или более из 2'-О-Ме, 2'-О-мие, 2'-F и PS связей между нуклеотидами.

В некоторых вариантах воплощения sgРНК содержит модификации в первых четырех нуклеотидах на 5'-конце 5'-концевой области и последних четырех нуклеотидах на 3'-конце 3'-концевой области. В некоторых случаях эти модификации являются соединяющими PS-связями (т.е. PS-связи, соединяющие первые четыре и последние четыре нуклеотида). В некоторых вариантах воплощения sgРНК дополнительно содержит 2'-О-Ме модификации в первых трех нуклеотидах на 5'-конце 5'-концевой области и последних трех нуклеотидах на 3'-конце 3'-концевой области.

В некоторых вариантах воплощения sgРНК содержит модификации в первых четырех нуклеотидах на 5'-конце 5'-концевой области и последних четырех нуклеотидах на 3'-конце 3'-концевой области, причем указанные модификации являются по меньшей мере PS-связями, соединяющими указанные четыре нуклеотида, и, кроме того, первые три нуклеотида на 5'-конце 5'-концевой области и последние три нуклеотида на 3'-конце 3'-концевой области содержат 2'-О-Ме, 2'-О-мие или 2'-F модификации.

В некоторых вариантах воплощения sgРНК содержит модификации LS1, LS6, LS7, LS8, LS11 и LS12, причем указанная модификация является 2'-О-Ме или 2'-F.

В некоторых вариантах воплощения sgРНК содержит модификации в каждом из нуклеотидов области расширения, причем указанная модификация является 2'-О-Ме или 2'-F.

В некоторых вариантах воплощения sgРНК содержит модификации в каждом из нуклеотидов в области верхнего стебля, причем указанная модификация является 2'-О-Ме или 2'-F.

В некоторых вариантах воплощения sgРНК содержит модификации в каждом из нуклеотидов в области шпильки 1, причем указанная модификация является 2'-О-Ме или 2'-F.

В некоторых вариантах воплощения sgРНК содержит модификации в каждом из нуклеотидов в области шпильки 2, причем указанная модификация является 2'-О-Ме или 2'-F.

Некоторые варианты воплощения включают sgРНК, содержащую 2'-О-Ме-модифицированные нуклеотиды в следующих положениях:

- первых трех нуклеотидах на 5'-конце 5'-концевой области;
- LS1, LS6, LS7, LS8, LS11 и/или LS12 в области нижнего стебля;
- B1 и/или B2 в области расширения;
- каждом нуклеotide в области верхнего стебля;
- N16, N17 и/или N18 в области связки;
- каждом нуклеotide в области шпильки 1;
- каждом нуклеotide в области шпильки 2; и
- последних четырех нуклеотидах на 3'-конце 3'-концевой области.

В некоторых вариантах воплощения B3-B6 модифицированы 2'-О-Ме. В некоторых случаях sgРНК дополнительно содержит три фосфоротиоатные (PS) связи, соединяющие первые четыре нуклеотида на 5'-конце 5'-концевой области и три PS связи, соединяющие последние четыре нуклеотида на 3'-конце 3'-концевой области. В некоторых вариантах воплощения sgРНК содержит 2'-F модификации в положениях LS9 и LS10. В некоторых вариантах воплощения sgРНК содержит 2'-F модификации в положениях N15, N16, N17 и N18. В некоторых вариантах воплощения sgРНК содержит 2'-F модификации в положениях H2-9, H2-10, H2-11, H2-12, H2-13, H2-14 и H2-15. В некоторых вариантах воплощения sgРНК содержит 2'-F модификации в положениях со второго по последний, с третьего по последний и с четвертого по последний нуклеотид на 3'-конце 3'-концевой области.

Некоторые варианты воплощения включают sgРНК, содержащую 2'-F модифицированные нуклеотиды в следующих положениях:

- LS9 и LS10 в области нижнего стебля;





2'-F модифицированный нуклеотид между шпилькой 1 и шпилькой 2;

2'-F модифицированные нуклеотиды в положениях H2-2, H2-4, H2-6, H2-8, H2-10, H2-12; и H2-14;

2'-O-Ме модифицированные нуклеотиды в положениях H2-1, H2-3, H2-5, H2-7, H2-9, H2-11; H2-13 и H2-15;

2'-F модифицированные нуклеотиды в положениях во втором от последнего и в четвертом от последнего нуклеотиде 3'-концевой области; и

2'-O-Ме модифицированный нуклеотид в третьем от последнего и последнем нуклеотиде на 3'-конце 3'-концевой области, и необязательно дополнительно содержащую три фосфоротиоатные (PS) связи, соединяющие первые четыре нуклеотида на 5'-конце 5'-концевой области и три PS связи, соединяющие последние четыре нуклеотида на 3'-конце 3'-концевой области.

Некоторые варианты воплощения включают sgPНК, содержащую:

2'-O-Ме модифицированные нуклеотиды LS8, LS10, LS12, H1-2, H1-4, H1-6, H1-8, H1-10, H1-12, H2-1, H2-3, H2-5, H2-7, H2-9, H2-11, H2-13 и H2-15; и

2'-F модифицированные нуклеотиды в положениях LS7, LS9, LS11; H1-1, H1-3, H1-5, H1-7, H1-9, H1-11, H1-13, H2-2, H2-4, H2-6, H2-8, H2-10, H2-12 и H2-14 и необязательно дополнительно содержащую три фосфоротиоатные (PS) связи, соединяющие первые четыре нуклеотида на 5'-конце 5'-концевой области и три PS связи, соединяющие последние четыре нуклеотида на 3'-конце 3'-концевой области; и необязательно дополнительно содержащую:

2'-O-Ме модифицированные нуклеотиды в последнем и с третьего по последний нуклеотиде на 3'-конце 3'-концевой области; и/или

2'-F модифицированные нуклеотиды со второго по последний, с четвертого по последний и/или в последнем нуклеотиде на 3'-конце 3'-концевой области.

Некоторые варианты воплощения включают sgPНК, содержащую нуклеиновые кислоты в соответствии с любой из SEQ ID No: 228-353, включая модификации, перечисленные в табл. 4. Некоторые варианты воплощения включают sgPНК, содержащую любую из SEQ ID No: 22 8-332, включая модификации, перечисленные в табл. 4. Некоторые варианты воплощения включают sgPНК, содержащую любую из SEQ ID No: 235-240, 265-285 и 309-329, включая модификации, перечисленные в табл. 4. Некоторые варианты воплощения включают sgPНК, содержащую SEQ ID No: 240. Некоторые варианты воплощения включают sgPНК, содержащую SEQ ID No: 240, включая модификации, перечисленные в табл. 4. Некоторые варианты воплощения включают sgPНК, содержащую SEQ ID No: 242. Некоторые варианты воплощения включают sgPНК, содержащую SEQ ID No: 358. В дополнительных вариантах воплощения sgPНК содержит нуклеиновые кислоты, обладающие по меньшей мере 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 85, 80, 75 или 70% идентичностью по отношению к нуклеиновым кислотам согласно любой из SEQ ID No: 235-240, 265-285 и 309-329, причем модификация каждого нуклеотида sgPНК, соответствующего нуклеотиду идентификатора эталонной последовательности в табл. 4, идентична или эквивалентна модификации, показанной в идентификаторе эталонной последовательности в табл. 4, и необязательно дополнительно содержащие три фосфоротиоатные (PS) связи, соединяющие первые четыре нуклеотида на 5'-конце 5'-концевой области и три PS связи, соединяющие последние четыре нуклеотида на 3'-конце 3'-концевой области. В некоторых вариантах воплощения sgPНК дополнительно содержит по меньшей мере три PS связи, связывающие нуклеотиды в области шпильки 1. В некоторых вариантах воплощения sgPНК дополнительно содержит по меньшей мере три PS связи, связывающие нуклеотиды в области шпильки 2. В некоторых вариантах воплощения sgPНК дополнительно содержит по меньшей мере три PS связи, связывающие нуклеотиды в области верхнего стебля. В некоторых вариантах воплощения sgPНК образует рибонуклеопротеиновый комплекс с Cas9 *S. pyogenes*.

#### **Краткое описание фигур**

На фиг. 1 показано процентное редактирование гена транстиретина (TTR) мыши после трансфекции клеток Neuro2A за счет модифицированных sgPНК совместно с мPНК Cas9 и немодифицированной trPНК (TR000002), измеренное с помощью секвенирования нового поколения (NGS).

На фиг. 2 показано процентное редактирование гена TTR мыши после трансфекции клеток Neuro2A за счет модифицированных trPНК совместно с немодифицированной sgPНК (CR000686) и мPНК Cas9, измеренное с помощью NGS.

На фиг. 3 показано процентное редактирование гена TTR мыши после трансфекции клеток Neuro2A за счет мPНК Cas9 и sgPНК и trPНК с парами G-C, не встречающимися в исходных последовательностях, измеренное с помощью NGS.

На фиг. 4 показано процентное редактирование гена TTR мыши после трансфекции клеток Neuro2A за счет модифицированных sgPНК и trPНК совместно с мPНК Cas9, измеренное с помощью NGS. После значения приведены стандартные отклонения.

На фиг. 5 показано процентное редактирование гена TTR мыши после трансфекции клеток Neuro2A модифицированными sgPНК совместно с мPНК Cas9, измеренное с помощью NGS.

На фиг. 6 показано процентное редактирование гена TTR мыши после трансфекции клеток Neuro2A модифицированными sgPНК и немодифицированной trPНК (TR000002) совместно с мPНК Cas9, измеренное с помощью NGS. Звездочкой обозначена двойная направляющая PНК, которая по техническим

причинам не демонстрировала активности в данном эксперименте. Эту двойную направляющую РНК повторно протестировали в эксперименте, представленном на фиг. 9, в котором она демонстрировала редактирующую активность.

На фиг. 7 показано процентное редактирование гена TTR мыши после трансфекции клеток Neuro2A немодифицированной sgРНК (CR000686) и модифицированными trРНК совместно с мРНК Cas9, измеренное с помощью NGS.

На фиг. 8 показано процентное редактирование гена TTR мыши после трансфекции клеток Neuro2A мРНК Cas9 и sgРНК и trРНК с парами G-C или несовпадениями G-U, не встречающимися в исходных последовательностях, измеренное с помощью NGS.

На фиг. 9 показано процентное редактирование гена TTR мыши после трансфекции клеток Neuro2A модифицированными sgРНК и модифицированными trРНК совместно с мРНК Cas9, измеренное с помощью NGS. После значения приведены стандартные отклонения.

На фиг. 10 показано процентное редактирование гена TTR мыши после трансфекции клеток Neuro2A модифицированными sgРНК совместно с мРНК Cas9, измеренное с помощью NGS.

На фиг. 11 показано процентное редактирование гена фактора VII (FVII) мыши после трансфекции клеток Neuro2A модифицированными sgРНК совместно с мРНК Cas9, измеренное с помощью NGS.

На фиг. 12A и 12B показано процентное редактирование гена TTR мыши (фиг. 12A) или FVII (фиг. 12B) после трансфекции клеток Neuro2A модифицированными sgРНК и немодифицированной trРНК совместно с мРНК Cas9, измеренное с помощью NGS.

На фиг. 13A и 13B показано процентное редактирование гена TTR мыши (фиг. 13A) или FVII (фиг. 13B) после трансфекции клеток Neuro2A модифицированными trРНК и немодифицированной sgРНК совместно с мРНК Cas9, измеренное с помощью NGS.

На фиг. 14A, 14B, 14C и 14D показаны уровни интерферона-альфа (ИФН-альфа, 14A), интерлейкина-6 (ИЛ-6, 14B), белка 1 хемотаксиса моноцитов (MCP-1, 14C) и фактора некроза опухолей-альфа (ФНО-альфа, 14D) в сыворотке после введения *in vivo* LNP, содержащих мРНК Cas9 и sgРНК.

На фиг. 15A, 15B и 15C показаны результаты, полученные *in vivo* после введения LNP, содержащих мРНК Cas9 и sgРНК. На фиг. 15A показан процент общего редактирования в печени. На фиг. 15B показан уровень TTR в сыворотке. На фиг. 15C показано среднее значение и стандартное отклонение для результатов, показанных на фиг. 15A. На фиг. 15D приведена сводная информация по модификациям sgРНК G000209 (SEQ ID NO: 228). На фиг. 15E приведена сводная информация по модификациям sgРНК G000267 (SEQ ID NO: 234). На фиг. 15D и 15E нуклеотиды, выделенные полужирным шрифтом, являются 2'-O-Me модифицированными.

На фиг. 16A, 16B, 16C и 16D показаны уровни интерферона-альфа (ИФН-альфа, 16A), фактора некроза опухолей-альфа (ФНО-альфа, 16B), интерлейкина-6 (ИЛ-6, 16C) и белка 1 хемотаксиса моноцитов (MCP-1, 16D) в сыворотке после введения *in vivo* LNP, содержащих мРНК Cas9 и sgРНК.

На фиг. 17A, 17B, 17C и 17D показаны результаты, полученные *in vivo* после введения LNP, содержащих мРНК Cas9 и sgРНК. На фиг. 17A показан процент общего редактирования в печени. На фиг. 17B показано среднее значение и стандартное отклонение для результатов, показанных на фиг. 17A. На фиг. 17C показан уровень TTR в сыворотке. На фиг. 17D показано среднее значение и стандартное отклонение для результатов, показанных на фиг. 17B.

На фиг. 18A, 18B и 18C показаны результаты, полученные *in vivo* после введения LNP, содержащих мРНК Cas9 и sgРНК. На фиг. 18A показан процент общего редактирования в печени. На фиг. 18B приведены сводные данные по редактированию в печени. На фиг. 18C показан уровень TTR в сыворотке. МРК=миллиграммов на килограмм; BLOD=ниже уровня обнаружения.

На фиг. 19A, 19B, 19C и 19D показаны уровни интерферона-альфа (ИФН-альфа, 19A), белка-1 хемотаксиса моноцитов (MCP-1, 19B), интерлейкина-6 (ИЛ-6, 19C) и фактора некроза опухолей-альфа (ФНО-альфа, 19D) в сыворотке после введения *in vivo* LNP, содержащих мРНК Cas9 и sgРНК.

На фиг. 20A и 20B показано редактирование локуса FVII (фиг. 20A) и локуса TTR (фиг. 20B) в печени после введения *in vivo* LNP, содержащих мРНК Cas9 и sgРНК.

На фиг. 21A, 21B и 21C показаны схемы аннотированной sgРНК (SEQ ID NO: 341) (фиг. 21A), неаннотированной dgРНК CR000686 (SEQ ID NO: 1) и TR000002 (SEQ ID NO: 188) (фиг. 21B) и аннотированной dgРНК CR000686 (SEQ ID NO: 1) и TR000002 (SEQ ID NO: 188) (фиг. 21C).

На фиг. 22A, 22B и 22C показаны результаты, полученные *in vivo* после введения LNP, содержащих мРНК Cas9 и sgРНК. На фиг. 22A показан процент общего редактирования локуса TTR в печени. На фиг. 22B приведены сводные данные по редактированию в печени. На фиг. 22C показан уровень TTR в сыворотке.

На фиг. 23A, 23B и 23C показаны результаты, полученные *in vivo* после введения LNP, содержащих мРНК Cas9 и sgРНК. На фиг. 23A показан процент общего редактирования локуса TTR в печени. На фиг. 23B приведены сводные данные по редактированию в печени. На фиг. 23C показан уровень TTR в сыворотке.

На фиг. 24A, 24B и 24C показано редактирование в первичных гепатоцитах мыши после введения LNP, содержащих мРНК Cas9 и sgРНК. На фиг. 24A показан процент общего редактирования локуса

TTR в печени. На фиг. 24B показаны нормированные преобразования процента редактирования в зависимости от дозы иРНК, использованные для расчета EC50. На фиг. 24C показаны значения EC50 для протестированных LNP.

#### Подробное описание изобретения

В настоящем документе предложены модифицированные направляющие РНК, в том числе двойные и одиночные направляющие РНК для применения в способах редактирования генов. Модифицированные направляющие РНК более стабильны и демонстрируют эффективность *in vitro* и *in vivo*, сопоставимую с их немодифицированными аналогами. Последовательности сконструированных и протестированных направляющих РНК показаны в табл. 4.

Таблица 4

SEQ ID NO	Название	Альтернативное название	Описание	Последовательность
	crРНК			
1	CR000686		немодифицированная	CCAGUCCAGCGAGGCCAAAGGGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUUG
2	CR003393	CR686-1	верхний стебель	CCAGUCCAGCGAGGCCAAAGGGUUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
3	CR003394	CR686-2	частичная модификация верхний стебель	CCAGUCCAGCGAGGCCAAAGGGUUUUAGAGCUAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
4	CR003395	CR686-3	частичная модификация верхний стебель	CCAGUCCAGCGAGGCCAAAGGGUUUUAGAGCUAUGCmUmGmUmUmUmUmUmG
5	CR003396	CR686-4	частичная модификация верхний стебель	CCAGUCCAGCGAGGCCAAAGGGUUUUAGAGCUAUGCUGUmUmUmUmUmG
6	CR003397	CR686-5	нижний стебель	CCAGUCCAGCGAGGCCAAAGGmGmUmUmUmUmAGAGCUAUGCUGUUUUUG
7	CR003398	CR686-6	прогулка по нижнему стеблю	CCAGUCCAGCGAGGCCAAAGGmUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUUG
8	CR003399	CR686-7	прогулка по нижнему стеблю	CCAGUCCAGCGAGGCCAAAGGGmUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUUG
9	CR003400	CR686-8	прогулка по нижнему стеблю	CCAGUCCAGCGAGGCCAAAGGGUmUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUUG
10	CR003401	CR686-9	прогулка по нижнему стеблю	CCAGUCCAGCGAGGCCAAAGGGUUmUUAGAGCUAUGCUGUUUUUG
11	CR003402	CR686-10	прогулка по нижнему стеблю	CCAGUCCAGCGAGGCCAAAGGGUUUmUAGAGCUAUGCUGUUUUUG
12	CR003403	CR686-11	прогулка по нижнему стеблю	CCAGUCCAGCGAGGCCAAAGGGUUUmAGAGCUAUGCUGUUUUUG
13	CR003404	CR686-12	частичная модификация нижний стебель	CCAGUCCAGCGAGGCCAAAGGGmUmUmUmUAGAGCUAUGCUGUUUUUG
14	CR003405	CR686-13	частичная модификация нижний стебель	CCAGUCCAGCGAGGCCAAAGGGUmUmUAGAGCUAUGCUGUUUUUG
15	CR003406	CR686-GC1	нижний стебель GC	CCAGUCCAGCGAGGCCAAAGGGCGCAGAGCUAUGCUGUUUUUG
16	CR003407	CR686-GC3	верхний стебель GC	CCAGUCCAGCGAGGCCAAAGGGUUUUAGAGCUAUGCUGGCGCG
17	CR003408	CR686-GC5	нижний стебель и верхний стебель GC	CCAGUCCAGCGAGGCCAAAGGGCGCAGAGCUAUGCUGGCGCG
18	CR003409	CR686 все OMe		mCmCmAmGmUmCmAmGmCmGmAmGmCmAmAmAmGmGmUmUmUmUmAmGmAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
19	CR003393 - только модифицированные		верхний стебель	GUUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmUmG

20	CR003394 только модифицирован ные	-		частичный верхний	GUUUUAGAGCUAmUmGmCmUmGmUmUmUmG
21	CR003395 только модифицирован ные	-		частичная модификация верхний стебель	GUUUUAGAGCUAUGCmUmGmUmUmUmG
22	CR003396 только модифицирован ные	-		частичный верхний	GUUUUAGAGCUAUGCUGUmUmUmG
23	CR003397 только модифицирован ные	-		нижний	mGmUmUmUmUmAGAGCUAUGCUGUUUUG
24	CR003398 только модифицирован ные	-		прогулка по нижнему стержню	mGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG
25	CR003399 только модифицирован ные	-		прогулка по нижнему стеблю	GmUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG
26	CR003400 только модифицирован ные	-		прогулка по нижнему стеблю	GUmUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG
27	CR003401 только модифицирован ные	-		прогулка по нижнему стеблю	GUUmUUAGAGCUAUGCUGUUUUG
28	CR003402 только модифицирован ные	-		прогулка по нижнему стеблю	GUUUUmAGAGCUAUGCUGUUUUG
29	CR003403 только модифицирован ные	-		прогулка по нижнему стеблю	GUUUUmAGAGCUAUGCUGUUUUG
30	CR003404 только модифицирован ные	-		частичная модификация нижний стебель	GmUmUmUmUAGAGCUAUGCUGUUUUG
31	CR003405 только	-		частичная модификация	GUmUmUUAGAGCUAUGCUGUUUUG



49	CR003738	CR686-GC7	С прогулка по нижнему стеблю	по CCAGUCCAGCGAGGCCAAAGGGCUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmG
50	CR003739	CR686-GC8	С прогулка по нижнему стеблю	по CCAGUCCAGCGAGGCCAAAGGGCUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmG
51	CR003740	CR686-GC9	С прогулка по нижнему стеблю	по CCAGUCCAGCGAGGCCAAAGGGUUCUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmG
52	CR003741	CR686-GC10	С прогулка по нижнему стеблю	по CCAGUCCAGCGAGGCCAAAGGGUUCAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmG
53	CR003721- только модифицирован ные	CR686-14-только модифицированные	верхний стебель и нижний стебель	mGUUUUmUmAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
54	CR003722- только модифицирован ные	CR686-15-только модифицированные	нижний стебель комбинированная модификация	mGUUUUmUmAGAGCUAUGCUGUUUG
55	CR003723- только модифицирован ные	CR686-16-только модифицированные	верхний стебель, нижний стебель комбинированная модификация	mGUUUUmUmAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
56	CR003724- только модифицирован ные	CR686-17-только модифицированные	нижний стебель комбинированная модификация	mGUUUUmUmAGAGCUAUGCUGUUUG
57	CR003725- только модифицирован ные	CR686-18-только модифицированные	верхний стебель, нижний стебель комбинированная модификация	mGUUUUmUmAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
58	CR003726- только модифицирован ные	CR686-19-только модифицированные	прогулка по связке	GUUUUAmGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
59	CR003727- только модифицирован ные	CR686-20-только модифицированные	прогулка по связке	GUUUUAGmAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
60	CR003728- только модифицирован ные	CR686-21-только модифицированные	прогулка по связке	GUUUUAFGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
61	CR003729- только модифицирован ные	CR686-22-только модифицированные	прогулка по связке	GUUUUAGfAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
62	CR003730- только	CR686-23-только модифицированные	2' F прогулка по нижнему стеблю	GfUUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG

	модифицированные			
63	CR003731- только модифицированные	CR686-24-только модифицированные	2'F прогулка по нижнему стеблю	GUUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
64	CR003732- только модифицированные	CR686-25-только модифицированные	2'F прогулка по нижнему стеблю	GUUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
65	CR003733- только модифицированные	CR686-26-только модифицированные	2'F прогулка по нижнему стеблю	GUUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
66	CR003734- только модифицированные	CR686-27-только модифицированные	2'F нижний стебель комбинированная модификация	fGfUfUfUfUfAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
67	CR003735- только модифицированные	CR686-28-только модифицированные	нижний стебель альтернативная модификация	fGmUfUmUfUmAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
68	CR003736- только модифицированные	CR686-29-только модифицированные	нижний стебель	mGfUmUfUmUfAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
	только модифицированные	модифицированные	альтернативная модификация	
69	CR003737- только модифицированные	CR686-GC6-только модифицированные	нижний стебель GC	GUCUCAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
70	CR003738- только модифицированные	CR686-GC7-только модифицированные	C прогулка по нижнему стеблю	GCUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
71	CR003739- только модифицированные	CR686-GC8-только модифицированные	C прогулка по нижнему стеблю	GUCUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
72	CR003740- только модифицированные	CR686-GC9-только модифицированные	C прогулка по нижнему стеблю	GUUCUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
73	CR003741- только модифицированные	CR686-GC10- только модифицированные	C прогулка по нижнему стеблю	GUUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG

74	CR000705		немодифицированная	UUACAGCCACGUCUACAGCAGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG
75	CR004188	CR705-1	верхний стебель	UUACAGCCACGUCUACAGCAGUUUUAGAmGmUmAmUmGmUmGmUmUmUmUmG
76	CR004189	CR705-2	частичная модификация верхний стебель	UUACAGCCACGUCUACAGCAGUUUUAGAGCUAmUmGmUmGmUmUmUmUmUmG
77	CR004190	CR705-3	частичная модификация верхний стебель	UUACAGCCACGUCUACAGCAGUUUUAGAGCUAUGCmUmGmUmUmUmUmG
78	CR004191	CR705-4	частичная модификация верхний стебель	UUACAGCCACGUCUACAGCAGUUUUAGAGCUAUGCUGUmUmUmUmG
79	CR004192	CR705-5	нижний стебель	UUACAGCCACGUCUACAGCAGmUmUmUmUmUmUmUmUmUmUmUmUmUmG
80	CR004193	CR705-6	прогулка по нижнему стеблю	UUACAGCCACGUCUACAGCAGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG
81	CR004194	CR705-7	прогулка по нижнему стеблю	UUACAGCCACGUCUACAGCAGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG
82	CR004195	CR705-8	прогулка по нижнему стеблю	UUACAGCCACGUCUACAGCAGUmUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG
83	CR004196	CR705-9	прогулка по нижнему стеблю	UUACAGCCACGUCUACAGCAGUmUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG
84	CR004197	CR705-10	прогулка по нижнему стеблю	UUACAGCCACGUCUACAGCAGUUUmUAGAGCUAUGCUGUUUUG
85	CR004198	CR705-11	прогулка по нижнему стеблю	UUACAGCCACGUCUACAGCAGUUUmUAGAGCUAUGCUGUUUUG
86	CR004199	CR705-14	верхний стебель и нижний стебель	UUACAGCCACGUCUACAGCAGUUUmUAGAmGmUmAmUmGmUmGmUmUmUmUmG
87	CR004200	CR705-15	нижний стебель комбинированная модификация	UUACAGCCACGUCUACAGCAGUUUmUAGAGCUAUGCUGUUUUG
88	CR004201	CR705-16	верхний стебель, нижний стебель комбинированная модификация	UUACAGCCACGUCUACAGCAGUUUmUAGAmGmUmAmUmGmUmGmUmUmUmUmG
89	CR004202	CR705-17	нижний стебель комбинированная модификация	UUACAGCCACGUCUACAGCAGUUUmUAGAGCUAUGCUGUUUUG
90	CR004203	CR705-18	верхний стебель, нижний стебель комбинированная модификация	UUACAGCCACGUCUACAGCAGUUUUAGAmGmUmAmUmGmUmGmUmUmUmUmG
91	CR004204	CR705-19	прогулка по связке	UUACAGCCACGUCUACAGCAGUUUUAGAmGmUmAmUmGmUmGmUmUmUmUmG
92	CR004205	CR705-20	прогулка по связке	UUACAGCCACGUCUACAGCAGUUUUAGAmGmUmAmUmGmUmGmUmUmUmUmG

93	CR004206	CR705-21	прогулка связке	по	UUACAGCCACGUCUACAGCAGUUUUAFGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmGmUmUmG
94	CR004207	CR705-22	прогулка связке	по	UUACAGCCACGUCUACAGCAGUUUAGfAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmGmUmUmG
95	CR004208	CR705-23	2'F прогулка нижнему стеблю	по	UUACAGCCACGUCUACAGCAGfUUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmGmUmUmG
96	CR004209	CR705-24	2'F прогулка нижнему стеблю	по	UUACAGCCACGUCUACAGCAGUfUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmGmUmUmG
97	CR004210	CR705-25	2'F прогулка нижнему стеблю	по	UUACAGCCACGUCUACAGCAGUUFUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmGmUmUmG
98	CR004211	CR705-26	2'F прогулка нижнему стеблю	по	UUACAGCCACGUCUACAGCAGUUUFUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmGmUmUmG
99	CR004212	CR705-27	2'F нижний стебель комбинированная модификация		UUACAGCCACGUCUACAGCAfGfUfUfUfUfAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
100	CR004213	CR705-28	нижний стебель альтернативная модификация		UUACAGCCACGUCUACAGCAfGmUfUmUfUmAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
101	CR004214	CR705-29	нижний стебель альтернативная модификация		UUACAGCCACGUCUACAGCAmGfUmUfUmUfUfAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
102	CR004215	CR705-GC1	нижний стебель	GC	UUACAGCCACGUCUACAGCAGGCGCAGAGCUAUGCUGUUUUUG
103	CR004216	CR705-GC3	верхний стебель	GC	UUACAGCCACGUCUACAGCAGUUUUAGAGCUAUGCUGGCGCG
104	CR004188- только модифицирован ные	CR705-1-только модифицированные	верхний стебель		GUUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmUmG
105	CR004189- только модифицирован ные	CR705-2-только модифицированные	частичная модификация верхний стебель		GUUUUAGAGCUAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmUmG
106	CR004190- только модифицирован ные	CR705-3-только модифицированные	частичная модификация верхний стебель		GUUUUAGAGCUAUGCmUmGmUmUmUmUmUmG
107	CR004191- только модифицирован ные	CR705-4-только модифицированные	частичная модификация верхний стебель		GUUUUAGAGCUAUGCUGUmUmUmUmG
108	CR004192- только модифицирован ные	CR705-5-только модифицированные	нижний стебель		mGmUmUmUmUmAGAGCUAUGCUGUUUUUG
109	CR004193-	CR705-6-только	прогулка	по	mGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUUG

	только модифицирован ные	модифицированные	нижнему стеблю	
110	CR004194- только модифицирован ные	CR705-7-только модифицированные	прогулка по нижнему стеблю	GmUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG
111	CR004195- только модифицирован ные-только модифицирован ные	CR705-8-только модифицированные	прогулка по нижнему стеблю	GUmUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG
112	CR004196- только модифицирован ные	CR705-9-только модифицированные	прогулка по нижнему стеблю	GUUmUUAGAGCUAUGCUGUUUUG
113	CR004197- только модифицирован ные	CR705-10-только модифицированные	прогулка по нижнему стеблю	GUUUUmUAGAGCUAUGCUGUUUUG
114	CR004198- только	CR705-11-только модифицированные	прогулка по нижнему стеблю	GUUUUmAGAGCUAUGCUGUUUUG
	модифицирован ные			
115	CR004199- только модифицирован ные	CR705-14-только модифицированные	верхний стебель и нижний стебель	mGUUUUmAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmUmUmUmG
116	CR004200- только модифицирован ные	CR705-15-только модифицированные	нижний стебель комбинированная модификация	mGUUUUmAGAGCUAUGCUGUUUUG
117	CR004201- только модифицирован ные	CR705-16-только модифицированные	верхний стебель, нижний стебель комбинированная модификация	mGUUUUmAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmUmUmUmG
118	CR004202- только модифицирован ные	CR705-17-только модифицированные	нижний стебель комбинированная модификация	mGUUUUmAGAGCUAUGCUGUUUUG
119	CR004203- только модифицирован ные	CR705-18-только модифицированные	верхний стебель, нижний стебель комбинированная модификация	mGUUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmUmUmUmG
120	CR004204-	CR705-19-только	прогулка по	GUUUUmAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmUmUmUmG

	только модифицированные	модифицированные	связке	
121	CR004205- только модифицированные	CR705-20-только модифицированные	прогулка по связке	GUUUUAGmAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
122	CR004206- только модифицированные	CR705-21-только модифицированные	прогулка по связке	GAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
123	CR004207- только модифицированные	CR705-22-только модифицированные	прогулка по связке	GfAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
124	CR004208- только модифицированные	CR705-23-только модифицированные	2' F прогулка по нижнему стеблю	GfUUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
125	CR004209- только модифицированные	CR705-24-только модифицированные	2' F прогулка по нижнему стеблю	GUUUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
126	CR004210- только модифицированные	CR705-25-только модифицированные	2' F прогулка по нижнему стеблю	GUUfUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
127	CR004211- только модифицированные	CR705-26-только модифицированные	2' F прогулка по нижнему стеблю	GUUUfUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
128	CR004212- только модифицированные	CR705-27-только модифицированные	2' F нижний стебель комбинированная модификация	fGfUfUfUfUfAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
129	CR004213- только модифицированные	CR705-28-только модифицированные	нижний стебель альтернативная модификация	fGmUfUmUfUmAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
130	CR004214- только модифицированные	CR705-29-только модифицированные	нижний стебель альтернативная модификация	mGfUmUfUmUfAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
131	CR000657		немодифицированная	CAGGGCCUCUUGAAGAUCUCCGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUU
132	CR004218	CR657-1	верхний стебель	CAGGGCCUCUUGAAGAUCUCCGUUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUm

				UmUmG
133	CR004219	CR657-2	частичная модификация верхний стебель	CAGGGCCUCUUGAAGAUCUCCGUUUUAGAGCUAmUmGmUmUmUmUmUmUmG
134	CR004220	CR657-3	частичная модификация верхний стебель	CAGGGCCUCUUGAAGAUCUCCGUUUUAGAGCUAUGCmUmGmUmUmUmUmG
135	CR004221	CR657-4	частичная модификация верхний стебель	CAGGGCCUCUUGAAGAUCUCCGUUUUAGAGCUAUGCUGUmUmUmUmG
136	CR004222	CR657-5	нижний стебель	CAGGGCCUCUUGAAGAUCUCCmGmUmUmUmUmUmAGAGCUAUGCUGUUUUG
137	CR004223	CR657-6	прогулка по нижнему стеблю	CAGGGCCUCUUGAAGAUCUCCmGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG
138	CR004224	CR657-7	прогулка по нижнему стеблю	CAGGGCCUCUUGAAGAUCUCCmUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG
139	CR004225	CR657-8	прогулка по нижнему стеблю	CAGGGCCUCUUGAAGAUCUCCGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG
140	CR004226	CR657-9	прогулка по нижнему стеблю	CAGGGCCUCUUGAAGAUCUCCGUUmUAGAGCUAUGCUGUUUUG
141	CR004227	CR657-10	прогулка по нижнему стеблю	CAGGGCCUCUUGAAGAUCUCCGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG
142	CR004228	CR657-11	прогулка по нижнему стеблю	CAGGGCCUCUUGAAGAUCUCCGUUUUmAGAGCUAUGCUGUUUUG
143	CR004229	CR657-14	верхний стебель и нижний стебель	CAGGGCCUCUUGAAGAUCUCCmGUUUUmAGAmGmUmAmUmGmUmUmUmUmUmG
144	CR004230	CR657-15	нижний стебель комбинированная модификация	CAGGGCCUCUUGAAGAUCUCCmGUUUUmAGAGCUAUGCUGUUUUG
145	CR004231	CR657-16	верхний стебель, нижний стебель комбинированная модификация	CAGGGCCUCUUGAAGAUCUCCmGUUUUmAGAmGmUmAmUmGmUmUmUmUmUmUmUmUmG
146	CR004232	CR657-17	нижний стебель комбинированная модификация	CAGGGCCUCUUGAAGAUCUCCmGUUUUmAGAGCUAUGCUGUUUUG
147	CR004233	CR657-18	верхний стебель, нижний стебель комбинированная модификация	CAGGGCCUCUUGAAGAUCUCCmGUUUUAGAmGmUmAmUmGmUmUmUmUmUmUmUmUmG
148	CR004234	CR657-19	прогулка по связке	CAGGGCCUCUUGAAGAUCUCCGUUUUmGAmGmUmAmUmGmUmUmUmUmUmUmUmUmG
149	CR004235	CR657-20	прогулка по связке	CAGGGCCUCUUGAAGAUCUCCGUUUUAGmAmGmUmAmUmGmUmUmUmUmUmUmUmUmG
150	CR004236	CR657-21	прогулка по связке	CAGGGCCUCUUGAAGAUCUCCGUUUUAGAmGmUmAmUmGmUmUmUmUmUmUmUmUmG
151	CR004237	CR657-22	прогулка по	CAGGGCCUCUUGAAGAUCUCCGUUUUAGfAmGmUmAmUmGmUmUmUmUmUmUmUmUmG



167	CR004224- только модифицирован ные	CR657-7-только модифицированные	прогулка по нижнему стеблю	GmUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG
168	CR004225- только модифицирован ные	CR657-8-только модифицированные	прогулка по нижнему стеблю	GUmUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG
169	CR004226- только модифицирован ные	CR657-9-только модифицированные	прогулка по нижнему стеблю	GUUmUUAGAGCUAUGCUGUUUUG
170	CR004227- только модифицирован ные	CR657-10-только модифицированные	прогулка по нижнему стеблю	GUUUUmAGAGCUAUGCUGUUUUG
171	CR004228- только модифицирован ные	CR657-11-только модифицированные	прогулка по нижнему стеблю	GUUUUmAGAGCUAUGCUGUUUUG
172	CR004229- только модифицирован ные	CR657-14-только модифицированные	верхний стебель и нижний стебель	mGUUUUmAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
173	CR004230- только модифицирован ные	CR657-15-только модифицированные	нижний стебель комбинированная модификация	mGUUUUmAGAGCUAUGCUGUUUUG
174	CR004231- только модифицирован ные	CR657-16-только модифицированные	верхний стебель, нижний стебель комбинированная модификация	mGUUUUmAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
175	CR004232- только модифицирован ные	CR657-17-только модифицированные	нижний стебель комбинированная модификация	mGUUUUmAGAGCUAUGCUGUUUUG
176	CR004233- только модифицирован ные	CR657-18-только модифицированные	верхний стебель, нижний стебель комбинированная модификация	mGUUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
177	CR004234- только модифицирован ные	CR657-19-только модифицированные	прогулка по связке	GUUUUAmGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
178	CR004235- только	CR657-20-только модифицированные	прогулка по связке	GUUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG

	модифицированные			
179	CR004236- только модифицированные	CR657-21-только модифицированные	прогулка по связке	GUUUUAfGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
180	CR004237- только модифицированные	CR657-22-только модифицированные	прогулка по связке	GUUUUAGfAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
181	CR004238- только модифицированные	CR657-23-только модифицированные	2'F прогулка по нижнему стеблю	GfUUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
182	CR004239- только модифицированные	CR657-24-только модифицированные	2'F прогулка по нижнему стеблю	GUfUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
183	CR004240- только модифицированные	CR657-25-только модифицированные	2'F прогулка по нижнему стеблю	GUUfUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
184	CR004241- только модифицированные	CR657-26-только модифицированные	2'F прогулка по нижнему стеблю	GUUUfUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
185	CR004242- только модифицированные	CR657-27-только модифицированные	2'F нижний стебель комбинированная модификация	fGfUfUfUfUfAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
186	CR004243- только модифицированные	CR657-28-только модифицированные	нижний стебель альтернативная модификация	fGmUfUmUfUmAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
187	CR004244- только модифицированные	CR657-29-только модифицированные	нижний стебель альтернативная модификация	mGfUmUfUmUfAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
	<b>trPHK</b>			
188	TR000002		немодифицированная	AACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU
189	TR000110	TR2-v2-1	укороченный хвост	AACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU
190	TR000111	TR2-v2-2	верхний стебель, шпильки	mAmAmCmAmGmCmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAm AmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmUm mGmCmUmUmUmU

191	TR000112	TR2-v2-3	только верхний стебель	mAmAmCmAmGmCmAmUmAmGmCAAGUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU
192	TR000113	TR2-v2-4	шпилька 1	AACAGCAUAGCAAGUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmUmUmUmU
193	TR000114	TR2-v2-5	шпилька 2	AACAGCAUAGCAAGUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmUmUmUmU
194	TR000115	TR2-v2-6	верхний стебель, шпилька 2	mAmAmCmAmGmCmAmUmAmGmCAAGUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmUmUmUmU
195	TR000116	TR2-v2-7	обе шпильки	AACAGCAUAGCAAGUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmUmUmUmU
196	TR000117	TR2-v2-8	прогулка по нижнему стеблю	AACAGCAUAGCAAGUmUmAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU
197	TR000118	TR2-v2-9	прогулка по нижнему стеблю	AACAGCAUAGCAAGUUmAmAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU
198	TR000119	TR2-v2-10	прогулка по нижнему стеблю	AACAGCAUAGCAAGUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU
199	TR000120	TR2-v2-11	частичная модификация связка	AACAGCAUAGCAAGUAAAAUAAGGCUAGUCCGmUmUmUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU
200	TR000121	TR2-v2-12	частичная модификация связка	AACAGCAUAGCAAGUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUmAmCmAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU
201	TR000122	TR2-GC1	нижний стебель GC	AACAGCAUAGCAAGUUGCGCUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU
202	TR000123	TR2-GC3	верхний стебель GC	GCCAGCAUAGCAAGUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU
203	TR000124	TR2-GC5	нижний стебель и верхний стебель GC	GCCAGCAUAGCAAGUUGCGCUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU
204	TR000125	TR2 все OMe		mAmAmCmAmGmCmAmUmAmGmCmAmAmGmUmUmAmAmAmAmUmAmAmGmCmUmAmGmUmCmCmGmUmAmUmCmAmAmAmAmUmUmUmUmUmUmUmU
205	TR000126	TR2-v2-13	нижний стебель	mAmAmCmAmGmCmAmUmAmGmCAAGUmUmAmAmAmUmAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmUmUmUmU
206	TR000127	TR2-v2-14	нижний стебель	mAmAmCmAmGmCmAmUmAmGmCAAGUmUmAAmAmUmAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmGmAmGmUmCmGmUmGmCmUmUmUmU
207	TR000128	TR2-v2-15	нижний стебель	mAmAmCmAmGmCmAmUmAmGmCAAGUmUmAfAmAfAmUmAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmGmAmGmUmCmGmUmGmCmUmUmUmU
208	TR000129	TR2-v2-16	нижний стебель альтернативная модификация	mAmAmCmAmGmCmAmUmAmGmCAAGUmUfAmAfAmfUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmGmAmGmUmCmGmUmGmCmUmUmUmU
209	TR000130	TR2-v2-17	нижний стебель	mAmAmCmAmGmCmAmUmAmGmCAAGUfUmAfAmAfAmUmAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmGmAmGmUmCmGmUmGmCmUmUmUmU

			альтернативная модификация	UAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmCmAmCmCmAmGmUmCmGmUmCmAmAmCmUmUmUmU
210	TR000131	TR2-v2-18	прогулка связке	по nAmAmCmAmGmCmAmUmAmGmCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCGUAUUmCmAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmCmAmCmCmAmGmUmCmGmGmUmGmCmUmUmUmU
211	TR000132	TR2-v2-19	прогулка связке	по mAmAmCmAmGmCmAmUmAmGmCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCGUAUUmCmAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmCmAmCmCmAmGmUmCmGmGmUmGmCmUmUmUmU
212	TR000133	TR2-v2-20	прогулка связке	по nAmAmCmAmGmCmAmUmAmGmCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCGUAUUmCmAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmCmAmCmCmAmGmUmCmGmGmUmGmCmUmUmUmU
213	TR000134	TR2-v2-21	прогулка связке	по mAmAmCmAmGmCmAmUmAmGmCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCGUAUUmCmAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmCmAmCmCmAmGmUmCmGmGmUmGmCmUmUmUmU
214	TR000135	TR2-v2-22	прогулка связке	по nAmAmCmAmGmCmAmUmAmGmCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCGUAUUmCmAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmCmAmCmCmAmGmUmCmGmGmUmGmCmUmUmUmU
215	TR000136	TR2-v2-23	прогулка связке	по mAmAmCmAmGmCmAmUmAmGmCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCGUAUUmCmAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmCmAmCmCmAmGmUmCmGmGmUmGmCmUmUmUmU
216	TR000137	TR2-v2-24	прогулка связке	по nAmAmCmAmGmCmAmUmAmGmCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCGUAUUmCmAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmCmAmCmCmAmGmUmCmGmGmUmGmCmUmUmUmU
217	TR000138	TR2-v2-25	прогулка связке	по mAmAmCmAmGmCmAmUmAmGmCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCGUAUUmCmAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmCmAmCmCmAmGmUmCmGmGmUmGmCmUmUmUmU
218	TR000139	TR2-v2-26	прогулка связке	по mAmAmCmAmGmCmAmUmAmGmCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCGUAUUmCmAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmCmAmCmCmAmGmUmCmGmGmUmGmCmUmUmUmU
219	TR000140	TR2-v2-27	прогулка связке	по mAmAmCmAmGmCmAmUmAmGmCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCGUAUUmCmAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmCmAmCmCmAmGmUmCmGmGmUmGmCmUmUmUmU
220	TR000141	TR2-v2-28	прогулка связке	по mAmAmCmAmGmCmAmUmAmGmCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCGUAUUmCmAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmCmAmCmCmAmGmUmCmGmGmUmGmCmUmUmUmU
221	TR000142	TR2-v2-29	прогулка расширению	по mAmAmCmAmGmCmAmUmAmGmCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCGUAUUmCmAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmCmAmCmCmAmGmUmCmGmGmUmGmCmUmUmUmU
222	TR000143	TR2-v2-30	прогулка расширению	по mAmAmCmAmGmCmAmUmAmGmCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCGUAUUmCmAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmCmAmCmCmAmGmUmCmGmGmUmGmCmUmUmUmU
223	TR000144	TR2-GC6	нижний стебель	GC AACAGCAUAGCAAGUUAAGAUAAAGGCUAGUCGUAUUAACAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCUUUU
224	TR000145	TR2-GC7	нижнему стеблю	GC AACAGCAUAGCAAGUUAAGAUAAAGGCUAGUCGUAUUAACAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCUUUU
225	TR000146	TR2-GC8	GC прогулка	по AACAGCAUAGCAAGUUAAGAUAAAGGCUAGUCGUAUUAACAACUUGAAAAAGU

			нижнему стеблю	GGCACCGAGUCGGUGCUUUU
226	TR000147	TR2-GC9	ГС прогулка по нижнему стеблю	AACAGCAUAGCAAGUUAGAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCUUUU
227	TR000148	TR2-GC10	ГС прогулка по нижнему стеблю	AACAGCAUAGCAAGUUAGAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGU GGCACCGAGUCGGUGCUUUU
	<b>sgPHK</b>			
228	G000209			mC*mC*mA*GUCCAGCGAGGCAAGGGUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUU AAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC mU*mU*mU*U
229	G000262	G209-1	шпилька 2	mC*mC*mA*GUCCAGCGAGGCAAGGGUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUU AAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUmGmGmCmAmCmGmA mGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
230	G000263	G209-2	шпильки	mC*mC*mA*GUCCAGCGAGGCAAGGGUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUU AAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmUmGmG mCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
231	G000264	G209-3	петля из четырех нуклеотидов	mC*mC*mA*GUCCAGCGAGGCAAGGGUUUAGAGCUAmGmAmAmAUAGCA AGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCG GUGCmU*mU*mU*U
232	G000265	G209-4	верхний стебель	mC*mC*mA*GUCCAGCGAGGCAAGGGUUUAGAmGmCmUmAGAAAmUmAm GmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGA GUCGGUGCmU*mU*mU*U
233	G000266	G209-5	верхний стебель и петля	mC*mC*mA*GUCCAGCGAGGCAAGGGUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCA CCGAGUCGGUGCmU*mU*mU*U
234	G000267	G209-6	верхний стебель, петля, шпильки	mC*mC*mA*GUCCAGCGAGGCAAGGGUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm UmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmA mAmAmGmUmGmGmCmAmCmGmAmGmUmCmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
235	G000262- только модифицирован ные	G209-1-только модифицированные	шпилька 2	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACU UGAAAAAGUmGmGmCmAmCmCmGmAmUmCmGmUmGmCmU*mU*mU*mU U
236	G000263- только модифицирован ные	G209-2-только модифицированные	шпильки	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAAm CmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmGmAmGmUmCmGmUmG mCmU*mU*mU*mU
237	G000264- только модифицирован ные	G209-3-только модифицированные	петля из четырех нуклеотидов	GUUUUAGAGCUAmGmAmAmAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUC AACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCmU*mU*mU*U
238	G000265- только модифицирован ные	G209-4-только модифицированные	верхний стебель	GUUUUAGAmGmCmUmAGAAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCmU*mU*mU*U
239	G000266- только модифицирован	G209-5-только модифицированные	верхний стебель и петля	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGU CCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCmU*mU*mU*U





			шпилька	fAmAfGmUfGmGfCmAfCmCfGmAfGmUfCmGfGmUfGmCfU*mU*fU*mU
265	G000331- только модифицирован ные	G211-7-только модифицированные	нижний стебель cr	mGUUUUmAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAUUAAAGGCUA GUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmCmAmCmCmAm mGmUmCmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
266	G000332- только модифицирован ные	G211-8-только модифицированные	нижний стебель cr	fGfUfUfUfUfAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAUUAAAG GCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmCmAmCmC mGmAmGmUmCmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
267	G000333- только модифицирован ные	G211-9-только модифицированные	нижний стебель cr	mGfUfUfUfUfAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAUUAAAG GCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmCmAmCmC mGmAmGmUmCmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
268	G000334- только модифицирован ные	G211-10-только модифицированные	нижний стебель tr	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUmAAAmUmAAAGGC UAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
269	G000335- только модифицирован ные	G211-11-только модифицированные	нижний стебель tr	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUmAfAfAmUmAAAG GCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmCmAmCmC mGmAmGmUmCmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
270	G000336- только	G211-12-только модифицированные	нижний стебель tr	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUfUmAfAmAfAmAAAG GCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmCmAmCmC mGmAmGmUmCmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
	модифицирован ные			mGmAmGmUmCmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
271	G000337- только модифицирован ные	G211-13-только модифицированные	нижний стебель все	mGUUUUmAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUmAAAmUmAAAG GCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmCmAmCmC mGmAmGmUmCmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
272	G000338- только модифицирован ные	G211-14-только модифицированные	нижний стебель все	mGUUUUmAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUmAfAfAmUmAAAG AGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmCmAmC mCmGmAmGmUmCmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
273	G000339- только модифицирован ные	G211-15-только модифицированные	нижний стебель все	mGUUUUmAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUfUmAfAmAfAmAAAG AGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmCmAmC mCmGmAmGmUmCmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
274	G000340- только модифицирован ные	G211-16-только модифицированные	нижний стебель все	fGfUfUfUfUfAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUmAAAmAm UAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmCmAm mCmCmGmAmGmUmCmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
275	G000341- только модифицирован ные	G211-17-только модифицированные	нижний стебель все	fGfUfUfUfUfAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUmAfAfAm AmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmCmC mAmCmCmGmAmGmUmCmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
276	G000342- только	G211-18-только	нижний стебель	fGfUfUfUfUfAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUfUmAfAmAf

	только модифицированные	модифицированные	все	AmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
277	G000343- только модифицированные	G211-19-только модифицированные	Расширение cr	GUUUUAmGmAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
278	G000344- только модифицированные	G211-20-только модифицированные	Расширение tr	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCmAmAmGmUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
279	G000345- только модифицированные	G211-21-только модифицированные	связка	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUfAfUfCfAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
280	G000346- только модифицированные	G211-22-только модифицированные	связка	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAmUmCmAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
281	G000347- только модифицированные	G211-23-только модифицированные	нижний стебель все	fGfUfUfUfUfUfAmGmAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCmAmAmGmUmUmAfAfAmAmUAAGGCUAGUCCGUUAmUmCmAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
282	G000348- только модифицированные	G211-24-только модифицированные	без PS	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmUmGmCmUmUmUmU
283	G000349- только модифицированные	G211-25-только модифицированные	2 Ome PS	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmUmGmCmUmU*mU*mU
284	G000350- только модифицированные	G211-26-только модифицированные	2 'F шпилька	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmCmAmCmCmGmAmGfUfCfGfGfUfGfCfU*fU*fU*fU
285	G000351- только модифицированные	G211-27-только модифицированные	Альтернативная модификация шпилька	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAfAmCfUmUfGmAfAmAfAmAfGmUfGmGfCmAfCmCfGmAfGmUfCmGfGmUfGmCfU*mU*fU*fU
286	G000208		концевая модификация	mC*mA*mG*GGCUCUUGAAGAUCUCCGUUUUAGAGCUAGAAAUAAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGGACCAGUCGGUGCmU*mU*mU*fU
287	G000373		мод. 6	mC*mA*mG*GGCUCUUGAAGAUCUCCGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
288	G000352	G208-7	нижний стебель cr	mC*mA*mG*GGCUCUUGAAGAUCUCCGUUUUmAGAmGmCmUmAmGmAmAm



				CmU*mU*mU*mU
300	G000364	G208-19	Расширение cr	mC*mA*mG*GGCUCUUGAAGAUCUCCGUUUUAGmAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
301	G000365	G208-20	Расширение tr	mC*mA*mG*GGCUCUUGAAGAUCUCCGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCmAmAmGmUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
302	G000366	G208-21	связка	mC*mA*mG*GGCUCUUGAAGAUCUCCGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUfAfUfCfAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
303	G000367	G208-22	связка	mC*mA*mG*GGCUCUUGAAGAUCUCCGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAmUmCmAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
304	G000368	G208-23	нижний стебель все	mC*mA*mG*GGCUCUUGAAGAUCUCCfGfUfUfUfUfAmGmAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCmAmAmGmUmUmAfAfAmAmUAAGGCUAGUCCGUUAmUmCmAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmAmAmGmUmCmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
305	G000369	G208-24	без PS	mCmAmGGCUCUUGAAGAUCUCCGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
				AmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmUmGmCmUmUmUmU
306	G000370	G208-25	2 OMe PS	mC*mAG*GGCUCUUGAAGAUCUCCGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
307	G000371	G208-26	2' F шпилька	mC*mA*mG*GGCUCUUGAAGAUCUCCGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGfUfCfGfGfUfGfCfU*fU*fU*mU
308	G000372	G208-27	Альтернативная модификация шпилька	mC*mA*mG*GGCUCUUGAAGAUCUCCGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAfAmCfUmUfGmAfAmAfAmAfGmUfGmGfCmAfCmCfGmAfGmUfCmGfGmUfGmCfU*mU*fU*mU
309	G000352- только модифицирован ные	G208-7-только модифицированные	нижний стебель cr	mGUUUUmAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
310	G000353- только модифицирован ные	G208-8-только модифицированные	нижний стебель cr	fGfUfUfUfUfUfAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
311	G000354- только модифицирован ные	G208-9-только модифицированные	нижний стебель cr	mGfUfUfUfUfUmAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
312	G000355-	G208-10-только	нижний стебель tr	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUmUmAAAmAmUAAGGCU

	только модифицирован ные	модифицированные		UAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmUmGmCmU *mU *mU *mU
313	G000356- только модифицирован ные	G208-11-только модифицированные	нижний стебель tr	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUmUmAfAfAmAmUAAG GCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmC mGmAmGmUmCmGmUmGmCmU *mU *mU *mU
314	G000357- только модифицирован ные	G208-12-только модифицированные	нижний стебель tr	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUfUmAfAmAfAmUAAG GCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmC mGmAmGmUmCmGmUmGmCmU *mU *mU *mU
315	G000358- только модифицирован ные	G208-13-только модифицированные	нижний стебель все	mGUUUUmAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUmUmAAAmAmUAAG GCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmC mGmAmGmUmCmGmUmGmCmU *mU *mU *mU
316	G000359- только модифицирован ные	G208-14-только модифицированные	нижний стебель все	mGUUUUmAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUmUmAfAfAmAmUA AGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmC mCmGmAmGmUmCmGmUmGmCmU *mU *mU *mU
317	G000360- только модифицирован ные	G208-15-только модифицированные	нижний стебель все	mGUUUUmAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUfUmAfAmAfAmUA AGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmC mCmGmAmGmUmCmGmUmGmCmU *mU *mU *mU
318	G000361- только модифицирован ные	G208-16-только модифицированные	нижний стебель все	fGfUfUfUfUfAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUmUmAAAmAm UAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmA mCmCmGmAmGmUmCmGmUmGmCmU *mU *mU *mU
319	G000362- только модифицирован ные	G208-17-только модифицированные	нижний стебель все	fGfUfUfUfUfAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUmUmAfAfAm AmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmC mAmCmCmGmAmGmUmCmGmUmGmCmU *mU *mU *mU
320	G000363- только модифицирован ные	G208-18-только модифицированные	нижний стебель все	fGfUfUfUfUfAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUfUmAfAmAf AmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmC mAmCmCmGmAmGmUmCmGmUmGmCmU *mU *mU *mU
321	G000364- только модифицирован ные	G208-19-только модифицированные	Расширение cr	GUUUUAmGmAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUAAAUAAGGCUA GUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmA mGmUmCmGmUmGmCmU *mU *mU *mU
322	G000365- только модифицирован ные	G208-20-только модифицированные	Расширение tr	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCmAmAmGmUAAAUAAGGCUA UAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmUmGmCmU *mU *mU *mU
323	G000366- только модифицирован ные	G208-21-только модифицированные	связка	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUAAAUAAGGCUAGU CCGUUfAfUfCfAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmUmGmCmU *mU *mU *mU

	ные			
324	G000367- только модифицирован ные	G208-22-только модифицированные	связка	GUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAUUAAAGGCUAGU CCGUUAUmUmCmAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmCmAmCmGm AmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
325	G000368- только модифицирован ные	G208-23-только модифицированные	нижний стебель все	fGfUfUfUfUfAmGmAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCmAmAmGmUmUm AfAfAmAmUAAGGCUAGUCCGUUAUmUmCmAmAmCmUmUmGmAmAmAmAm GmUmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
326	G000369- только модифицирован ные	G208-24-только модифицированные	без PS	GUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAUUAAAGGCUAGU CCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmCmAmCmCmGmAmG mUmCmGmGmUmGmCmUmUmU
327	G000370- только модифицирован ные	G208-25-только модифицированные	2 OMe PS	GUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAUUAAAGGCUAGU CCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmCmAmCmCmGmAmG mUmCmGmGmUmGmCmUmU*mU*mU
328	G000371- только модифицирован ные	G208-26-только модифицированные	2' F шпилька	GUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAUUAAAGGCUAGU CCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmCmAmCmCmGmAmG fUfCfGfGfUfGfCfU*fU*fU*fU
329	G000372- только модифицирован ные	G208-27-только модифицированные	Альтернативная модификация	GUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAUUAAAGGCUAGU CCGUUAUCAfAmCfUmUfGmAfAmAfAmAfGmUfGmGfCmAfCmCfGmAfG
			шпилька	mUfCmGfGmUfGmCfU*mU*fU*mU
330	G000269		концевая модификация	mC*mC*mC*AUACUCCUACAGCACCAGUUUAGAGCUAGAAUAAGCAAGUU AAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCAGUCGGUGC mU*mU*mU*U
331	G000283		мод. 6	mC*mC*mC*AUACUCCUACAGCACCAGUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAm UmAmGmCAAGUUAUUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmA mAmAmGmUmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
332	G000285		немод.	CCCAUACUCCUACAGCACCAGUUUAGAGCUAGAAUAAGCAAGUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCAGUCGGGCUUUU
342	G000537	G211-33	5'-конец 3xOMePS	mU*mU*mA*CAGCCAGUCUACAGCAGUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmA mUmAmGmCAAGUUAUUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmA mAmAmAmGmUmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmUmGmCmUmUmUmU
343	G000538	G211-34	3'-конец 3xOMePS	mUmUmACAGCCAGUCUACAGCAGUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUm AmGmCAAGUUAUUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAm AmAmGmUmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
344	G000539	G211-35	5xOMePS	mU*mU*mA*mC*mA*GCCACGUCUACAGCAGUUUAGAmGmCmUmAmGmAmA mAmAmUmAmGmCAAGUUAUUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmG mAmAmAmAmAmUmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmUmG*mC*mU *mU*mU*mU
345	G000541	G211-37	3xOMePS+2PS	mU*mU*mA*C*A*GCCACGUCUACAGCAGUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAm AmUmAmGmCAAGUUAUUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmA mAmAmAmGmUmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmUmGmC*mC*mU*mU*m

				U*mU
346	G000542	G211-38	3xOMePS+7PS	mU*mU*mA*C*A*G*C*C*A*C*GUCUACAGCAGUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmGmAmGmU*mC*mG*mG*mU*mG*mC*mU*mU*mU*mU
347	G000543	G211-39	инв. удаленными основаниями	(invd)UUACAGCCACGUCUACAGCAGUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmUmUmU(инв.)
348	G000544	G211-40	инв. удаленными основаниями+3xOMePS	(инв.)mU*mU*mA*CAGCCACGUCUACAGCAGUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU(инв.)
349	G000564	G211-42	3xMOE-PS	moeU*moeU*moeA*CAGCCACGUCUACAGCAGUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmo eU*moeU*moeU*mU
350	G000545	G211-43	US петля PS	mU*mU*mA*CAGCCACGUCUACAGCAGUUUAGAmGmCmUmA*mG*mA*mA*mA*mUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
351	G000546	G211-44	H1 петля PS	mU*mU*mA*CAGCCACGUCUACAGCAGUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmU*mG*mA*mA*mA*mAmAmGmUmGmGmCmAmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
352	G000547	G211-45	H2 петля PS	mU*mU*mA*CAGCCACGUCUACAGCAGUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmG*mA*mG*mU*mCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
353	G000548	G211-46	все петли PS	mU*mU*mA*CAGCCACGUCUACAGCAGUUUAGAmGmCmUmA*mG*mA*mA*mA*mUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmU*mG*mA*mA*mA*mAmAmGmUmGmGmCmAmCmG*mA*mG*mU*mCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
354			Мод. 6 модификациями, не показанными в списке последовательностей)	(c mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU N=любой нуклеотид
355			Только невариабельная область	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU
356			Паттерн мод. 6; только невариабельная область	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmGmAmAmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
357			Вариабельная и невариабельная область	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU
358			Мод. 6 модификациями, показанными в списке последовательностей)	(c mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU N=любой нуклеотид

Термины "направляющая РНК" и "gРНК" используются в настоящем документе на равных основаниях и совместно относятся к sgРНК, trРНК (также известной как trasРНК) или crРНК (также известной как CRISPR РНК). crРНК и trРНК могут быть ассоциированы на одной молекуле РНК (одиночная направляющая РНК [sgРНК]) или в двух отдельных молекулах РНК (двойная направляющая РНК [dgРНК]). Термины "направляющая РНК" или "gРНК" относятся к каждому из этих типов.

Последовательности trРНК могут быть природными или последовательность trРНК может содер-

жать модификации или изменения по сравнению с природными последовательностями.

"Эффективность редактирования" или "процентная доля редактирования" или "процент редактирования" в настоящем документе является общим количеством считанных фрагментов последовательности с инсерциями или делециями нуклеотидов в исследуемой области-мишени по отношению к общему количеству считанных фрагментов последовательности после расщепления РНП Cas.

"Шпилька" в настоящем документе обозначает петлю нуклеиновой кислоты, образованную при складывании нуклеотидной цепи и образовании пар оснований с другим фрагментом той же цепи. Шпилька может образовывать структуру, содержащую петлю или U-образную структуру.

В некоторых вариантах воплощения шпилька может содержать петлю РНК. Шпильки могут быть образованы двумя комплементарными последовательностями одиночной молекулы нуклеиновой кислоты, связывающимися друг с другом при складывании или сморщивании молекулы.

В некоторых вариантах воплощения шпильки образуют структуры типа "стебель" или "стебель-петля".

В настоящем документе термин "области" обозначает консервативные группы нуклеиновых кислот. Области также можно называть "модулями" или "доменами". Области gРНК могут выполнять конкретные функции, например, при определении специфичности эндонуклеазной активности РНП, например, как описано в статье Briner AE et al., *Molecular Cell* 56:333-339 (2014). Области gРНК описаны в табл. 1-3.

В настоящем документе термин "рибонуклеопротеин" (РНП) или "РНП-комплекс" описывает gРНК, например, вместе с нуклеазой, например, белком Cas. В некоторых вариантах воплощения РНП содержит Cas9 и gРНК.

Термин "стебель-петля" в настоящем документе описывает вторичную структуру нуклеотидов, образующих "стебель" из пар оснований, заканчивающийся петлей из неспаренных нуклеотидов. Стебель может быть образован при по меньшей мере частичной комплементарности двух областей одной и той же цепи нуклеиновой кислоты в последовательности при чтении в противоположных направлениях. Термин "петля" в настоящем документе описывает область из нуклеотидов, не образующих пар оснований (т.е. не комплементарных друг другу), которые могут находиться над стеблем. Термин "тетра-петля" описывает петлю из 4 нуклеотидов. В настоящем документе верхний стебель sgРНК может содержать петлю из 4 нуклеотидов.

В некоторых вариантах воплощения, включающих dgРНК, область "стебля" в настоящем документе означает вторичную структуру из нуклеотидов, образующих область спаренных оснований между некоторыми областями sgРНК и trРНК (например, области нижнего и верхнего стебля каждой РНК). Область "стебля" в dgРНК в данной области техники также можно называть областью "флагштока".

"Лечение" в настоящем документе охватывает любое введение или нанесение терапевтического средства для лечения заболевания у субъекта и включает ингибирование заболевания, остановку его развития, облегчения одного или более из симптомов заболевания, излечение заболевания или профилактику повторного возникновения одного или более из симптомов заболевания.

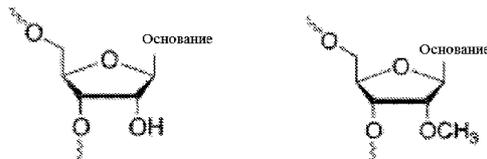
#### 1. Типы модификаций.

##### 2'-О-метил-модификации.

Считается, что модифицированные углеводы управляют сморщиванием углеводных колец нуклеотидов - физическим свойством, влияющим на сродство связывания олигонуклеотидов с комплементарными цепями, образование двуцепочечных структур и взаимодействие с нуклеазами. Поэтому заместитель углеводных колец может влиять на подтверждение и сморщивание этих углеводов. Например, 2'-О-метил (2'-О-Ме) модификации могут повышать сродство связывания и нуклеазную стабильность олигонуклеотидов, хотя, как показано в примерах, влияние любой модификации в данном положении олигонуклеотида следует определять эмпирически.

Термины "mA," "mC," "mU" или "mG" можно использовать для обозначения нуклеотида, модифицированного 2'-О-Ме.

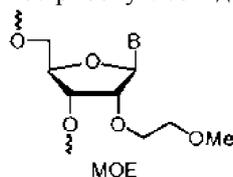
Модификацию рибонуклеотида как 2'-О-метилрибонуклеотида можно обозначить следующим образом



РНК 2'-О-Ме.

2'-О-(2-метоксиэтил) модификации.

В некоторых вариантах воплощения модификация может быть 2'-O-(2-метоксиэтил) (2'-O-мое). Модификацию рибонуклеотида как а 2'-O-мое-рибонуклеотида можно обозначить следующим образом



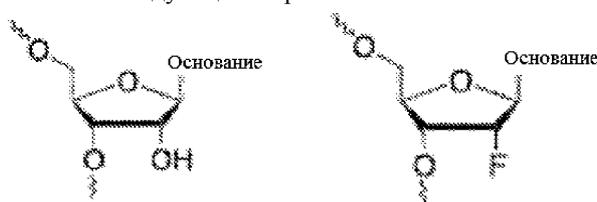
Термины "моеА," "моеС," "моеU" или "моеG" можно использовать для обозначения нуклеотида, модифицированного 2'-O-мое.

2'-фтор-модификации.

Показано, что еще одна химическая модификация, влияющая на углеводные кольца нуклеотидов, является заместителем галогена. Например, 2'-фтор- (2'-F) заместитель в углеводных кольцах нуклеотида может увеличить сродство связывания и нуклеазную стабильность олигонуклеотида.

В настоящей заявке термины "fA," "fC," "fU" или "fG" можно использовать для обозначения нуклеотида, замещенного 2'-F.

Замену 2'-F можно обозначить следующим образом



РНК 2'F-РНК.

Натуральная структура РНК 2'F замещение.

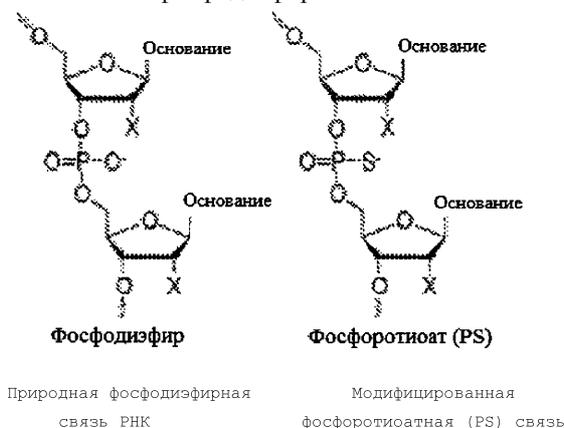
Фосфоротиоатные модификации.

Фосфоротиоатная (PS) связь относится к связи, где немостиковый атом кислорода в составе фосфата, образующего фосфодиэфирную связь, например, в связях между основаниями нуклеотидов, замещен атомом серы. При использовании фосфоротиоатов для образования олигонуклеотидов модифицированные олигонуклеотиды также можно называть S-олигонуклеотидами.

Знак "\*" можно использовать для обозначения PS-модификации. Например, термины A\*, C\*, U\* или G\* можно использовать для обозначения нуклеотида, соединенного со следующим (например, 3'-) нуклеотидом PS-связью.

В настоящей заявке термины "mA\*," "mC\*," "mU\*" или "mG\*" можно использовать для обозначения нуклеотида, замещенного 2'-O-Me и соединенного со следующим (например, 3'-) нуклеотидом PS-связью. Аналогичным образом, термины "fA\*," "fC\*," "fU\*" или "fG\*" можно использовать для обозначения нуклеотида, замещенного 2'-F и соединенного со следующим (например, 3'-) нуклеотидом PS-связью. Эквиваленты PS-соединения или связи входят в варианты воплощения, описанные в настоящем документе.

На приведенной ниже диаграмме показаны S-замены немостиковых атомов кислорода в составе фосфата с образованием PS-связи вместо фосфодиэфирной связи



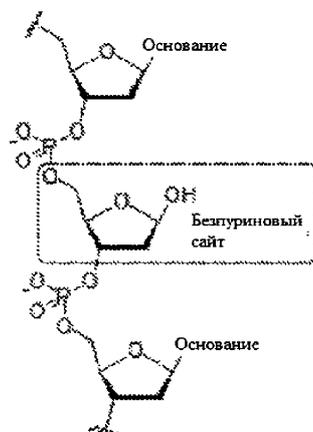
G-C-заместители.

В некоторых вариантах воплощения gРНК модифицированы заместителями в составе последовательности, не содержащими химических модификаций. В некоторых вариантах воплощения сконструированы модифицированные gРНК с G-C парами (например, в областях нижнего и/или верхнего стебля), не встречающиеся в исходной последовательности gРНК. В некоторых вариантах воплощения сконструированы модифицированные gРНК с G-U-несовпадениями ("прецессией GU" или образованием несо-

ответствующих пар), не встречающиеся в исходной последовательности gРНК.

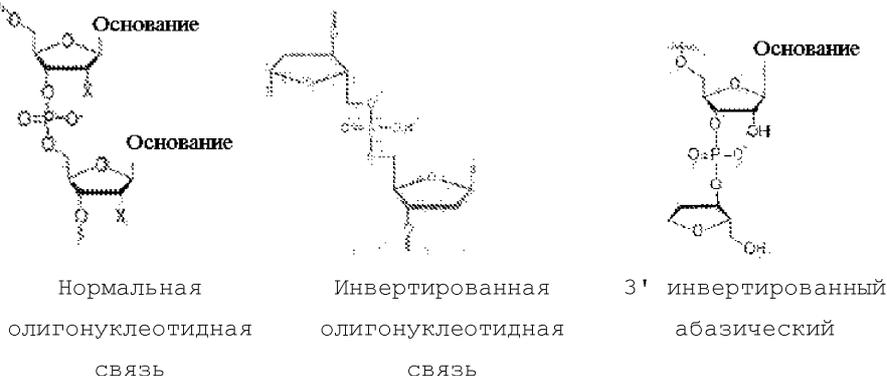
Инвертированные модификации без оснований.

Нуклеотиды без оснований относятся к нуклеотидам, не содержащим азотистых оснований. Ниже на фигуре изображен олигонуклеотид с сайтом без основания (также называемым апуриновым сайтом), не содержащим азотистого основания.



Инвертированные основания относятся к основаниям со связями, инвертированными по сравнению с обычной 5'-3'-связью (т.е. 5'-5'-связью или 3'-3'-связью).

Например.



Нуклеотид без основания можно присоединить инвертированной связью. Например, нуклеотид без основания можно присоединить к концевому 5'-нуклеотиду 5'-5'-связью, либо нуклеотид без основания можно присоединить к концевому 3'-нуклеотиду 3'-3'-связью. Инвертированный нуклеотид без основания в положении концевом 5'- или 3'-нуклеотида также можно называть инвертированным концевым экпом без основания. В настоящей заявке термин "инв." означает инвертированную нуклеотидную связь без оснований.

Вышеприведенные модификации и их эквиваленты входят в рамки вариантов воплощения, описанных в настоящем документе.

## 2. Композиции направляющих РНК.

Настоящее изобретение включает композиции, содержащие направляющую РНК. В некоторых вариантах воплощения направляющая РНК содержит trРНК. В некоторых вариантах воплощения направляющая РНК содержит сгРНК. В некоторых вариантах воплощения направляющая РНК содержит сгРНК и trРНК. В некоторых вариантах воплощения направляющая РНК содержит сгРНК и trРНК в одной молекуле РНК, например, sgРНК. В некоторых вариантах воплощения направляющая РНК содержит сгРНК и trРНК в двух молекулах РНК, например, dgРНК. В dgРНК две молекулы РНК могут связываться посредством образования пар оснований.

В некоторых вариантах воплощения направляющая РНК содержит 5'-концевую область. В некоторых вариантах воплощения направляющая РНК не содержит 5'-концевой области. В некоторых вариантах воплощения 5'-концевая область содержит "спейсерную" область, описанную в статье Briner AE et al., Molecular Cell 56:333-339 (2014) для sgРНК (однако в настоящем документе применимую ко всем направляющим РНК). В некоторых вариантах воплощения 5'-концевая область содержит 5'-концевую модификацию. 5'-концевая область со спейсерной областью или без нее может связываться с сгРНК, trРНК, sgРНК и/или dgРНК. Спейсерную область в настоящем и других документах иногда называют "направляющей областью", "направляющим доменом" или "доменом, обеспечивающим адресное воздействие". Термин "последовательность-мишень" в настоящем документе относится к нуклеотидной последовательности, по отношению к которой направляющая область/домен обеспечивает адресное воздействие нуклеазного гидролиза. В некоторых вариантах воплощения направляющая область/домен может обес-

печивать специфичность белка *spuCas9* по отношению к последовательности-мишени молекулы нуклеиновой кислоты-мишени за счет нуклеотидов, присутствующих в спейсерной области. В некоторых вариантах воплощения направляющая РНК не содержит спейсерной области.

В некоторых вариантах воплощения направляющая РНК, описанная в настоящем документе, содержит или состоит из любой из последовательностей, показанных в табл. 4. В то же время следует учитывать, что если последовательность содержит направляющую/спейсерную область, композиция может содержать или не содержать эту область. Кроме того, настоящее изобретение включает направляющие РНК, содержащие модификации любой из последовательностей, показанных в табл. 4 и приведенных в настоящем документе под идентификаторами SEQ ID No. Т.е. нуклеотиды могут быть такими же или другими, но показанный шаблон модификации может быть таким же, как шаблон модификации направляющей последовательности, приведенной в табл. 4, или аналогичным ему. Шаблон модификации включает относительное положение и идентификатор модификации gРНК или области gРНК (например, 5'-концевой области, области нижнего стебля, области расширения, области верхнего стебля, области связки, области шпильки 1, области шпильки 2, 3'-концевой области). В некоторых вариантах воплощения шаблон модификации содержит по меньшей мере 50, 55, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 и 99% модификаций любой из последовательностей, показанных в столбце последовательностей табл. 4, или в одной или более из областей последовательности. В некоторых вариантах воплощения шаблон модификации по меньшей мере на 50, 55, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 и 99% идентичен шаблону модификации любой из последовательностей, показанных в столбце последовательностей табл. 4. В некоторых вариантах воплощения шаблон модификации по меньшей мере на 50, 55, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 и 99% идентичен в одной или более из областей последовательности, представленной в табл. 4, например, 5'-концевой области, области нижнего стебля, области расширения, области верхнего стебля, области связки, области шпильки 1, области шпильки 2 и/или 3'-концевой области. Например, некоторые варианты воплощения включают направляющую РНК, в которой шаблон модификации по меньшей мере на 50, 55, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 и 99% идентичен шаблону модификации последовательности в 5'-концевой области. Некоторые варианты воплощения включают направляющую РНК, в которой шаблон модификации по меньшей мере на 50, 55, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 и 99% идентичен шаблону в области нижнего стебля. Некоторые варианты воплощения включают направляющую РНК, в которой шаблон модификации по меньшей мере на 50, 55, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 и 99% идентичен шаблону в области расширения. Некоторые варианты воплощения включают направляющую РНК, в которой шаблон модификации по меньшей мере на 50, 55, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 и 99% идентичен шаблону в области верхнего стебля. Некоторые варианты воплощения включают направляющую РНК, в которой шаблон модификации по меньшей мере на 50, 55, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 и 99% идентичен шаблону в области связки. Некоторые варианты воплощения включают направляющую РНК, в которой шаблон модификации по меньшей мере на 50, 55, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 и 99% идентичен шаблону в области шпильки 1. Некоторые варианты воплощения включают направляющую РНК, в которой шаблон модификации по меньшей мере на 50, 55, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 и 99% идентичен шаблону в области шпильки 2. Некоторые варианты воплощения включают направляющую РНК, причем шаблон модификации по меньшей мере на 50, 55, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 и 99% идентичен шаблону в 3'-концевой области. В некоторых вариантах воплощения шаблон модификации отличается от шаблона модификации последовательности, приведенной в табл. 4, или области (например, 5'-концевой области, нижнего стебля, расширения, верхнего стебля, связки, шпильки 1, шпильки 2, 3'-концевой области) такой последовательности на 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6 нуклеотидов. В некоторых вариантах воплощения gРНК содержит модификации, отличающиеся от модификаций последовательности, приведенной в табл. 4, на 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6 нуклеотидов. В некоторых вариантах воплощения gРНК содержит модификации, отличающиеся от модификаций области (например, 5'-концевой области, нижнего стебля, расширения, верхнего стебля, связки, шпильки 1, шпильки 2, 3'-концевой области) последовательности, приведенной в табл. 4, на 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6 нуклеотидов.

В некоторых вариантах воплощения gРНК содержит 2'-О-метил (2'-О-Ме) модифицированный нуклеотид. В некоторых вариантах воплощения gРНК содержит 2'-О-(2-метоксиэтил) (2'-О-томе) модифицированный нуклеотид. В некоторых вариантах воплощения gРНК содержит 2'-фтор (2'-F) модифицированный нуклеотид. В некоторых вариантах воплощения gРНК содержит фосфоротиоатную (PS) связь между нуклеотидами.

В некоторых вариантах воплощения gРНК содержит а 5'-концевую модификацию, 3'-концевую модификацию или 5'- и 3'-концевые модификации. В некоторых вариантах воплощения 5'-концевая модификация содержит фосфоротиоатную (PS) связь между нуклеотидами. В некоторых вариантах воплощения 5'-концевая модификация содержит а 2'-О-метил (2'-О-Ме), 2'-О-(2-метоксиэтил) (2'-О-томе) и/или 2'-фтор (2'-F) модифицированный нуклеотид. В некоторых вариантах воплощения 5'-концевая модификация содержит по меньшей мере одну фосфоротиоатную (PS) связь и один или более из 2'-О-метил (2'-О-Ме), 2'-О-(2-метоксиэтил) (2'-О-томе) и/или 2'-фтор (2'-F) модифицированных нуклеотидов. Концевая модификация может включать фосфоротиоатную (PS), 2'-О-метил (2'-О-Ме), 2'-О-(2-метоксиэтил) (2'-О-томе) и/или 2'-фтор (2'-F) модификацию. Эквивалентные концевые модификации также входят в вариан-

ты воплощения, описанные в настоящем документе. В некоторых вариантах воплощения gРНК содержит концевую модификацию в комбинации с модификацией одной или более областей gРНК.

Композиции sgРНК.

В некоторых вариантах воплощения композиции и способы согласно настоящему изобретению включают gРНК, содержащую crРНК и trРНК, обеспечивающие специфичность нуклеазы, например, Cas9, по отношению к последовательности ДНК-мишени. В некоторых вариантах воплощения gРНК, описанные в настоящем документе, могут быть ассоциированы на одной молекуле РНК (одиночной направляющей РНК или sgРНК).

В некоторых вариантах воплощения настоящее изобретение включает sgРНК, содержащую или состоящую из любой из последовательностей, описанных в SEQ ID No: 228-332.

В некоторых вариантах воплощения предложена sgРНК, содержащая любую одну из модифицированных последовательностей SEQ ID Nos: 235-240, 265-285 и 309-329. Некоторые варианты воплощения включают sgРНК, содержащую любую одну из модифицированных последовательностей SEQ ID No: 235-240, 265-285 и 309-329, причем sgРНК дополнительно содержит 5'-"спейсерную" последовательность ("направляющую последовательность"), комплементарную последовательности-мишени и обеспечивающую специфичность Cas9 по отношению к гидролизуемой мишени. В некоторых случаях настоящее изобретение включает sgРНК, содержащую нуклеиновые кислоты, характеризующиеся по меньшей мере 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 85, 80, 75 или 70% идентичностью по отношению к нуклеиновым кислотам любой из SEQ ID No: 235-240, 265-285 и 309-329, в которой шаблон модификации идентичен шаблону модификации, представленному в эталонном идентификаторе последовательности.

#### 1. Домены sgРНК.

В статье Briner AE et al., Molecular Cell 56:333-339 (2 014) описаны функциональные домены sgРНК, в настоящем документе называемые "доменами", включая "спейсерный" домен, отвечающий за адресное воздействие, домены "нижний стебель", "расширение", "верхний стебель" (который может содержать петлю из 4 нуклеотидов), "связка" и "шпилька 1" и "шпилька 2". См. Briner et al. на странице 334, фиг. 1А.

В табл. 1 и на фиг. 21А представлено описание доменов sgРНК, используемое в настоящем документе. В табл. 1, "n" между областями является переменной количества 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 n равно 0. В некоторых вариантах воплощения n равно 1.

Таблица 1  
Области sgРНК (линейный вид, от 5' к 3')

	LS1-6		B1-2		US1-12		B3-6	
5'-концевая область	Нижний стебель	n	Расширение	n	Верхний стебель	n	Расширение	n
LS7-12		N1-18		H1-1 по H1-12		H2-1 по H2-12		
Нижний стебель	n	Связь	n	Шпилька 1	n	Шпилька 2		3'-концевая область

5'-концевая область.

В некоторых вариантах воплощения sgРНК содержит нуклеотиды в 5'-концевой области, показанные в табл. 1. В некоторых вариантах воплощения 5'-концевая область sgРНК содержит спейсерную или направляющую область, обеспечивающую специфичность белка Cas по отношению к нуклеотидной последовательности-мишени. В некоторых вариантах воплощения 5'-концевая область не содержит спейсерной или направляющей области. В некоторых вариантах воплощения 5'-концевая область содержит спейсер и дополнительные нуклеотиды, не обеспечивающие специфичности белка Cas по отношению к нуклеотидной области-мишени.

В некоторых вариантах воплощения направляющая область содержит первые 1-10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов на 5'-конце sgРНК. В некоторых вариантах воплощения направляющая область содержит 20 нуклеотидов. В некоторых вариантах воплощения направляющая область может содержать 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 или более нуклеотидов. В некоторых вариантах воплощения направляющая область может содержать 17 нуклеотидов. В некоторых вариантах воплощения направляющая область может содержать 18 нуклеотидов. В некоторых вариантах воплощения направляющая область может содержать 19 нуклеотидов.

В некоторых вариантах воплощения выбор направляющей области определяется последовательностями-мишенями в пределах генов, подлежащих редактированию. Например, в некоторых вариантах воплощения sgРНК содержит направляющую область, комплементарную последовательностям-мишеням исследуемого гена.

В некоторых вариантах воплощения последовательность-мишень исследуемого гена может быть комплементарна направляющей области sgРНК. В некоторых вариантах воплощения степень комплементарности или идентичности между направляющей областью sgРНК и соответствующей последовательностью-мишенью исследуемого гена может составлять приблизительно 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85,

90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100%. В некоторых вариантах воплощения направляющая область sgРНК и область-мишень исследуемого гена могут быть на 100% комплементарны или идентичны. В других вариантах воплощения направляющая область sgРНК и последовательность-мишень исследуемого гена могут содержать по меньшей мере одно несовпадение. Например, направляющая область sgРНК и последовательность-мишень исследуемого гена могут содержать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 несовпадений, причем общая длина последовательности-мишени составляет по меньшей мере приблизительно 17, 18, 19, 20 или более пар оснований. В других вариантах воплощения направляющая область sgРНК и последовательность-мишень исследуемого гена могут содержать 1-6 несовпадений, причем направляющая последовательность содержит по меньшей мере 17, 18, 19, 20 или более нуклеотидов. В других вариантах воплощения направляющая область sgРНК и последовательность-мишень исследуемого гена могут содержать 1, 2, 3, 4, 5 или 6 несовпадений, причем направляющая последовательность содержит приблизительно 20 нуклеотидов. 5'-концевая область может содержать нуклеотиды, не считающиеся направляющими областями (например, не обеспечивающие специфичности белка cas9 по отношению к нуклеиновой кислоте-мишени).

#### Нижний стебель.

В некоторых вариантах воплощения sgРНК содержит область нижнего стебля (LS), которая при просмотре в линейном виде разделена областями расширения и верхнего стебля. См. табл. 1.

В некоторых вариантах воплощения области нижнего стебля содержат 1-12 нуклеотидов, например, в одном варианте воплощения область нижнего стебля содержит LS1-LS12. В некоторых вариантах воплощения область нижнего стебля содержит меньшее количество нуклеотидов, чем показано в табл. 1 и на фиг. 21А. В некоторых вариантах воплощения область нижнего стебля содержит большее количество нуклеотидов, чем показано в табл. 1 и на фиг. 21А. Если область нижнего стебля содержит меньшее или большее количество нуклеотидов, чем показано на схеме в табл. 1 и на фиг. 21А, шаблон модификации, как очевидно для специалиста, должен соблюдаться.

В некоторых вариантах воплощения область нижнего стебля содержит нуклеотидные последовательности, комплементарные друг другу при просмотре в противоположных направлениях. В некоторых вариантах воплощения комплементарность нуклеотидной последовательности нижнего стебля приводит к образованию вторичной структуры типа "стебель" в sgРНК (например, области могут образовывать пары оснований друг с другом). В некоторых вариантах воплощения области нижнего стебля могут быть не полностью комплементарны друг другу при просмотре в противоположных направлениях.

#### Расширение.

В некоторых вариантах воплощения sgРНК содержит область расширения, содержащую шесть нуклеотидов - В1-В6. При просмотре в линейном виде область расширения разделена на две области. См. табл. 1. В некоторых вариантах воплощения область расширения содержит шесть нуклеотидов, причем после первых двух нуклеотидов располагается область верхнего стебля, после которой располагаются последние четыре нуклеотида расширения. В некоторых вариантах воплощения область расширения содержит меньшее количество нуклеотидов, чем показано в табл. 1 и на фиг. 21А. В некоторых вариантах воплощения область расширения содержит большее количество нуклеотидов, чем показано в табл. 1 и на фиг. 21А. Если область расширения содержит меньшее или большее количество нуклеотидов, чем показано на схеме в табл. 1 и на фиг. 21А, шаблон модификации, как очевидно для специалиста, должен соблюдаться.

В некоторых вариантах воплощения наличие расширения приводит к направленной связи между модулями верхнего и нижнего стебля в sgРНК.

#### Верхний стебель.

В некоторых вариантах воплощения sgРНК содержит область верхнего стебля, содержащую 12 нуклеотидов. В некоторых вариантах воплощения область верхнего стебля содержит последовательность петли. В некоторых случаях указанная петля является петлей, состоящей из четырех нуклеотидов.

В некоторых вариантах воплощения область верхнего стебля содержит меньшее количество нуклеотидов, чем показано в табл. 1 и на фиг. 21А. В некоторых вариантах воплощения область верхнего стебля содержит большее количество нуклеотидов, чем показано в табл. 1 и на фиг. 21А. Если область верхнего стебля содержит меньшее или большее количество нуклеотидов, чем показано на схеме в табл. 1 и на фиг. 21А, шаблон модификации, как очевидно для специалиста, должен соблюдаться.

В некоторых вариантах воплощения область верхнего стебля содержит нуклеотидные последовательности, комплементарные друг другу при просмотре в противоположных направлениях. В некоторых вариантах воплощения комплементарность нуклеотидной последовательности верхнего стебля приводит к образованию вторичной структуры типа "стебель" в sgРНК (например, области могут образовывать пары оснований друг с другом). В некоторых вариантах воплощения области верхнего стебля могут быть не полностью комплементарны друг другу при просмотре в противоположных направлениях.

#### Связка.

В некоторых вариантах воплощения sgРНК содержит область связки, расположенную между областью нижнего стебля и областью шпильки 1. В некоторых вариантах воплощения связка содержит 18 нуклеотидов. В некоторых вариантах воплощения область связки содержит нуклеотиды N1-N18, пока-

занные в табл. 1 и на фиг. 21А.

В некоторых вариантах воплощения область связки содержит меньшее количество нуклеотидов, чем показано в табл. 1 и на фиг. 21А. В некоторых вариантах воплощения область связки содержит большее количество нуклеотидов, чем показано в табл. 1 и на фиг. 21А. Если область связки содержит меньшее или большее количество нуклеотидов, чем показано на схеме в табл. 1 и на фиг. 21А, шаблон модификации, как очевидно для специалиста, должен соблюдаться.

В некоторых вариантах воплощения область связки содержит нуклеотидные последовательности, комплементарные друг другу при просмотре в противоположных направлениях. В некоторых вариантах воплощения комплементарность нуклеотидной последовательности приводит к образованию вторичной структуры типа "стебель" и/или "стебель-петля" в sgРНК (например, некоторые нуклеотиды в области связки могут образовывать пары оснований друг с другом). В некоторых вариантах воплощения области связки могут быть не полностью комплементарны друг другу при просмотре в противоположных направлениях.

Шпилька.

В некоторых вариантах воплощения sgРНК содержит одну или более из областей шпильки. В некоторых вариантах воплощения область шпильки находится ниже (например, в 3'-направлении от) области связки. В некоторых вариантах воплощения область нуклеотидов непосредственно ниже области связки называют "шпилькой 1" или "Н1". В некоторых вариантах воплощения область нуклеотидов в 3'-направлении от шпильки 1 называют "шпилькой 2" или "Н2". В некоторых вариантах воплощения область шпильки содержит шпильку 1 и шпильку 2. В некоторых вариантах воплощения sgРНК содержит только шпильку 1 или шпильку 2.

В некоторых вариантах воплощения область шпильки 1 содержит 12 нуклеотидов непосредственно ниже области связки. В некоторых вариантах воплощения область шпильки 1 содержит нуклеотиды с Н1-1 по Н1-12, показанные в табл. 1 и на фиг. 21А.

В некоторых вариантах воплощения область шпильки 2 содержит 15 нуклеотидов непосредственно ниже области шпильки 1. В некоторых вариантах воплощения область шпильки 2 содержит нуклеотиды с Н2-1 по Н2-15, показанные в табл. 1 и на фиг. 21А.

В некоторых вариантах воплощения между областями шпильки 1 и шпильки 2 присутствует один или более из нуклеотидов. Один или более из нуклеотидов между областями шпильки 1 и шпильки 2 могут быть модифицированными или немодифицированными. В некоторых вариантах воплощения шпилька 1 и шпилька 2 разделены одним нуклеотидом. В некоторых вариантах воплощения области шпилек содержат меньшее количество нуклеотидов, чем показано в табл. 1 и на фиг. 21А. В некоторых вариантах воплощения области шпилек содержат большее количество нуклеотидов, чем показано в табл. 1 и на фиг. 21А. Если область шпильки содержит меньшее или большее количество нуклеотидов, чем показано на схеме в табл. 1 и на фиг. 21А, шаблон модификации, как очевидно для специалиста, должен соблюдаться.

В некоторых вариантах воплощения область шпильки содержит нуклеотидные последовательности, комплементарные друг другу при просмотре в противоположных направлениях. В некоторых вариантах воплощения области шпильки могут быть не полностью комплементарны друг другу при просмотре в противоположных направлениях (например, верхняя область или петля шпильки содержит неспаренные нуклеотиды).

В некоторых вариантах воплощения sgРНК содержит заместитель шпильки 1 "n" нуклеотидами, причем "n" является целым числом между 1 и 50, 40, 30, 20, 15, 10, 5, 4, 3 и 2. В некоторых вариантах воплощения область шпильки 1 sgРНК замещена 2 нуклеотидами.

3'-концевая область.

В некоторых вариантах воплощения sgРНК содержит нуклеотиды после области(ей) шпильки. В некоторых вариантах воплощения 3'-концевая область содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 или 20 или более нуклеотидов, например, не ассоциированных со вторичной структурой шпильки. В некоторых вариантах воплощения 3'-концевая область содержит 1, 2, 3 или 4 нуклеотида, не ассоциированных со вторичной структурой шпильки. В некоторых вариантах воплощения 3'-концевая область содержит 4 нуклеотида, не ассоциированных со вторичной структурой шпильки. В некоторых вариантах воплощения 3'-концевая область содержит 1, 2 или 3 нуклеотида, не ассоциированных со вторичной структурой шпильки.

2. Модификации sgРНК.

В некоторых вариантах воплощения настоящее изобретение включает sgРНК, содержащую одну или более из модификаций в пределах одной или более из следующих областей: нуклеотидов в 5'-концевой области; области нижнего стебля; области расширения; области верхнего стебля; области связки; области шпильки 1; области шпильки 2; и нуклеотидов в 3'-концевой области.

В некоторых вариантах воплощения модификация содержит 2'-О-метил (2'-О-Ме) модифицированный нуклеотид. В некоторых вариантах воплощения модификация содержит 2'-О-(2-метоксиэтил) (2'-О-тое) модифицированный нуклеотид. В некоторых вариантах воплощения модификация содержит 2'-фтор (2'-Ф) модифицированный нуклеотид. В некоторых вариантах воплощения модификация содержит

фосфоротиоатную (PS) связь между нуклеотидами.

В некоторых вариантах воплощения sgPHK содержит модификации в 1, 2, 3 или 4 из первых 4 нуклеотидов на 5'-конце. В некоторых вариантах воплощения первые три или четыре нуклеотида в 5'-концевой области и последние три или четыре нуклеотида в 3'-концевой области являются модифицированными. В некоторых вариантах воплощения первые четыре нуклеотида в 5'-концевой области и последние четыре нуклеотида в 3'-концевой области соединены фосфоротиоатными (PS) связями. В некоторых вариантах воплощения модификация содержит 2'-О-Ме. В некоторых вариантах воплощения модификация содержит 2'-F. В некоторых вариантах воплощения модификация содержит 2'-О-тое.

В некоторых вариантах воплощения sgPHK содержит модификации в 1, 2, 3 или 4 из первых 4 нуклеотидов на 5'-конце. В некоторых вариантах воплощения sgPHK содержит модификации в 1, 2, 3 или 4 из первых 4 нуклеотидов на 3'-конце. В некоторых вариантах воплощения первые четыре нуклеотида в 5'-концевой области и последние четыре нуклеотида в 3'-концевой области соединены PS связью, а первые три нуклеотида в 5'-концевой области и последние три нуклеотида в 3'-концевой области содержат 2'-О-Ме или 2'-О-тое модификации.

В некоторых вариантах воплощения первые четыре нуклеотида в 5'-концевой области и последние четыре нуклеотида в 3'-концевой области соединены PS связью, а первые три нуклеотида в 5'-концевой области и последние три нуклеотида в 3'-концевой области содержат 2'-F модификации.

В некоторых вариантах воплощения предложена sgPHK, в которой LS1, LS6, LS7, LS8, LS11 и LS12 модифицированы 2'-О-Ме. В некоторых вариантах воплощения каждый из нуклеотидов в области расширения sgPHK модифицирован 2'-О-Ме. В некоторых вариантах воплощения каждый из нуклеотидов в области верхнего стебля sgPHK модифицирован 2'-О-Ме. В некоторых вариантах воплощения N16, N17 и N18 в области связки sgPHK модифицированы 2'-О-Ме. В некоторых вариантах воплощения каждый из нуклеотидов в области шпильки 1 sgPHK модифицирован 2'-О-Ме. В некоторых вариантах воплощения каждый из нуклеотидов в области шпильки 2 sgPHK модифицирован 2'-О-Ме.

В некоторых вариантах воплощения sgPHK содержит следующие 2'-О-Ме модифицированные нуклеотиды: первые три нуклеотида в 5'-концевой области; LS1, LS6, LS7, LS8, LS11 и LS12; B1 и B2 в области расширения; каждый из нуклеотидов в области верхнего стебля sgPHK; N16, N17 и N18 в области связки; каждый из нуклеотидов в области шпильки 1; каждый из нуклеотидов в области шпильки 2; и последние четыре нуклеотида в 3'-концевой области.

В некоторых вариантах воплощения sgPHK дополнительно содержит три фосфоротиоатные (PS) связи, соединяющие первые четыре нуклеотида в 5'-концевой области, и три PS связи, соединяющие последние четыре нуклеотида в 3'-концевой области. В некоторых вариантах воплощения sgPHK дополнительно содержит 2'-О-Ме или 2'-F модифицированные нуклеотиды в первых трех нуклеотидах в 5'-концевой области и 2'-О-Ме или 2'-F модифицированные нуклеотиды в последних четырех нуклеотидах в 3'-концевой области. В некоторых вариантах воплощения LS9 и LS10 модифицированы 2'-F. В некоторых вариантах воплощения N15, N16, N17 и N18 модифицированы 2'-F. В некоторых вариантах воплощения H2-9, H2-10, H2-11, H2-12, H2-13, HS-14 и H2-15 модифицированы 2'-F. В некоторых вариантах воплощения со второго по последний, с третьего по последний и с четвертого по последний нуклеотиды в 3'-концевой области модифицированы 2'-F.

В некоторых вариантах воплощения предложена одиночная направляющая РНК (sgPHK), содержащая следующие 2'-F модифицированные нуклеотиды: LS9 и LS10 в области нижнего стебля; N15, N16, N17 и N18 в области связки; и H2-9, H2-10, H2-11, H2-12, H2-13, HS-14 и H2-15 в области шпильки 2. В некоторых вариантах воплощения sgPHK дополнительно содержит 2'-F модифицированные нуклеотиды со второго по последнее, с третьего по последнее и с четвертого по последнее положение в 3'-концевой области. В некоторых вариантах воплощения sgPHK дополнительно содержит три фосфоротиоатные (PS) связи, соединяющие первые четыре нуклеотида в 5'-концевой области, и три PS связи, соединяющие последние четыре нуклеотида в 3'-концевой области. В некоторых вариантах воплощения sgPHK дополнительно содержит 2'-О-Ме или 2'-F модифицированные нуклеотиды в первых трех положениях в 5'-концевой области и 2'-О-Ме или 2'-F модифицированные нуклеотиды в трех из последних четырех нуклеотидов в 3'-концевой области.

В некоторых вариантах воплощения предложена одиночная направляющая РНК (sgPHK), содержащая 2'-О-Ме модифицированные нуклеотиды в первых трех положениях в 5'-концевой области; 2'-О-Ме модифицированные нуклеотиды в положениях LS1 и LS6; 2'-О-Ме модифицированные нуклеотиды в положениях US1-US12; 2'-О-Ме модифицированные нуклеотиды в положениях H1-1-H1-12; 2'-О-Ме модифицированный нуклеотид между шпилькой 1 и шпилькой 2; 2'-О-Ме модифицированные нуклеотиды в положениях H2-1-H2-15; и 2'-О-Ме модифицированные нуклеотиды в последних четырех нуклеотидах в 3'-концевой области. В некоторых вариантах воплощения sgPHK дополнительно содержит три фосфоротиоатные (PS) связи, соединяющие первые четыре нуклеотида в 5'-концевой области, и три PS связи, соединяющие последние четыре нуклеотида в 3'-концевой области.

В некоторых вариантах воплощения предложена одиночная направляющая РНК (sgPHK), содержащая 2'-О-Ме модифицированные нуклеотиды в первых трех положениях в 5'-концевой области; 2'-F модифицированные нуклеотиды в положениях LS1-LS6; 2'-О-Ме модифицированные нуклеотиды в поло-



тельно содержит три фосфоротиоатные (PS) связи, соединяющие первые четыре нуклеотида в 5'-концевой области, и три PS связи, соединяющие последние четыре нуклеотида в 3'-концевой области.

В некоторых вариантах воплощения предложена одиночная направляющая РНК (sgРНК), содержащая 2'-О-Ме модифицированные нуклеотиды в первых трех положениях в 5'-концевой области; 2'-О-Ме модифицированные нуклеотиды в положениях US1-US12; 2'-О-Ме модифицированные нуклеотиды в положениях H1-2, H1-4, H1-6, H1-8, H1-10 и H1-12; 2'-F модифицированные нуклеотиды в положениях H1-1, H1-3, H1-5, H1-7, H1-9 и H1-11; 2'-F модифицированный нуклеотид между шпилькой 1 и шпилькой 2; 2'-F модифицированные нуклеотиды в положениях H2-2, H2-4, H2-6, H2-8, H2-10, H2-12 и H2-14; 2'-О-Ме модифицированные нуклеотиды в положениях H2-1, H2-3, H2-5, H2-8, H2-9, H2-11, H2-13 и H2-15; 2'-F модифицированные нуклеотиды во втором с последнего и четвертом с последнего положениях в 3'-концевой области; и 2'-О-Ме модифицированные нуклеотиды в третьем с последнего и последнем положении в 3'-концевой области. В некоторых вариантах воплощения sgРНК дополнительно содержит три фосфоротиоатные (PS) связи, соединяющие первые четыре нуклеотида в 5'-концевой области, и три PS связи, соединяющие последние четыре нуклеотида в 3'-концевой области.

В настоящем документе в некоторых вариантах воплощения описана одиночная направляющая РНК (sgРНК), содержащая 2'-О-Ме модификации в положениях LS8, LS10, LS12, H1-2, H1-4, H1-6, H1-8, H1-10, H1-12, H2-1, H2-3, H2-5, H2-7, H2-9, H2-11, H2-13 и H2-15; и 2'-F модификации в положениях LS7, LS9, LS11; H1-1, H1-3, H1-5, H1-7, H1-9, H1-11, H1-13, H2-2, H2-4, H2-6, H2-8, H2-10, H2-12 и H2-14. В некоторых вариантах воплощения sgРНК дополнительно содержит три фосфоротиоатные (PS) связи, соединяющие первые четыре нуклеотида в 5'-концевой области, и три PS связи, соединяющие последние четыре нуклеотида в 3'-концевой области. В некоторых вариантах воплощения sgРНК дополнительно содержит 2'-О-Ме модифицированные нуклеотиды в последнем и с третьего по последнее положениях в 3'-концевой области; и 2'-F модифицированные нуклеотиды со второго по последнее и с третьего по последнего положениях в 3'-концевой области.

В настоящем документе в некоторых вариантах воплощения описана sgРНК, содержащая нуклеиновые кислоты согласно любой из SEQ ID No: 228-232. В настоящем документе в некоторых вариантах воплощения описана sgРНК, содержащая нуклеиновые кислоты согласно любой одной из SEQ ID No: 235-240, 265-285 и 309-329. В настоящем документе в некоторых вариантах воплощения описана sgРНК, содержащая нуклеиновые кислоты, обладающие по меньшей мере 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 85, 80, 75 или 70% идентичностью по отношению к нуклеиновым кислотам согласно любой одной из SEQ ID No: 235-240, 265-285 и 309-329, в которой шаблон модификации идентичен шаблону модификации, представленному в эталонном идентификаторе последовательности. В некоторых вариантах воплощения sgРНК дополнительно содержит три фосфоротиоатные (PS) связи, соединяющие первые четыре нуклеотида в 5'-концевой области, и три PS связи, соединяющие последние четыре нуклеотида в 3'-концевой области.

В некоторых вариантах воплощения предложена sgРНК, содержащая 5'-концевую модификацию и одну или более из модификаций в одной или более из: области верхнего стебля; области шпильки 1; и области шпильки 2, причем 5'-концевая модификация включает по меньшей мере две фосфоротиоатных связи в пределах первых семи нуклеотидов 5'-концевой области.

В некоторых вариантах воплощения предложена sgРНК, содержащая 5'-концевую модификацию и одну или более из модификаций в одной или более из: области верхнего стебля; области шпильки 1; и области шпильки 2, причем 5'-концевая модификация включает одну или более из фосфоротиоатных связей в 5'-концевой области РНК. В некоторых вариантах воплощения одна или более из фосфоротиоатных связей соединяет 5' концевые нуклеотиды.

В некоторых вариантах воплощения предложена sgРНК, содержащая 5'-концевую модификацию и одну или более из модификаций в одной или более из: области верхнего стебля; области шпильки 1; и области шпильки 2, причем 5'-концевая модификация включает одну или более из фосфоротиоатных связей в пределах первых семи нуклеотидов 5'-концевой области.

В некоторых вариантах воплощения предложена sgРНК, содержащая любую одну из модифицированных последовательностей sgРНК согласно SEQ ID No: 228-332.

В некоторых вариантах воплощения предложена sgРНК, содержащая или состоящая из любой одной из модифицированных последовательностей sgРНК согласно SEQ ID No: 235-240, 265-285 и 309-329.

В некоторых вариантах воплощения настоящее изобретение включает sgРНК, содержащую любую одну из модифицированных последовательностей согласно SEQ ID No: 235-240, 265-285 и 309-329, причем sgРНК дополнительно содержит 5'-спейсерную последовательность, по меньшей мере частично комплементарную последовательности-мишени, обеспечивающую специфичность Cas9 по отношению к гидролизуемой мишени.

В некоторых вариантах воплощения настоящее изобретение включает sgРНК, содержащую нуклеотиды, обладающие по меньшей мере 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 85, 80, 75 или 70% идентичностью по отношению к нуклеотидам согласно любой из SEQ ID No: 235-240, 265-285 и 309-329, в которой шаблон модификации идентичен шаблону модификации, представленному в эталонном идентификаторе последовательности. Т.е. нуклеотиды А, U, С и G могут различаться на 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91,

90, 85, 80, 75 или 70% по сравнению с нуклеотидами, показанными в последовательностях, однако модификации остаются неизменными.

В некоторых вариантах воплощения настоящее изобретение включает sgРНК, содержащую одну или более из модификаций в пределах одной или более из следующих областей: нуклеотидов в 5'-концевой области; области нижнего стебля; области расширения; области верхнего стебля; области связи; области шпильки 1; области шпильки 2; и нуклеотидов в 3'-концевой области.

В некоторых вариантах воплощения модификация включает 2'-О-метил (2'-О-Ме) модифицированный нуклеотид. В некоторых вариантах воплощения модификация включает 2'-фтор (2'-F) модифицированный нуклеотид. В некоторых вариантах воплощения модификация включает фосфоротиоатную (PS) связь между нуклеотидами. В некоторых вариантах воплощения модификация включает инвертированный нуклеотид без основания.

В некоторых вариантах воплощения предложена sgРНК, содержащая следующие 2'-О-Ме модифицированные нуклеотиды: первые три нуклеотида в 5'-концевой области; LS1, LS6, LS7, LS8, LS11 и LS12 в нижнем стебле; B1 и B2 в области расширения; каждый из нуклеотидов в области верхнего стебля; N16, N17 и N18 в области связи; каждый из нуклеотидов в области шпильки 1; один нуклеотид между шпилькой 1 и шпилькой 2; каждый из нуклеотидов в области шпильки 2; и последние четыре нуклеотида в 3'-концевой области. В одном варианте воплощения sgРНК дополнительно содержит три PS связи между первыми четырьмя нуклеотидами в 5'-концевой области и три PS связи между последними четырьмя нуклеотидами в 3'-концевой области.

В некоторых вариантах воплощения предложена sgРНК, содержащая 2'-О-Ме модифицированные нуклеотиды в: первых трех положениях в 5'-концевой области; LS1, LS6, LS7, LS8, LS11 и LS12 в нижнем стебле; B1-B6 в области расширения; каждый из нуклеотидов в области верхнего стебля; N16, N17 и N18 в области связи; каждый из нуклеотидов в области шпильки 1; один нуклеотид между шпилькой 1 и шпилькой 2; каждый из нуклеотидов в области шпильки 2; и последние четыре нуклеотида в 3'-концевой области. В одном варианте воплощения sgРНК дополнительно содержит три PS связи между первыми четырьмя нуклеотидами в 5'-концевой области и три PS связи между последними четырьмя нуклеотидами в 3'-концевой области.

В некоторых вариантах воплощения предложена sgРНК, содержащая 2'-F модифицированные нуклеотиды в положениях: LS9 и LS10 в нижнем стебле; 15-N18 в области связи; H2-9-HS-15 в области шпильки 2; во втором от последнего, в третьем от последнего и в четвертом от последнего нуклеотидах в 3'-концевой области.

В некоторых вариантах воплощения предложена sgРНК, содержащая 2'-F модифицированные нуклеотиды в положениях: каждом положении в нижнем стебле; 15-N18 в области связи; H2-9-HS-15 в области шпильки 2; и во втором от последнего, в третьем от последнего и в четвертом от последнего нуклеотидах в 3'-концевой области.

В некоторых вариантах воплощения предложена одиночная направляющая РНК (sgРНК), содержащая 2'-О-Ме модифицированные нуклеотиды в положениях LS8, LS10, LS12, H1-2, H1-4, H1-6, H1-8, H1-10, H1-12, H2-1, H2-3, H2-5, H2-7, H2-9, H2-11, H2-13, H2-15 и в последнем и в третьем от последнего нуклеотидах в 3'-концевой области; и 2'-F модификации в положениях LS7, LS9, LS11; H1-1, H1-3, H1-5, H1-7, H1-9, H1-11, H1-13, H2-2, H2-4, H2-6, H2-8, H2-10, H2-12, H2-14 и во втором от последнего и в четвертом от последнего нуклеотидах в 3'-концевой области.

Настоящее изобретение включает каждый из следующих вариантов воплощения.

Вариант воплощения 01. Одиночная направляющая РНК (sgРНК), содержащая одну или более из модификаций в одной или более из следующих областей:

- 5'-концевой области;
- области нижнего стебля;
- области расширения;
- области верхнего стебля;
- области связи;
- области шпильки 1;
- области шпильки 2; и
- 3'-концевой области.

Вариант воплощения 02. sgРНК согласно варианту воплощения 1, в которой указанная модификация включает 2'-О-метил (2'-О-Ме) модифицированный нуклеотид.

Вариант воплощения 03. sgРНК согласно варианту воплощения 1, в которой указанная модификация включает 2'-фтор (2'-F) модифицированный нуклеотид.

Вариант воплощения 04. sgРНК согласно варианту воплощения 1, в которой указанная модификация включает фосфоротиоатную (PS) связь между нуклеотидами.

Вариант воплощения 05. sgРНК согласно любому из вариантов воплощения 1-3, в которой первые три или четыре нуклеотида в 5'-концевой области и последние три или четыре нуклеотида в 3'-концевой области являются модифицированными.

Вариант воплощения 06. sgРНК согласно любому из вариантов воплощения 1-5, в которой первые

четыре нуклеотида в 5'-концевой области и последние четыре нуклеотида в 3'-концевой области соединены фосфоротиоатными (PS) связями.

Вариант воплощения 07. sgРНК согласно варианту воплощения 5, в которой указанная модификация включает 2'-О-Ме.

Вариант воплощения 08. sgРНК согласно варианту воплощения 5, в которой указанная модификация включает 2'-F.

Вариант воплощения 09. sgРНК согласно любому из вариантов воплощения 1-7, в которой первые четыре нуклеотида в 5'-концевой области и последние четыре нуклеотида в 3'-концевой области соединены PS связью, а первые три нуклеотида в 5'-концевой области и последние три нуклеотида в 3'-концевой области содержат 2'-О-Ме модификации.

Вариант воплощения 10. sgРНК согласно любому из вариантов воплощения 1-8, в которой первые четыре нуклеотида в 5'-концевой области и последние четыре нуклеотида в 3'-концевой области соединены PS связью, а первые три нуклеотида в 5'-концевой области и последние три нуклеотида в 3'-концевой области содержат 2'-F модификации.

Вариант воплощения 11. sgРНК согласно любому из вариантов воплощения 1-10, в которой LS1, LS6, LS7, LS8, LS11 и LS12 модифицированы 2'-О-Ме.

Вариант воплощения 12. sgРНК согласно любому из вариантов воплощения 1-11, в которой каждый из нуклеотидов в области расширения модифицирован 2'-О-Ме.

Вариант воплощения 13. sgРНК согласно любому из вариантов воплощения 1-12, в которой каждый из нуклеотидов в области верхнего стебля модифицирован 2'-О-Ме.

Вариант воплощения 14. sgРНК согласно любому из вариантов воплощения 1-13, в которой N16, N17 и N18 в области связки модифицированы 2'-О-Ме.

Вариант воплощения 15. sgРНК согласно любому из вариантов воплощения 1-14, в которой каждый из нуклеотидов в области шпильки 1 модифицирован 2'-О-Ме.

Вариант воплощения 16. sgРНК согласно любому из вариантов воплощения 1-15, в которой каждый из нуклеотидов в области шпильки 2 модифицирован 2'-О-Ме.

Вариант воплощения 17. Одиночная направляющая РНК (sgРНК), содержащая 2'-О-Мемодифицированные нуклеотиды в следующих положениях:

- первых трех нуклеотидах в 5'-концевой области;
- LS1, LS6, LS7, LS8, LS11 и LS12 в области нижнего стебля;
- B1 и B2 в области расширения;
- каждом нуклеотиде в области верхнего стебля;
- N16, N17 и N18 в области связки;
- каждом нуклеотиде в области шпильки 1;
- каждом нуклеотиде в области шпильки 2; и
- последних четырех нуклеотидах в 3'-концевой области.

Вариант воплощения 18. sgРНК согласно варианту воплощения 17, в которой B3-B6 модифицированы 2'-О-Ме.

Вариант воплощения 19. sgРНК согласно варианту воплощения 17, дополнительно содержащая три фосфоротиоатные (PS) связи, соединяющие первые четыре нуклеотида в 5'-концевой области, и три PS связи, соединяющие последние четыре нуклеотида в 3'-концевой области.

Вариант воплощения 20. sgРНК согласно любому из вариантов воплощения 1-10, в которой LS9 и LS10 модифицированы 2'-F.

Вариант воплощения 21. sgРНК согласно любому из вариантов воплощения 1-10 и 20, в которой N15, N16, N17 и N18 модифицированы 2'-F.

Вариант воплощения 22. sgРНК согласно любому из вариантов воплощения 1-10 и 20-21, в которой H2-9, H2-10, H2-11, H2-12, H2-13, H2-14 и H2-15 модифицированы 2'-F.

Вариант воплощения 23. sgРНК согласно любому из вариантов воплощения 1-10 и 21-22, в которой второй от последнего, третий от последнего и четвертый от последнего нуклеотиды 3'-концевой области модифицированы 2'-F.

Вариант воплощения 24. Одиночная направляющая РНК (sgРНК), содержащая 2'-F-модифицированные нуклеотиды в следующих положениях:

- LS9 и LS10 в области нижнего стебля;
- N15, N16, N17 и N18 в области связки; и
- H2-9, H2-10, H2-11, H2-12, H2-13, H2-14 и H2-15 в области шпильки 2.

Вариант воплощения 25. sgРНК согласно варианту воплощения 24, дополнительно содержащая 2'-F модифицированные нуклеотиды во втором от последнего, в третьем от последнего и в четвертом от последнего нуклеотидах в 3'-концевой области.

Вариант воплощения 26. sgРНК согласно любому из вариантов воплощения 24 или 25, дополнительно содержащая три фосфоротиоатные (PS) связи, соединяющие первые четыре нуклеотида в 5'-концевой области и три PS связи, соединяющие последние четыре нуклеотида в 3'-концевой области.

Вариант воплощения 27. sgРНК согласно любому из вариантов воплощения 24-26, дополнительно





Вариант воплощения 48. Одиночная направляющая РНК (sgРНК), содержащая:

2'-О-Ме модифицированные нуклеотиды LS8, LS10, LS12, H1-2, H1-4, H1-6, H1-8, H1-10, H1-12, H2-1, H2-3, H2-5, H2-7, H2-9, H2-11, H2-13 и H2-15; и

2'-F модифицированные нуклеотиды в положениях LS7, LS9, LS11; H1-1, H1-3, H1-5, H1-7, H1-9, H1-11, H1-13, H2-2, H2-4, H2-6, H2-8, H2-10, H2-12 и H2-14.

Вариант воплощения 49. sgРНК согласно варианту воплощения 48, дополнительно содержащая три фосфоротиоатные (PS) связи, соединяющие первые четыре нуклеотида в 5'-концевой области, и три PS связи, соединяющие последние четыре нуклеотида в 3'-концевой области.

Вариант воплощения 50. sgРНК согласно любому из вариантов воплощения 48-49, дополнительно содержащая:

2'-О-Ме модифицированные нуклеотиды в последнем и в третьем от последнего положении в 3'-концевой области; и

2'-F модифицированные нуклеотиды во втором от последнего и в третьем от последнего нуклеотидах в 3'-концевой области.

Вариант воплощения 51. sgРНК, содержащая нуклеиновые кислоты согласно любой одной из SEQ ID No: 228-332.

Вариант воплощения 52. sgРНК, содержащая нуклеиновые кислоты согласно любой одной из SEQ ID No: 235-240, 265-285 и 309-329.

Вариант воплощения 53. sgРНК, содержащая нуклеиновые кислоты, обладающие по меньшей мере 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 85, 80, 75 или 70% идентичностью по отношению к нуклеиновым кислотам согласно любой из SEQ ID No: 235-240, 265-285 и 309-329, в которой шаблон модификации идентичен шаблону модификации, представленному в эталонном идентификаторе последовательности.

Вариант воплощения 54. sgРНК согласно любому из вариантов воплощения 51-53, дополнительно содержащая три фосфоротиоатные (PS) связи, соединяющие первые четыре нуклеотида в 5'-концевой области и три PS связи, соединяющие последние четыре нуклеотида в 3'-концевой области.

Композиции dgРНК.

В некоторых вариантах воплощения композиции и способы согласно настоящему изобретению включают gРНК, содержащую crРНК и trРНК, обеспечивающие специфичность нуклеазы, например, Cas9, по отношению к последовательности ДНК-мишени. В некоторых вариантах воплощения gРНК ассоциированы, но находятся на двух отдельных молекулах РНК (двойная направляющая РНК или dgРНК).

В табл. 2 и на фиг. 21С представлено описание доменов crРНК, используемое в настоящем документе. 5'-концевая область может содержать спейсерную область в 5'-концевой области crРНК или вблизи от нее, обеспечивающую специфичность Cas9 по отношению к области ДНК-мишени, например, описанной в настоящем документе. В табл. 2 "n" между областями является переменной количества 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 n равно 0. Любая из dgРНК, описанных в настоящем документе, может содержать "n" между любыми доменами.

В табл. 3 и на фиг. 21С представлено описание доменов trРНК, используемое в настоящем документе. В табл. 3 "n" между областями является переменной количества 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 n равно 0. Любая из dgРНК, описанных в настоящем документе, может содержать "n" между любыми доменами.

### 3. Домены dgРНК.

Как описано в статье Briner 2014, dgРНК можно разработать на основе специфических функциональных доменов, в настоящем документе называемых "доменами", в том числе спейсера, отвечающего за адресное воздействие, доменов нижнего стебля, расширения, верхнего стебля, связки и шпильки. В dgРНК crРНК содержит некоторые компоненты gРНК и trРНК содержит некоторые компоненты gРНК.

Области crРНК представлены в табл. 2 и на фиг. 21С. Области trРНК представлены в табл. 3 и на фиг. 21С. На фиг. 21С показана схема типичной dgРНК.

Таблица 2  
Области crРНК (линейный вид, от 5' к 3')

	LS1-6		V1-2		US1-14	
5'-концевая область	Нижний стебель	n	Расширение	n	Верхний стебель	3'-концевая область

Таблица 3  
Области тРНК (линейный вид, от 5' к 3')

	U51-11		V1-4		LS1-6		N1-18		H1-1 по H1-12		H2-1 по H2-15	
5' – концев ая област ь	Верхни й стебел ь	n	Расширени е	n	Нижний стебел ь	n	Связ ь	n	Шпилька 1	n	Шпилька 2	3' – концевая область

5'-концевая область.

В некоторых вариантах воплощения dgРНК содержит нуклеотиды в 5'-концевой области сРНК и тРНК, показанные в табл. 2-3 и на фиг. 21С.

В некоторых вариантах воплощения 5'-концевая сРНК содержит спейсерную или направляющую область, обеспечивающую специфичность белка Cas по отношению к нуклеотидной последовательности-мишени. В некоторых вариантах воплощения 5'-концевая область не содержит спейсерной или направляющей области. В некоторых вариантах воплощения 5'-концевая область содержит спейсер и дополнительные нуклеотиды, не обеспечивающие специфичности белка Cas по отношению к нуклеотидной области-мишени.

В некоторых вариантах воплощения направляющая область содержит первые 1-10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов в 5'-конце сРНК. В некоторых вариантах воплощения направляющая область содержит 20 нуклеотидов. В некоторых вариантах воплощения направляющая область может содержать 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 или более нуклеотидов. В некоторых вариантах воплощения направляющая область может содержать 17 нуклеотидов. В некоторых вариантах воплощения направляющая область может содержать 18 нуклеотидов. В некоторых вариантах воплощения направляющая область может содержать 19 нуклеотидов.

В некоторых вариантах воплощения выбор направляющей области определяется последовательностями-мишенями в пределах генов, подлежащих редактированию. В некоторых вариантах воплощения сРНК содержит направляющую область, комплементарную последовательностям-мишеням исследуемого гена.

В некоторых вариантах воплощения последовательность-мишень исследуемого гена может быть комплементарна направляющей области сРНК. В некоторых вариантах воплощения степень комплементарности или идентичности между направляющей областью сРНК и соответствующей последовательностью-мишенью исследуемого гена может составлять приблизительно 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100%. В некоторых вариантах воплощения направляющая область сРНК и область-мишень исследуемого гена могут быть на 100% комплементарны или идентичны. В других вариантах воплощения направляющая область сРНК и последовательность-мишень исследуемого гена могут содержать по меньшей мере одно несовпадение. Например, направляющая область сРНК и последовательность-мишень исследуемого гена могут содержать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 несовпадений, причем общая длина последовательности-мишени составляет по меньшей мере приблизительно 17, 18, 19, 20 или более пар оснований. В некоторых вариантах воплощения направляющая область сРНК и последовательность-мишень исследуемого гена могут содержать 1-6 несовпадений, причем направляющая последовательность содержит по меньшей мере приблизительно 17, 18, 19, 20 или более нуклеотидов. В некоторых вариантах воплощения направляющая область сРНК и область-мишень исследуемого гена может содержать 1, 2, 3, 4, 5 или 6 несовпадений, причем направляющая последовательность содержит приблизительно 20 нуклеотидов.

В некоторых вариантах воплощения тРНК содержит 5'-концевую область. В некоторых вариантах воплощения тРНК содержит 5'-концевую область, которая образует, в частности, верхний стебель dgРНК. 5'-концевая область тРНК не комплементарна области гена-мишени.

Нижний стебель.

В некоторых вариантах воплощения dgРНК содержит область нижнего стебля (LS). Область нижнего стебля содержит область нижнего стебля сРНК и область нижнего стебля тРНК, ассоциированные согласно изображению на фиг. 21С. В некоторых вариантах воплощения область нижнего стебля сРНК по меньшей мере частично комплементарна области нижнего стебля тРНК. В некоторых вариантах воплощения область нижнего стебля сРНК полностью комплементарна области нижнего стебля тРНК.

В некоторых вариантах воплощения каждая из областей нижнего стебля сРНК и тРНК содержит по 6 нуклеотидов. В некоторых вариантах воплощения каждая из областей нижнего стебля сРНК и тРНК содержит меньшее количество нуклеотидов, чем показано в табл. 2 и 3 и на фиг. 21С. В некоторых вариантах воплощения область нижнего стебля содержит большее количество нуклеотидов, чем показано в табл. 2 и 3 и на фиг. 21С. Если область нижнего стебля содержит меньшее или большее количество нуклеотидов, чем показано на схемах в табл. 2 и 3 и на фиг. 21С, шаблоны модификации, как очевидно для специалиста, соблюдаются. В некоторых вариантах воплощения количество нуклеотидов в нижнем

стебле сгРНК отличается от количества нуклеотидов в нижнем стебле трРНК.

#### Расширение.

В некоторых вариантах воплощения dgРНК содержит область расширения (B). В некоторых вариантах воплощения сгРНК содержит одну область расширения и трРНК содержит одну область расширения. В некоторых вариантах воплощения каждая область расширения содержит 1-4 нуклеотида. В некоторых вариантах воплощения область расширения сгРНК содержит два нуклеотида, а область расширения трРНК содержит четыре нуклеотида.

В некоторых вариантах воплощения область расширения сгРНК расположена между областью нижнего стебля и областью верхнего стебля сгРНК. В некоторых вариантах воплощения область расширения сгРНК содержит два нуклеотида. В некоторых вариантах воплощения область расширения сгРНК содержит нуклеотиды B1 и B2, показанные в табл. 2 и на фиг. 21С.

В некоторых вариантах воплощения область расширения трРНК расположена между областью верхнего стебля и областью нижнего стебля трРНК. В некоторых вариантах воплощения область расширения трРНК содержит четыре нуклеотида. В некоторых вариантах воплощения область расширения трРНК содержит нуклеотиды B1-B4, показанные в табл. 3 и на фиг. 21С.

В некоторых вариантах воплощения наличие расширения приводит к образованию направленного изгиба между модулями верхнего и нижнего стебля в dgРНК. Расширение сгРНК и расширение трРНК могут быть частично комплементарны. Расширение сгРНК и расширение трРНК могут не обладать комплементарностью.

В некоторых вариантах воплощения области расширения сгРНК и трРНК содержат большее количество нуклеотидов, чем показано в табл. 2 и 3 и на фиг. 21С. Если область расширения содержит меньшее или большее количество нуклеотидов, чем показано на схеме в табл. 2 и 3 и на фиг. 21С, шаблоны модификации, как очевидно для специалиста, соблюдаются. В некоторых вариантах воплощения количество нуклеотидов в расширении сгРНК отличается от количества нуклеотидов в расширении трРНК.

#### Верхний стебель.

В некоторых вариантах воплощения dgРНК содержит область верхнего стебля (US). Область верхнего стебля содержит область верхнего стебля сгРНК и область верхнего стебля трРНК, ассоциированные согласно изображению на фиг. 21С. В некоторых вариантах воплощения область верхнего стебля сгРНК по меньшей мере частично комплементарна области верхнего стебля трРНК. В некоторых вариантах воплощения область верхнего стебля сгРНК полностью комплементарна области верхнего стебля трРНК.

В некоторых вариантах воплощения область верхнего стебля сгРНК содержит четырнадцать нуклеотидов. В некоторых вариантах воплощения область верхнего стебля трРНК содержит одиннадцать нуклеотидов. В некоторых вариантах воплощения каждая из областей верхнего стебля сгРНК и трРНК содержит меньшее количество нуклеотидов, чем показано в табл. 2 и 3 и на фиг. 21С. В некоторых вариантах воплощения области верхнего стебля сгРНК и трРНК содержат большее количество нуклеотидов, чем показано в табл. 2 и 3 и на фиг. 21С. Если область верхнего стебля содержит меньшее или большее количество нуклеотидов, чем показано на схемах в табл. 2 и 3 и на фиг. 21С, шаблоны модификации, как очевидно для специалиста, соблюдаются.

В некоторых вариантах воплощения верхний стебель сгРНК содержит нуклеотиды US1 - US14, показанные в табл. 2 и на фиг. 21С.

В некоторых вариантах воплощения верхний стебель трРНК содержит нуклеотиды US1 - US11, показанные в табл. 3 и на фиг. 21С.

#### Связка.

В некоторых вариантах воплощения sgРНК содержит трРНК, содержащую область связки. В некоторых вариантах воплощения область связки располагается между областью нижнего стебля и областью шпильки 1 трРНК. В некоторых вариантах воплощения связка располагается непосредственно ниже нижнего стебля трРНК. В некоторых вариантах воплощения связка содержит восемнадцать нуклеотидов. В некоторых вариантах воплощения область связки трРНК содержит нуклеотиды N1-N18, показанные в табл. 3 и на фиг. 21С. В некоторых вариантах воплощения область связки содержит меньшее количество нуклеотидов, чем показано в табл. 3 и на фиг. 21С. В некоторых вариантах воплощения область связки трРНК содержит большее количество нуклеотидов, чем показано в табл. 3 и на фиг. 21С. Если область связки содержит меньшее или большее количество нуклеотидов, чем показано в табл. 3 и на фиг. 21С, шаблоны модификации, как очевидно для специалиста, соблюдаются.

В некоторых вариантах воплощения область связки содержит нуклеотидные последовательности, комплементарные друг другу при просмотре в противоположных направлениях. В некоторых вариантах воплощения комплементарность нуклеотидной последовательности приводит к образованию вторичной структуры типа "стебель" и/или "стебель-петля" в sgРНК (например, некоторые нуклеотиды в области связки могут образовывать пары оснований друг с другом). В некоторых вариантах воплощения области связки могут быть не полностью комплементарны друг другу при просмотре в противоположных направлениях.

#### Шпилька.

В некоторых вариантах воплощения область шпильки трРНК располагается ниже области связки. В

некоторых вариантах воплощения область нуклеотидов непосредственно ниже области связки называют "шпилькой 1". В некоторых вариантах воплощения область нуклеотидов непосредственно ниже области шпильки 1 называют "шпилькой 2". В некоторых вариантах воплощения область шпильки содержит шпильку 1 и шпильку 2. В некоторых вариантах воплощения шпилька 1 и шпилька 2 разделены одним или более нуклеотидом "n". В некоторых вариантах воплощения  $n=1$ . В некоторых вариантах воплощения tРНК содержит только шпильку 1 или шпильку 2.

Показано, что замещение области шпильки 1 tРНК 2 нуклеотидами обеспечивает редактирующую активность РНП Cas (см. US20150376586, фиг. 16). В некоторых вариантах воплощения tРНК содержит заместитель шпильки 1 нуклеотидами "n", причем "n" является целым числом между 1 и 50, 40, 30, 20, 15, 10, 5, 4, 3 и 2. В некоторых вариантах воплощения область шпильки 1 tРНК замещена 2 нуклеотидами.

В некоторых вариантах воплощения шпилька 1 tРНК содержит двенадцать нуклеотидов непосредственно ниже области связки. В некоторых вариантах воплощения область шпильки 1 tРНК содержит нуклеотиды Н1-1-Н1-12, показанные в табл. 3 и на фиг. 21С.

В некоторых вариантах воплощения между областями шпильки 1 и шпильки 2 tРНК присутствуют нуклеотиды, не относящиеся к шпильке. В некоторых вариантах воплощения между шпилькой 1 и шпилькой 2 находятся от одного до двух нуклеотидов, не относящихся к шпильке.

В некоторых вариантах воплощения шпилька 2 tРНК содержит пятнадцать нуклеотидов после (в направлении 3') шпильки 1. В некоторых вариантах воплощения область шпильки 2 tРНК содержит нуклеотиды Н2-1-Н2-15, показанные в табл. 3 и на фиг. 21С. В некоторых вариантах воплощения область шпильки 2 tРНК содержит нуклеотиды Н2-1-Н2-15, показанные в табл. 3, и "n" между шпилькой 1 и шпилькой 2 составляет 1 или 2.

В некоторых вариантах воплощения область шпильки tРНК содержит большее количество нуклеотидов, чем показано в табл. 3 и на фиг. 21С. Если область шпильки содержит меньшее или большее количество нуклеотидов, чем показано в табл. 3 и на фиг. 21С, шаблоны модификации, как очевидно для специалиста, соблюдаются.

В некоторых вариантах воплощения область шпильки содержит нуклеотидные последовательности, комплементарные друг другу при просмотре в противоположных направлениях. В некоторых вариантах воплощения области шпильки могут быть не полностью комплементарны друг другу при просмотре в противоположных направлениях (например, верхняя область или петля шпильки содержит неспаренные нуклеотиды).

В некоторых вариантах воплощения tРНК содержит заместитель шпильки 1 нуклеотидами "n", причем "n" является целым числом между 1 и 50, 40, 30, 20, 15, 10, 5, 4, 3 и 2. В некоторых вариантах воплощения область шпильки 1 tРНК замещена 2 нуклеотидами.

3'-концевая область.

В некоторых вариантах воплощения dgРНК содержит tРНК, содержащую 3'-концевую область, содержащую дополнительные нуклеотиды после (в направлении 3') области(ей) шпильки. В некоторых вариантах воплощения 3'-концевая область содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 или 20 или более нуклеотидов, не ассоциированных со вторичной структурой шпильки. В некоторых вариантах воплощения 3'-концевая область содержит 1, 2, 3 или 4 нуклеотида, не ассоциированных со вторичной структурой шпильки. В некоторых вариантах воплощения 3'-концевая область содержит 4 нуклеотида, не ассоциированных со вторичной структурой шпильки. В некоторых вариантах воплощения 3'-концевая область содержит 1, 2 или 3 нуклеотида, не ассоциированных со вторичной структурой шпильки.

4. Модификации dgРНК.

В некоторых вариантах воплощения dgРНК содержит модифицированную сРНК и немодифицированную tРНК. В некоторых вариантах воплощения dgРНК содержит немодифицированную сРНК и модифицированную tРНК. В некоторых вариантах воплощения как сРНК, так и tРНК dgРНК содержат модификации.

В некоторых вариантах воплощения gРНК, описанные в настоящем документе, находятся на двух различных молекулах РНК (двойная направляющая или dgРНК). См. табл. 2, 3 и фиг. 21С.

В некоторых вариантах воплощения настоящее изобретение включает dgРНК, содержащую или состоящую из а) любой из последовательностей сРНК согласно SEQ ID No: 1-187; и б) любой из последовательностей tРНК, описанных в SEQ ID No: 188-227.

В некоторых вариантах воплощения предложена dgРНК, содержащая любую одну из модифицированных последовательностей сРНК 1-187.

В некоторых вариантах воплощения предложена dgРНК, содержащая любую одну из модифицированных последовательностей tРНК 188-227.

В некоторых вариантах воплощения предложена dgРНК, содержащая любую одну из модифицированных последовательностей сРНК согласно SEQ ID No: 19-31, 53-73 и 104-130. В некоторых вариантах воплощения настоящее изобретение включает dgРНК, содержащую любую одну из модифицированных последовательностей согласно SEQ ID No: 19-31, 53-73 и 104-130, причем сРНК дополнительно содержит 5'-спейсерную последовательность, по меньшей мере частично комплементарную последовательно-

сти-мишени, обеспечивающую специфичность Cas9 по отношению к гидролизуемой мишени.

В некоторых вариантах воплощения настоящее изобретение включает crPHK, содержащую любую одну из последовательностей, описанных в SEQ ID No: 1-187. В некоторых вариантах воплощения настоящее изобретение включает crPHK, содержащую или состоящую из любой одной из последовательностей, описанных в SEQ ID No: 19-31, 53-73 и 104-130. В некоторых вариантах воплощения настоящее изобретение включает crPHK, содержащую любую одну из последовательностей, описанных в SEQ ID No: 19-31, 53-73 и 104-130, и спейсерную область.

В некоторых вариантах воплощения настоящее изобретение включает trPHK, содержащую или состоящую из любой одной из последовательностей, описанных в SEQ ID No: 188-277.

В некоторых вариантах воплощения настоящее изобретение включает crPHK, содержащую нуклеотиды, обладающие по меньшей мере 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 85, 80, 75 или 70% идентичностью по отношению к нуклеотидам любой из SEQ ID No: 1-187, в которой шаблон модификации идентичен шаблону модификации, представленному в эталонном идентификаторе последовательности. Т.е. нуклеотиды A, U, C и G могут различаться на 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 85, 80, 75 или 70% по сравнению с нуклеотидами, показанными в последовательностях, однако модификации остаются неизменными.

В некоторых вариантах воплощения настоящее изобретение включает trPHK, содержащую нуклеотиды, обладающие по меньшей мере 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 85, 80, 75 или 70% идентичностью по отношению к нуклеотидам согласно любой одной из SEQ ID No: 188-277, в которой шаблон модификации идентичен шаблону модификации, представленному в эталонном идентификаторе последовательности. Т.е. нуклеотиды A, U, C и G могут различаться на 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 85, 80, 75 или 70% по сравнению с нуклеотидами, показанными в последовательностях, однако модификации каждого нуклеотида остаются неизменными.

5. crPHK, trPHK и dgPHK с модификациями.

В некоторых вариантах воплощения crPHK содержит один или более из модифицированных нуклеотидов в пределах одного или более из доменов 5'-концевой области, нижнего стебля, расширения, верхнего стебля и 3'-концевой области.

В некоторых вариантах воплощения модификация включает 2'-O-Ме.

В некоторых вариантах воплощения модификация включает 2'-F.

В некоторых вариантах воплощения модификация включает фосфоротиоатную (PS) связь, соединяющую один или более из нуклеотидов. В некоторых вариантах воплощения модификация является тремя PS связями соединяющими первые четыре нуклеотида в 5'-концевой области, и тремя PS связями, соединяющими последние четыре нуклеотида в 3'-концевой области.

В некоторых вариантах воплощения модификация включает инвертированный нуклеотид без основания.

В некоторых вариантах воплощения предложена crPHK, содержащая 2'-O-Ме модифицированные нуклеотиды в каждом нуклеотиде в верхнем стебле. В некоторых вариантах воплощения каждый из нуклеотидов US-1-US-14 crPHK модифицирован 2'-O-Ме. В некоторых вариантах воплощения LS1 и LS6 crPHK модифицированы 2'-O-Ме. В некоторых вариантах воплощения LS5 crPHK модифицирован 2'-O-Ме.

В некоторых вариантах воплощения предложена crPHK, содержащая 2'-O-Ме модифицированные нуклеотиды в каждом нуклеотиде в верхнем стебле и LS1 и LS6 в нижнем стебле. В некоторых вариантах воплощения crPHK дополнительно содержит один или более из 2'-O-Ме или 2'-O-томе модифицированных нуклеотидов в 5'- и/или 3'-концевой области, например, в виде 5'- и/или 3'-концевой модификации.

В некоторых вариантах воплощения предложена crPHK, содержащая 2'-O-Ме модифицированные нуклеотиды в каждом нуклеотиде в верхнем стебле, LS1, LS5 и LS6 в нижнем стебле. В некоторых вариантах воплощения crPHK дополнительно содержит один или более из 2'-O-Ме или 2'-O-томе модифицированных нуклеотидов в 5'- и/или 3'-концевой области, например, в виде 5'- и/или 3'-концевой модификации.

В некоторых вариантах воплощения настоящее изобретение включает crPHK, содержащую 2'-F модифицированные нуклеотиды в положениях LS1, LS2 и LS6 в нижнем стебле. В некоторых вариантах воплощения crPHK дополнительно содержит 2'-F модифицированные нуклеотиды в каждом из положений B1 и B2 в области расширения. В некоторых вариантах воплощения настоящее изобретение включает crPHK, содержащую 2'-F модифицированные нуклеотиды в положениях LS1, LS2 и LS6 в нижнем стебле и каждом из положений B1 и B2 в области расширения. В некоторых вариантах воплощения crPHK дополнительно содержит один или более из 2'-O-Ме или 2'-O-томе модифицированных нуклеотидов в 5'- и/или 3'-концевой области, например, в виде 5'- и/или 3'-концевой модификации.

В некоторых вариантах воплощения crPHK содержит 2'-O-Ме модифицированные нуклеотиды в положениях LS1 и LS6 в области верхнего стебля; каждом из нуклеотидов в области расширения; и каждым из нуклеотидов в области верхнего стебля. В некоторых вариантах воплощения нуклеотид LS5 crPHK также модифицирован 2'-O-Ме. В некоторых вариантах воплощения LS2, LS3 и LS4 crPHK не являются модифицированными. В некоторых вариантах воплощения crPHK дополнительно содержит

один или более из 2'-О-Ме или 2'-О-тое модифицированных нуклеотидов в 5'- и/или 3'-концевой области, например, в виде 5'- и/или 3'-концевой модификации.

В некоторых вариантах воплощения crPHK содержит 2'-фтор (2'-F) модифицированные нуклеотиды в положениях LS1, LS2, и LS6 в области нижнего стебля и каждом из нуклеотидов в области расширения. В некоторых вариантах воплощения crPHK содержит 2'-фтор (2'-F) модифицированные нуклеотиды в положениях LS1, LS2 и LS6 в области нижнего стебля и положениях B2 и B2 в области расширения. В некоторых вариантах воплощения crPHK содержит 2'-фтор (2'-F) модифицированные нуклеотиды в положениях LS1- LS6 в области нижнего стебля и каждом из нуклеотидов в области расширения. В некоторых вариантах воплощения crPHK дополнительно содержит один или более из 2'-О-Ме или 2'-О-тое модифицированных нуклеотидов в 5'- и/или 3'-концевой области, например, в виде 5'- и/или 3'-концевой модификации.

В некоторых вариантах воплощения настоящее изобретение включает trPHK, содержащую один или более из модифицированных нуклеотидов в одной или более из следующих областей: 5'-концевой области, области верхнего стебля; области расширения; области нижнего стебля; области связки; области шпильки 1; промежуточной области между областями шпильки 1 и шпильки 2; области шпильки 2; и 3'-концевой области.

В некоторых вариантах воплощения модификация включает 2'-О-Ме.

В некоторых вариантах воплощения модификация включает 2'-F.

В некоторых вариантах воплощения модификация включает а фосфоротиоатную (PS) связь, соединяющую один или более из нуклеотидов. В некоторых вариантах воплощения модификация является тремя PS связями, соединяющими первые четыре нуклеотида в 5'-концевой области, и тремя PS связями, соединяющими последние четыре нуклеотида в 3'-концевой области.

В некоторых вариантах воплощения модификация включает инвертированный нуклеотид без основания.

В некоторых вариантах воплощения trPHK содержит 2'-О-Ме модифицированные нуклеотиды в каждом положении в верхнем стебле; в положениях B1 и B2 в области расширения; в положениях LS1 и LS2 в области нижнего стебля; в положениях N3, N4, N5, N15, N16, N17 и N18 в области связки; в каждом положении в области шпильки 1; в одном нуклеотиде между областями шпильки 1 и шпильки 2; и в каждом положении в области шпильки 2. В некоторых вариантах воплощения trPHK дополнительно содержит один или более из 2'-О-Ме или 2'-О-тое модифицированных нуклеотидов в 5'- и/или 3'-концевой области, например, в виде 5'- и/или 3'-концевой модификации.

В некоторых вариантах воплощения trPHK содержит 2'-О-Ме модифицированные нуклеотиды в каждом положении в верхнем стебле; в каждом положении в области расширения; в положениях LS1, LS2, LS5 и LS6 в области нижнего стебля; в положениях N3-N5, N10-N18 в области связки; в каждом положении в области шпильки 1; в одном нуклеотиде между областями шпильки 1 и шпильки 2; и в каждом положении в области шпильки 2. В некоторых вариантах воплощения crPHK дополнительно содержит один или более из 2'-О-Ме или 2'-О-тое модифицированных нуклеотидов в 5'- и/или 3'-концевой области, например, в виде 5'- и/или 3'-концевой модификации.

В некоторых вариантах воплощения trPHK содержит 2'-F модифицированные нуклеотиды в положениях N15 - N18 в области связки. В некоторых вариантах воплощения trPHK дополнительно содержит один или более из 2'-F модифицированных нуклеотидов в 5'- и/или 3'-концевой области, например, в виде 5'- и/или 3'-концевой модификации.

В некоторых вариантах воплощения trPHK содержит 2'-F модифицированные нуклеотиды в положениях LS4 и LS5 в области нижнего стебля и положениях N13-N18 в области связки. В некоторых вариантах воплощения trPHK дополнительно содержит один или более из 2'-F модифицированных нуклеотидов в 5'- и/или 3'-концевой области, например, в виде 5'- и/или 3'-концевой модификации.

В некоторых вариантах воплощения trPHK содержит 2'-F модифицированные нуклеотиды в положениях LS1, LS3 и LS5 в нижнем стебле и 2'-О-Ме модифицированные нуклеотиды в положениях LS2, LS4 и LS6 в нижнем стебле.

В настоящем документе в некоторых вариантах воплощения описана crispr PHK (crPHK), содержащая одну или более из модификаций в пределах одной или более из следующих областей: первых пяти нуклеотидов в 5'-концевой области; области нижнего стебля; области расширения; области верхнего стебля; и последних пяти нуклеотидов в 3'-концевой области. В некоторых вариантах воплощения модификация включает 2'-О-метил (2'-О-Ме) модифицированный нуклеотид. В некоторых вариантах воплощения модификация включает 2'-фтор (2'-F) модифицированный нуклеотид. В некоторых вариантах воплощения модификация включает фосфоротиоатную (PS) связь между нуклеотидами. В некоторых вариантах воплощения первые три нуклеотида в 5'-концевой области и последние три нуклеотида в 3'-концевой области являются модифицированными. В некоторых вариантах воплощения первые четыре нуклеотида в 5'-концевой области и последние четыре нуклеотида в 3'-концевой области соединены фосфоротиоатными (PS) связями. В некоторых вариантах воплощения модификация содержит 2'-О-Ме. В некоторых вариантах воплощения модификация включает 2'-F. В некоторых вариантах воплощения первые четыре нуклеотида в 5'-концевой области и последние четыре нуклеотида в 3'-концевой области со-

единены PS связью, причем первые три нуклеотида в 5'-концевой области и последние три нуклеотида в 3'-концевой области содержат 2'-О-Ме модификации. В некоторых вариантах воплощения первые четыре нуклеотида в 5'-концевой области и последние четыре нуклеотида в 3'-концевой области соединены PS связью, причем первые три нуклеотида в 5'-концевой области и последние три нуклеотида в 3'-концевой области содержат 2'-F модификации. В некоторых вариантах воплощения LS1 и LS6 модифицированы 2'-О-Ме. В некоторых вариантах воплощения каждый из нуклеотидов в области верхнего стебля модифицирован 2'-О-Ме.

В некоторых вариантах воплощения настоящее изобретение включает crispr РНК (сrРНК), содержащую следующие 2'-О-Ме модифицированные нуклеотиды: LS1 и LS6 в области нижнего стебля; и каждый нуклеотид в области верхнего стебля. В некоторых вариантах воплощения сrРНК дополнительно содержит три фосфоротиоатные (PS) связи, соединяющие первые четыре нуклеотида в 5'-концевой области, и три PS связи, соединяющие последние четыре нуклеотида в 3'-концевой области. В некоторых вариантах воплощения сrРНК дополнительно содержит 2'-О-Ме или 2'-F модифицированные нуклеотиды в первых трех положениях в 5'-концевой области и 2'-О-Ме или 2'-F-модифицированные нуклеотиды в последних трех положениях в 3'-концевой области. В некоторых вариантах воплощения LS1, LS2 и LS6 модифицированы 2'-F. В некоторых вариантах воплощения каждый из нуклеотидов в области расширения модифицирован 2'-F.

В настоящем документе в некоторых вариантах воплощения описана crispr РНК (сrРНК), содержащая 2'-F модифицированные нуклеотиды в следующих положениях: LS1, LS2, и LS6 в области нижнего стебля; и каждом положении в области расширения. В некоторых вариантах воплощения сrРНК дополнительно содержит три фосфоротиоатные (PS) связи, соединяющие первые четыре нуклеотида в 5'-концевой области, и три PS связи, соединяющие последние четыре нуклеотида в 3'-концевой области. В некоторых вариантах воплощения сrРНК дополнительно содержит 2'-О-Ме или 2'-F модифицированные нуклеотиды в первых трех положениях в 5'-концевой области и 2'-О-Ме или 2'-F-модифицированные нуклеотиды в последних трех положениях в 3'-концевой области.

В некоторых вариантах воплощения предложена сrРНК, содержащая нуклеиновые кислоты согласно любой одной из SEQ ID No: 1-187. В некоторых вариантах воплощения предложена сrРНК, содержащая нуклеиновые кислоты согласно любой из SEQ ID No: 19-31, 53-73, 104-130 и 161-187. В некоторых вариантах воплощения предложена сrРНК, содержащая нуклеиновые кислоты, обладающие по меньшей мере 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 85, 80, 75 или 70% идентичностью по отношению к нуклеиновым кислотам согласно любой из SEQ ID No: 19-31, 53-73, 104-130 и 161-187, в которой шаблон модификации идентичен шаблону модификации, представленному в эталонном идентификаторе последовательности. В некоторых вариантах воплощения сrРНК дополнительно содержит три фосфоротиоатные (PS) связи, соединяющие первые четыре нуклеотида в 5'-концевой области, и три PS связи, соединяющие последние четыре нуклеотида в 3'-концевой области.

Кроме того, настоящее изобретение включает tracr РНК (trРНК), содержащую одну или более из модификаций в одной или более из следующих областей: первых пяти нуклеотидах в 5'-концевой области; области верхнего стебля; области расширения; области нижнего стебля; области связки; области шпильки 1; области шпильки 2; и последних пяти нуклеотидов в 3'-концевой области. В некоторых вариантах воплощения модификация включает 2'-О-метил (2'-О-Ме) модифицированный нуклеотид. В некоторых вариантах воплощения модификация включает 2'-фтор (2'-F) модифицированный нуклеотид. В некоторых вариантах воплощения модификация включает фосфоротиоатную (PS) связь между нуклеотидами. В некоторых вариантах воплощения первые четыре нуклеотида в 5'-концевой области и последние четыре нуклеотида в 3'-концевой области соединены фосфоротиоатными (PS) связями. В некоторых вариантах воплощения первые три нуклеотида в 5'-концевой области и последние три нуклеотида в 3'-концевой области являются модифицированными. В некоторых вариантах воплощения модификация содержит 2'-О-Ме. В некоторых вариантах воплощения модификация включает 2'-F. В некоторых вариантах воплощения первые четыре нуклеотида в 5'-концевой области и последние четыре нуклеотида в 3'-концевой области соединены PS связью, причем первые три нуклеотида в 5'-концевой области и последние три нуклеотида в 3'-концевой области содержат 2'-О-Ме модификации. В некоторых вариантах воплощения первые четыре нуклеотида в 5'-концевой области и последние четыре нуклеотида в 3'-концевой области соединены PS связью, причем первые три нуклеотида в 5'-концевой области и последние три нуклеотида в 3'-концевой области содержат 2'-F модификации. В некоторых вариантах воплощения каждый нуклеотид в области верхнего стебля модифицирован 2'-О-Ме. В некоторых вариантах воплощения B1 и B2 в области расширения модифицированы 2'-О-Ме. В некоторых вариантах воплощения N3, N4, N5, N15, N16, N17 и N18 в области связки модифицированы 2'-О-Ме. В некоторых вариантах воплощения каждый нуклеотид в области шпильки 1 модифицирован 2'-О-Ме. В некоторых вариантах воплощения каждый нуклеотид в области шпильки 2 модифицирован 2'-О-Ме.

В некоторых вариантах воплощения настоящее изобретение включает tracr РНК (trРНК), содержащую 2'-О-Ме модифицированные нуклеотиды в следующих положениях: каждом положении в верхнем стебле; положениях B1 и B2 в области расширения; положениях N3, N4, N5, N15, N16, N17 и N18 в области связки; каждом положении в области шпильки 1; и каждом положении в области шпильки 2. В не-

которых вариантах воплощения tРНК дополнительно содержит три фосфоротиоатные (PS) связи, соединяющие первые четыре нуклеотида в 5'-концевой области, и три PS связи, соединяющие последние четыре нуклеотида в 3'-концевой области. В некоторых вариантах воплощения tРНК дополнительно содержит 2'-О-Ме или 2'-F модифицированные нуклеотиды в первых трех положениях в 5'-концевой области и 2'-О-Ме или 2'-F модифицированные нуклеотиды в последних трех положениях в 3'-концевой области. В некоторых вариантах воплощения N15, N16, N17 и N18 модифицированы 2'-F. В некоторых вариантах воплощения LS1, LS3 и LS5 модифицированы 2'-F, а LS2, LS4 и LS6 модифицированы 2'-О-Ме. В некоторых вариантах воплощения tРНК дополнительно содержит три фосфоротиоатные (PS) связи, соединяющие первые четыре нуклеотида в 5'-концевой области, и три PS связи, соединяющие последние четыре нуклеотида в 3'-концевой области. В некоторых вариантах воплощения tРНК дополнительно содержит 2'-О-Ме или 2'-F модифицированные нуклеотиды в первых трех положениях в 5'-концевой области и 2'-О-Ме или 2'-F модифицированные нуклеотиды в последних трех положениях в 3'-концевой области.

В некоторых вариантах воплощения предложена tРНК, содержащая нуклеиновые кислоты согласно любой из SEQ ID No: 188-227. В некоторых вариантах воплощения предложена tРНК, содержащая нуклеиновые кислоты, обладающие по меньшей мере 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 85, 80, 75 или 70% идентичностью по отношению к нуклеиновым кислотам согласно любой из SEQ ID No: 188-227, в которой шаблон модификации идентичен шаблону модификации, представленному в эталонном идентификаторе последовательности. В некоторых вариантах воплощения tРНК дополнительно содержит три фосфоротиоатные (PS) связи, соединяющие первые четыре нуклеотида в 5'-концевой области, и три PS связи, соединяющие последние четыре нуклеотида в 3'-концевой области.

В некоторых случаях предложена двойная направляющая РНК, содержащая сгРНК и tРНК, в которой сгРНК содержит нуклеиновые кислоты согласно любой из SEQ ID No: 1-187, а tРНК содержит нуклеиновые кислоты согласно любой из SEQ ID No: 188-227.

Настоящее изобретение включает двойную направляющую РНК, содержащую сгРНК, описанную в настоящем документе, и tRNA, описанную в настоящем документе, как и двойная направляющая РНК, содержащая сгРНК, описанную в настоящем документе, и немодифицированную tРНК. В некоторых вариантах воплощения предложена двойная направляющая РНК, содержащая немодифицированную сгРНК и модифицированную tРНК, описанную в настоящем документе.

В некоторых вариантах воплощения настоящее изобретение включает все следующие компоненты.

Вариант воплощения 55. Crispr РНК (сгРНК), содержащая одну или более из модификаций в одной или более из следующих областей:

- первых пяти нуклеотидах в 5'-концевой области;
- области нижнего стебля;
- области расширения;
- области верхнего стебля; и
- последних пяти нуклеотидах в 3'-концевой области.

Вариант воплощения 56. сгРНК согласно варианту воплощения 55, в которой модификация включает 2'-О-метил (2'-О-Ме) модифицированный нуклеотид.

Вариант воплощения 57. сгРНК согласно варианту воплощения 55, в которой модификация включает 2'-фтор (2'-F) модифицированный нуклеотид.

Вариант воплощения 58. сгРНК согласно варианту воплощения 55, в которой модификация включает фосфоротиоатную (PS) связь между нуклеотидами.

Вариант воплощения 59. сгРНК согласно любому из вариантов воплощения 55-58, в которой первые три нуклеотида в 5'-концевой области и последние три нуклеотида в 3'-концевой области являются модифицированными.

Вариант воплощения 60. сгРНК согласно любому из вариантов воплощения 55-58, в которой первые четыре нуклеотида в 5'-концевой области и последние четыре нуклеотида в 3'-концевой области соединены фосфоротиоатными (PS) связями.

Вариант воплощения 61. сгРНК согласно варианту воплощения 59, в которой модификация включает 2'-О-Ме.

Вариант воплощения 62. сгРНК согласно варианту воплощения 59, в которой модификация включает 2'-F.

Вариант воплощения 63. сгРНК согласно любому из вариантов воплощения 55-62, в которой первые четыре нуклеотида в 5'-концевой области и последние четыре нуклеотида в 3'-концевой области соединены PS связью, и в которой первые три нуклеотида в 5'-концевой области и последние три нуклеотида в 3'-концевой области содержат 2'-О-Ме модификации.

Вариант воплощения 64. сгРНК согласно любому из вариантов воплощения 55-62, в которой первые четыре нуклеотида в 5'-концевой области и последние четыре нуклеотида в 3'-концевой области соединены PS связью, и в которой первые три нуклеотида в 5'-концевой области и последние три нуклеотида в 3'-концевой области содержат 2'-F модификации.

Вариант воплощения 65. сгРНК согласно любому из вариантов воплощения 55-60, в которой LS1 и

LS6 модифицированы 2'-О-Ме.

Вариант воплощения 66. crPHK согласно любому из вариантов воплощения 55-60 и 65, в которой каждый из нуклеотидов в области верхнего стебля модифицирован 2'-О-Ме.

Вариант воплощения 67. Crispr PHK (crPHK), содержащая 2'-О-Ме модифицированные нуклеотиды в положениях:

LS1 и LS6 в области нижнего стебля; и  
каждом нуклеотиде в области верхнего стебля.

Вариант воплощения 68. crPHK согласно варианту воплощения 67, дополнительно содержащая три фосфоротиоатные (PS) связи, соединяющие первые четыре нуклеотида в 5'-концевой области, и три PS связи, соединяющие последние четыре нуклеотида в 3'-концевой области.

Вариант воплощения 69. crPHK согласно варианту воплощения 67 или 68, дополнительно содержащая 2'-О-Ме или 2'-F модифицированные нуклеотиды в первых трех нуклеотидах в 5'-концевой области, и 2'-О-Ме или 2'-F модифицированные нуклеотиды в последних трех нуклеотидах в 3'-концевой области.

Вариант воплощения 70. crPHK согласно любому из вариантов воплощения 55-60, в которой LS1, LS2 и LS6 модифицированы 2'-F.

Вариант воплощения 71. crPHK согласно любому из вариантов воплощения 55-60 и 70, в которой каждый нуклеотид в области расширения модифицирован 2'-F.

Вариант воплощения 72. Crispr PHK (crPHK), содержащая 2'-F модифицированные нуклеотиды в: положениях LS1, LS2 и LS6 в области нижнего стебля; и  
каждом нуклеотиде в области расширения.

Вариант воплощения 73. crPHK согласно любому из вариантов воплощения 70-72, дополнительно содержащая три фосфоротиоатные (PS) связи, соединяющие первые четыре нуклеотида в 5'-концевой области и три PS связи, соединяющие последние четыре нуклеотида в 3'-концевой области.

Вариант воплощения 74. crPHK согласно варианту воплощения 72 или 73, дополнительно содержащая 2'-О-Ме или 2'-F модифицированные нуклеотиды в первых трех нуклеотидах в 5'-концевой области, и 2'-О-Ме или 2'-F модифицированные нуклеотиды в последних трех нуклеотидах в 3'-концевой области.

Вариант воплощения 75. crPHK, содержащая нуклеиновые кислоты согласно любой из SEQ ID No: 1-187.

Вариант воплощения 76. crPHK, содержащая нуклеиновые кислоты согласно любой из SEQ ID No: 19-31, 53-73, 104-130, и 161-187.

Вариант воплощения 77. crPHK, содержащая нуклеиновые кислоты, обладающие по меньшей мере 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 85, 80, 75 или 70% идентичностью по отношению к нуклеиновым кислотам согласно любой одной из SEQ ID No: 19-31, 53-73, 104-130 и 161-187, в которой шаблон модификации идентичен шаблону модификации, представленному в эталонном идентификаторе последовательности.

Вариант воплощения 78. crPHK согласно любому из вариантов воплощения 75-77, дополнительно содержащая три фосфоротиоатные (PS) связи, соединяющие первые четыре нуклеотида в 5'-концевой области и три PS связи, соединяющие последние четыре нуклеотида в 3'-концевой области.

Вариант воплощения 79. Tracr PHK (trPHK), содержащая одну или более из модификаций в одной или более из следующих областей:

первых пяти нуклеотидах в 5'-концевой области;  
области верхнего стебля;  
области расширения;  
области нижнего стебля;  
области связки;  
области шпильки 1;  
области шпильки 2; и  
последних пяти нуклеотидах в 3'-концевой области.

Вариант воплощения 80. trPHK согласно варианту воплощения 79, в которой модификация включает 2'-О-метил (2'-О-Ме) модифицированный нуклеотид.

Вариант воплощения 81. trPHK согласно варианту воплощения 79, в которой модификация включает 2'-фтор (2'-F) модифицированный нуклеотид.

Вариант воплощения 82. trPHK согласно варианту воплощения 79, в которой модификация включает фосфоротиоатную (PS) связь между нуклеотидами.

Вариант воплощения 83. trPHK согласно любому из вариантов воплощения 79-82, в которой первые четыре нуклеотида в 5'-концевой области и последние четыре нуклеотида в 3'-концевой области соединены фосфоротиоатными (PS) связями.

Вариант воплощения 84. trPHK согласно любому из вариантов воплощения 79-82, в которой первые три нуклеотида в 5'-концевой области и последние три нуклеотида в 3'-концевой области являются модифицированными.

Вариант воплощения 85. тРНК согласно варианту воплощения 84, в которой модификация включает 2'-О-Ме.

Вариант воплощения 86. тРНК согласно варианту воплощения 84, в которой модификация включает 2'-F.

Вариант воплощения 87. тРНК согласно любому из вариантов воплощения 79-86, в которой первые четыре нуклеотида в 5'-концевой области и последние четыре нуклеотида в 3'-концевой области соединены PS связью, и первые три нуклеотида в 5'-концевой области и последние три нуклеотида в 3'-концевой области содержат 2'-О-Ме модификации.

Вариант воплощения 88. тРНК согласно любому из вариантов воплощения 79-86, в которой первые четыре нуклеотида в 5'-концевой области и последние четыре нуклеотида в 3'-концевой области соединены PS связью, и первые три нуклеотида в 5'-концевой области и последние три нуклеотида в 3'-концевой области содержат 2'-F модификации.

Вариант воплощения 89. тРНК согласно любому из вариантов воплощения 79-84, в которой каждый нуклеотид в области верхнего стебля модифицирован 2'-О-Ме.

Вариант воплощения 90. тРНК согласно любому из вариантов воплощения 79-84 и 89, в которой В1 и В2 в области расширения модифицированы 2'-О-Ме.

Вариант воплощения 91. тРНК согласно любому из вариантов воплощения 79-84 и 89-90, в которой N3, N4, N5, N15, N16, N17 и N18 в области связки модифицированы 2'-О-Ме.

Вариант воплощения 92. тРНК согласно любому из вариантов воплощения 79-84 и 89-91, в которой каждый нуклеотид в области шпильки 1 модифицирован 2'-О-Ме.

Вариант воплощения 93. тРНК согласно любому из вариантов воплощения 79-84 и 89-92, в которой каждый нуклеотид в области шпильки 2 модифицирован 2'-О-Ме.

Вариант воплощения 94. Тгас РНК (тРНК), содержащая 2'-О-Ме модифицированные нуклеотиды в:

- каждом нуклеотиде в верхнем стебле;
- В1 и В2 в области расширения;
- N3, N4, N5, N15, N16, N17 и N18 в области связки;
- каждом нуклеотиде в области шпильки 1; и
- каждом нуклеотиде в области шпильки 2.

Вариант воплощения 95. тРНК согласно варианту воплощения 94, дополнительно содержащая три фосфоротиоатные (PS) связи, соединяющие первые четыре нуклеотида в 5'-концевой области, и три PS связи, соединяющие последние четыре нуклеотида в 3'-концевой области.

Вариант воплощения 96. сРНК согласно варианту воплощения 94 или 95, дополнительно содержащая 2'-О-Ме или 2'-F модифицированные нуклеотиды в первых трех положениях в 5'-концевой области, и 2'-О-Ме или 2'-F модифицированные нуклеотиды в последних трех положениях в 3'-концевой области.

Вариант воплощения 97. тРНК согласно любому из вариантов воплощения 79-84, в которой N15, N16, N17 и N18 модифицированы 2'-F.

Вариант воплощения 98. тРНК согласно любому из вариантов воплощения 79-84 и 97, в которой LS1, LS3 и LS5 модифицированы 2'-F, а LS2, LS4 и LS6 модифицированы 2'-О-Ме.

Вариант воплощения 99. тРНК согласно любому из вариантов воплощения 87-98, дополнительно содержащая три фосфоротиоатные (PS) связи, соединяющие первые четыре нуклеотида в 5'-концевой области, и три PS связи, соединяющие последние четыре нуклеотида в 3'-концевой области.

Вариант воплощения 100. тРНК согласно варианту воплощения 98 или 99, дополнительно содержащая 2'-О-Ме или 2'-F модифицированные нуклеотиды в первых трех положениях в 5'-концевой области, и 2'-О-Ме или 2'-F модифицированные нуклеотиды в последних трех нуклеотидах в 3'-концевой области.

Вариант воплощения 101. тРНК, содержащая нуклеиновые кислоты согласно любой одной из SEQ ID No: 188-227.

Вариант воплощения 102. тРНК, содержащая нуклеиновые кислоты, обладающие по меньшей мере 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 85, 80, 75 или 70% идентичностью по отношению к нуклеиновым кислотам согласно любой одной из SEQ ID No: 188-227, в которой шаблон модификации идентичен шаблону модификации, представленному в эталонном идентификаторе последовательности.

Вариант воплощения 103. тРНК согласно любому из вариантов воплощения 101-102, дополнительно содержащая три фосфоротиоатные (PS) связи, соединяющие первые четыре нуклеотида в 5'-концевой области, и три PS связи, соединяющие последние четыре нуклеотида в 3'-концевой области.

Вариант воплощения 104. Двойная направляющая РНК, содержащая сРНК и тРНК, в которой сРНК содержит нуклеотиды согласно любой одной из SEQ ID No: 1-187, а тРНК содержит нуклеиновые кислоты согласно любой одной из SEQ ID No: 188-227.

Вариант воплощения 105. Двойная направляющая РНК, содержащая сРНК согласно любому из вариантов воплощения 55-7 8 и тРНК согласно любому из вариантов воплощения 79-103.

Вариант воплощения 106. Двойная направляющая РНК, содержащая сРНК согласно любому из ва-

риантов воплощения 55-7 8 и немодифицированную tРНК.

Вариант воплощения 107. Двойная направляющая РНК, содержащая немодифицированную сРНК и tРНК согласно любому из вариантов воплощения 79-103.

Модификации концевых нуклеотидов.

В некоторых вариантах воплощения 5' или 3'-концевые нуклеотиды любой из направляющих РНК, описанных в настоящем документе, являются модифицированными.

В некоторых вариантах воплощения концевые (т.е. последние) 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 нуклеотидов в 3'-концевой области направляющей РНК, включая, например, sgРНК, dgРНК, сРНК, tРНК, или как сРНК, так и tРНК, являются модифицированными.

В некоторых вариантах воплощения концевые (т.е. последние) 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 нуклеотидов в 3'-концевой области направляющей РНК содержат более одной модификации.

В некоторых вариантах воплощения по меньшей мере один из концевых (т.е. последних) 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 нуклеотидов в 3'-концевой области является модифицированным.

В некоторых вариантах воплощения по меньшей мере два из концевых (т.е. последних) 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 нуклеотидов в 3'-концевой области являются модифицированными.

В некоторых вариантах воплощения по меньшей мере три из концевых (т.е. последних) 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 нуклеотидов в 3'-концевой области являются модифицированными.

В некоторых вариантах воплощения модификация включает PS соединение.

В некоторых вариантах воплощения 5'-конец 5'-концевой области является модифицированным, например, первые 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 нуклеотидов sgРНК, dgРНК, сРНК, tРНК или как сРНК, так и tРНК являются модифицированными.

В некоторых вариантах воплощения первые 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 нуклеотидов в 3'-концевой области направляющей РНК содержат более одной модификации. В некоторых вариантах воплощения по меньшей мере один из концевых (т.е. первых) 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 нуклеотидов на 5'-конце являются модифицированными.

В некоторых вариантах воплощения по меньшей мере два из концевых 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 нуклеотидов на 5'-конце являются модифицированными. В некоторых вариантах воплощения по меньшей мере три из концевых 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 нуклеотидов на 5'-конце являются модифицированными.

В некоторых вариантах воплощения модификация включает PS соединение.

В некоторых вариантах воплощения как 5'-, так и 3'-концевые области (например, концы) направляющей РНК, например, sgРНК, dgРНК, сРНК, tРНК или как сРНК, так и tРНК являются модифицированными. В некоторых вариантах воплощения только 5'-концевая область направляющей РНК, например, sgРНК, dgРНК, сРНК, tРНК или как сРНК, так и tРНК является модифицированной.

В некоторых вариантах воплощения только 3'-концевая область направляющей РНК, например, sgРНК, dgРНК, сРНК, tРНК или как сРНК, так и tРНК является модифицированной.

В некоторых вариантах воплощения gРНК содержит модификации в 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 из первых 7 нуклеотидов на 5'-конце gРНК. В некоторых вариантах воплощения gРНК содержит модификации в 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 из 7 концевых нуклеотидов на 3'-конце.

В некоторых вариантах воплощения 2, 3 или 4 из первых 4 нуклеотидов на 5'-конце и/или 2, 3 или 4 из концевых 4 нуклеотидов на 3'-конце являются модифицированными.

В некоторых вариантах воплощения 2, 3 или 4 из первых 4 нуклеотидов на 5'-конце соединены фосфоротиоатными (PS) связями.

В некоторых вариантах воплощения модификация в 5'-концевой области и/или 3'-концевой области содержит 2'-О-метил (2'-О-Ме) или 2'-О-(2-метоксиэтил) (2'-О-мое) модификацию нуклеотида. В некоторых вариантах воплощения модификация включает 2'-фтор (2'-F) модификацию нуклеотида. В некоторых вариантах воплощения модификация включает фосфоротиоатное (PS) соединение между нуклеотидами. В некоторых вариантах воплощения модификация включает инвертированный нуклеотид без основания. В некоторых вариантах воплощения модификация включает более чем одну модификацию, выбранную из 2'-О-Ме, 2'-О-мое, 2'-фтор (2'-F), фосфоротиоатной (PS) связи между нуклеотидами и инвертированного нуклеотида без основания. Некоторые варианты воплощения включают эквивалентную модификацию.

В некоторых вариантах воплощения направляющая РНК, например, sgРНК, dgРНК, сРНК, tРНК или как сРНК, так и tРНК содержит одно или более из фосфоротиоатных (PS) соединений между первыми одним, двумя, тремя, четырьмя, пятью, шестью или семью нуклеотидами в 5'-концевой области. В некоторых вариантах воплощения направляющая РНК, например, sgРНК, dgРНК, сРНК, tРНК или как сРНК, так и tРНК содержит одно или более из PS соединений между последними одним, двумя, тремя, четырьмя, пятью, шестью или семью нуклеотидами в 3'-концевой области. В некоторых вариантах воплощения направляющая РНК, например, sgРНК, dgРНК, сРНК, tРНК или как сРНК, так и tРНК содержит одно или более из PS соединений между последними одним, двумя, тремя, четырьмя, пятью, шестью или семью нуклеотидами как в 5'-концевой, так и в 3'-концевой области. В некоторых вариантах воплощения в дополнение к PS связям 5'- и 3'-концевые нуклеотиды могут содержать 2'-О-Ме, 2'-О-мое или 2'-F модифицированные нуклеотиды.

В некоторых вариантах воплощения направляющая РНК, например, sgРНК, dgРНК, crРНК, trРНК или как crРНК, так и trРНК содержит модифицированные нуклеотиды в 5'- и 3'-концевой области и модифицированные нуклеотиды в одной или более из других областей, описанных в табл. 1-3 и на фиг. 21А или 21С.

В некоторых вариантах воплощения crРНК, trРНК или как crРНК, так и trРНК содержит модифицированные нуклеотиды, не находящиеся на 5'- или 3'-концах. Конкретные шаблоны модификации описаны ниже и в табл. 4.

### 3. Доставка gРНК и белка Cas.

В некоторых вариантах воплощения в дополнение к по меньшей мере одной gРНК в настоящем документе предложены композиции, дополнительно содержащие нуклеазу. В некоторых вариантах воплощения нуклеаза является белком Cas. В некоторых вариантах воплощения gРНК совместно с белком Cas называют РНП Cas. В некоторых вариантах воплощения белок Cas получен из системы CRISPR/Cas II типа. В некоторых вариантах воплощения белок Cas является Cas9. В некоторых вариантах воплощения белок Cas9 является Cas9 дикого типа. В некоторых вариантах воплощения белок Cas9 получен из белка Cas9 *Streptococcus pyogenes*, например, Cas9 *S. pyogenes*. В некоторых вариантах воплощения белок Cas9 получен не из *S. pyogenes*, однако функционирует аналогично Cas9 *S. pyogenes*, например, gРНК, специфичная по отношению к Cas9 *S. pyogenes*, может обеспечивать специфичность Cas9, полученного не из *S. pyogenes*, по отношению к ее сайту-мишени. В некоторых вариантах воплощения Cas индуцирует двуцепочечный разрыв в ДНК-мишени. Варианты воплощения, описанные в настоящем документе, включают эквиваленты белка Cas9 *S. pyogenes*.

Cas9 охватывает его модифицированные формы и варианты. Модифицированные версии Cas9, содержащие один неактивный каталитический домен (RuvC или HNH), называют "никазами". Никазы разрезают только одну цепь ДНК-мишени, таким образом создавая одноцепочечный разрыв. Одноцепочечный разрыв также может быть известен под названием "ник". В некоторых вариантах воплощения композиции и способы включают никазы. В некоторых вариантах воплощения композиции и способы включают никазу Cas9, индуцирующую ник, а не двуцепочечный разрыв в ДНК-мишени.

В некоторых вариантах воплощения белок Cas может быть модифицирован и содержать только один функциональный нуклеазный домен. Например, белок Cas можно модифицировать так, что один из нуклеазных доменов мутируют или полностью или частично удаляют с целью снижения его активности по гидролизу нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах воплощения применяют никазу Cas, содержащую домен RuvC с пониженной активностью. В некоторых вариантах воплощения применяют никазу Cas, содержащую неактивный домен RuvC. В некоторых вариантах воплощения применяют никазу Cas, содержащую домен HNH с пониженной активностью. В некоторых вариантах воплощения применяют никазу Cas, содержащую неактивный домен HNH.

В некоторых вариантах воплощения консервативную аминокислоту в нуклеазном домене белка Cas заменяют с целью снижения или модификации нуклеазной активности. В некоторых вариантах воплощения белок Cas может содержать аминокислотный заместитель в RuvC или RuvC-подобном нуклеазном домене. Типичные аминокислотные заместители в RuvC или RuvC-подобном нуклеазном домене включают D10A (на основе белка Cas9 *S. pyogenes*). В некоторых вариантах воплощения белок Cas может содержать аминокислотный заместитель в HNH или HNH-подобном нуклеазном домене. Типичные аминокислотные заместители в HNH или HNH-подобном нуклеазном домене включают E762A, H840A, N863A, H983A и D986A (на основе белка Cas9 *S. pyogenes*).

В некоторых вариантах воплощения комплекс РНК, описанный в настоящем документе, содержит никазу и пару направляющих РНК, комплементарных смысловой и антисмысловой цепям последовательности-мишени, соответственно. В данном варианте воплощения направляющие РНК обеспечивают специфичность никазы по отношению к последовательности-мишени и внедрение двуцепочечного разрыва (DSB) путем получения ника на противоположных цепях последовательности-мишени (т.е. получения двойного ника). В некоторых вариантах воплощения использование двойного ника может улучшить специфичность и снизить неспецифические эффекты. В некоторых вариантах воплощения никазу Cas применяют совместно с двумя отдельными направляющими РНК, оказывающими адресное воздействие на противоположные цепи ДНК с получением двойного ника в ДНК-мишени. В некоторых вариантах воплощения никазу Cas применяют совместно с двумя отдельными направляющими РНК, выбранными на основании их близкого расположения, позволяющего получить двойной ник в ДНК-мишени.

В некоторых вариантах воплощения применяют химерные белки Cas, в которых один домен или область белка замещают фрагментом другого белка. В некоторых вариантах воплощения нуклеазный домен Cas можно заместить доменом другой нуклеазы, например, FokI. В некоторых вариантах воплощения белок Cas может быть модифицированной нуклеазой.

В некоторых вариантах воплощения белок Cas содержит гибридный белок, содержащий каталитически неактивный Cas9, присоединенный к гетерологичному функциональному домену (см., например, WO2014152432). В некоторых вариантах воплощения каталитически неактивный Cas9 получают из *S. pyogenes*. В некоторых вариантах воплощения каталитически неактивный Cas9 содержит мутации, инактивирующие Cas9. В некоторых вариантах воплощения гетерологичный функциональный домен являет-

ся доменом, модифицирующим экспрессию гена, гистоны или ДНК. В некоторых вариантах воплощения гетерологичный функциональный домен является доменом активации транскрипции или доменом репрессии транскрипции.

РАМ.

В некоторых вариантах воплощения последовательность-мишень может располагаться рядом с РАМ. В некоторых вариантах воплощения РАМ может располагаться рядом с последовательностью-мишенью или в пределах 1, 2, 3 или 4 нуклеотидов от ее 3'-конца. Длина и последовательность РАМ может зависеть от используемого белка Cas. Например, РАМ можно выбрать из консенсусной или частной последовательности РАМ конкретного белка Cas9 или ортолога Cas9, в том числе последовательностей, описанных на фиг. 1 статьи Ran et al., Nature 520:186-191 (2015), включенной в настоящий документ посредством ссылки. В некоторых вариантах воплощения длина РАМ может составлять 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов. Неограничивающие типичные последовательности РАМ включают NGG, NAG, NGA, NGAG, NGCG, NNGRRT, TTN, NGGNG, NG, NAAAAN, NAAAAAW, NNNNACA, GNNNCNA и NNNNGATT (где N обозначает любой нуклеотид, W обозначает A или T, а R обозначает A или G). В некоторых вариантах воплощения последовательность РАМ может быть NGG. В некоторых вариантах воплощения последовательность РАМ может быть NGGNG. В некоторых вариантах воплощения последовательность РАМ может быть NAAAAAW.

Доставка модифицированной gРНК.

Липидные наночастицы (LNP) являются хорошо известными средствами доставки груза нуклеотидов и белка, которые можно применять для доставки gРНК, мРНК, Cas9 и РНП, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах воплощения LNP используют для доставки нуклеиновой кислоты, белка или нуклеиновой кислоты вместе с белком.

В некоторых вариантах воплощения настоящее изобретение включает способ доставки любой из gРНК, описанных в настоящем документе, в организм субъекта, причем gРНК ассоциирована с LNP. В некоторых вариантах воплощения gРНК/LNP также ассоциирован с Cas9 или мРНК, кодирующей Cas9.

В некоторых вариантах воплощения настоящее изобретение включает композицию, содержащую любую одну из описанных gРНК и LNP. В некоторых вариантах воплощения композиция дополнительно содержит Cas9 или мРНК, кодирующую Cas9.

В некоторых вариантах воплощения LNP содержат катионные липиды. В некоторых вариантах воплощения LNP содержат (9Z12Z)-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-диеноатом). В некоторых вариантах воплощения LNP содержат молярные соотношения амина катионного липида и фосфата РНК (N:P), составляющие приблизительно 4,5.

В некоторых вариантах воплощения LNP, ассоциированные с gРНК, описанной в настоящем документе, предназначены для применения при получении медикамента для лечения заболевания или расстройства.

Электропорация является хорошо известным средством доставки груза, и любую методологию электропорации можно применять для доставки любой из gРНК, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах воплощения электропорацию можно применять для доставки любой одной из gРНК, описанных в настоящем документе, и Cas9 или мРНК, кодирующей Cas9.

В некоторых вариантах воплощения настоящее изобретение включает способ доставки любой одной из gРНК, описанных в настоящем документе, в клетку ex vivo, причем gРНК ассоциирована с LNP или не ассоциирована с LNP. В некоторых вариантах воплощения gРНК/LNP или gРНК также ассоциирована с Cas9 или мРНК, кодирующей Cas9.

4. Способы модуляции генов.

В некоторых вариантах воплощения настоящее изобретение включает фармацевтический состав, содержащий любую из gРНК, описанных в настоящем документе, вместе с фармацевтически приемлемым носителем. В некоторых вариантах воплощения настоящее изобретение включает фармацевтический состав, содержащий любую одну из gРНК, описанных в настоящем документе, и LNP вместе с фармацевтически приемлемым носителем. В некоторых вариантах воплощения настоящее изобретение включает фармацевтический состав, содержащий любую одну из gРНК, описанных в настоящем документе, белок Cas9 или мРНК, кодирующую белок Cas9, и LNP вместе с фармацевтически приемлемым носителем. В некоторых вариантах воплощения фармацевтический состав предназначен для применения при получении медикамента для лечения заболевания или расстройства. В некоторых вариантах воплощения настоящее изобретение включает способ лечения пациента-человека, включающий введение любой из gРНК или фармацевтических составов, описанных в настоящем документе.

В некоторых вариантах воплощения настоящее изобретение включает способ или применение, модифицирующие ДНК-мишень, включающие введение или доставку белка Cas или мРНК Cas и одной или более gРНК, описанных в настоящем документе.

В некоторых вариантах воплощения настоящее изобретение включает способ или применение для модуляции гена-мишени, включающие введение или доставку белка Cas или мРНК Cas и любой одной

или более из gРНК, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах воплощения модуляция является редактированием гена-мишени. В некоторых вариантах воплощения модуляция является изменением экспрессии белка, кодируемого геном-мишенью.

В некоторых вариантах воплощения способ или применение приводят к редактированию гена. В некоторых вариантах воплощения способ или применение приводят к образованию двуцепочечного разрыва в гене-мишени. В некоторых вариантах воплощения способ или применения приводит к образованию инсерционно-делеционной мутации во время негомологичного соединения концов DSB. В некоторых вариантах воплощения способ или применение приводят к инсерции или делеции нуклеотидов в гене-мишени. В некоторых вариантах воплощения инсерция или делеция нуклеотидов в гене-мишени приводит к мутации сдвига рамки считывания или появлению преждевременного стоп-кодона, что приводит к получению нефункционального белка. В некоторых вариантах воплощения инсерция или делеция нуклеотидов в гене-мишени приводит к нокдауну или устранению экспрессии гена-мишени. В некоторых вариантах воплощения способ или применение включает гомологичную специфическую репарацию DSB. В некоторых вариантах воплощения способ или применение дополнительно включает доставку матрицы в клетку, причем по меньшей мере часть матрицы включается в ДНК-мишень в сайте двуцепочечного разрыва, индуцируемого белком Cas, или рядом с ним.

В некоторых вариантах воплощения способ или применение приводит к модуляции гена. В некоторых вариантах воплощения модуляция гена является усилением или ослаблением экспрессии гена, изменением состояния метилирования ДНК или модификацией субъединицы гистона. В некоторых вариантах воплощения способ или применение приводит к усилению или ослаблению экспрессии белка, кодируемого геном-мишенью.

В некоторых вариантах воплощения любую из gРНК, описанных в настоящем документе, можно применять при получении медикамента для лечения заболевания или расстройства.

Меры модуляции гена.

Эффективность модифицированных gРНК можно тестировать *in vitro* и *in vivo*. В некоторых вариантах воплощения настоящее изобретение включает одну или более из gРНК, описанных в настоящем документе, причем gРНК приводит к модуляции гена при ее попадании в клетку вместе с Cas9. В некоторых вариантах воплощения эффективность gРНК можно измерить в ходе анализов *in vitro* или *in vivo*.

1. Измерение эффективности Cas *in vitro*.

В некоторых вариантах воплощения активность РНП Cas, содержащего модифицированную sgРНК, сравнивают с активностью РНП Cas, содержащего немодифицированную sgРНК.

В некоторых вариантах воплощения активность РНП Cas, содержащего dgРНК, содержащую модифицированную trРНК, сравнивают с активностью РНП Cas, содержащего dgРНК, содержащую немодифицированную trРНК.

В некоторых вариантах воплощения активность РНП Cas, содержащего dgРНК, содержащую модифицированную sgРНК, сравнивают с активностью РНП Cas, содержащего dgРНК, содержащую немодифицированную sgРНК.

В некоторых вариантах воплощения активность РНП Cas, содержащего dgРНК, содержащую модифицированную sgРНК и модифицированную trРНК, сравнивают с активностью РНП Cas, содержащего немодифицированную sgРНК и немодифицированную trРНК.

В некоторых вариантах воплощения эффективность gРНК при увеличении или ослаблении экспрессии белка-мишени определяют путем измерения количества белка-мишени. В некоторых вариантах воплощения настоящее изобретение включает любую одну из gРНК, описанных в настоящем документе, причем gРНК увеличивает или уменьшает количество белка, продуцированного с гена-мишени. В некоторых вариантах воплощения настоящее изобретение включает способ модулирования экспрессии белка, включающий введение любой одной из gРНК, описанных в настоящем документе, субъекту, причем gРНК обеспечивает специфичность Cas9 по отношению к гену, кодирующему белок-мишень, и экспрессия гена-мишени усиливается или ослабляется по сравнению с контрольной gРНК, не обеспечивающей адресное воздействие Cas9 на указанный ген.

В некоторых вариантах воплощения эффективность редактирования с помощью специфических gРНК определяют путем редактирования, присутствующего в местоположении мишени в геноме после доставки Cas9 и gРНК (sgРНК или dgРНК, содержащей sgРНК и trРНК). В некоторых вариантах воплощения эффективность редактирования с помощью специфических gРНК измеряют с помощью секвенирования нового поколения. В некоторых вариантах воплощения определяют процент редактирования исследуемой области-мишени. В некоторых вариантах воплощения измеряют общее количество считанных фрагментов с инсерциями или делециями нуклеотидов в исследуемой области-мишени по сравнению с общим количеством считанных фрагментов последовательности после доставки gРНК и Cas9. В некоторых вариантах воплощения настоящее изобретение включает способ увеличения эффективности редактирования генов, включающий введение или доставку любой одной из модифицированных gРНК, описанных в настоящем документе, в клетку, причем процент редактирования гена увеличивается по сравнению с контрольной gРНК, не модифицированной аналогичным образом.

В некоторых вариантах воплощения эффективность редактирования с использованием конкретных

gРНК измеряют по наличию инсерций или делеций нуклеотидов, внедренных при успешном редактировании гена. В некоторых вариантах воплощения настоящее изобретение включает способ создания инсерций или делеций нуклеотидов в генах, включающий введение или доставку любой одной из модифицированных gРНК, описанных в настоящем документе, в клетку, причем нуклеотиды вставляют или удаляют по сравнению с контрольной gРНК, не модифицированной аналогичным образом. В некоторых вариантах воплощения активность Cas9 и gРНК тестируют в ходе биохимических анализов. В некоторых вариантах воплощения активность Cas9 и gРНК тестируют в ходе бесклеточного анализа расщепления. В некоторых вариантах воплощения активность Cas9 и gРНК тестируют в клетках Neuro2A.

В некоторых вариантах воплощения Cas9 и sgРНК или dgРНК, содержащие модифицированную crРНК и/или trРНК, демонстрируют аналогичную, более высокую или пониженную активность по сравнению с немодифицированной sgРНК или dgРНК, содержащей немодифицированную crРНК и trРНК. В некоторых вариантах воплощения Cas9 и модифицированная sgРНК или dgРНК, содержащие модифицированные crРНК и/или trРНК, демонстрируют усиленную активность по сравнению с немодифицированной sgРНК или dgРНК, содержащей немодифицированные crРНК и trРНК.

#### 2. Измерение эффективности Cas in vivo.

В некоторых вариантах воплощения измеряют активность модифицированных gРНК после введения in vivo LNP, содержащего модифицированные gРНК и белок Cas или мРНК кодирующую белок Cas.

В некоторых вариантах воплощения эффективность in vivo gРНК или композиции, предложенных в настоящем документе, определяют по эффективности редактирования, измеренной в ДНК, выделенной из ткани (например, ткани печени) после введения gРНК и Cas9.

#### 3. Измерения активации иммунной системы in vivo.

Модификации gРНК, описанные в настоящем документе, могут ослаблять иммунный ответ субъекта на введение gРНК in vivo. В некоторых вариантах воплощения активацию иммунного ответа субъекта измеряют по концентрации цитокина(ов) в сыворотке после введения sgРНК или dgРНК, содержащей trРНК и crРНК, вместе с мРНК или белком Cas9 (например, в составе с LNP) in vivo. В некоторых вариантах воплощения цитокин является интерфероном-альфа (ИФН-альфа), интерлейкином-6 (ИЛ-6), белком 1 хемотаксиса моноцитов (MCP-1) и/или фактором некроза опухолей-альфа (ФНО-альфа). В некоторых вариантах воплощения настоящее изобретение включает способ снижения иммунного ответа субъекта для доставки gРНК, включающий введение любой одной из gРНК, описанных в настоящем документе, причем gРНК продуцирует ослабленный ответ иммунной системы субъекта после введения. В некоторых вариантах воплощения настоящее изобретение включает способ ослабления активации иммунной системы субъекта после введения по сравнению с контрольной gРНК, не модифицированной аналогичным образом.

В некоторых вариантах воплощения введение РНП Cas или мРНК Cas9 вместе с модифицированной gРНК (например, sgРНК или dgРНК) вызывает более низкую концентрацию(и) цитокинов иммунного ответа в сыворотке по сравнению с введением немодифицированной sgРНК. В некоторых вариантах воплощения настоящее изобретение включает способ снижения концентрации цитокинов иммунного ответа в сыворотке субъекта, включающий введение любой из gРНК, описанных в настоящем документе, причем gРНК вызывает более низкую концентрацию цитокинов иммунного ответа в сыворотке субъекта по сравнению с контрольной gРНК, не модифицированной аналогичным образом.

Данное описание типичных вариантов воплощения не следует воспринимать как ограничивающее. Для целей настоящего патентного описания и прилагаемой формулы изобретения, если не указано иное, все числа, выражающие количественные показатели, процентные доли, пропорции и другие численные значения, использованные в описании и формуле изобретения, во всех случаях следует понимать как модифицированные термином "приблизительно" в тех случаях, когда они не модифицированы таким образом. Соответственно, если не указано противоположное, численные параметры, заданные в следующем описании и прилагаемой формуле изобретения, являются приближенными значениями, которые могут изменяться в зависимости от желательных свойств, которые следует получить. По меньшей мере и не в качестве попытки ограничить применение доктрины эквивалентов к сущности формулы изобретения, каждый численный параметр следует истолковывать по меньшей мере в свете количества приведенных значащих цифр и с применением обычных способов округления.

Следует отметить, что в данном описании и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа любого слова включают определяемые объекты во множественном числе, если явно и недвусмысленно не указано, что они ограничиваются одним определяемым объектом. В настоящем документе термин "включать" и его грамматические варианты считаются неограничивающими, так что упоминание элементов в списке не является исключением других подобных элементов, которые могут замещать или добавляться к перечисленным элементам.

#### Примеры

Следующие примеры приведены с целью иллюстрирования некоторых описанных вариантов воплощения и не должны рассматриваться как ограничивающие сущность описания каким-либо образом.

Пример 1. Материалы и способы.

Синтетическая направляющая РНК (gРНК).

gРНК как в двойном (dgРНК, т.е. crРНК и trРНК), так и в одиночном направляющем (sgРНК) формате, химически синтезированные коммерческими поставщиками с использованием модифицированных нуклеотидов и связей представлены в табл. 4.

Транскрипция мРНК Cas9 *in vitro* ("IVT").

Копированную и полиаденилированную мРНК Cas9, содержащую N1-метил псевдо-U, получали транскрипцией *in vitro* с использованием матрицы линейаризованной плазмидной ДНК и РНК-полимеразы T7. Плазмидную ДНК, содержащую промотор T7 и поли(A/E) область размером 100 нуклеотидов (nt), линейаризовали XbaI и получали от коммерческого производителя. Реакционную смесь для IVT с целью получения модифицированной мРНК Cas9 инкубировали при 37°C в течение 4 ч в следующих условиях: 50 нг/мкл линейаризованной плазмиды; по 2 mM GTP, ATP, CTP и N1-метил псевдо-UTP (Trilink); 10 mM ARCA (Trilink); 5 ед/мкл РНК-полимеразы T7 (NEB); 1 ед/мкл ингибитора РНКазы мыши (NEB); 0,004 ед/мкл неорганической пирофосфатазы *E. coli* (NEB); и 1x реакционный буфер. После 4-ч инкубирования добавляли ДНКазу TURBO (ThermoFisher) в конечной концентрации 0,01 ед/мкл и инкубировали реакционную смесь в течение еще 30 мин для удаления ДНК-матрицы. мРНК Cas9 очищали от ферментов и нуклеотидов с использованием стандартных протоколов, включая колонки для связывания с диоксидом кремния, например, набор для очистки продуктов транскрипции MegaClear Transcription Clean-up (ThermoFisher) или поэтапного осаждения с использованием LiCl, а затем EtOH с NaOAc. Концентрацию транскрипта определяли путем измерения поглощения света при 260 нм (Nanodrop), транскрипт анализировали капиллярным электрофорезом на Bioanalyzer (Agilent).

Трансфекция мРНК Cas9 и gРНК в клетки Neuro2A.

Клетки линии Neuro2A мыши культивировали в среде DMEM с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки и высевали из расчета плотности 15000 клеток/лунку в 96-луночный планшет за 24 ч до трансфекции. В день трансфекции среду аспирировали от клеток и заменяли свежей средой. Липофектамин-2000 (Invitrogen) разбавляли в соотношении 1:50 (об/об) Opti-MEM (Invitrogen). мРНК Cas9 и одиночную направляющую РНК разбавляли Opti-MEM по отдельности. Для двойного направляющего формата crРНК и trРНК разбавляли совместно в молярном соотношении 1:1 Opti-MEM. Как мРНК Cas9, так и gРНК раздельно смешивали в соотношении 1:1 (об/об) с разбавленным липофектамином-2000, получая два липоплекса. Через 5 мин инкубирования липоплексы последовательно добавляли к клеткам до конечной концентрации 100 нг мРНК Cas9/лунку и в общей сложности 0,4 мкл реагента для липофекции. Направляющие РНК тестировали на двух уровнях дозы для каждого эксперимента, включая 25 нМ и 2,5 нМ, 16,7 нМ и 1,67 нМ, 10 нМ и 1 нМ, 8,3 нМ и 0,83 нМ, и 3 нМ и 0,3 нМ. Для двойной направляющей РНК данная концентрация включала эквимольные количества crРНК и trРНК, например, 25 нМ crРНК и 25 нМ trРНК давали общую концентрацию двойной направляющей РНК 25 нМ. Клетки лизировали через 24 ч после трансфекции, а лизаты использовали непосредственно для ПЦР, продукты которой анализировали на предмет редактирования посредством NGS.

## mPHK Cas9 c 1xNLS (SEQ ID NO: 359):

GGGUCCCGCAGUCGGCGUCCAGCGGCUCUGCUUGUUCGUGUGUGUCGUUGCAGGCCU  
UAUUCGGAUCCAUGGAUAAGAAGUACUCAUUCGGGCUGGAUAUCGGAACUAAUUCGUGGGUUG  
GGCAGUGAUCACGGAUGAAUACAAAGUGCCGUCCAAGAAGUUCAAGGUCCUGGGGAACACCGAU  
AGACACAGCAUCAAGAAAAUCUCAUCGGAGCCCUGCUGUUUGACUCCGGCGAAACCGCAGAAG  
CGACCCGGCUCAAACGUACCGCGAGGGCGACGCUACACCCGGCGGAAGAAUCGCAUCUGCUAUCU  
GCAAGAGAUUUUUUGAACGAAUUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUCCACCGCCUGGAAGAA  
UCUUUCUGGUGGAGGAGGACAAGAAGCAUGAACGGCAUCCUAUCUUUGGAAACAUCGUCGACG  
AAGUGGCGUACCACGAAAAGUACCCGACCAUCUACCAUCUGCGGAAGAAGUUGGUUGACUCAAC  
UGACAAGGCCGACCUCAGAUUGAUCUACUUGGCCCCUCGCCCAUAUGAUCAAAUUCGCGGACAC  
UUCUGAUCGAAGGCGAUCUGAACCCUGAUAACUCCGACGUGGAUAAGCUUUUCAUUC AACUGG  
UGCAGACCUACAACCAACUGUUCGAAGAAAACCCAAUCA AUGCUAGCGGCGUCGAUGCCAAGGC  
CAUCCUGUCCGCCCGGCGUUCGGAAGUCGCGGCGCCUCGAAAACCCUGAUCGCACAGCUGCCGGGA  
GAGAAAAAGAACGGACUJUUCGGCAACUUGAUCGCUCUCACUGGGACUCACUCCCAAUUUCA  
AGUCCAAUUUUGACCUGGCCGAGGACGCGAAGCUGCAACUCUCAAGGACACCUACGACGACGA  
CUUGGACAAUUUGCUGGCACAAUUGGCGAUCAGUACGCGGAUCUGUCCUUGCCGCUAAGAAC  
CUUUCGGACGCAAUCUUGCUGUCCGAUAUCCUGCGCGUGAACACCGAAAUAACCAAAGCGCCGC  
UUAGCGCCUCGAUGAUUAAGCGGUACGACGAGCAUACCCAGGAUCUCACGCGUCUCAAGCGCU  
CGUGAGACAGCAACUGCCUGAAAAGUACAAGGAGAUCUUCUUCGACCAGUCCAAGAAUGGGUAC  
GCAGGGUACAUCGAUGGAGGCGCUAGCCAGGAAGAGUUCUAUAAGUUCAUCAAGCCAAUCCUGG  
AAAAGAUGGACGGAACCGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGGGAGGAUCUGCUCCGGAACA  
GAGAACCUUGACAACGGAUCCAUUCACCAGAUCCAUCUGGGUGAGCUGCACGCCAUCUUG  
CGGCGCCAGGAGGACUUUUACCCAUUCCUCAAGGACAACCGGGAAAAGAU CGAGAAAAUUCUGA  
CGUUCGCAUCCCGUAUUACGUGGGCCACUGGCGCGCGGCAAUUCGCGCUUCGCGUGGAUGAC  
UAGAAAAUCAGAGGAAACCAUCACUCCUUGGAAUUCGAGGAAGUUGUGGAUAAGGGAGCUUCG  
GCACAAAGCUUCAUCGAACGAAUGACCAACUUCGACAAGAAUCUCCCAAACGAGAGGUGCUUC  
CUAAGCACAGCCUCCUUUACGAAUACUUCACUGUCUACAACGAACUGACUAAAAGUGAAAUACGU

UACUGAAGGAAUGAGGAAGCCGGCCUUUCUGUCCGGAGAACAGAAAGCAAUUGUCGAUCUG  
CUGUUC AAGACCAACCGCAAGGUGACCGUCAAGCAGCUUAAAGAGGACUACUUC AAGAAGAUCC  
AGUGUUUCGACUCAGUGGAAAUCAGCGGGGUGGAGGACAGAUUCAACGCUUCGUCUGGGAACCUA  
UCAUGAUCUCCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCUUGACAACGAGGAGAACGAGGACAUC  
CUGGAAGAUUUCGUCCUGACCUUGACCCUUUCGAGGAUCGCGAGAUUGAUCGAGGAGAGGCUUA  
AGACCUACGCUCAUCUCUUCGACGAUAAGGUC AUGAAACAACUCAAGCGCCGCCGGUACACUGG  
UUGGGGCCGCCUCUCCCGCAAGCUGAUCAACGGUAUUCGCGAUAAACAGAGCGGUAAAACUAUC  
CUGGAUUCUCCUAAAUCGGAUGGCUUCGCUAAUCGUAACUUC AUGCAAUUGAUCCACGACGACA  
GCCUGACCUUUAAGGAGGACAUC CAAAAAGCACAAGUGUCCGGACAGGGAGACUCACUCCAUGA  
ACACAUCGCGAAUCUGGCCGGUUCGCCGGCGAUUAAGAAGGGAAUUCUGCAAACUGUGAAGGUG  
GUCGACGAGCUGGUGAAGGUCAUGGGACGGCACAACCCGGAGAAUUCGUGAUUGAAAUGGCC  
GAGAAAACAGACUACCCAGAAGGGCCAGAAAACUCCCGCGAAAGGAUGAAGCGGAUCGAAGA  
AGGAAUCAAGGAGCUGGGCAGCCAGAUCCUGAAAGAGCACCCGGUGGAAAACACGCAGCUCGAG  
AACGAGAAGCUCUACCUUGUACU AUUUGCAAUUGGACGGGACAUGUACGUGGACCAAGAGCUGG  
ACAUCAAUUCGGUUGUCUGAUUACGACGUGGACCACAUCGUUCCACAGUCCUUUCUGAAGGAUGA  
CUCGAUCGAUAACAAGGUGUUGACUCGCAGCGACAAGAACAGAGGGAAUCAGAUAAUUGGCCA  
UCGGAGGAGGUCUGAAGAAGAUGAAGAAUUCUGGCGGCAGCUCUUGAAUGCGAAGCUGAUUA  
CCCAGAGAAAGUUUGACAAUCUCACUAAAGCCGAGCGCGGGCAGCUCUCAGAGCUGGAUAAGGC  
UGGAUUCAUCAAAACGGCAGCUGGUCGAGACUCGGCAGAUUACCAAGCACGUGGCCGAGAUUUG  
GACUCCCGCAUGAACACUAAAUACGACGAGAACGAUAAGCUCAUCCGGGAAGUGAAGGUGAUUA  
CCUGAAAAGCAAACUUGUGUCGGACUUUCGGAAGGACUUUCAGUUUACAAAGUGAGAGAAAU  
CAACAACUACCAUCACGCGCAUGACGCAUACCUCAACGCUGUGGUCGGUACCGCCUGAUCAA  
AAGUACCCUAAACUUGAAUCGGAGUUUGUGUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUGAGGAAGA  
UGAUAGCC AAGUCCGAACAGGAAAUCGGGAAAGCAACUGCGAAAUAUCUUCUUUACUCAACAU  
CAUGAACUUUUCAAGACUGAAAUACGCUGGCCAAUGGAGAAAUCAGGAAGAGGCCACUGAUC  
GAAACUAACGGAGAAACGGGCGAAAUCGUGUGGGACAAGGGCAGGGACUUCGCAACUGUUCGCA  
AAGUGCUCUCUAUGCCGCAAGUCAUAUUGUGAAGAAAACCGAAGUGCAAACCGGCCGAUUUC  
AAAGGAAUCGAUCCUCCCAAAGAGAAUAGCGACAAGCUCAUUGCACGCAAGAAAGACUGGGAC  
CCGAAGAAGUACGGAGGAUUCGAUUCGCCGACUGUCGCAUACUCCGUCCUCGUGGUGGCCAAGG  
UGGAGAAGGGAAAGAGCAAAAAGCUCAAAUCGUCUAAAGAGCUCGUCUGGGGAUUACCAUCAUGGA  
ACGAUCCUCGUUCGAGAAGAACCCGAUUGAUUUCUUCGAGGCGAAGGGUUACAAGGAGGUGAAG  
AAGGAUCUGAUCAUCAAACUCCCAAGUACUCACUGUUCGAACUGGAAAUGGUCGGAAGCGCA  
UGCUGGCUUCGGCCGGAGAACUCCAAAAGGAAAUGAGCUGGCCUUGCCUAGCAAGUACGUCAA  
CUCCUCUAUCUUGCUUCGCACUACGAAAACUCAAAAGGGUCACCGGAAGAUAAACGAACAGAAG  
CAGCUUUCGUGGAGCAGCACAAGCAUUAUCUGGAUGAAAUCAUCGAACAAAUCUCCGAGUUUU  
CAAAGCGCGUGAUCCUCGCCGACGCCAACUCGACAAAGUCCUGUCGGCCUACAAUAAGCAUAG  
AGAUAAAGCCGAUCAGAGAACAGGCCGAGAACAUAUCCACUUGUUCACCCUGACUAACCUGGGA  
GCCCCAGCCGCCUUCAAGUACUUCGAUACUACUUCGAUCGCAAAAGAUACACGUCCACCAAGG  
AAGUUCUGGACGCGACCCUGAUCCACCAAAGCAUCACUGGACUCUACGAAAUCAGGAUCGAUCU  
GUCGCAGCUGGGUGGCCAUGGCCGUGGAUCUCCGAAAAGAAGAGAAAAGGUGUAAUGAGCUAGC  
CAUCACAUUAAAAGCAUCUCAGCCUACCAUGAGAAUAAGAGAAAAGAAAUGAAGAUCAAUAGC  
UUAUUCAUCUCUUUUUCUUUUUCGUUGGUGUAAAGCCAACACCCUGUCUAAAAAACUAUUUUU  
CUUUAAUCAUUUUGCCUCUUUCUCUGUGCUUCAAUUAAUAAAAAUGGAAAAGAACCUAGAGAA  
AA  
AA

## мРНК Cas9 с 2xNLS и маркером HA (SEQ ID NO: 360):

GGGUCCCGCAGUCGGCGUCCAGCGGCUCUGCUUGUUCGUGUGUGUCGUUGCAGGCCU  
UAUUCGGAUCCAUGGAUAAGAAGUACUCAUUCGGGCGUGGAUAUCGGAACUAAUUCGUGGGUUG  
GGCAGUGAUCACGGAUGAAUACAAAGUGCCGUCCAAGAAGUUCAAGGUCCUGGGGAACACCGAU  
AGACACAGCAUCAAGAAAAUCUCAUCGGAGCCCUGCUGUUUGACUCCGGCGAAAACCGCAGAAG  
CGACCCGGCUCAAACGUACCGCGAGGGCAGCGUACACCCGGCGGAAGAAUCGCAUCUGCUAUCU  
GCAAGAGAUUUUUCGAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUCCACCGCCUGGAAGAA  
UCUUUCCUGGUGGAGGAGGACAAGAAGCAUGAACGGCAUCCUAUCUUUGGAAACAUCGUCGACG  
AAGUGGGCUACCACGAAAAGUACCCGACCAUCUACCAUCUGCGGAAGAAGUUGGUUGACUCAAC  
UGACAAGGCCGACCUCAGAUUGAUCUACUUGGCCCCUCGCCCAUAUGAUCAAAUUCGCGGACAC  
UUCUGAUCGAAGGCGAUCUGAACCCUGAUAACUCCGACGUGGAUAAGCUUUUCAUUCACUGG  
UGCAGACCUACAACCAACUGUUCGAAGAAAACCCAAUCAAUGCUAGCGGGCUGCAUGCCAAGGC  
CAUCCUGUCCGCCCGGGCUGUCGAAGUCGCGGGCGCCUCGAAAACCUGAUCGCACAGCUGCCGGGA  
GAGAAAAAGAACGGACUUUUCGGCAACUUGAUCGCUCUCACUGGGACUCACUCCCAAUUUCA  
AGUCCAAUUUUGACCUGGCCGAGGACGCGAAGCUGCAACUCUCAAAAGGACACCUACGACGACGA  
CUUGGACAAUUUGCUGGCACAAUUGGCGAUCAGUACGCGGAUCUGUCCUUGCCGCUAAGAAC  
CUUUCGGACGCAAUCUUGCUGUCCGAUAUCCUGCGCGUGAACACCCGAAAUAACCAAAGCGCCGC  
UUAGCGCCUCGAUGAUUAAGCGGUACGACGAGCAUACCCAGGAUCUCACGCGUCUCAAGCGCU  
CGUGAGACAGCAACUGCCUGAAAAGUACAAGGAGAUUUUCUUCGACCAGUCCAAGAAUGGGUAC  
GCAGGGUACAUCGAUGGAGGCGCUAGCCAGGAAGAGUUUCAUAAGUUCAUCAAGCCAAUCCUGG  
AAAAGAUUGGACGGAACCGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGGGAGGAUCUGCUCCGGAAACA  
GAGAACCUUUGACAACGGAUCCAUUCACCAGAUCCAUCUGGGUGAGCUGCACGCCAUUCUUG  
CGGCGCCAGGAGGACUUUUACCCAUUCCUCAAGGACAACCGGGAAAAGAU CGAGAAAAUUCUGA  
CGUUCCGCAUCCCGUAUUACGUGGGCCACUGGCGCGCGGCAAUUCGCGCUUCGCGUGGAUGAC  
UAGAAAAUCAGAGGAAACCAUCACUCCUUGGAAUUUCGAGGAAGUUGUGGAUAAGGGAGCUUCG  
GCACAAAAGCUUCAUCGAACGAAUGACCAACUUCGACAAGAAUCUCCAAAACGAGAAGGUGCUUC  
CUAAGCACAGCCUCCUUUACGAAUACUUCACUGUCUACAACGAACUGACUAAAGUGAAAUACGU  
UACUGAAGGAAUGAGGAAGCCGGCCUUUCUGUCCGGAGAACAGAAAGAAAGCAAUUGUCGAUCUG  
CUGUUCAAGACCAACCGCAAGGUGACCGUCAAGCAGCUUAAAGAGGACUACUUCAAGAAGAUCG  
AGUGUUUCGACUCAGUGGAAAUCAGCGGGGUGGAGGACAGAUUCAACGCUUCGCUUGGGAAACCUA  
UCAUGAUCUCCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCUUGACAACGAGGAGAACGAGGACAUC  
CUGGAAGAUUUCGUCCUGACCUUGACCCUUUCGAGGAUCGCGAGAUUGAUCGAGGAGAGGCUUA  
AGACCUACGCUCAUCUCUUCGACGAUAAGGUCAUGAAACAACUCAAGCGCCGCCGGUACACUGG  
UUGGGGCCGCCUCUCCCGCAAGCUGAUAACGGUAUUCGCGAUAAAACAGAGCGGUAAAACUAUC  
CUGGAUUUCCUCAAUUCGGAUGGCUUCGCUAAUCGUAACUUCAUGCAAUUGAUCCACGACGACA

GCCUGACCUUUAAGGAGGACAUCACAAAAAGCACAAGUGUCCGGACAGGGAGACUCACUCCAUGA  
ACACAUCGCGAAUCUGGCCGCUUCGCGCGCAUUAAGAAGGGAAUUCUGCAAACUGUGAAGGUG  
GUCGACGAGCUGGUGAAGGUCAUGGGACGGCACAAACCGGAGAAUAUCGUGAUUAAAUGGCC  
GAGAAAAACAGACUACCCAGAAGGGCCAGAAAAACUCCCGCAAAGGAUGAAGCGGAUCGAAGA  
AGGAAUCAAGGAGCUGGGCAGCCAGAUCUGAAAGAGCACCCGGUGGAAAACACGCAGCUGCAG  
AACGAGAAGCUCUACCUGUACUAUUUGCAAAAUGGACGGGACAUGUACGUGGACCAAGAGCUGG  
ACAUCAAUCCGGUUGUCUGAUUACGACGUGGACCACAUCGUUCCACAGUCCUUUCUGAAGGAUGA  
CUCGAUCGAUAACAAGGUGUUGACUCGCAGCGACAAGAACAGAGGGAAAGUCAGAUAAAUGGCCA  
UCGGAGGAGGUCUGAAGAAGAUGAAGAUAUCUGGCGGCAGCUCUGAAUGCGAAGCUGAUUA  
CCCAGAGAAAAGUUGACAAUCUCACUAAAGCCGAGCGGGGACUCUCAGAGCUGGAUAAGGC  
UGGAUUCAUCAACGGCAGCUGGUCGAGACUCGGCAGAUUACCAAGCACGUGGCGCAGAUCUUG  
GACUCCCGCAUGAACACUAAUACGACGAGAACGAUAAGCUCAUCCGGGAAGUGAAGGUGAUUA  
CCCUGAAAAGCAAACUUGUGUCGGACUUUCGGAAGGACUUUCAGUUUUAACAAGUGAGAGAAA  
CAACAACUACCAUCACGCGAUGACGCAUACCUCAACCGUGGUCGGUACCGCCUGAUCAAA  
AAGUACCCUAAACUUGAAUCGGAGUUGUGUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUGAGGAAGA  
UGAUAGCCAAAGUCCGAACAGGAAAUCGGGAAAGCAACUGCGAAAUAUCUUAUUACUCAAA  
CAUGAACUUUUCAAGACUGAAAUAUCGUGGCCAAUGGAGAAAUCAGGAAGAGGCCACUGAUC  
GAAACUAAACGGAGAAACGGGCGAAAUCGUGUGGGACAAGGGCAGGGACUUCGCAACUGUUCGCA  
AAGUGCUCUUAUGCCGCAAGUCAUAUUGUGAAGAAAACCGAAGUGCAAACCGGCCGAUUAUC  
AAAGGAAUCGAUCCUCCAAAGAGAAAUAAGCACAAGCUCAUUGCACGCAAGAAAGACUGGGAC  
CCGAAGAAGUACGGAGGAUUCGAUUCGCGACUGUCGCAUACUCCGUCCUGUGGUGGCCAAGG  
UGGAGAAGGGAAAGAGCAAAAAGCUCAAAUCCGUCAAGAGCUGCUGGGGAUUAACCAUCAUGGA  
ACGAUCCUCGUUCGAGAAGAACCAGUUGAUUUCUUCGAGGCGAAGGGUUACAAGGAGGUGAAG  
AAGGAUCUGAUCAUCAACUCCCAAGUACUCACUGUUCGAACUGGAAAAUGGUCGGAAGCGCA  
UGCUGGCUUCGGCCGGGAGAACUCCAAAAGGAAAUGAGCUGGCUUGCCUAGCAAGUACGUCAA  
CUUCCUCUAUCUUGCUUCGCACUACGAAAACUCAAAAGGGUCACCGGAAGAUAACGAACAGAAG  
CAGCUUUUCGUGGAGCAGCACAAAGCAUUAUCUGGAUGAAAUAUCAAGCAAAAUCUCCGAGUUUU  
CAAAGCGGUGAUCUCGCGCAGCCAAACCUCGACAAAAGUCCUGUCGGCCUACAAUAAGCAUAG  
AGAUAAGCCGAUCAGAGAACAGGCCGAGAACAUAUAUCCACUUGUUCACCCUGACUAACCUGGGA  
GCCCCAGCCGCCUUCAGUACUUCGAUACUACUUCGAUCGCAAAAGAUACACGUCCACCAAGG  
AAGUUCUGGACGCGACCCUGAUCACCAGCAUCACUGGACUCUACGAAACUAGGAUCGAUCU  
GUCGCAGCUGGGUGGCGAUGGCUCGGCUUACCAUACGACGUGCCUGACUACGCCUCGCUCGGA  
UCGGGCUCUU  
CCGGAUGAGAAUUAUGCAGUCUAGCCAUCACAUAUUAAAAGCAUCUCAGCCUACCAUGAGAAUAA  
GAGAAAGAAAAUGAAGAUCAUAUAGCUUAUUCAUCUCUUUUUUCUUUUUUCGUGGUGUAAGCCAA  
CACCCUGUCUAAAAAACAUAAAUUUCUUUAUCAUUUUGCCUCUUUUUCUUGUGCUUCAAUUA  
UAAAAAAUGGAAAGAACCUCGAGAA  
AA  
AAUUCUAG

#### Первичные гепатоциты печени.

Первичные гепатоциты печени мыши (PMH) (Gibco) культивировали в соответствии с протоколом производителя (Invitrogen, протокол 11.28.2012). Вкратце, клетки размораживали и ресуспендировали в среде для размораживания гепатоцитов с добавками (Gibco, № по каталогу CM7000) с последующим центрифугированием при 100 г в течение 10 мин. Супернатант удаляли, а осажденные клетки ресуспендировали в среде для посева гепатоцитов с добавками (Invitrogen, № по каталогу A1217601 и CM3000). Клетки подсчитывали и высевали на 96-луночные планшеты, покрытые коллагеном I Bio-coat (ThermoFisher, № по каталогу 877272) из расчета плотности 15000 клеток/луночку и инкубировали в течение 5 ч при 37°C и в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> для образования монослоя. Через 5 ч среду для посева удаляли и заменяли средой для культивирования гепатоцитов с добавками (Invitrogen, № по каталогу A1217601 и CM4000), содержащей мРНК Cas9 и направляющую РНК в составе с LNP и 3% сыворотки мыши. LNP разбавляли с исходного уровня дозы 100 нг мРНК Cas9 и приблизительно 30 нМ направляющей РНК на

лунку, выполняя последовательные разведения до концентрации 0,1 нг мРНК и 0,03 нМ направляющей РНК на лунку. Клетки инкубировали в течение приблизительно 48 ч при 37°C и в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>, после чего выполняли лизис клеток и NGS-анализ, как описано в настоящем документе.

Состав липидных наночастиц ("LNP").

LNP составляли при молярном соотношении амина катионного липида и фосфата РНК (N:P) приблизительно 4,5. Компоненты липидных наночастиц растворяли в 100% этаноле при следующих молярных соотношениях: 45 мол.% (12,7 мМ) катионного липида (например, (9Z,12Z)-3-((4,4-бис(октилокси)бутаноил)окси)-2-(((3-(диэтиламино)пропокси)карбонил)окси)метил)пропил-октадека-9,12-диеноата, также называемого 3-((4,4-бис(октилокси)бутаноил)окси)-2-(((3-(диэтиламино)пропокси)карбонил)окси)метил)пропил(9Z,12Z)-октадека-9,12-диеноатом); 44 мол.% (12,4 мМ) вспомогательного липида (например, холестерина); 9 мол.% (2,53 мМ) нейтрального липида (например, DSPC); и 2 мол.% (0,563 мМ) ПЭГ (например, ПЭГ2k-DMG). Нагрузку РНК получали в 25 мМ натрий-ацетатном буфере, pH 4,5, что приводило к получению концентрации нагрузки РНК приблизительно 0,45 мг/мл.

LNP образовывали путем микрожидкостного смешивания растворов липидов и РНК с использованием прибора Precision Nanosystems NanoAssemblr™ Benchtop Instrument согласно протоколу производителя. Во время смешивания поддерживали соотношение водного и органического растворителя 2:1 с помощью дифференциальной скорости потока.

Составление LNP, процедура А: после смешивания LNP собирали, разбавляли физиологическим раствором с фосфатным буфером (PBS, приблизительно 1:1), а оставшийся буфер обменивали на PBS (100-кратный избыток объема образца) в течение ночи при 4°C и аккуратном перемешивании с использованием кассеты для диализа 10 кДа Slide-a-Lyzer™ G2 (ThermoFisher Scientific). LNP концентрировали с использованием центрифужного фильтра 10 кДа Amicon (центрифугированием при 4000 g и 4°C) для получения желательной концентрации. Затем полученную смесь фильтровали с использованием 0,2 мкм стерильного фильтра. Полученный фильтрат хранили при 2-8°C.

Составление LNP, процедура В: после смешивания LNP собирали, разбавляли 50 мМ трис, pH 7,5 (приблизительно 1:1), а затем LNP обменивали в 50 мМ трис, pH 7,5 (100-кратный избыток объема образца) в течение ночи при 4°C и аккуратном перемешивании с использованием кассеты для диализа 10 кДа Slide-a-Lyzer™ G2 (ThermoFisher Scientific). LNP концентрировали с использованием центрифужного фильтра 10 кДа Amicon (центрифугированием при 4000 g и 4°C) для получения двукратной желательной концентрации. Концентрированные LNP смешивали в соотношении 1:1 с 50 мМ трис, 90 мМ NaCl, 10% сахарозой при pH 7,5 (2X TSS). Затем полученную смесь фильтровали с использованием 0,2 мкм стерильного фильтра. Полученный фильтрат хранили при -80°C.

Составление LNP, процедура С: нагрузку РНК получали в 25 мМ цитрате натрия, 100 мМ хлориде натрия при pH 5, что приводило к образованию нагрузки РНК в концентрации приблизительно 0,45 мг/мл. После перемешивания LNP собирали в воде в соотношении 3:1. LNPs инкубировали в течение ч при комнатной температуре и смешивали с водой в соотношении 1:1. Затем обменивали буфер на 1X TSS (50 мМ трис, 45 мМ NaCl, 5% сахароза при pH 7,5) на колонках PD-10 (GE Healthcare) с использованием протокола производителя. LNP концентрировали с использованием центрифужного фильтра 10 кДа Amicon (центрифугированием при 4000 g и 4°C) для получения желательной концентрации. Затем полученную смесь фильтровали с использованием 0,2 мкм стерильного фильтра. Полученный фильтрат хранили при -80°C.

Секвенирование нового поколения ("NGS") и анализ эффективности специфического гидролиза.

Для количественного определения эффективности редактирования по положению-мишени в составе генома использовали углубленное секвенирование с целью выявления наличия инсерций и делеций, внедренных при редактировании гена.

Сконструировали праймеры для ПЦР вокруг сайта-мишени (например, TTR, FVII), и амплифицировали исследуемую область генома. Последовательности праймеров представлены ниже в табл. 5.

Таблица 5

Направляющая РНК	Ген	Прямой праймер (5'–3')	SEQ ID	Обратный праймер (5'–3')	SEQ ID
Для экспериментов с направляющими РНК на основе доменов адресного воздействия CR000686/G000209	TTR	AGTCAATAATCAGA ATCAGCAGGT	333	AGAAGGCACTTCTTC TTTATСТАAGGT	337
Для экспериментов с направляющими РНК на основе доменов адресного воздействия CR000705/G000211	TTR	GTTTTGTTCCAGAG TCTATCACCG	334	ACACGAATAAGAGCA AATGGGAAC	338
Для экспериментов с направляющими РНК на основе доменов адресного воздействия G000269/G000285	TTR	ATTACCAGCTTAGC ATCCTGTGAA	335	ACACGGTTTATAGAG CAAGAACAC	339
Для экспериментов с направляющими РНК на основе доменов адресного воздействия CR000657/G000208	FVII	AGCACATGAGACCT TCTGTTTCTC	336	GACATAGGTGTGACC CTCACAATC	340

Дополнительную ПЦР выполняли согласно протоколам производителя (Illumina) с добавлением необходимых реагентов для секвенирования. Ампликоны секвенировали на приборе Illumina MiSeq. Читанные фрагменты выравнивали с эталонным геномом человека (например, hg38) после удаления низкокачественных фрагментов. Полученные файлы, содержащие считанные фрагменты, картировали на эталонном геноме (BAM-файлы), где отбирали считанные фрагменты, перекрывающие исследуемую область-мишень и рассчитывали количество считанных фрагментов дикого типа по сравнению с количеством считанных фрагментов, содержащих инсерцию, замещение или делецию.

Процентную долю редактирования (например, "эффективность редактирования" или "процент редактирования") определяли как общее количество считанных фрагментов последовательности с инсерциями или делециями по отношению к общему количеству считанных фрагментов последовательности, в том числе дикого типа.

Доставка LNP *in vivo*.

Самок мышей CD-1 в возрастном диапазоне 6-10 недель использовали в каждом исследовании. Жи-

вотных взвешивали и группировали в соответствии с массой тела для получения растворов для введения на основании средней массы тела в группе. LNP вводили в латеральную хвостовую вену в объеме 0,2 мл на животное (приблизительно 10 мл на килограмм массы тела). За животными наблюдали на предмет нежелательных эффектов в течение приблизительно 6 ч после введения. Массу тела изменяли через 24 ч после введения, после чего животных умерщвляли в различные моменты времени путем обескровливания посредством пункции сердца под анестезией с применением изофлурана. Кровь собирали в пробирки для отделения сыворотки или в пробирки с забуференным цитратом натрия для получения плазмы, как описано в настоящем документе. Для исследований с вовлечением редактирования *in vivo* собирали ткань средней доли печени каждого животного для выделения и анализа ДНК.

Анализ индукции цитокинов.

Для этого анализа выполняли отбор приблизительно 50-100 мкл крови путем надреза хвостовой вены для измерения цитокинов в сыворотке. Крови позволяли свернуться при комнатной температуре в течение приблизительно 2 ч, а затем выполняли центрифугирование при 1000 g в течение 10 мин, после чего собирали сыворотку. Многоканальный анализ с магнитными гранулами на основе Luminex (Affymetrix ProcartaPlus, номер по каталогу Exr040-00000-801), позволяющий измерять ИЛ-6, ФНО-альфа, ИФН-альфа и MCP-1, использовали для анализа цитокинов в собранных образцах. Реагенты и стандарты набора подготавливали в соответствии с протоколом производителя. 25 мкл сыворотки мыши добавляли в лунки, содержавшие 25 мкл разбавленных магнитных гранул с иммобилизованными антителами. Планшет инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре, а затем промывали. Разбавленное антитело с биотином (50 мкл) добавляли к гранулам и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч. Гранулы повторно промывали, а затем в каждую лунку добавляли 50 мкл разбавленного стрептавидина-PE с последующим инкубированием в течение 30 мин. Гранулы повторно однократно промывали, а затем суспендировали в 100 мкл буфера для промывки и считывали на приборе Bio-Plex 200 (Bio-Rad). Данные анализировали в аналитическом пакете Bioplex Manager версии 6.1, концентрации цитокинов рассчитывали по стандартной кривой с использованием аппроксимации кривой пятипараметрической логистической моделью.

Выделение геномной ДНК.

Для исследований *in vivo* геномную ДНК выделяли из 10 мг ткани с использованием набора для выделения на основе гранул, MagMAX-96 DNA Multi-Sample Kit (ThermoFisher, № по каталогу 4413020) в соответствии с протоколом производителя, включавшим гомогенизацию ткани в лизирующем буфере (приблизительно 400 мкл/10 мг ткани). Все образцы ДНК нормировали до концентрации 100 нг/мкл для ПЦР и последующего NGS-анализа, описанного в настоящем документе.

Анализ транстретина (TTR) с помощью твердофазного ИФА.

Отбор крови и выделение сыворотки выполняли в соответствии с указаниями. Уровень общего TTR в сыворотке определяли с использованием анализа преальбумина (транстретина) мыши с помощью твердофазного ИФА (Aviva Systems Biology, № по каталогу OKIA00111). Реагенты и стандарты набора подготавливали в соответствии с протоколом производителя. Сыворотку мыши разбавляли 1x разбавителем для анализа до конечного 10000-кратного разведения. Разбавление выполняли путем выполнения двух последовательных 50-кратных разведений, что приводило к 2500-кратному разбавлению. Этап окончательного 4-кратного разбавления выполняли для получения общего 10000-кратного разведения образца. Как разведения для получения стандартной кривой (по 100 мкл), так и разбавленные образцы сыворотки добавляли в каждую лунку планшета для твердофазного ИФА с заранее иммобилизованным антителом для захвата. Планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин, а затем промывали. Добавляли конъюгат фермент - антитело (100 мкл на лунку) и выполняли инкубирование в течение 20 мин. Несвязанный конъюгат антитела удаляли, планшет повторно промывали и добавляли раствор хромогенного субстрата. Планшет инкубировали в течение 10 мин, а затем добавляли 100 мкл стоп-раствора, например, серной кислоты (приблизительно 0,3M). Планшет считывали на планшет-ридере SpectraMax M5, регистрируя поглощение при 450 нм. Уровень TTR в сыворотке рассчитывали с использованием программного обеспечения SoftMax Pro версии 6.4.2 с использованием четырехпараметрической логистической аппроксимации стандартной кривой. Окончательные значения в сыворотке рассчитывали с поправкой на разбавление при анализе.

Пример 2. Конструирование и тестирование модифицированной gРНК *in vitro*.

Модифицированные gРНК проектировали в формате двойной направляющей РНК (dgРНК), как показано в табл. 4. Соответственно, проектировали и химически синтезировали как модифицированные crРНК, так и trРНК с целью сопряжения модифицированных и немодифицированных компонентов с образованием dgРНК. Эти сопряженные пары трансфицировали в клетки Neuro2A в концентрациях, указанных на Фигурах, и измеряли эффективность редактирования (например, процент редактирования) с помощью NGS, как описано в примере 1.

Некоторые модифицированные crРНК из табл. 4, обеспечивающие адресное воздействие на ген TTR мыши, трансфицировали с mРНК Cas9 и немодифицированной trРНК (TR000002). Протестированные направляющие РНК включали SEQ ID No: 1-18. Как показано на фиг. 1, некоторые из модифицированных crРНК (вместе с немодифицированными trРНК) обеспечивали аналогичную или усиленную ак-

тивность по сравнению с немодифицированным контролем, в то время как другие модифицированные сгРНК снижали активность.

Параллельно модифицированные трРНК из табл. 4 трансфицировали с мРНК Cas9 наряду с немодифицированной сгРНК (CR000686), обеспечивавшей адресное воздействие на ту же последовательность гена TTR мыши. Протестированные направляющие РНК включали SEQ ID No: 188-200 и 204. Как показано на фиг. 2, многие из модифицированных трРНК (вместе с немодифицированными сгРНК) обеспечивали аналогичную или усиленную активность по сравнению с немодифицированным контролем, в то время как некоторые модифицированные трРНК снижали активность.

В дополнение к замещению химически модифицированных нуклеотидов, некоторые из протестированных сопряженных пар сгРНК и трРНК также сконструировали с замещениями в последовательности, например, приводившими к образованию пар G-C, не встречающихся в исходных последовательностях. Протестированные направляющие РНК включали SEQ ID No: 15 и 201; 16 и 202; 1 и 188. Как показано на фиг. 3, одна из таких сопряженных пар (SEQ ID No: 16 и 202) приводила к аналогичной или усиленной активности по сравнению с немодифицированным контролем, в то время как две другие сопряженные пары снижали активность.

Затем протестировали сопряженные пары модифицированных сгРНК и модифицированных трРНК из табл. 4. Как показано на фиг. 4, многие из сопряженных пар модифицированной сгРНК и модифицированной трРНК обеспечивали аналогичную или усиленную активность по сравнению с немодифицированным контролем, в то время как некоторые сопряженные пары снижали активность. Заголовки столбцов на фиг. 4 обозначают различные трРНК, использованные в эксперименте, а заголовки строк - различные использованные сгРНК. Для определения комбинации, использованной в эксперименте, необходимо сопоставить столбец и строку. TR000002 и CR000686 являются немодифицированными контролями (см. нижние правые ячейки).

На основании конструкции dgРНК сконструировали одиночные направляющие РНК (sgРНК), характеризующиеся аспектами некоторых модифицированных сгРНК и трРНК, изображенных в табл. 4 и на фиг. 15D. Эти sgРНК, SEQ ID No: 228-234, также протестировали в клетках Neuro2A, и, как показано на фиг. 5, каждая из модифицированных sgРНК демонстрировала активность, сопоставимую с контролями, содержащими только 5'- и 3'-концевые модификации (G0000209; SEQ ID NO: 228).

Аналогичный набор экспериментов выполнили для дополнительных dgРНК, описанных в табл. 4 и на фиг. 6. Протестированные направляющие РНК включали SEQ ID No: 32-47 и 1. Модифицированные сгРНК, также обеспечивающие адресное воздействие на ген TTR мыши, трансфицировали с мРНК Cas9 и немодифицированной трРНК (TR000002). Как показано на фиг. 6, некоторые из модифицированных сгРНК (вместе с немодифицированной трРНК) обеспечивали аналогичную или усиленную активность по сравнению с немодифицированным контролем (CR000686), в то время как другие модифицированные сгРНК снижали активность.

Параллельно, как показано на фиг. 7, модифицированные трРНК из табл. 4 трансфицировали с мРНК Cas9 наряду с немодифицированной сгРНК (CR000686), обеспечивавшей адресное воздействие на ту же последовательность гена TTR мыши. Протестированные направляющие РНК включали SEQ ID No: 205-222 и 1. Как показано на фиг. 7, многие из модифицированных трРНК (вместе с немодифицированной сгРНК) обеспечивали аналогичную или усиленную активность по сравнению с немодифицированным контролем (TR000002), в то время как некоторые модифицированные трРНК снижали активность.

В дополнение к замещению химически модифицированных нуклеотидов, некоторые из протестированных сопряженных пар сгРНК и трРНК из табл. 4 также сконструировали с замещениями в последовательности, например, приводившими к образованию пар G-C или несовпадений G-U ("прецессии GU"), не встречающихся в исходных последовательностях. Как показано на фиг. 8, некоторые из модификаций и сопряженных пар обеспечивали аналогичную или усиленную активность по сравнению с немодифицированным контролем, в то время как некоторые (например, сопряженные пары с "прецессией GU" или несовпадениями) снижали активность. На фиг. 8 показаны результаты использования направляющих трРНК, показанных в SEQ ID No: 223-227 и 188 с направляющими сгРНК, показанными в SEQ ID No: 48-52 и 1.

Затем протестировали выбранные сопряженные пары модифицированных сгРНК и модифицированных трРНК из табл. 4, как показано на фиг. 9. Некоторые из сопряженных пар модифицированной сгРНК и модифицированной трРНК обеспечивали аналогичную или усиленную активность по сравнению с немодифицированным контролем, в то время как некоторые сопряженные пары снижали активность. Заголовки столбцов на фиг. 9 обозначают различные трРНК, использованные в эксперименте, а заголовки строк - различные использованные сгРНК. Для определения комбинации, использованной в эксперименте, необходимо сопоставить столбец и строку. Немодифицированные контроли являются TR000002 и CR000686.

Некоторые из модифицированных gРНК (dgРНК и sgРНК) из табл. 4 также тестировали в чисто биохимическом анализе (т.е. бесклеточном анализе гидролиза). Интересно, что многие из модифицированных gРНК, которые были в основном неактивны в клетках Neuro2A, являлись активными при биохимическом анализе, что указывало на то, что такие биохимические анализы могут не позволять прогнози-

ровать активность модифицированных gРНК в клетках (данные не показаны).

Пример 3. Дальнейшее тестирование модифицированных gРНК по отношению к другим мишеням.

На следующем этапе после установления влияния некоторых модификаций на активность gРНК протестировали возможность влияния таких модификаций на активность при адресном воздействии на (1) отдельную последовательность в том же гене или (2) последовательность в другом гене. Соответственно, сконструировали и синтезировали gРНК, обеспечивавшие адресное воздействие на другую последовательность в гене TTR мыши, а также последовательность в гене фактора VII (FVII) мыши, характеризовавшиеся некоторыми шаблонами модификации, протестированными в примере 2 (см. табл. 4). Эти gРНК трансфицировали в клетки Neuro2A в концентрациях, указанных на фигурах, и измеряли эффективность редактирования (например, процент редактирования) с помощью NGS, как описано в примере 1.

Модифицированные sgРНК из табл. 4, обеспечивающие адресное воздействие на ген TTR мыши (другую последовательность в отличие от адресного воздействия в примере 2) или ген FVII мыши, трансфицировали с mРНК Cas9 и немодифицированной trРНК (TR000002). Протестированные направляющие РНК включали последовательности, показанные на фиг. 12A и 12B. Некоторые из модифицированных sgРНК (вместе с немодифицированной trРНК) обеспечивали аналогичную или усиленную активность по сравнению с немодифицированными контролями, в то время как другие модифицированные sgРНК снижали активность.

Параллельно модифицированные trРНК из табл. 4 трансфицировали с mРНК Cas9 наряду с немодифицированной sgРНК, обеспечивавшей адресное воздействие на ген TTR мыши (CR000705; другую последовательность в отличие от адресного воздействия в примере 2) или ту же последовательность, что и в гене FVII мыши (CR000657). Как показано на фиг. 13A и 13B, многие из модифицированных trРНК (вместе с немодифицированными sgРНК) обеспечивали аналогичную или усиленную активность по сравнению с немодифицированными контролями, в то время как некоторые модифицированные trРНК снижали активность. Эти данные показывают тенденцию к тому, что некоторые шаблоны модификации обладают аналогичным действием на различные последовательности.

На основании вышеописанной конструкции dgРНК сконструировали одиночные направляющие РНК (sgРНК), характеризующиеся аспектами некоторых модифицированных sgРНК и trРНК. См. табл. 4. Эти sgРНК также протестировали в клетках Neuro2A. Результаты показаны на фиг. 10 (TTR мыши) и Фиг. 11 (FVII мыши). Эти эксперименты показали, что некоторые шаблоны модификации приводят к аналогичному действию даже при адресном воздействии на другие гены.

Пример 4. Тестирование модифицированной gРНК *in vivo*.

После тестирования *in vitro* выполнили доставку модифицированных sgРНК в организмы животных в шести отдельных исследованиях с целью определения возможности получения благоприятного эффекта для редактирования *in vivo* за счет этих модификаций.

LNP составляли с IVT mРНК Cas9 совместно с химически модифицированной sgРНК (обеспечивавшей адресное воздействие на TTR или FVII), как описано в примере 1. Соотношение mРНК:sgРНК составляло приблизительно 1:1 по массе РНК-компонентов. Если не указано иное, mРНК Cas9, использованная в исследованиях, описанных в данном примере, обладала последовательностью согласно SEQ ID NO: 360, а LNP составляли с использованием процедуры A составления LNP, описанной выше.

В одном эксперименте мышам ( $n=5$  на группу) однократно вводили LNP в дозе 2 мг/кг и выполняли отбор крови для анализа цитокинов в сыворотке через четыре ч после введения. Через 7 дней после введения во время аутопсии выполняли сбор печени и крови для измерений эффективности редактирования с помощью NGS и анализа TTR в сыворотке, соответственно. Каждая из sgРНК в данном эксперименте обеспечивала адресное воздействие на одну и ту же последовательность в гене TTR, единственным различием между sgРНК являлись модификации, внесенные в каждую из них (см. фиг. 14A-D и 15A-E; табл. 4, SEQ ID No: 228-234). G000209 (две протестированные партии) использовали в качестве в меньшей степени модифицированного контроля, содержавшего лишь 2'-O-метил модификации и фосфоротиоатные связи в трех концевых положениях и между ними как в 5'-, так и в 3'-концевых областях sgРНК, соответственно. (См. фиг. 15D).

Результаты, приведенные на фиг. 14A-D, показали наличие тенденции к тому, что в большей степени модифицированные sgРНК индуцируют ответ каждого из проанализированных цитокинов в меньшей степени по сравнению с менее модифицированными контролями G000209. В большей степени модифицированные sgРНК также обеспечивали повышенную эффективность редактирования в печени обработанных животных, причем процент редактирования достигал ~60% для двух в большей степени модифицированных sgРНК (например, G000263 и G000267) по сравнению с ~44-47% для менее модифицированных контролей (партий G000209) (фиг. 15A). Важно отметить, что эффективность редактирования коррелировала с фенотипическими изменениями, поскольку уровни нокдауна TTR в сыворотке были сопоставимы или значительно превышали таковые для менее модифицированных контролей (см., например, G000263 и G000267 по сравнению с партиями G000209 на фиг. 15A-15B). Сводные различия между G000209 с концевыми модификациями и значительно модифицированной G000267 приведены на фиг. 15D и 15E (2'-O-Me модифицированные нуклеотиды показаны полужирным шрифтом, а \* является

фосфоротиоатной связью).

В еще одном исследовании *in vivo* протестировали три sgPНК, обеспечивавшие адресное воздействие на отдельные последовательности в гене TTR мыши. Мышам (n=5 на группу) однократно вводили LNP в дозе 2 мг/кг, 1 мг/кг или 0,3 мг/кг. Отбор крови для анализа цитокинов в сыворотке выполняли через четыре ч после введения. Через 7 дней после введения во время аутопсии выполняли сбор печени и крови для измерений эффективности редактирования с помощью NGS и анализа TTR в сыворотке, соответственно. В данном исследовании каждая из sgPНК обеспечивала адресное воздействие на одну и ту же последовательность в гене TTR (другую последовательность в отличие от адресного воздействия в предыдущем исследовании *in vivo*), причем одна sgPНК являлась полностью немодифицированной (G000201 (SEQ ID NO: 243)), еще одна содержала лишь концевые модификации (G000211 (SEQ ID NO: 241)), причем 2'-О-метил модификации и фосфоротиоатные связи располагались в трех концевых положениях и между ними как в 5'-, так и 3'-концевых областях sgPНК, соответственно), а третья sgPНК характеризовалась тем же шаблоном модификации, что и G000267 в предыдущем исследовании *in vivo* (G000282 (SEQ ID NO: 242)).

Как показано на фиг. 16A-16D, каждая из sgPНК приводила к аналогичным ответам каждого из протестированных цитокинов в зависимости от дозы. По отношению к эффективности редактирования немодифицированная sgPНК (G000201 (SEQ ID NO: 243)) обеспечивала незначительное редактирование *in vivo*, в то время как значительно модифицированная sgPНК (G000282 (SEQ ID NO: 242)) обеспечивала достижение ~60% уровня в дозе 2 мг/кг, что значительно превышало уровни, достигаемые с использованием в меньшей степени модифицированной sgPНК (G000211 (SEQ ID NO: 241)) (фиг. 17A и B). Как и в предыдущем исследовании *in vivo*, уровень редактирования коррелировал с количественным нокдауном TTR в сыворотке (фиг. 17C и D).

Затем выполнили исследование, аналогичное второму исследованию *in vivo* с использованием еще одного набора трех sgPНК, обеспечивавших адресное воздействие на другую последовательность TTR в гене TTR мыши (адресное воздействие на другую последовательность в отличие от адресного воздействия в двух предыдущих исследованиях *in vivo*). Мышам (n=5 на группу) однократно вводили LNP в дозе 2 мг/кг, 1 мг/кг или 0,3 мг/кг. Отбор крови для анализа цитокинов в сыворотке выполняли через четыре ч после введения. Через 7 дней после введения во время аутопсии выполняли сбор печени и крови для измерений эффективности редактирования с помощью NGS и анализа TTR в сыворотке, соответственно. В данном исследовании каждая из sgPНК обеспечивала адресное воздействие на одну и ту же последовательность в гене TTR (другую последовательность в отличие от адресного воздействия в двух предыдущих исследованиях *in vivo*), причем одна sgPНК являлась полностью немодифицированной (G000285; (SEQ ID NO: 332)), еще одна содержала лишь концевые модификации (G000269 (SEQ ID NO: 330)), причем 2'-О-метил модификации и фосфоротиоатные связи располагались в трех концевых положениях и между ними как на 5'-, так и 3'-конце sgPНК, соответственно), а третья sgPНК характеризовалась тем же шаблоном модификации, что и G000267 и G000282 в двух предыдущих исследованиях *in vivo* (G000283 (SEQ ID NO: 331)).

В данном исследовании немодифицированная sgPНК (G000285 (SEQ ID NO: 332)) обеспечивала незначительное редактирование *in vivo*, в то время как значительно модифицированная sgPНК (G000283 (SEQ ID NO: 331)) обеспечивала достижение ~60% уровня в дозе 2 мг/кг, что значительно превышало уровни, достигаемые с использованием в меньшей степени модифицированной sgPНК (G000269 (SEQ ID NO: 330)) (фиг. 18A-18B). Как и в предыдущих исследованиях *in vivo*, уровень редактирования коррелировал с количественным нокдауном TTR в сыворотке (фиг. 18C).

В четвертом исследовании *in vivo* выполнили оценку влияния модификаций gPНК для другого гена (FVII). Для сравнений в рамках исследования включили две из sgPНК, протестированные в первом исследовании *in vivo* (G000209 и G000267). Мышам (n=5 на группу) однократно вводили LNP в дозе 2 мг/кг, 1 мг/кг и 0,3 мг/кг и выполняли отбор крови для анализа цитокинов в сыворотке через четыре ч после введения. Через 6 дней после введения во время аутопсии выполняли сбор печени для измерений эффективности редактирования с помощью NGS. В данном исследовании каждая из sgPНК обеспечивала адресное воздействие на одну и ту же последовательность в генах TTR или FVII, причем одна sgPНК для каждого гена содержала лишь концевые модификации (G000208 (SEQ ID NO: 286)) для FVII, G000209 для TTR, причем обе они содержали 2'-О-метил модификации и фосфоротиоатные связи в трех концевых положениях и между ними как на 5'-, так и на 3'-конце sgPНК, соответственно), а вторая sgPНК характеризовалась теми же шаблонами модификации, что и G000267, G000282 и G000283 в предыдущих исследованиях *in vivo* (G000373 (SEQ ID NO: 287) для FVII; G000267 (SEQ ID NO: 234) для TTR).

Как показано на фиг. 19A-19D, каждая из sgPНК приводила к аналогичным ответам каждого из протестированных цитокинов в зависимости от дозы. По отношению к эффективности редактирования в большей степени модифицированная sgPНК, обеспечивавшая адресное воздействие на FVII (G000373 (SEQ ID NO: 287)), обладала повышенной эффективностью редактирования по сравнению с менее модифицированной версией (G000208 (SEQ ID NO: 286)) во всем диапазоне протестированных доз (фиг. 18A). Эти результаты также наблюдали для sgPНК, обеспечивавших адресное воздействие на TTR (фиг. 20A-20B).

В еще одном исследовании *in vivo* протестировали десять дополнительных sgРНК, обеспечивавшие адресное воздействие на ту же последовательность в гене TTR мыши, что и G000282. G000282 также включили в данное исследование для целей сравнения. Мышам (n=5 на группу) однократно вводили LNP в дозе 1 мг/кг или 0,5 мг/кг. LNP, использованные в данном исследовании, составляли с использованием процедуры В составления LNP, описанной выше. Через семь (7) дней после введения во время аутопсии выполняли сбор печени и крови для измерений эффективности редактирования с помощью NGS и анализа TTR в сыворотке, соответственно. В данном исследовании каждая из sgРНК обеспечивала адресное воздействие не одну и ту же последовательность в гене TTR. Шаблон модификации для каждой протестированной sgРНК различался и включал 2'-ОМе, 2'-F и PS модификации в 5'-концевой области, 3'-концевой области, шпильке 1, шпильке 2, связке, нижнем стебле, расширении и верхнем стебле sgРНК. Результаты данного исследования показаны на фиг. 22А-22С, включая % редактирования (фиг. 22А), среднее значение и стандартное отклонение редактирования (фиг. 22В) и уровень TTR в сыворотке (фиг. 22С). Эти же sgРНК протестировали в первичных гепатоцитах мыши согласно способам, описанным в настоящем документе. Результаты данного исследования редактирования TTR в зависимости от дозы показаны на фиг. 24А-24С, включая % редактирования (фиг. 24А), кривые зависимости ответа от дозы (фиг. 24В) и значения EC50 (фиг. 24С).

В еще одном исследовании *in vivo* протестировали тринадцать sgРНК, обеспечивавших адресное воздействие на ту же последовательность в гене TTR мыши, что и G000282. G000282 также включили в данное исследование для целей сравнения. Мышам (n=5 на группу) однократно вводили LNP в дозе 1 мг/кг. LNP, использованные в данном исследовании, составляли с использованием процедуры С составления LNP, описанной выше. мРНК Cas9, использованная в данном исследовании, обладала последовательностью согласно SEQ ID NO: 359. Отбор крови для анализа цитокинов в сыворотке выполняли через четыре ч после введения. Через 7 дней после введения во время аутопсии выполняли сбор печени и крови для измерений эффективности редактирования с помощью NGS и анализа TTR в сыворотке, соответственно. В данном исследовании каждая из sgРНК обеспечивала адресное воздействие на одну и ту же последовательность в гене TTR. Протестированные sgРНК включали дополнительные 2'-ОМе и PS модификации в 5'-концевой области, 3'-концевой области, шпильке 1, шпильке 2 и верхнем стебле sgРНК. Результаты данного исследования показаны на фиг. 23А-23С, включая % редактирования (фиг. 23А), средний % редактирования (фиг. 23В) и уровень TTR в сыворотке (фиг. 23С).

#### Перечень последовательностей

<110> INTELLIA THERAPEUTICS, INC.

<120> МОДИФИЦИРОВАННЫЕ НАПРАВЛЯЮЩИЕ РНК

<130> 01155-0004-00PCT

<140>

<141>

<150> 62/431,756

<151> 2016-12-08

<160> 360

<170> Патентная версия 3.5

<210> 1

<211> 42

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 1

сcaguccagc gaggsaaagg guuuuagagc uaugciguuu ug 42

<210> 2

<211> 42  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 2  
сгагссагс гaggсааagg гуишшagagc иагсигуиш иг 42

<210> 3  
<211> 42  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 3  
сгагссагс гaggсааagg гуишшagagc иагсигуиш иг 42

<210> 4  
<211> 42  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 4  
сгагссагс гaggсааagg гуишшagagc иагсигуиш иг 42

<210> 5  
<211> 42  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 5  
сгагссагс гaggсааagg гуишшagagc иагсигуиш иг 42

<210> 6  
<211> 42  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 6

сsagussagc gaggсааagg гуиіііаgаgс іаугсгуііі іg 42

<210> 7

<211> 42

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 7

сsagussagc gaggсааagg гуиіііаgаgс іаугсгуііі іg 42

<210> 8

<211> 42

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 8

сsagussagc gaggсааagg гуиіііаgаgс іаугсгуііі іg 42

<210> 9

<211> 42

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 9

сsagussagc gaggсааagg гуиіііаgаgс іаугсгуііі іg 42

<210> 10

<211> 42

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 10

сsagussagc gaggсааagg гуиіііаgаgс іаугсгуііі іg 42

<210> 11  
<211> 42  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 11  
ссагуссагс gaggsaaagg гуиуиуагагс иагсигуиуи уг 42

<210> 12  
<211> 42  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 12  
ссагуссагс gaggsaaagg гуиуиуагагс иагсигуиуи уг 42

<210> 13  
<211> 42  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 13  
ссагуссагс gaggsaaagg гуиуиуагагс иагсигуиуи уг 42

<210> 14  
<211> 42  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 14  
ссагуссагс gaggsaaagg гуиуиуагагс иагсигуиуи уг 42

<210> 15  
<211> 42  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 15  
ссaгссаgс gaggсааagg ggcгсаgаgс uагсггuuu ug 42

<210> 16  
<211> 42  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 16  
ссaгссаgс gaggсааagg гуuuаgаgс uагсггgсg сg 42

<210> 17  
<211> 42  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 17  
ссaгссаgс gaggсааagg ggcгсаgаgс uагсггgсg сg 42

<210> 18  
<211> 42  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 18  
ссaгссаgс gaggсааagg гуuuаgаgс uагсггuuu ug 42

<210> 19  
<211> 22  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 19

guuuuagagc uaugcuuuu ug 22

<210> 20  
<211> 22  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 20  
guuuuagagc uaugcuuuu ug 22

<210> 21  
<211> 22  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 21  
guuuuagagc uaugcuuuu ug 22

<210> 22  
<211> 22  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 22  
guuuuagagc uaugcuuuu ug 22

<210> 23  
<211> 22  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 23  
guuuuagagc uaugcuuuu ug 22

<210> 24  
<211> 22  
<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 24

guuuuagagc uaugcuuuu ug 22

<210> 25

<211> 22

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 25

guuuuagagc uaugcuuuu ug 22

<210> 26

<211> 22

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 26

guuuuagagc uaugcuuuu ug 22

<210> 27

<211> 22

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 27

guuuuagagc uaugcuuuu ug 22

<210> 28

<211> 22

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 28  
guuuuagagc uaugcuguu ug 22

<210> 29  
<211> 22  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 29  
guuuuagagc uaugcuguu ug 22

<210> 30  
<211> 22  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 30  
guuuuagagc uaugcuguu ug 22

<210> 31  
<211> 22  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 31  
guuuuagagc uaugcuguu ug 22

<210> 32  
<211> 42  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 32  
cgaugcagc gaggsaaagg guuuuagagc uaugcuguu ug 42

<210> 33

<211> 42  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 33  
сsagussagc gaggsaaagg гуиуиуаgagc иаугсигуиу иg 42

<210> 34  
<211> 42  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 34  
сsagussagc gaggsaaagg гуиуиуаgagc иаугсигуиу иg 42

<210> 35  
<211> 42  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 35  
сsagussagc gaggsaaagg гуиуиуаgagc иаугсигуиу иg 42

<210> 36  
<211> 42  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 36  
сsagussagc gaggsaaagg гуиуиуаgagc иаугсигуиу иg 42

<210> 37  
<211> 42  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 37

ссagussaccg gaggсааagg гуиіііаgаgс іаугсигиііі ug 42

<210> 38

<211> 42

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 38

ссagussaccg gaggсааagg гуиіііаgаgс іаугсигиііі ug 42

<210> 39

<211> 42

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 39

ссagussaccg gaggсааagg гуиіііаgаgс іаугсигиііі ug 42

<210> 40

<211> 42

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 40

ссagussaccg gaggсааagg гуиіііаgаgс іаугсигиііі ug 42

<210> 41

<211> 42

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 41

ссagussaccg gaggсааagg гуиіііаgаgс іаугсигиііі ug 42

<210> 42  
<211> 42  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 42  
ссагуссагс gaggсааagg гуиуиаgаgс иагсигуиу иg 42

<210> 43  
<211> 42  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 43  
ссагуссагс gaggсааagg гуиуиаgаgс иагсигуиу иg 42

<210> 44  
<211> 42  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 44  
ссагуссагс gaggсааagg гуиуиаgаgс иагсигуиу иg 42

<210> 45  
<211> 42  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 45  
ссагуссагс gaggсааagg гуиуиаgаgс иагсигуиу иg 42

<210> 46  
<211> 42  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 46  
ссagussagc gaggsaaagg гуиуиаgagc иаугсигуиу ug 42

<210> 47  
<211> 42  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 47  
ссagussagc gaggsaaagg гуиуиаgagc иаугсигуиу ug 42

<210> 48  
<211> 42  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 48  
ссagussagc gaggsaaagg гуиссagagc иаугсигуиу ug 42

<210> 49  
<211> 42  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 49  
ссagussagc gaggsaaagg гсиуиаgagc иаугсигуиу ug 42

<210> 50  
<211> 42  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 50

ссaguccagc gaggsaaagg гуиуаgagc иагсигуиу ug 42

<210> 51

<211> 42

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 51

ссaguccagc gaggsaaagg гуиуаgagc иагсигуиу ug 42

<210> 52

<211> 42

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 52

ссaguccagc gaggsaaagg гуиуаgagc иагсигуиу ug 42

<210> 53

<211> 22

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 53

гуиуаgagc иагсигуиу ug 22

<210> 54

<211> 22

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 54

гуиуаgagc иагсигуиу ug 22

<210> 55

<211> 22

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 55

guuuuagagc uaugcuuuu ug 22

<210> 56

<211> 22

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 56

guuuuagagc uaugcuuuu ug 22

<210> 57

<211> 22

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 57

guuuuagagc uaugcuuuu ug 22

<210> 58

<211> 22

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 58

guuuuagagc uaugcuuuu ug 22

<210> 59

<211> 22

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 59  
guuuuagagc uaugcuguu ug 22

<210> 60  
<211> 22  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 60  
guuuuagagc uaugcuguu ug 22

<210> 61  
<211> 22  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 61  
guuuuagagc uaugcuguu ug 22

<210> 62  
<211> 22  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 62  
guuuuagagc uaugcuguu ug 22

<210> 63  
<211> 22  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 63  
guuuuagagc uaugcuguu ug 22

<210> 64

<211> 22  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 64  
guuuuagagc uaugcuguu ug 22

<210> 65  
<211> 22  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 65  
guuuuagagc uaugcuguu ug 22

<210> 66  
<211> 22  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 66  
guuuuagagc uaugcuguu ug 22

<210> 67  
<211> 22  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 67  
guuuuagagc uaugcuguu ug 22

<210> 68  
<211> 22  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 68

guuuuagagc uaugcuguuu ug 22

<210> 69

<211> 22

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 69

gucucagagc uaugcuguuu ug 22

<210> 70

<211> 22

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 70

gcuuuagagc uaugcuguuu ug 22

<210> 71

<211> 22

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 71

gucuuagagc uaugcuguuu ug 22

<210> 72

<211> 22

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 72

guucuagagc uaugcuguuu ug 22

<210> 73  
<211> 22  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 73  
guuucagagc uaugcuguuu ug 22

<210> 74  
<211> 42  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 74  
uuacagccac gucuacagca guuuuagagc uaugcuguuu ug 42

<210> 75  
<211> 42  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 75  
uuacagccac gucuacagca guuuuagagc uaugcuguuu ug 42

<210> 76  
<211> 42  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 76  
uuacagccac gucuacagca guuuuagagc uaugcuguuu ug 42

<210> 77  
<211> 42  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 77  
uuacagccac gucacagca guuuagagc uaugciguuu ug 42

<210> 78  
<211> 42  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 78  
uuacagccac gucacagca guuuagagc uaugciguuu ug 42

<210> 79  
<211> 42  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 79  
uuacagccac gucacagca guuuagagc uaugciguuu ug 42

<210> 80  
<211> 42  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 80  
uuacagccac gucacagca guuuagagc uaugciguuu ug 42

<210> 81  
<211> 42  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 81

uuacagccac gucacagca guuuuagagc uaugciguuu ug 42

<210> 82

<211> 42

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 82

uuacagccac gucacagca guuuuagagc uaugciguuu ug 42

<210> 83

<211> 42

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 83

uuacagccac gucacagca guuuuagagc uaugciguuu ug 42

<210> 84

<211> 42

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 84

uuacagccac gucacagca guuuuagagc uaugciguuu ug 42

<210> 85

<211> 42

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 85

uuacagccac gucacagca guuuuagagc uaugciguuu ug 42

<210> 86

<211> 42

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 86

uuacagccac gucacagca guuuuagagc uaugciguuu ug 42

<210> 87

<211> 42

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 87

uuacagccac gucacagca guuuuagagc uaugciguuu ug 42

<210> 88

<211> 42

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 88

uuacagccac gucacagca guuuuagagc uaugciguuu ug 42

<210> 89

<211> 42

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 89

uuacagccac gucacagca guuuuagagc uaugciguuu ug 42

<210> 90

<211> 42

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 90

uuacagccac guciacagca guuuuagagc uaugciguuu ug 42

<210> 91

<211> 42

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 91

uuacagccac guciacagca guuuuagagc uaugciguuu ug 42

<210> 92

<211> 42

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 92

uuacagccac guciacagca guuuuagagc uaugciguuu ug 42

<210> 93

<211> 42

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 93

uuacagccac guciacagca guuuuagagc uaugciguuu ug 42

<210> 94

<211> 42

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 94

uuacagccac guciacagca guuuuagagc uaugciguuu ug 42

<210> 95

<211> 42  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 95  
uuacagccac gucacagca guuuuagagc uaugciguuu ug 42

<210> 96  
<211> 42  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 96  
uuacagccac gucacagca guuuuagagc uaugciguuu ug 42

<210> 97  
<211> 42  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 97  
uuacagccac gucacagca guuuuagagc uaugciguuu ug 42

<210> 98  
<211> 42  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 98  
uuacagccac gucacagca guuuuagagc uaugciguuu ug 42

<210> 99  
<211> 42  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 99

уаасагссас гуаасагса гуиуаагагс ааугсигуиу уг 42

<210> 100

<211> 42

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 100

уаасагссас гуаасагса гуиуаагагс ааугсигуиу уг 42

<210> 101

<211> 42

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 101

уаасагссас гуаасагса гуиуаагагс ааугсигуиу уг 42

<210> 102

<211> 42

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 102

уаасагссас гуаасагса ггсгсагагс ааугсигуиу уг 42

<210> 103

<211> 42

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 103

уаасагссас гуаасагса гуиуаагагс ааугсиггсг сг 42

<210> 104  
<211> 22  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 104  
guuuuagagc uaugcuguuu ug 22

<210> 105  
<211> 22  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 105  
guuuuagagc uaugcuguuu ug 22

<210> 106  
<211> 22  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 106  
guuuuagagc uaugcuguuu ug 22

<210> 107  
<211> 22  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 107  
guuuuagagc uaugcuguuu ug 22

<210> 108  
<211> 22  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 108  
guuuuagagc uaugcuguu ug 22

<210> 109  
<211> 22  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 109  
guuuuagagc uaugcuguu ug 22

<210> 110  
<211> 22  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 110  
guuuuagagc uaugcuguu ug 22

<210> 111  
<211> 22  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 111  
guuuuagagc uaugcuguu ug 22

<210> 112  
<211> 22  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 112

guuuuagagc uaugcuuuu ug 22

<210> 113  
<211> 22  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 113  
guuuuagagc uaugcuuuu ug 22

<210> 114  
<211> 22  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 114  
guuuuagagc uaugcuuuu ug 22

<210> 115  
<211> 22  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 115  
guuuuagagc uaugcuuuu ug 22

<210> 116  
<211> 22  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 116  
guuuuagagc uaugcuuuu ug 22

<210> 117  
<211> 22  
<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 117

guuuuagagc uaugcuuuu ug 22

<210> 118

<211> 22

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 118

guuuuagagc uaugcuuuu ug 22

<210> 119

<211> 22

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 119

guuuuagagc uaugcuuuu ug 22

<210> 120

<211> 22

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 120

guuuuagagc uaugcuuuu ug 22

<210> 121

<211> 22

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 121  
 гуишшгаgagc uaugсгуишш ug 22

<210> 122  
 <211> 16  
 <212> РНК  
 <213> Искусственная Последовательность

<220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 122  
 gagсuaugсu гуишшug 16

<210> 123  
 <211> 16  
 <212> РНК  
 <213> Искусственная Последовательность

<220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 123  
 gagсuaugсu гуишшug 16

<210> 124  
 <211> 22  
 <212> РНК  
 <213> Искусственная Последовательность

<220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 124  
 гуишшгаgagc uaugсгуишш ug 22

<210> 125  
 <211> 22  
 <212> РНК  
 <213> Искусственная Последовательность

<220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 125  
 гуишшгаgagc uaugсгуишш ug 22

<210> 126

<211> 22  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 126  
guuuuagagc uaugcuguuu ug 22

<210> 127  
<211> 22  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 127  
guuuuagagc uaugcuguuu ug 22

<210> 128  
<211> 22  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 128  
guuuuagagc uaugcuguuu ug 22

<210> 129  
<211> 22  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 129  
guuuuagagc uaugcuguuu ug 22

<210> 130  
<211> 22  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 130  
guuuuagagc uaugcuguuu ug 22

<210> 131  
<211> 42  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 131  
cagggсисуи гагауиссс гуууаgаgс uaugcuguuu ug 42

<210> 132  
<211> 42  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 132  
cagggсисуи гагауиссс гуууаgаgс uaugcuguuu ug 42

<210> 133  
<211> 42  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 133  
cagggсисуи гагауиссс гуууаgаgс uaugcuguuu ug 42

<210> 134  
<211> 42  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 134  
cagggсисуи гагауиссс гуууаgаgс uaugcuguuu ug 42

<210> 135  
<211> 42  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 135  
cagggсисии гаагаусисс гуиуиаgаgс иаугсигуиу иг 42

<210> 136  
<211> 42  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 136  
cagggсисии гаагаусисс гуиуиаgаgс иаугсигуиу иг 42

<210> 137  
<211> 42  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 137  
cagggсисии гаагаусисс гуиуиаgаgс иаугсигуиу иг 42

<210> 138  
<211> 42  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 138  
cagggсисии гаагаусисс гуиуиаgаgс иаугсигуиу иг 42

<210> 139  
<211> 42  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 139  
cagggcсuu gaагаucсс guuuuаgаgс uаugсигuuu ug 42

<210> 140  
<211> 42  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 140  
cagggcсuu gaагаucсс guuuuаgаgс uаugсигuuu ug 42

<210> 141  
<211> 42  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 141  
cagggcсuu gaагаucсс guuuuаgаgс uаugсигuuu ug 42

<210> 142  
<211> 42  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 142  
cagggcсuu gaагаucсс guuuuаgаgс uаugсигuuu ug 42

<210> 143  
<211> 42  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 143

cagggсисии гаагаусисс гуиуиагагс иаугсигуиу иг 42

<210> 144

<211> 42

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 144

cagggсисии гаагаусисс гуиуиагагс иаугсигуиу иг 42

<210> 145

<211> 42

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 145

cagggсисии гаагаусисс гуиуиагагс иаугсигуиу иг 42

<210> 146

<211> 42

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 146

cagggсисии гаагаусисс гуиуиагагс иаугсигуиу иг 42

<210> 147

<211> 42

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 147

cagggсисии гаагаусисс гуиуиагагс иаугсигуиу иг 42

<210> 148

<211> 42

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 148

sagggсисии гаагаусисс гуиуиагагс иаугсигуиу иг 42

<210> 149

<211> 42

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 149

sagggсисии гаагаусисс гуиуиагагс иаугсигуиу иг 42

<210> 150

<211> 42

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 150

sagggсисии гаагаусисс гуиуиагагс иаугсигуиу иг 42

<210> 151

<211> 42

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 151

sagggсисии гаагаусисс гуиуиагагс иаугсигуиу иг 42

<210> 152

<211> 42

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 152  
cagggсисии гаагаусисс гуиуиагагс иаугсигуиу иг 42

<210> 153  
<211> 42  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 153  
cagggсисии гаагаусисс гуиуиагагс иаугсигуиу иг 42

<210> 154  
<211> 42  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 154  
cagggсисии гаагаусисс гуиуиагагс иаугсигуиу иг 42

<210> 155  
<211> 42  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 155  
cagggсисии гаагаусисс гуиуиагагс иаугсигуиу иг 42

<210> 156  
<211> 42  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 156  
cagggсисии гаагаусисс гуиуиагагс иаугсигуиу иг 42

<210> 157

<211> 42  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 157  
cagggссиии гаагаусисс гуиииагагс иаугсигиии уг 42

<210> 158  
<211> 42  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 158  
cagggссиии гаагаусисс гуиииагагс иаугсигиии уг 42

<210> 159  
<211> 42  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 159  
cagggссиии гаагаусисс ggcgcagagc иаугсигиии уг 42

<210> 160  
<211> 42  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 160  
cagggссиии гаагаусисс гуиииагагс иаугсигggcg cg 42

<210> 161  
<211> 22  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 161  
guuuuagagc uaugcuguuu ug 22

<210> 162  
<211> 22  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 162  
guuuuagagc uaugcuguuu ug 22

<210> 163  
<211> 22  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 163  
guuuuagagc uaugcuguuu ug 22

<210> 164  
<211> 22  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 164  
guuuuagagc uaugcuguuu ug 22

<210> 165  
<211> 22  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 165  
guuuuagagc uaugcuguuu ug 22

<210> 166  
<211> 22  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 166  
guuuuagagc uaugcuguuu ug 22

<210> 167  
<211> 22  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 167  
guuuuagagc uaugcuguuu ug 22

<210> 168  
<211> 22  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 168  
guuuuagagc uaugcuguuu ug 22

<210> 169  
<211> 22  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 169  
guuuuagagc uaugcuguuu ug 22

<210> 170  
<211> 22  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 170  
guuuuagagc uaugcuguu ug 22

<210> 171  
<211> 22  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 171  
guuuuagagc uaugcuguu ug 22

<210> 172  
<211> 22  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 172  
guuuuagagc uaugcuguu ug 22

<210> 173  
<211> 22  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 173  
guuuuagagc uaugcuguu ug 22

<210> 174  
<211> 22  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 174

guuuuagagc uaugcguuu ug 22

<210> 175  
<211> 22  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 175  
guuuuagagc uaugcguuu ug 22

<210> 176  
<211> 22  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 176  
guuuuagagc uaugcguuu ug 22

<210> 177  
<211> 22  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 177  
guuuuagagc uaugcguuu ug 22

<210> 178  
<211> 22  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 178  
guuuuagagc uaugcguuu ug 22

<210> 179  
<211> 22  
<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 179

guuuuagagc uaugcuuuu ug 22

<210> 180

<211> 22

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 180

guuuuagagc uaugcuuuu ug 22

<210> 181

<211> 22

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 181

guuuuagagc uaugcuuuu ug 22

<210> 182

<211> 22

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 182

guuuuagagc uaugcuuuu ug 22

<210> 183

<211> 22

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 183  
guuuuagagc uaugcuguu ug 22

<210> 184  
<211> 22  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 184  
guuuuagagc uaugcuguu ug 22

<210> 185  
<211> 22  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 185  
guuuuagagc uaugcuguu ug 22

<210> 186  
<211> 22  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 186  
guuuuagagc uaugcuguu ug 22

<210> 187  
<211> 22  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 187  
guuuuagagc uaugcuguu ug 22

<210> 188

<211> 74  
 <212> РНК  
 <213> Искусственная Последовательность

<220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 188  
 аасагсаиаг саагиаааа иааггсиаги ссгиаисаа сиугаааааг уггсасцгаг 60

исггугсиии ииии 74

<210> 189  
 <211> 71  
 <212> РНК  
 <213> Искусственная Последовательность

<220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 189  
 аасагсаиаг саагиаааа иааггсиаги ссгиаисаа сиугаааааг уггсасцгаг 60

исггугсиии и 71

<210> 190  
 <211> 71  
 <212> РНК  
 <213> Искусственная Последовательность

<220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 190  
 аасагсаиаг саагиаааа иааггсиаги ссгиаисаа сиугаааааг уггсасцгаг 60

исггугсиии и 71

<210> 191  
 <211> 71  
 <212> РНК  
 <213> Искусственная Последовательность

<220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 191  
 аасагсаиаг саагиаааа иааггсиаги ссгиаисаа сиугаааааг уггсасцгаг 60

исггугсиии и 71





аасаgсаиаg сааgиiaааа iaаggсиаgи ссgиiaасаа сиgаааааg uggсaccgag 60

ucggugсиии и 71

<210> 200

<211> 71

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 200

аасаgсаиаg сааgиiaааа iaаggсиаgи ссgиiaасаа сиgаааааg uggсaccgag 60

ucggugсиии и 71

<210> 201

<211> 71

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 201

аасаgсаиаg сааgиugсгс iaаggсиаgи ссgиiaасаа сиgаааааg uggсaccgag 60

ucggugсиии и 71

<210> 202

<211> 71

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 202

гссаgсаиаg сааgиiaааа iaаggсиаgи ссgиiaасаа сиgаааааg uggсaccgag 60

ucggugсиии и 71

<210> 203

<211> 71

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 203  
gссagсаuаg сааgиugсgc uаaggсuаgи ссgииаuсаа сиugаааааg ugгсассgаg 60

ucggugсиии u 71

<210> 204  
<211> 74  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 204  
аасagсаuаg сааgииаааа uаaggсuаgи ссgииаuсаа сиugаааааg ugгсассgаg 60

ucggugсиии ииии 74

<210> 205  
<211> 71  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 205  
аасagсаuаg сааgииаааа uаaggсuаgи ссgииаuсаа сиugаааааg ugгсассgаg 60

ucggugсиии u 71

<210> 206  
<211> 71  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 206  
аасagсаuаg сааgииаааа uаaggсuаgи ссgииаuсаа сиugаааааg ugгсассgаg 60

ucggugсиии u 71

<210> 207  
<211> 71  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 207

аасагсаиаг саагиаааа иааггсиагу ссгиаусаа сиугаааааг уggсaccгaг 60

ucggugcuuu u 71

<210> 208

<211> 71

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 208

аасагсаиаг саагиаааа иааггсиагу ссгиаусаа сиугаааааг уggсaccгaг 60

ucggugcuuu u 71

<210> 209

<211> 71

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 209

аасагсаиаг саагиаааа иааггсиагу ссгиаусаа сиугаааааг уggсaccгaг 60

ucggugcuuu u 71

<210> 210

<211> 71

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 210

аасагсаиаг саагиаааа иааггсиагу ссгиаусаа сиугаааааг уggсaccгaг 60

ucggugcuuu u 71

<210> 211

<211> 71

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 211  
 аасагсаиаг саагиаааа иааггсиагу ссгиаусаа сиугаааааг уггсасцгаг 60

исггугсиии и 71

<210> 212  
 <211> 71  
 <212> РНК  
 <213> Искусственная Последовательность

<220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 212  
 аасагсаиаг саагиаааа иааггсиагу ссгиаусаа сиугаааааг уггсасцгаг 60

исггугсиии и 71

<210> 213  
 <211> 71  
 <212> РНК  
 <213> Искусственная Последовательность

<220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 213  
 аасагсаиаг саагиаааа иааггсиагу ссгиаусаа сиугаааааг уггсасцгаг 60

исггугсиии и 71

<210> 214  
 <211> 71  
 <212> РНК  
 <213> Искусственная Последовательность

<220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 214  
 аасагсаиаг саагиаааа иааггсиагу ссгиаусаа сиугаааааг уггсасцгаг 60

исггугсиии и 71

<210> 215  
 <211> 71  
 <212> РНК





<210> 223  
<211> 71  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 223  
аасагсаиаг саагиугага иааггсиагу ссгииаусаа сиугаааааг уggсaccгag 60  
исggугсиии и 71

<210> 224  
<211> 71  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 224  
аасагсаиаг саагиуаааг иааггсиагу ссгииаусаа сиугаааааг уggсaccгag 60  
исggугсиии и 71

<210> 225  
<211> 71  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 225  
аасагсаиаг саагиуаааг иааггсиагу ссгииаусаа сиугаааааг уggсaccгag 60  
исggугсиии и 71

<210> 226  
<211> 71  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 226  
аасагсаиаг саагиуагаа иааггсиагу ссгииаусаа сиугаааааг уggсaccгag 60

ucggugcuiи u 71

<210> 227  
 <211> 71  
 <212> РНК  
 <213> Искусственная Последовательность

<220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 227  
 аасагсаиаг саагиугааа иааггсиагу ссгииаусаа сиугаааааг уггсасцгаг 60

ucggugcuiи u 71

<210> 228  
 <211> 100  
 <212> РНК  
 <213> Искусственная Последовательность

<220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полинуклеотид"

<400> 228  
 ссагсцагс гаггсааагг гуиуиагагс иагааиуагс аагуиааааи ааггсиагс 60

сгииаусаас иугааааагу ггсасцгагу сггугсuiии 100

<210> 229  
 <211> 100  
 <212> РНК  
 <213> Искусственная Последовательность

<220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полинуклеотид"

<400> 229  
 ссагсцагс гаггсааагг гуиуиагагс иагааиуагс аагуиааааи ааггсиагс 60

сгииаусаас иугааааагу ггсасцгагу сггугсuiии 100

<210> 230  
 <211> 100  
 <212> РНК  
 <213> Искусственная Последовательность

<220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полинуклеотид"

<400> 230

ссaguccagc gaggsaaagg гуиуиagagc иагааиagc аагуиаааи аaggcuaguc 60

сгуиаисаас иугааааагу ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 231

<211> 100

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полинуклеотид"

<400> 231

ссaguccagc gaggsaaagg гуиуиagagc иагааиagc аагуиаааи аaggcuaguc 60

сгуиаисаас иугааааагу ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 232

<211> 100

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полинуклеотид"

<400> 232

ссaguccagc gaggsaaagg гуиуиagagc иагааиagc аагуиаааи аaggcuaguc 60

сгуиаисаас иугааааагу ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 233

<211> 100

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полинуклеотид"

<400> 233

ссaguccagc gaggsaaagg гуиуиagagc иагааиagc аагуиаааи аaggcuaguc 60

сгуиаисаас иугааааагу ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 234

<211> 100

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полинуклеотид"

<400> 234  
 ccaguccagc gaggsaaagg guuuuagagc uagaaaagc aaguuaaaau aaggcuagc 60

сгуиуаусаас иугааааагу ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 235  
 <211> 80  
 <212> РНК  
 <213> Искусственная Последовательность

<220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 235  
 guuuuagagc uagaaaagc aaguuaaaau aaggcuagc сгуиуаусаас иугааааагу 60

ggcaccgagu cggugcuuuu 80

<210> 236  
 <211> 80  
 <212> РНК  
 <213> Искусственная Последовательность

<220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 236  
 guuuuagagc uagaaaagc aaguuaaaau aaggcuagc сгуиуаусаас иугааааагу 60

ggcaccgagu cggugcuuuu 80

<210> 237  
 <211> 80  
 <212> РНК  
 <213> Искусственная Последовательность

<220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 237  
 guuuuagagc uagaaaagc aaguuaaaau aaggcuagc сгуиуаусаас иугааааагу 60

ggcaccgagu cggugcuuuu 80

<210> 238  
 <211> 80  
 <212> РНК  
 <213> Искусственная Последовательность

<220>  
 <221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 238

гуиуиуагагс иагааиуагс аагуиаааи ааггсуагс сгуиуаусаас иугааааагу 60

ггсассгагу сггугсуиуи 80

<210> 239

<211> 80

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 239

гуиуиуагагс иагааиуагс аагуиаааи ааггсуагс сгуиуаусаас иугааааагу 60

ггсассгагу сггугсуиуи 80

<210> 240

<211> 80

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 240

гуиуиуагагс иагааиуагс аагуиаааи ааггсуагс сгуиуаусаас иугааааагу 60

ггсассгагу сггугсуиуи 80

<210> 241

<211> 100

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полинуклеотид"

<400> 241

иуасагссас гисуасагса гуиуиуагагс иагааиуагс аагуиаааи ааггсуагс 60

сгуиуаусаас иугааааагу ггсассгагу сггугсуиуи 100

<210> 242

<211> 100

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность



<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полинуклеотид"

<400> 246

уиасагссас гисуасагса гуиуиуагaгс иагаааиагс аагуиааааи ааггсуагс 60

сгуиуаисаас иугааааагу ггсассгагу сggугсуиуи 100

<210> 247

<211> 100

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полинуклеотид"

<400> 247

уиасагссас гисуасагса гуиуиуагaгс иагаааиагс аагуиааааи ааггсуагс 60

сгуиуаисаас иугааааагу ггсассгагу сggугсуиуи 100

<210> 248

<211> 100

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полинуклеотид"

<400> 248

уиасагссас гисуасагса гуиуиуагaгс иагаааиагс аагуиааааи ааггсуагс 60

сгуиуаисаас иугааааагу ггсассгагу сggугсуиуи 100

<210> 249

<211> 100

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полинуклеотид"

<400> 249

уиасагссас гисуасагса гуиуиуагaгс иагаааиагс аагуиааааи ааггсуагс 60

сгуиуаисаас иугааааагу ггсассгагу сggугсуиуи 100

<210> 250

<211> 100  
 <212> РНК  
 <213> Искусственная Последовательность

<220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полинуклеотид"

<400> 250  
 уаасагссас гисуасагса гуиуагсгс иагаауагс аагуаааау ааггсуагс 60  
 сгуаусаас иугааааагу ггсасгсгау сггугсуиуу 100

<210> 251  
 <211> 100  
 <212> РНК  
 <213> Искусственная Последовательность

<220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полинуклеотид"

<400> 251  
 уаасагссас гисуасагса гуиуагсгс иагаауагс аагуаааау ааггсуагс 60  
 сгуаусаас иугааааагу ггсасгсгау сггугсуиуу 100

<210> 252  
 <211> 100  
 <212> РНК  
 <213> Искусственная Последовательность

<220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полинуклеотид"

<400> 252  
 уаасагссас гисуасагса гуиуагсгс иагаауагс аагуаааау ааггсуагс 60  
 сгуаусаас иугааааагу ггсасгсгау сггугсуиуу 100

<210> 253  
 <211> 100  
 <212> РНК  
 <213> Искусственная Последовательность

<220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полинуклеотид"

<400> 253  
 уаасагссас гисуасагса гуиуагсгс иагаауагс аагуаааау ааггсуагс 60  
 сгуаусаас иугааааагу ггсасгсгау сггугсуиуу 100

<210> 254  
 <211> 100  
 <212> РНК  
 <213> Искусственная Последовательность

<220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полинуклеотид"

<400> 254  
 уаасагссас гуиуасагса гуиууагасгс иагаауагс аагуиааааи ааггсуагс 60  
 сгуиуаусаас иугааааагу ггсассгагу сггугсуиуи 100

<210> 255  
 <211> 100  
 <212> РНК  
 <213> Искусственная Последовательность

<220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полинуклеотид"

<400> 255  
 уаасагссас гуиуасагса гуиууагасгс иагаауагс аагуиааааи ааггсуагс 60  
 сгуиуаусаас иугааааагу ггсассгагу сггугсуиуи 100

<210> 256  
 <211> 100  
 <212> РНК  
 <213> Искусственная Последовательность

<220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полинуклеотид"

<400> 256  
 уаасагссас гуиуасагса гуиууагасгс иагаауагс аагуиааааи ааггсуагс 60  
 сгуиуаусаас иугааааагу ггсассгагу сггугсуиуи 100

<210> 257  
 <211> 100  
 <212> РНК  
 <213> Искусственная Последовательность

<220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полинуклеотид"

<400> 257  
 уаасагссас гуиуасагса гуиууагасгс иагаауагс аагуиааааи ааггсуагс 60

сгуиуаусаас иугаааааагу ггсассггагу сggugcuuuu 100

<210> 258

<211> 100

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полинуклеотид"

<400> 258

иуасасгсас гисуасасгса гуиууагасгс иагаауагс аагуиуааау ааggcuaguc 60

сгуиуаусаас иугаааааагу ггсассггагу сggugcuuuu 100

<210> 259

<211> 100

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полинуклеотид"

<400> 259

иуасасгсас гисуасасгса гуиууагасгс иагаауагс аагуиуааау ааggcuaguc 60

сгуиуаусаас иугаааааагу ггсассггагу сggugcuuuu 100

<210> 260

<211> 100

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полинуклеотид"

<400> 260

иуасасгсас гисуасасгса гуиууагасгс иагаауагс аагуиуааау ааggcuaguc 60

сгуиуаусаас иугаааааагу ггсассггагу сggugcuuuu 100

<210> 261

<211> 100

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полинуклеотид"

<400> 261

uuacagccac gucacagca guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaacaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 262

<211> 100

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полинуклеотид"

<400> 262

uuacagccac gucacagca guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaacaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 263

<211> 100

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полинуклеотид"

<400> 263

uuacagccac gucacagca guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaacaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 264

<211> 100

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полинуклеотид"

<400> 264

uuacagccac gucacagca guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaacaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 265

<211> 80

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 265  
гуишuuаgаgс uаgааuuаgс ааgиuuаааи ааggсuаgс сgиuuасuас uгuаааааgи 60

ggсaccgаgи сggиgсишuu 80

<210> 266  
<211> 80  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 266  
гуишuuаgаgс uаgааuuаgс ааgиuuаааи ааggсuаgс сgиuuасuас uгuаааааgи 60

ggсaccgаgи сggиgсишuu 80

<210> 267  
<211> 80  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 267  
гуишuuаgаgс uаgааuuаgс ааgиuuаааи ааggсuаgс сgиuuасuас uгuаааааgи 60

ggсaccgаgи сggиgсишuu 80

<210> 268  
<211> 80  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 268  
гуишuuаgаgс uаgааuuаgс ааgиuuаааи ааggсuаgс сgиuuасuас uгuаааааgи 60

ggсaccgаgи сggиgсишuu 80

<210> 269  
<211> 80  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 269

гуиуиуагагс иагааиуагс аагуиаааи ааггсуагс сгуиуаусаас иугааааагу 60

ггсассгагу сггугсуиуи 80

<210> 270

<211> 80

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 270

гуиуиуагагс иагааиуагс аагуиаааи ааггсуагс сгуиуаусаас иугааааагу 60

ггсассгагу сггугсуиуи 80

<210> 271

<211> 80

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 271

гуиуиуагагс иагааиуагс аагуиаааи ааггсуагс сгуиуаусаас иугааааагу 60

ггсассгагу сггугсуиуи 80

<210> 272

<211> 80

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 272

гуиуиуагагс иагааиуагс аагуиаааи ааггсуагс сгуиуаусаас иугааааагу 60

ггсассгагу сггугсуиуи 80

<210> 273

<211> 80

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 273  
 гуиуиуагагс иагааиуагс аагиуаааи ааггсиагс сгиуаусаас иугааааагу 60

ггсассгагу сггигсиуиуи 80

<210> 274  
 <211> 80  
 <212> РНК  
 <213> Искусственная Последовательность

<220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 274  
 гуиуиуагагс иагааиуагс аагиуаааи ааггсиагс сгиуаусаас иугааааагу 60

ггсассгагу сггигсиуиуи 80

<210> 275  
 <211> 80  
 <212> РНК  
 <213> Искусственная Последовательность

<220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 275  
 гуиуиуагагс иагааиуагс аагиуаааи ааггсиагс сгиуаусаас иугааааагу 60

ггсассгагу сггигсиуиуи 80

<210> 276  
 <211> 80  
 <212> РНК  
 <213> Искусственная Последовательность

<220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 276  
 гуиуиуагагс иагааиуагс аагиуаааи ааггсиагс сгиуаусаас иугааааагу 60

ггсассгагу сггигсиуиуи 80

<210> 277  
 <211> 80  
 <212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 277

guuuuagagc uagaaaagc aaguuaaaa aaggcuagc cguuausaac uugaaaaagu 60

ggcaccgagu cggugcuuuu 80

<210> 278

<211> 80

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 278

guuuuagagc uagaaaagc aaguuaaaa aaggcuagc cguuausaac uugaaaaagu 60

ggcaccgagu cggugcuuuu 80

<210> 279

<211> 80

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 279

guuuuagagc uagaaaagc aaguuaaaa aaggcuagc cguuausaac uugaaaaagu 60

ggcaccgagu cggugcuuuu 80

<210> 280

<211> 80

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 280

guuuuagagc uagaaaagc aaguuaaaa aaggcuagc cguuausaac uugaaaaagu 60

ggcaccgagu cggugcuuuu 80

<210> 281

<211> 80  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 281  
гуишшгагагс иагаааиагс аагуиаааи ааггсиагс сгуиаусаас шгааааагу 60  
ggcaccgagu cggugcшшш 80

<210> 282  
<211> 80  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 282  
гуишшгагагс иагаааиагс аагуиаааи ааггсиагс сгуиаусаас шгааааагу 60  
ggcaccgagu cggugcшшш 80

<210> 283  
<211> 80  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 283  
гуишшгагагс иагаааиагс аагуиаааи ааггсиагс сгуиаусаас шгааааагу 60  
ggcaccgagu cggugcшшш 80

<210> 284  
<211> 80  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 284  
гуишшгагагс иагаааиагс аагуиаааи ааггсиагс сгуиаусаас шгааааагу 60  
ggcaccgagu cggugcшшш 80

<210> 285  
 <211> 80  
 <212> РНК  
 <213> Искусственная Последовательность

<220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 285  
 гуиуиуагагс иагаауагс аагуиааау ааггсуагс сгуиуаусаас иугааааагу 60  
 ггсассгагу сггугсуиуи 80

<210> 286  
 <211> 100  
 <212> РНК  
 <213> Искусственная Последовательность

<220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полинуклеотид"

<400> 286  
 сaggгсусиу гаагаусисс гуиуиуагагс иагаауагс аагуиааау ааггсуагс 60  
 сгуиуаусаас иугааааагу ггсассгагу сггугсуиуи 100

<210> 287  
 <211> 100  
 <212> РНК  
 <213> Искусственная Последовательность

<220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полинуклеотид"

<400> 287  
 сaggгсусиу гаагаусисс гуиуиуагагс иагаауагс аагуиааау ааггсуагс 60  
 сгуиуаусаас иугааааагу ггсассгагу сггугсуиуи 100

<210> 288  
 <211> 100  
 <212> РНК  
 <213> Искусственная Последовательность

<220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полинуклеотид"

<400> 288  
 сaggгсусиу гаагаусисс гуиуиуагагс иагаауагс аагуиааау ааггсуагс 60

сгуиасаас иугааааагу ггсассгагу сggугсуиуи 100

<210> 289  
 <211> 100  
 <212> РНК  
 <213> Искусственная Последовательность

<220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полинуклеотид"

<400> 289  
 сaggгсусиу гаагаусисс гуиуиагагс иагаааиагс аагуиааааи аaggсуагс 60

сгуиасаас иугаааааагу ггсассгагу сggугсуиуи 100

<210> 290  
 <211> 100  
 <212> РНК  
 <213> Искусственная Последовательность

<220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полинуклеотид"

<400> 290  
 сaggгсусиу гаагаусисс гуиуиагагс иагаааиагс аагуиааааи аaggсуагс 60

сгуиасаас иугаааааагу ггсассгагу сggугсуиуи 100

<210> 291  
 <211> 100  
 <212> РНК  
 <213> Искусственная Последовательность

<220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полинуклеотид"

<400> 291  
 сaggгсусиу гаагаусисс гуиуиагагс иагаааиагс аагуиааааи аaggсуагс 60

сгуиасаас иугаааааагу ггсассгагу сggугсуиуи 100

<210> 292  
 <211> 100  
 <212> РНК  
 <213> Искусственная Последовательность

<220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полинуклеотид"

<400> 292

sagggсисии гаагаусисс гуиуиагагс иагаауагс аагуиааааи ааггсиагс 60

сгуиуаисаас иугааааагу ггсассгагу сggugcuiuu 100

<210> 293

<211> 100

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полинуклеотид"

<400> 293

sagggсисии гаагаусисс гуиуиагагс иагаауагс аагуиааааи ааггсиагс 60

сгуиуаисаас иугааааагу ггсассгагу сggugcuiuu 100

<210> 294

<211> 100

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полинуклеотид"

<400> 294

sagggсисии гаагаусисс гуиуиагагс иагаауагс аагуиааааи ааггсиагс 60

сгуиуаисаас иугааааагу ггсассгагу сggugcuiuu 100

<210> 295

<211> 100

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полинуклеотид"

<400> 295

sagggсисии гаагаусисс гуиуиагагс иагаауагс аагуиааааи ааггсиагс 60

сгуиуаисаас иугааааагу ггсассгагу сggugcuiuu 100

<210> 296

<211> 100

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полинуклеотид"

<400> 296  
 cagggcсии гагаaucсс гуиuuаgаgс uаgаааuаgс аагуиааааи ааggсuаgс 60

сгуиаисаас иугааааагу ggcaccgаgи сggugсииии 100

<210> 297  
 <211> 100  
 <212> РНК  
 <213> Искусственная Последовательность

<220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полинуклеотид"

<400> 297  
 cagggcсии гагаaucсс гуиuuаgаgс uаgаааuаgс аагуиааааи ааggсuаgс 60

сгуиаисаас иугааааагу ggcaccgаgи сggugсииии 100

<210> 298  
 <211> 100  
 <212> РНК  
 <213> Искусственная Последовательность

<220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полинуклеотид"

<400> 298  
 cagggcсии гагаaucсс гуиuuаgаgс uаgаааuаgс аагуиааааи ааggсuаgс 60

сгуиаисаас иугааааагу ggcaccgаgи сggugсииии 100

<210> 299  
 <211> 100  
 <212> РНК  
 <213> Искусственная Последовательность

<220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полинуклеотид"

<400> 299  
 cagggcсии гагаaucсс гуиuuаgаgс uаgаааuаgс аагуиааааи ааggсuаgс 60

сгуиаисаас иугааааагу ggcaccgаgи сggugсииии 100

<210> 300  
 <211> 100  
 <212> РНК  
 <213> Искусственная Последовательность

<220>  
 <221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полинуклеотид"

<400> 300

sagggссиuu гаагаусисс гуиuuаgаgс uаgаааuаgс аагуиааааu ааggсuаgс 60

сгуиаусаас uгaаааааgи gгсассgаgи сggugсииии 100

<210> 301

<211> 100

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полинуклеотид"

<400> 301

sagggссиuu гаагаусисс гуиuuаgаgс uаgаааuаgс аагуиааааu ааggсuаgс 60

сгуиаусаас uгaаааааgи gгсассgаgи сggugсииии 100

<210> 302

<211> 100

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полинуклеотид"

<400> 302

sagggссиuu гаагаусисс гуиuuаgаgс uаgаааuаgс аагуиааааu ааggсuаgс 60

сгуиаусаас uгaаааааgи gгсассgаgи сggugсииии 100

<210> 303

<211> 100

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полинуклеотид"

<400> 303

sagggссиuu гаагаусисс гуиuuаgаgс uаgаааuаgс аагуиааааu ааggсuаgс 60

сгуиаусаас uгaаааааgи gгсассgаgи сggugсииии 100

<210> 304

<211> 100

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; источник

&lt;223&gt; /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полинуклеотид"

&lt;400&gt; 304

cagggcсии гагааусисс гуиуиагагс иагаааиагс аагуиааааи ааггсиагс 60

сгуиаусаас иугааааагу ггсассгагу сггугсииуи 100

&lt;210&gt; 305

&lt;211&gt; 100

&lt;212&gt; РНК

&lt;213&gt; Искусственная Последовательность

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; источник

&lt;223&gt; /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полинуклеотид"

&lt;400&gt; 305

cagggcсии гагааусисс гуиуиагагс иагаааиагс аагуиааааи ааггсиагс 60

сгуиаусаас иугааааагу ггсассгагу сггугсииуи 100

&lt;210&gt; 306

&lt;211&gt; 100

&lt;212&gt; РНК

&lt;213&gt; Искусственная Последовательность

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; источник

&lt;223&gt; /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полинуклеотид"

&lt;400&gt; 306

cagggcсии гагааусисс гуиуиагагс иагаааиагс аагуиааааи ааггсиагс 60

сгуиаусаас иугааааагу ггсассгагу сггугсииуи 100

&lt;210&gt; 307

&lt;211&gt; 100

&lt;212&gt; РНК

&lt;213&gt; Искусственная Последовательность

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; источник

&lt;223&gt; /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полинуклеотид"

&lt;400&gt; 307

cagggcсии гагааусисс гуиуиагагс иагаааиагс аагуиааааи ааггсиагс 60

сгуиаусаас иугааааагу ггсассгагу сггугсииуи 100

&lt;210&gt; 308

&lt;211&gt; 100

&lt;212&gt; РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полинуклеотид"

<400> 308

сagggcсuии гагаaucсc гуиииagagc uагаaaиagc aагуиaaааи aaggсuаguc 60

сгуиаисаас uгаааааагу ggcaccgаgи сggugсuиии 100

<210> 309

<211> 80

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 309

гуиииagagc uагаaaиagc aагуиaaааи aaggсuаguc сгуиаисаас uгаааааагу 60

ggcaccgаgи сggugсuиии 80

<210> 310

<211> 80

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 310

гуиииagagc uагаaaиagc aагуиaaааи aaggсuаguc сгуиаисаас uгаааааагу 60

ggcaccgаgи сggugсuиии 80

<210> 311

<211> 80

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 311

гуиииagagc uагаaaиagc aагуиaaааи aaggсuаguc сгуиаисаас uгаааааагу 60

ggcaccgаgи сggugсuиии 80

<210> 312

<211> 80  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 312  
гуишшиагагс иагааиагс аагишааааи ааггсиагс сгишаусаас шгааааагу 60  
ggсaccgagu сggugсшшшш 80

<210> 313  
<211> 80  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 313  
гуишшиагагс иагааиагс аагишааааи ааггсиагс сгишаусаас шгааааагу 60  
ggсaccgagu сggugсшшшш 80

<210> 314  
<211> 80  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 314  
гуишшиагагс иагааиагс аагишааааи ааггсиагс сгишаусаас шгааааагу 60  
ggсaccgagu сggugсшшшш 80

<210> 315  
<211> 80  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 315  
гуишшиагагс иагааиагс аагишааааи ааггсиагс сгишаусаас шгааааагу 60  
ggсaccgagu сggugсшшшш 80

<210> 316  
 <211> 80  
 <212> РНК  
 <213> Искусственная Последовательность

<220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 316  
 гуиуиуагагс иагаауагс аагуиаааи ааггсуагс сгуиуаусаас иугааааагу 60  
 ггсассгагу сггугсуиуи 80

<210> 317  
 <211> 80  
 <212> РНК  
 <213> Искусственная Последовательность

<220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 317  
 гуиуиуагагс иагаауагс аагуиаааи ааггсуагс сгуиуаусаас иугааааагу 60  
 ггсассгагу сггугсуиуи 80

<210> 318  
 <211> 80  
 <212> РНК  
 <213> Искусственная Последовательность

<220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 318  
 гуиуиуагагс иагаауагс аагуиаааи ааггсуагс сгуиуаусаас иугааааагу 60  
 ггсассгагу сггугсуиуи 80

<210> 319  
 <211> 80  
 <212> РНК  
 <213> Искусственная Последовательность

<220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 319  
 гуиуиуагагс иагаауагс аагуиаааи ааггсуагс сгуиуаусаас иугааааагу 60

ggcaccgagu cggugcuuuu 80

<210> 320  
 <211> 80  
 <212> РНК  
 <213> Искусственная Последовательность

<220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 320  
 гуиуиагагс иагааиагс аагуиаааи ааггсиагс сгуиуаусаас иугааааагу 60

ggcaccgagu cggugcuuuu 80

<210> 321  
 <211> 80  
 <212> РНК  
 <213> Искусственная Последовательность

<220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 321  
 гуиуиагагс иагааиагс аагуиаааи ааггсиагс сгуиуаусаас иугааааагу 60

ggcaccgagu cggugcuuuu 80

<210> 322  
 <211> 80  
 <212> РНК  
 <213> Искусственная Последовательность

<220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 322  
 гуиуиагагс иагааиагс аагуиаааи ааггсиагс сгуиуаусаас иугааааагу 60

ggcaccgagu cggugcuuuu 80

<210> 323  
 <211> 80  
 <212> РНК  
 <213> Искусственная Последовательность

<220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 323

guuuuagagc uagaaaagc aaguuaaaau aaggcuaguc cguuausaac uugaaaaagu 60

ggcaccgagu cggugcuuuu 80

<210> 324

<211> 80

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 324

guuuuagagc uagaaaagc aaguuaaaau aaggcuaguc cguuausaac uugaaaaagu 60

ggcaccgagu cggugcuuuu 80

<210> 325

<211> 80

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 325

guuuuagagc uagaaaagc aaguuaaaau aaggcuaguc cguuausaac uugaaaaagu 60

ggcaccgagu cggugcuuuu 80

<210> 326

<211> 80

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 326

guuuuagagc uagaaaagc aaguuaaaau aaggcuaguc cguuausaac uugaaaaagu 60

ggcaccgagu cggugcuuuu 80

<210> 327

<211> 80

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 327  
guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaa uaggcuaguc cguuausaac uugaaaaagu 60

ggcaccgagu cggugcuuuu 80

<210> 328  
<211> 80  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 328  
guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaa uaggcuaguc cguuausaac uugaaaaagu 60

ggcaccgagu cggugcuuuu 80

<210> 329  
<211> 80  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 329  
guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaa uaggcuaguc cguuausaac uugaaaaagu 60

ggcaccgagu cggugcuuuu 80

<210> 330  
<211> 100  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полинуклеотид"

<400> 330  
сссауасусс уасгассса guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaa uaggcuaguc 60

cguuausaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 331  
<211> 100  
<212> РНК  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полинуклеотид"

<400> 331

сссаиасисс иасгсассса гуиуиуагас иагааиуагс аагуиаааи ааггсуагс 60

сгуиуаисаас иугааааагу ггсассгагу сggугсуиуи 100

<210> 332

<211> 100

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полинуклеотид"

<400> 332

сссаиасисс иасгсассса гуиуиуагас иагааиуагс аагуиаааи ааггсуагс 60

сгуиуаисаас иугааааагу ггсассгагу сggугсуиуи 100

<210> 333

<211> 24

<212> DNA

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический праймер"

<400> 333

агтсаатаат сагаатсгс агт 24

<210> 334

<211> 24

<212> DNA

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический праймер"

<400> 334

gtttgttcc agagtctatc accg 24

<210> 335

<211> 24

<212> DNA

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический праймер"

<400> 335  
attaccagct tagcatcctg tga 24

<210> 336  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический праймер"

<400> 336  
agcacatgag accttctgtt tctc 24

<210> 337  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический праймер"

<400> 337  
agaaggcact tcttcttat ctaaggt 27

<210> 338  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический праймер"

<400> 338  
асасгаатаа gagсааtgg гаас 24

<210> 339  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Искусственная Последовательность

<220>  
<221> источник  
<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический праймер"

<400> 339  
асасggttta tagagсаага асас 24

<210> 340

<211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Искусственная Последовательность

<220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический праймер"

<400> 340  
 gacataggtg tgaccctcac aatc 24

<210> 341  
 <211> 100  
 <212> РНК  
 <213> Искусственная Последовательность

<220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полинуклеотид"

<400> 341  
 cсагссагс gaggсааagg гуиуиаgаgс иаgааиаgс аагуиаааи аaggсuаgс 60

сгуиаисаас иугааааагу ggcaccgagu cggugcиии 100

<210> 342  
 <211> 100  
 <212> РНК  
 <213> Искусственная Последовательность

<220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полинуклеотид"

<400> 342  
 иасагссас гуиуиаgаgс гуиуиаgаgс иаgааиаgс аагуиаааи аaggсuаgс 60

сгуиаисаас иугааааагу ggcaccgagu cggugcиии 100

<210> 343  
 <211> 100  
 <212> РНК  
 <213> Искусственная Последовательность

<220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полинуклеотид"

<400> 343  
 иасагссас гуиуиаgаgс гуиуиаgаgс иаgааиаgс аагуиаааи аaggсuаgс 60

сгуиаисаас иугааааагу ggcaccgagu cggugcиии 100

<210> 344

<211> 100  
 <212> РНК  
 <213> Искусственная Последовательность

<220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полинуклеотид"

<400> 344  
 уаасагссас гисаасагса гуиуаагасгс иагаауагс аагуаааау ааггсуагс 60  
 сгуаусаас иагааааагу ггсасггау сггуагуиуи 100

<210> 345  
 <211> 100  
 <212> РНК  
 <213> Искусственная Последовательность

<220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полинуклеотид"

<400> 345  
 уаасагссас гисаасагса гуиуаагасгс иагаауагс аагуаааау ааггсуагс 60  
 сгуаусаас иагааааагу ггсасггау сггуагуиуи 100

<210> 346  
 <211> 100  
 <212> РНК  
 <213> Искусственная Последовательность

<220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полинуклеотид"

<400> 346  
 уаасагссас гисаасагса гуиуаагасгс иагаауагс аагуаааау ааггсуагс 60  
 сгуаусаас иагааааагу ггсасггау сггуагуиуи 100

<210> 347  
 <211> 100  
 <212> РНК  
 <213> Искусственная Последовательность

<220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полинуклеотид"

<400> 347  
 уаасагссас гисаасагса гуиуаагасгс иагаауагс аагуаааау ааггсуагс 60  
 сгуаусаас иагааааагу ггсасггау сггуагуиуи 100



сгуааусаас иугааааагу ггсассгагу сggугсуиуи 100

<210> 352  
 <211> 100  
 <212> РНК  
 <213> Искусственная Последовательность

<220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полинуклеотид"

<400> 352  
 иаасгссас гисуасгса гуиуагас иагаауагс аагуааааи аaggсуагс 60

сгуааусаас иугааааагу ггсассгагу сggугсуиуи 100

<210> 353  
 <211> 100  
 <212> РНК  
 <213> Искусственная Последовательность

<220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полинуклеотид"

<400> 353  
 иаасгссас гисуасгса гуиуагас иагаауагс аагуааааи аaggсуагс 60

сгуааусаас иугааааагу ггсассгагу сggугсуиуи 100

<210> 354  
 <211> 100  
 <212> РНК  
 <213> Искусственная Последовательность

<220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полинуклеотид"

<220>  
 <221> разное  
 <222> (1)..(20)  
 <223> n является а, с, г, или и

<400> 354  
 нnnnnnnnnn нnnnnnnnnn гуиуагас иагаауагс аагуааааи аaggсуагс 60

сгуааусаас иугааааагу ггсассгагу сggугсуиуи 100

<210> 355  
 <211> 80  
 <212> РНК  
 <213> Искусственная Последовательность

<220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полинуклеотид"

<400> 355  
 гуиуиуагагс иагаауагс аагуиаааи ааггсуагс сгуиуаусаас иугааааагу 60

ггсассгагу сггугсуиуи 80

<210> 356  
 <211> 80  
 <212> РНК  
 <213> Искусственная Последовательность

<220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полинуклеотид"

<400> 356  
 гуиуиуагагс иагаауагс аагуиаааи ааггсуагс сгуиуаусаас иугааааагу 60

ггсассгагу сггугсуиуи 80

<210> 357  
 <211> 100  
 <212> РНК  
 <213> Искусственная Последовательность

<220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полинуклеотид"

<220>  
 <221> разное  
 <222> (1)..(20)  
 <223> n является а, с, g, или u

<400> 357  
 нннннннннн нннннннннн гуиуиуагагс иагаауагс аагуиаааи ааггсуагс 60

сгуиуаусаас иугааааагу ггсассгагу сггугсуиуи 100

<210> 358  
 <211> 100  
 <212> РНК  
 <213> Искусственная Последовательность

<220>  
 <221> источник  
 <223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полинуклеотид"

<220>  
 <221> модифицированное\_основание

<222> (1)..(3)

<223> Модифицированные нуклеотиды 2'-О-Ме

<220>

<221> разное

<222> (1)..(2)

<223> Фосфоротиоатная связь

<220>

<221> модифицированное\_основание

<222> (1)..(20)

<223> N = любой нуклеотид

<220>

<221> разное

<222> (2)..(3)

<223> Фосфоротиоатная связь

<220>

<221> разное

<222> (3)..(4)

<223> Фосфоротиоатная связь

<220>

<221> разное

<222> (5)..(20)

<223> n является a, c, g, или u

<220>

<221> модифицированное\_основание

<222> (29)..(40)

<223> Модифицированные нуклеотиды 2'-О-Ме

<220>

<221> модифицированное\_основание

<222> (69)..(100)

<223> Модифицированные нуклеотиды 2'-О-Ме

<220>

<221> разное

<222> (97)..(98)

<223> Фосфоротиоатная связь

<220>

<221> разное

<222> (98)..(99)

<223> Фосфоротиоатная связь

<220>

<221> разное

<222> (99)..(100)

<223> Фосфоротиоатная связь

<400> 358

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn guuuuagagc uagaaaagc aaguuuuuu aaggcuaguc 60

сгуааусаас иугааааагу ггсассггуи сггугсуиуу 100

<210> 359

<211> 4514

<212> РНК



ggccuuucug uccggagaac agaagaaagc aaugucgau cugcuguuca agaccaaccg 1740  
 caaggugacc gucaagcagc uaaaagagga cuacuuaag aagaucgagu guuucgacuc 1800  
 aguggaaauc agcggggugg aggacagauu caacgcuucg cugggaaccu aucaugaucu 1860  
 ccugaagauc aucaaggaca aggacuuccu ugacaacgag gagaacgagg acauccugga 1920  
 agauaucguc cugaccuuga cccuuuucga ggauccgag augaucgagg agaggcuuaa 1980  
 gaccuacgcu caucucuucg acgaaaggu caugaaaca cucaagcgc gccgguacac 2040  
 ugguuugggc cgccucucc gcaagcugau caacgguuuu cgcgauaac agagcgguaa 2100  
 aacuauccug gauuuccu aaucggaugg cuucgcuuuu cguaacuua ugcaauugau 2160  
 ccacgacgac agccugaccu uuaagagga cauccaaaa gcacaagugu ccggacaggg 2220  
 agacucacuc caugaacaca ucgcgaauu ggccgguucg ccggcgauua agaagggaau 2280  
 ucugcaaacu gugaaggugg ucgacgagcu ggugaagguc augggacggc acaaccgga 2340  
 gaauaucgug auugaaaugg cccgagaaaa ccagacuacc cagaagggcc agaaaaacuc 2400  
 ccgcgaaaag augaagcggg ucgaagaagg aaucaggag cugggcagcc agauccugaa 2460  
 agagcaccgg guggaaaaca cgcagcugca gaacgagaag cucuaccugu acuaauugca 2520  
 aaauggacgg gacauguacg uggaccaaga gcuggacauc aaucgguugu cugauuacga 2580  
 cguggaccac aucguuccac aguccuuuc gaaggaugac ucgaucgaa acaagguguu 2640  
 gacucgcagc gacaagaaca gagggaaguc agauaaugug ccaucggagg aggucgugaa 2700  
 gaagaugaag aauuacuggc ggcagcuccu gaauccgag cugauuacc agagaaugu 2760  
 ugacaauuc acuaaagccg agcgcggcgg acucucagag cuggauaagg cuggauuau 2820  
 caaacggcag cuggucgaga cucggcagau uaccaagcag guggcgcaga ucuuggacuc 2880  
 ccgcaugaac acuaauuacg acgagaacga uaagcuuac cggaaguga aggugauuac 2940  
 ccugaaaagc aaauugugu cggacuucg gaaggaucuu caguuuuaca aagugagaga 3000  
 aaucacaac uaccaucagc cgcaugacgc auaccuac gcugugguc guaccgccu 3060  
 gaucaaaaag uaccuaaac uugaucgga guuuguguac ggagacuaca aggucucga 3120  
 cgugaggag augauagcca aguccgaaca gaaaucggg aaagcaucg cgaauuacu 3180  
 cuuuuacua acaucauga acuuuuucaa gacugaaau acgucggcca auggagaaau 3240  
 caggaaagg ccacugaucg aaucuaacgg agaaacggc gaaucgugu gggacaaggg 3300  
 cagggacuuc gcaacuguuc gcaaaguc cuuauccg caagucuaa uuugaagaa 3360  
 aaccgaagug caaacggcg gauuuucaa ggaucguc cuccaaaga gaaauagcga 3420  
 caagcuauu gcacgcaaga aagacuggga cccgaagaag uacggaggau ucgauucgc 3480  
 gacugucgca uacuccgucc ucguggugc caagguggag aagggaaga gcaaaaagcu 3540

caaaucguc aaagagcugc ugaggauuac caucauggaa cgauccucgu ucgagaaga 3600  
 cccgauugau uuccucgagg cgaaggguua caaggaggug aagaaggauc ugaucauaa 3660  
 acuccccaag uacucacugu ucgaacugga aaauggucgg aagcgcaugc uggcuucggc 3720  
 cggagaacuc saaaaaggaa augagcuggc cuugccuagc aaguacguca acuuccucua 3780  
 ucuugcuucg cacuacgaaa aacucaaaag gucaccgga gaaacgaac agaagcagcu 3840  
 uuucguggag cagcacaagc auuaucugga ugaaucauc gaacaauc ccgauuuuc 3900  
 aaagcgcgug auccucgccg acgccaaccu cgacaaguc cugucggccu acauaagca 3960  
 uagagauaag ccgaucagag aacaggccga gaacuuuuc cacuuguuca ccugacuaa 4020  
 ccugggagcc ccagccgccu ucaaguacu cgaucacu aucgaucgca aaagauacac 4080  
 guccaccaag gaaguucg acgcgaccu gauccacca agcaucacug gacucucga 4140  
 aacuaggauc gaucugucgc agcugggug cgauggcggg ggaucuccga aaaagaagag 4200  
 aaagguguaa ugagcuagcc aucacuuua aaagcaucuc agccuaccu gagaauaaga 4260  
 gaaagaaaau gaagaucuuu agcuuuuua ucucuuuuu uuuuucguug guguaagcc 4320  
 aacaccugu caaaaaaca uaaaauuuu uaaucuuuu gccucuuuu ucugugcuuc 4380  
 aauuaaaaa aaauggaaag aaccucgaga aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa 4440  
 aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa 4500  
 aaaaaaaaa cuag 4514

<210> 360

<211> 4603

<212> РНК

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание Искусственной Последовательности: Транскрипция мРНК"

<400> 360

gggucscgca gucggcugc agcggcucug cuugucugug ugugugucgu ucgagccuu 60  
 auucggaucc auggaauaaga aguacuaau cgggcuggau aucggaaua auucguggg 120  
 uuaggcagug aucacggaug aauacaaagu gccgucsaag aaguucaagg uccugggga 180  
 caccgauaga cacagcaua agaaaauc cuacggagcc cugcuguuug acuccggcga 240  
 aaccgcaaa gcgaccggc ucaaacguac cgcgaggcga cgcuaaccc ggcggaaga 300  
 ucgaucugc uaucugsaag agaucuuuu gaacgaaug gaaaggucg acgacagcu 360  
 cuaccaccg cuggaagaau cuuuccuggu ggaggaggac aagaagcaug aacggaucc 420  
 uaucuuugga acaucugc acgaagguc guaccagaa aaguaccga ccaucuaa 480

ucugcggaag aaguugguug acucaacuga caaggccgac cucagauuga ucuacuuggc 540  
 ccucgcccaw augaucaau uccgcgaca cuuccugauc gaaggcgau ugaaccuga 600  
 uaacuccgac guggauaagc uuuucauua acuggugcag accuacaacc aacuguucga 660  
 agaaaacca aucaaugcua gcggcgucga ugccaagcc auccuguccg cccggcuguc 720  
 gaagucgagg cgccugaaa accugaucgc acagcugccg ggagagaaaa agaaccgacu 780  
 uuucggcaac uugaucguc ucucacuggg acucacuccc aauucaagu ccauuuuga 840  
 ccuggccgag gacgcaagc ugcaacucuc aaaggacacc uacgacgacg acuuggaca 900  
 uuugcuggca caauuggcg aucaguacgc ggauucguuc cuugccgcu agaaccuuc 960  
 ggacgcauc uugcuguccg auauccgcg cgugaacacc gaaauacca aagcgccgcu 1020  
 uagcgccugc augauaagc gguacgagc gcauccagc gaucucguc ugcuaaagc 1080  
 gucgugaga cagcaucg cugaaaagua caaggagau uucuucgacc aguccaaga 1140  
 uggguacga ggguaucg auggagcgc uagccaggaa gaguucuaa aguucaua 1200  
 gccauccug gaaaagugg acggaaccga agaucguc gucaagcuga acaggaggga 1260  
 ucugcuccg aaacagaga ccuugaca cggauccau cccaccaga uccaucuggg 1320  
 ugagcugcacc gccaucuugc ggcgccagga ggacuuuac ccauuccu aggacaaccg 1380  
 ggaaaaguc gaaaaauuc ugacguuccg cauccguau uacgugggcc cacuggcgcg 1440  
 cggcaauucg cgcucgcu ggauacugc aaaaucagag gaaaccau cuccuuggaa 1500  
 uuucgaggaa guuguggaua agggagcuuc ggcacaaagc uucaucgac gaugacca 1560  
 cuucgacaag aaucuccaa acgagaaggu gcuuccuag cacagccucc uuucgaaua 1620  
 cuucacuguc uacaacgac ugacuaaagu gaaauacgu acugaaggaa ugaggaagcc 1680  
 ggccuuucg uccggagaac agaagaagc aauugcgu cuvcguuca agaccaaccg 1740  
 caaggugacc gucaagcagc uaaaagagga cuacuuaag aagaucgag guuucgacuc 1800  
 aguggaaauc agcggggugg aggacagau caacgcuucg cugggaaccu aucaugacu 1860  
 ccugaaguc aucaaggaca aggacuuccu ugacaacgag gagaacgagg acauccugga 1920  
 agauaucguc cugaccuuga ccuuuucga ggauvcgag augaucgagg agaggcuua 1980  
 gaccuacgcu caucucuucg acgaaaggu caugaaaca cucaagcgc gccgguacac 2040  
 uggguugggc cgccucucc gcaagcugau caacgguuu cgcgauaac agagcgguaa 2100  
 aacuaucug gauuuccu aaucggaug cuucgcuau cguaacuua ugcaauugau 2160  
 ccacgacgac agccugacc uuaaggagga cauccaaaa gcacaagugu ccggacaggg 2220  
 agacucacuc caugaacaca ucgcgaucu ggccgguucg ccggcgauua agaagggaau 2280  
 ucugcaacu gugaaggugg ucgacgagcu ggugaagguc augggacggc acaaccgga 2340

gaauaucgug auugaaaugg cccgagaaaa ccagacuacc cagaagggcc agaaaaacuc 2400  
 ccgcgaaaagg augaagcggg ucgaagaagg aaucaggag cugggcagcc agauccugaa 2460  
 agagcaccgg guggaaaaca cgcagcugca gaacgagaag cucuaccugu acuaauugca 2520  
 aaauggacgg gacauguacg uggaccaaga gcuggacauc aaucgguugu cugauuacga 2580  
 cguggaccac aucguuccac aguccuuucu gaaggaugac ucgaucgaa acaagguguu 2640  
 gacucgcagc gacaagaaca gagggaaguc agauaaugug ccaucggagg aggucgugaa 2700  
 gaagaugaag aauuacuggc ggcagcuccu gaaugcgaag cugauuacc agagaaugu 2760  
 ugacaauuc acuaaagccg agcgcggcgg acucucagag cuggauaagg cuggauuau 2820  
 caaacggcag cuggucgaga cucggcagau uaccaagcac guggcgcaga ucuuggacuc 2880  
 ccgcaugaac acuaaaucg acgagaacga uaagcucauc cgggaaguga aggugauuac 2940  
 ccugaaaagc aaauugugu cggacuucg gaaggaucuu caguuuuaca aagugagaga 3000  
 aaucacaac uaccaucagc cgcaugacgc auaccucaac gcuguggucg guaccgccu 3060  
 gaucaaaaag uaccuaaac uugaucgga guuuguguac ggagacuaca aggucucga 3120  
 cgugaggag augauagcca aguccgaaca gaaaucggg aaagcaacug cgaauuacu 3180  
 cuuuuacua acaucauga acuuuuucaa gacugaaau acgcuggcca auggagaaau 3240  
 caggaaagg ccacugaucg aaucuaacgg agaaacgggc gaaucgugu gggacaagg 3300  
 cagggacuuc gcaacuguuc gcaaagucg cucuaugccg caagucuaa uugugaaga 3360  
 aaccgaagug caaacggcg gauuuucaa ggaucgauc cuccaaaga gaaauagcga 3420  
 caagcucau gcacgcaaga aagacuggga cccgaagaag uacggaggau ucgauucgcc 3480  
 gacugucgca uacuccguc ucguggugc caagguggag aagggaaga gcaaaaagcu 3540  
 caaacgguc aaagagcugc uggggauuac caucauggaa cgaucucgu ucgagaaga 3600  
 cccgauugau uucccgagg cgaaggguua caaggaggug aagaaggauc ugaucaua 3660  
 acucccaag uacucacugu ucgaacugga aauggucgg aagcgaucg uggcuucggc 3720  
 cggagaacuc caaaaaggaa augagcugc cuugccuagc aaguacguc acuccucua 3780  
 ucuugcuucg cacuacgaaa aacucaagg gucaccgga gauaacgaac agaagcagcu 3840  
 uuucguggag cagcacaagc auuauucgga ugaaucauc gaacaauc ccgauuuuc 3900  
 aaagcgcgug aucccgccg acgccaaccu cgacaaguc cugucggccu acauaagca 3960  
 uagagauaag ccgaucagag aacaggccga gaacauuac cacuuguuca ccugacuaa 4020  
 ccugggagcc ccagccgccu ucaaguacu cgauacuacu aucgaucgca aaagauacac 4080  
 guccaccaag gaaguucgg acgcgaccu gaucacca agcaucacug gacucucga 4140  
 aacuaggauc gaucugucg agcugggugg cgauggcucg gcuuaccu acgacugcc 4200

ugacuacgcc ucgcucggau cgggcucccc saaaaagaaa cggaaggugg acggaucccc 4260  
 gaaaaagaag agaaggugg acuccggaug agaauaugc agucuagcca usacauiuaa 4320  
 aagcaucusa gccuaccaug agaauaagag aaagaaaug aagaucuaa gcuuuuucsu 4380  
 cucuuiuuuucu uuuucguugg uguaaagcca acaccuguc uaaaaacau aauiuuuuuu 4440  
 aaucuuuuug ccucuuiuuu cuugucuuca auuaauaaaa auuggaaaga accucgagaa 4500  
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4560  
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa uag 4603

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Одиночная направляющая РНК (sgРНК), содержащая:
  - (i) 2'-О-метил (2'-О-Ме) модификации в каждом из нуклеотидов в области верхнего стебля и 2'-О-Ме модификации в каждом из нуклеотидов в области шпильки 2; и
  - (ii) 5'-концевую модификацию;
 

причем 5'-концевая модификация содержит по меньшей мере две фосфоротиоатных (PS) связи в пределах первых семи нуклеотидов на 5'-конце 5'-концевой области.
2. sgРНК по п.1, отличающаяся тем, что sgРНК дополнительно содержит одну или более модификаций в области шпильки 1.
3. sgРНК по п.1 или 2, отличающаяся тем, что дополнительно содержит область нижнего стебля, содержащую модификацию.
4. sgРНК по любому из пп.1-3, отличающаяся тем, что дополнительно содержит 3'-концевую область, содержащую модификацию, необязательно где модификация в 3'-концевой области представляет собой 3'-концевую модификацию.
5. sgРНК по п.4, отличающаяся тем, что по меньшей мере два из последних четырех нуклеотидов на 3'-конце 3'-концевой области являются модифицированными, необязательно 2'-О-Ме, 2'-F или 2'-О-мое.
6. sgРНК по п.4 или 5, отличающаяся тем, что дополнительно содержит фосфоротиоатные (PS) связи между одним или более из последних четырех нуклеотидов на 3'-конце 3'-концевой области.
7. sgРНК по любому из пп.1-6, отличающаяся тем, что дополнительно содержит область расширения, содержащую модификацию, и/или область связи, содержащую модификацию.
8. sgРНК по любому из пп.1-7, отличающаяся тем, что указанная модификация содержит 2'-О-метил (2'-О-Ме) модифицированный нуклеотид и/или 2'-фтор (2'-F) модифицированный нуклеотид и/или фосфоротиоатную (PS) связь между нуклеотидами.
9. sgРНК по любому из пп.1-8, отличающаяся тем, что по меньшей мере первые три нуклеотида на 5'-конце 5'-концевой области и последние три нуклеотида на 3'-конце 3'-концевой области являются модифицированными, необязательно где первые четыре нуклеотида на 5'-конце 5'-концевой области и последние четыре нуклеотида на 3'-конце 3'-концевой области соединены фосфоротиоатными (PS) связями, необязательно где концевые модификации включают 2'-О-Ме или 2'-F.
10. sgРНК по любому из пп.1-9, отличающаяся тем, что первые четыре нуклеотида на 5'-конце 5'-концевой области и последние четыре нуклеотида на 3'-конце 3'-концевой области соединены PS связью, а первые три нуклеотида на 5'-конце 5'-концевой области и последние три нуклеотида на 3'-конце 3'-концевой области содержат 2'-О-Ме модификации.
11. sgРНК по любому из пп.1-9, отличающаяся тем, что первые четыре нуклеотида на 5'-конце 5'-концевой области и последние четыре нуклеотида на 3'-конце 3'-концевой области соединены PS связью, а первые три нуклеотида на 5'-конце 5'-концевой области и последние четыре нуклеотида на 3'-конце 3'-концевой области содержат 2'-О-Ме модификации.
12. sgРНК по любому из пп.1-11, отличающаяся тем, что первые четыре нуклеотида в 5'-концевой области и последние четыре нуклеотида в 3'-концевой области соединены PS связью, а первые три нуклеотида в 5'-концевой области и последние три нуклеотида в 3'-концевой области содержат 2'-О-Ме, 2'-F и/или 2'-О-мое модификации.
13. sgРНК по любому из пп.1-12, отличающаяся тем, что (1) область нижнего стебля содержит нуклеотиды от LS1 до LS12 от 5' к 3', и LS1, LS6, LS7, LS8, LS11 и/или LS12 модифицированы 2'-О-Ме; и/или (2) каждый из нуклеотидов в области расширения модифицирован 2'-О-Ме; и/или (3) по меньшей мере 50% нуклеотидов в области расширения модифицированы 2'-О-Ме.

14. sgPHK по любому из пп.1-13, отличающаяся тем, что область связки содержит нуклеотиды от N1 до N18 от 5' к 3', и отличающаяся тем, что N16, N17 и/или N18 в области связки и/или N15, N16, N17 и/или N18 в области связки являются модифицированными, необязательно где модификации в области связки выбраны из 2'-О-Ме и 2'F, и необязательно где N16, N17 и N18 соединены PS связями.

15. sgPHK по любому из пп.1-14, отличающаяся тем, что каждый из нуклеотидов в области шпильки 1 модифицирован 2'-О-Ме.

16. sgPHK по п.1, отличающаяся тем, что область верхнего стебля содержит нуклеотиды от US1 до US12, область шпильки 1 содержит нуклеотиды от H1-1 до H1-12, и область шпильки 2 содержит нуклеотиды от H2-1 до H2-15, от 5' к 3', и отличающаяся тем, что содержит:

а) 2'-О-Ме модифицированные нуклеотиды в первых трех нуклеотидах на 5'-конце 5'-концевой области;

б) 2'-О-Ме модифицированные нуклеотиды в положениях H1-1 -H1-12;

с) 2'-О-Ме модифицированные нуклеотиды в последних четырех нуклеотидах на 3'-конце 3'-концевой области.

17. sgPHK по п.16, отличающаяся тем, что дополнительно содержит три фосфоротиоатные (PS) связи, соединяющие первые четыре нуклеотида на 5'-конце 5'-концевой области и три PS связи, соединяющие последние четыре нуклеотида на 3'-конце 3'-концевой области.

18. sgPHK, содержащая GUUUUAGAGCUAGAAUAGCAAGUAAAAUAA GGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (SEQ ID NO: 355), где нуклеотиды SEQ ID NO: 355 модифицированы в соответствии с паттерном модификации sgPHK по любому из пп.1-17.

19. sgPHK по п.1, содержащая GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAUUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmC

mUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU\*mU\*mU\*mU (SEQ ID NO: 356), где U\* обозначает, что нуклеотид связан со следующим нуклеотидом PS связью, а mA, mG, mC или mU обозначают, что нуклеотид модифицирован 2'-О-Ме.

20. sgPHK по п.1, где указанная sgPHK содержит любую из SEQ ID NO: 240 или 331.

21. sgPHK по п.1, содержащая mU\*mU\*mA\*CAGCCACGUCUACAGCAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmG

mUmCmGmGmUmGmCmU\*mU\*mU\*mU

(SEQ ID No: 242); или

mN\*mN\*mN\*NNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmG

mUmCmGmGmUmGmCmU\*mU\*mU\*mU

(SEQ ID NO: 358), где N\* или U\* обозначают, что нуклеотид связан со следующим нуклеотидом PS связью, а mA, mG, mC или mU обозначают, что нуклеотид модифицирован 2'-О-Ме, где N представляет собой любой нуклеотид.

22. sgPHK по любому из пп.1-21, отличающаяся тем, что sgPHK образует рибонуклеопротеиновый комплекс с Cas9 S. pyogenes.

23. sgPHK по п.1, отличающаяся тем, что sgPHK содержит 2'-О-Ме модификации в каждом нуклеотиде, начиная от H2-1 и до последнего нуклеотида 3'-концевой области, или состоит из них, где H2-1 представляет собой первый нуклеотид области шпильки 2 от 5' к 3'.

24. sgPHK по любому из пп.1-23, содержащая нуклеотиды SEQ ID NO: 357.

25. sgPHK по п.1, содержащая 2'-О-Ме модифицированные нуклеотиды в:

а) первых трех нуклеотидах на 5'-конце 5'-концевой области;

б) каждом нуклеотиде в области шпильки 1;

с) нуклеотиде между шпилькой 1 и шпилькой 2; и

д) последних четырех нуклеотидах на 3'-конце 3'-концевой области.

26. Композиция для модификации ДНК-мишени, содержащая sgPHK по любому из пп.1-25, ассоциированную с липидной наночастицей (LNP).

27. Композиция для модификации ДНК-мишени, содержащая sgPHK по любому из пп.1-25, дополнительно содержащая нуклеазу или мРНК, кодирующую нуклеазу.

28. Композиция по п.27, отличающаяся тем, что нуклеаза является белком Cas.

29. Композиция по п.28, отличающаяся тем, что белок Cas является Cas9.

30. Композиция по п.29, отличающаяся тем, что Cas9 является Cas9 S. pyogenes.

31. Композиция по любому из пп.27-30, отличающаяся тем, что нуклеаза является никазой, и/или где нуклеаза является модифицированной, необязательно где модифицированная нуклеаза содержит сигнал ядерной локализации (NLS).

32. Фармацевтический состав, содержащий sgPHK по любому из пп.1-25 или композицию по лю-

бому из пп.26-31 и фармацевтически приемлемый носитель.

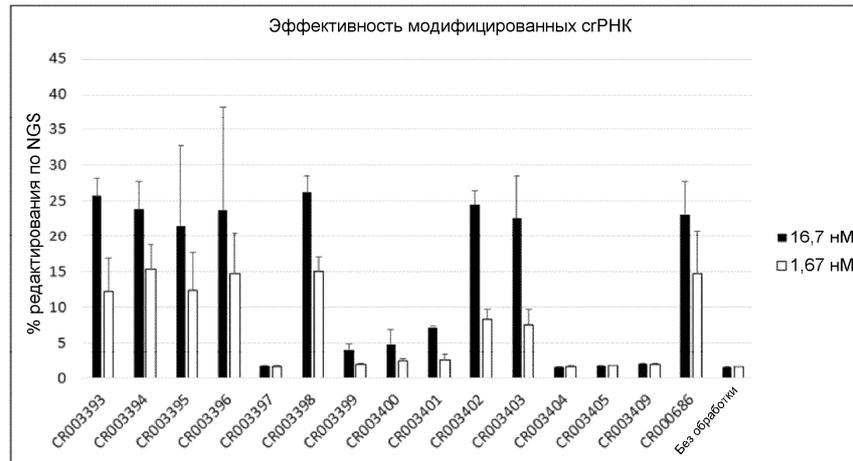
33. Способ модификации ДНК-мишени, включающий доставку в клетку белка Cas или нуклеиновой кислоты, кодирующей белок Cas, и любого одного или более из следующих компонентов:

- a) sgРНК по любому из пп.1-25;
- b) композиции по любому из пп.26-31; или
- c) фармацевтического состава по п.32.

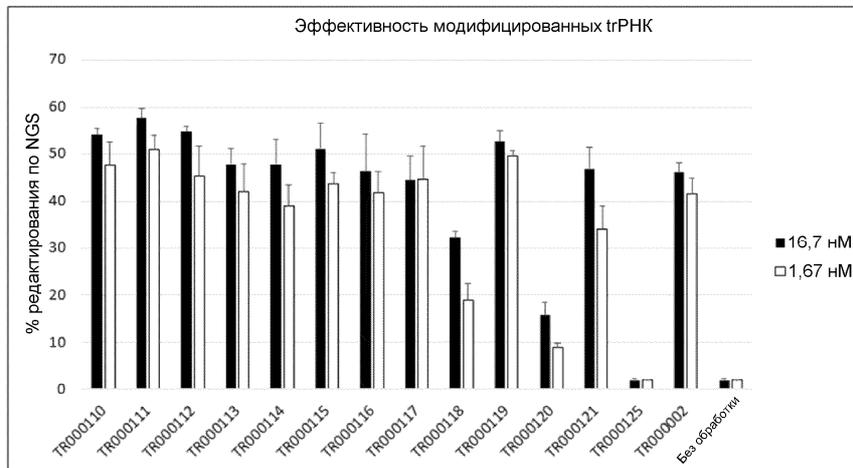
34. Способ по п.33, отличающийся тем, что способ приводит к образованию инсерции или делеции в гене.

35. Способ по п.34, отличающийся тем, что дополнительно включает доставку матрицы в клетку, причем по меньшей мере часть матрицы включается в ДНК-мишень в сайте двуцепочечного разрыва, индуцируемого белком Cas, или рядом с ним.

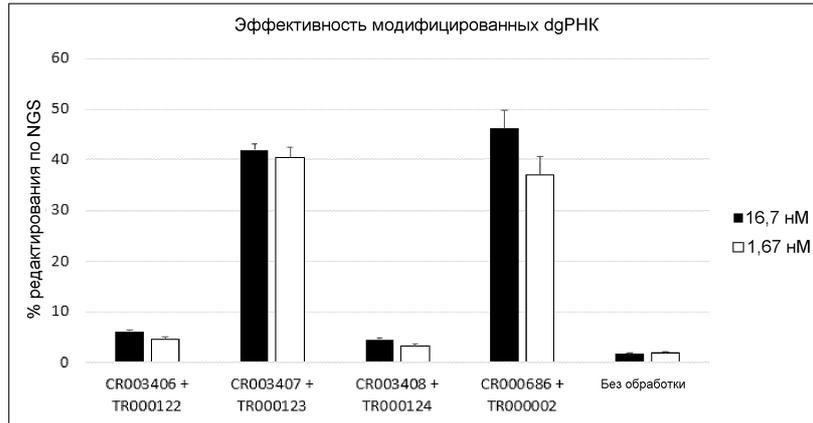
36. sgРНК по любому из пп.1-25 или фармацевтический состав по п.32 для получения медикамента для лечения заболевания или расстройства.



Фиг. 1



Фиг. 2

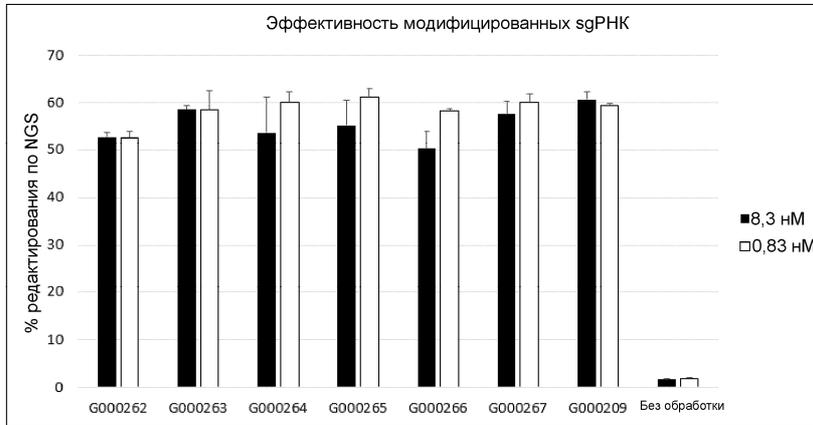


Фиг. 3

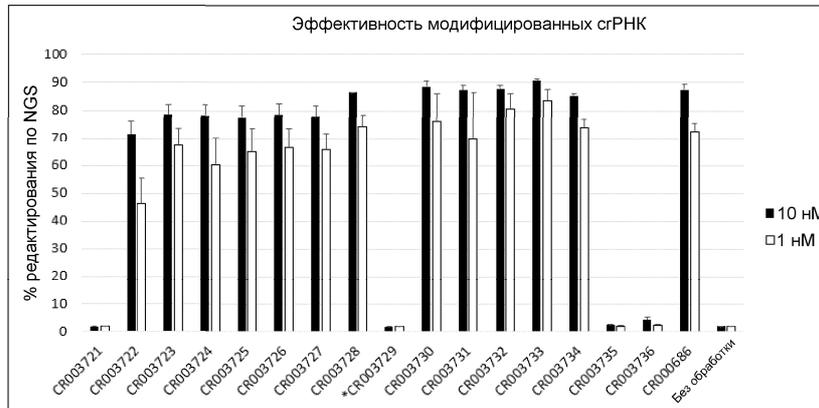
	25 нМ											TR000002
	TR000110	TR000111	TR000112	TR000113	TR000114	TR000115	TR000116	TR000117	TR000118	TR000119	TR000121	
CR003393	54.1 ± 5	61.2 ± 3.1	56.7 ± 5	55.9 ± 4	53.8 ± 10.7	56.3 ± 10	52.7 ± 5.8	55.5 ± 7	40.7 ± 12.9	48.5 ± 8.1	51.3 ± 11.4	
CR003394	57.7 ± 4.7	61.5 ± 8.2	64.8 ± 6.4	65.4 ± 8.9	60.1 ± 2.5	61.6 ± 4.6	57.3 ± 7.2	57.8 ± 8.3	38.6 ± 7.9	50.9 ± 10.3	54.8 ± 8.9	
CR003395	52.4 ± 2.4	62.8 ± 6.8	61.1 ± 7.2	62.8 ± 11.1	55.9 ± 7.6	57 ± 4.9	53.4 ± 7.1	52.5 ± 8.1	38.2 ± 7.5	49.7 ± 14.4	53.1 ± 11.7	
CR003396	56 ± 3.9	56.4 ± 7.6	58.7 ± 7.3	58.1 ± 7.3	54.7 ± 4.9	58.8 ± 5	48.9 ± 2.8	52.5 ± 9.7	34.3 ± 6	48.3 ± 10.3	52.4 ± 9.5	
CR003398	50.8 ± 10.2	56.2 ± 8.2	62.5 ± 6.9	59.7 ± 8.9	56.3 ± 3.4	61.2 ± 5	53 ± 7.1	53.8 ± 9.2	29.4 ± 9.3	52.2 ± 12.2	51.9 ± 15.6	
CR003402	42.7 ± 4.5	53.3 ± 5.4	56.9 ± 11	57.4 ± 12.1	52.8 ± 9.3	55.1 ± 8.5	46.1 ± 8.4	50.5 ± 8.8	17.7 ± 6.7	45.2 ± 12	52.8 ± 11.3	
CR003403	45.8 ± 9.9	52.7 ± 8.6	59.7 ± 13.9	54.8 ± 13.7	47.2 ± 12.1	50.9 ± 8.4	43.4 ± 10.3	47 ± 13	10.5 ± 5.9	44.5 ± 15.2	46 ± 19.3	
CR000686												34.5 ± 6.4

	2.5 нМ											TR000002
	TR000110	TR000111	TR000112	TR000113	TR000114	TR000115	TR000116	TR000117	TR000118	TR000119	TR000121	
CR003393	41.8 ± 6.2	50.4 ± 3.2	40.2 ± 4.7	43.4 ± 2	40.1 ± 4.8	43.1 ± 3.9	39.1 ± 4.2	43 ± 6	15.6 ± 3.1	34.9 ± 11.6	38.6 ± 2.2	
CR003394	45.4 ± 4.7	49.6 ± 7.9	43.9 ± 6.6	46.7 ± 5.6	40.4 ± 7.5	47.2 ± 6.9	46.8 ± 3.1	43.9 ± 2.4	13.7 ± 1.6	28.9 ± 4.3	35.9 ± 6.2	
CR003395	39 ± 10	56 ± 5.1	42.2 ± 3.5	48.2 ± 3.2	36 ± 2.8	47.4 ± 7.3	44.4 ± 5.9	41.6 ± 7	12 ± 1.4	25.8 ± 1	31.4 ± 1.8	
CR003396	34.8 ± 2.3	46.5 ± 0.4	42 ± 4.9	42.4 ± 1.8	32 ± 4	44.4 ± 5.5	41.1 ± 7.7	40.5 ± 5.1	20.7 ± 1.2	26 ± 1.2	42.4 ± 8.9	
CR003398	33.6 ± 3.3	47 ± 6.8	41.9 ± 2.6	41.9 ± 1.1	37.1 ± 4.1	43.2 ± 9.4	40.1 ± 3.9	42.9 ± 3.6	1.4 ± 0.1	34.2 ± 2	40.7 ± 7.4	
CR003402	31.2 ± 4.7	46.4 ± 5	38.5 ± 2.8	40.7 ± 3.5	29.9 ± 1.1	42.4 ± 6.6	31.7 ± 2.9	32.8 ± 4.6	7 ± 0.8	31.3 ± 2.1	46.8 ± 3.8	
CR003403	28 ± 4.3	38.3 ± 3.3	37.5 ± 4.4	36.4 ± 2.7	31.4 ± 4.6	34.6 ± 3.7	32.9 ± 4	35.8 ± 4.2	1.4 ± 0.1	34.6 ± 6.1	40.7 ± 6.6	
CR000686												21.7 ± 4.9

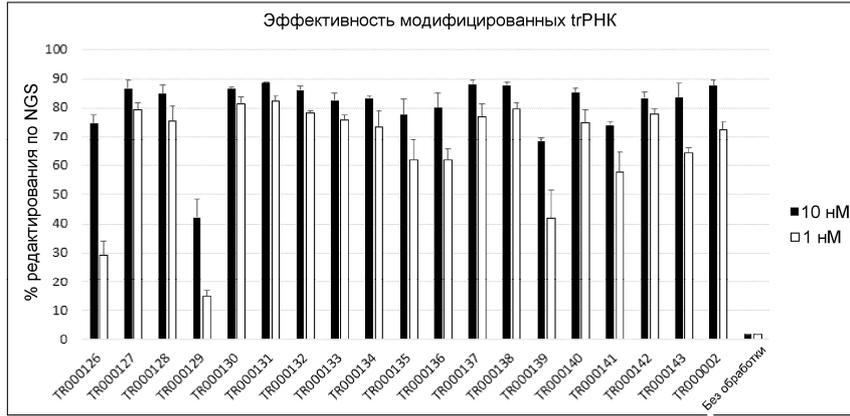
Фиг. 4



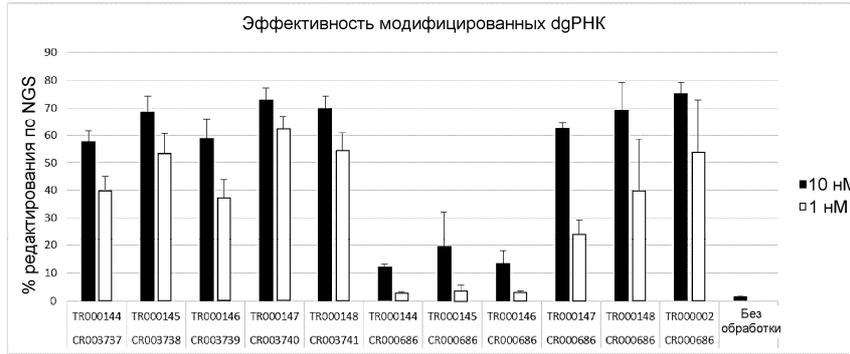
Фиг. 5



Фиг. 6



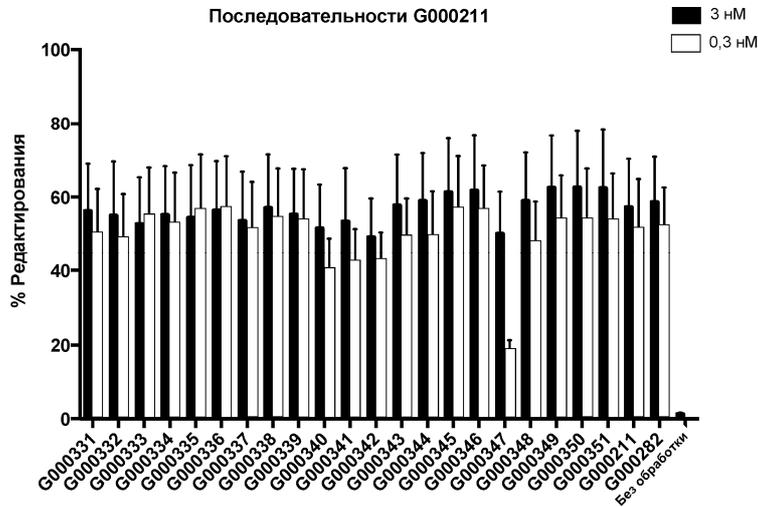
Фиг. 7



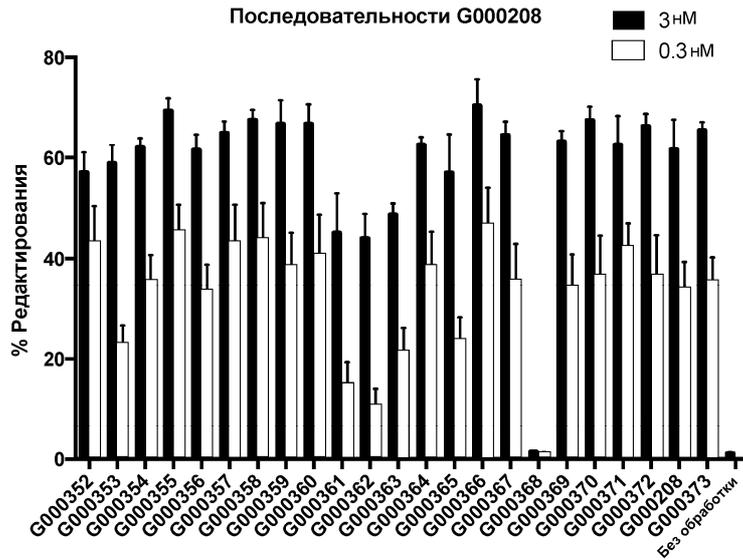
Фиг. 8

	TR000127	TR000128	TR000130	TR000134	TR000135	TR000136	TR000137	TR000138	TR000139	TR000142	TR000143	TR000002
10 нМ	18 ± 13.8	22.8 ± 4.1	24 ± 2.6	26.9 ± 2.8	20.8 ± 5	22.2 ± 5.7	26.7 ± 5	23.6 ± 4.1	13.7 ± 2.4	22.3 ± 4.4	10.8 ± 2.2	18.5 ± 1.5
CR000723	28.4 ± 1.2	29.2 ± 4.2	27.9 ± 1.3	30.6 ± 3.4	26.1 ± 3.8	25.9 ± 4.4	30 ± 3	26.9 ± 2	18.5 ± 2.2	25.1 ± 0.9	23.1 ± 1.7	
CR000725	30.4 ± 1.1	31.3 ± 3.2	30.6 ± 2.9	32 ± 2.2	29.8 ± 2.5	29.9 ± 2.8	32.3 ± 1	28.7 ± 2.2	20.9 ± 2.4	27 ± 1.4	23.6 ± 2.3	24.9 ± 1.1
CR000726	31.6 ± 2.1	27 ± 2.7	29.6 ± 0.8	32.1 ± 1.3	26.7 ± 1.2	27.2 ± 5.2	31 ± 2	28.1 ± 0.7	19.2 ± 0.7	26.7 ± 2.1	22.5 ± 1.2	25.6 ± 3
CR000727	34.6 ± 2.4	2.4 ± 0.1	34.9 ± 2.6	37.7 ± 3.1	33.1 ± 2.1	33.1 ± 4	35.4 ± 0.9	32.4 ± 2.9	25.8 ± 4.8	30.7 ± 2.7	28.2 ± 2.2	28.6 ± 0.7
CR000728	34.8 ± 0.9	32.3 ± 1.5	33.8 ± 1.1	34.8 ± 2.5	29.8 ± 1.8	31.5 ± 3.6	32.6 ± 1.7	31 ± 1.9	25.4 ± 3.7	28.6 ± 0.5	25.6 ± 1.1	27.8 ± 0.6
CR000729	27.5 ± 0.3	21.5 ± 1.5	29.8 ± 1.6	29.5 ± 1.6	13.7 ± 2.1	14.6 ± 1.2	31 ± 2.4	28 ± 2.5	7 ± 1.1	25.5 ± 1.3	3.4 ± 0.1	22.7 ± 2.8
CR000734	23 ± 2.8	22.4 ± 3.9	23.6 ± 6.2	26.4 ± 1	22.2 ± 2	19.5 ± 1.1	24.6 ± 3	27.4 ± 2.6	12.2 ± 1.7	22.9 ± 1.8	20.2 ± 1.1	22.6 ± 3
CR000686												
1 нМ	18.3 ± 14.1	16 ± 12.1	25.3 ± 0.8	22.5 ± 3.4	14.3 ± 10.6	17.5 ± 2	23.1 ± 3.8	21 ± 1.4	8.8 ± 1.4	18.3 ± 0.7	8.3 ± 1.5	14.6 ± 0.4
CR000723	26.9 ± 1.8	25.1 ± 4.1	25 ± 2.7	24.8 ± 2.3	23.1 ± 2.8	16.2 ± 12.1	17.3 ± 13.1	22.5 ± 1	15.2 ± 1.7	22.7 ± 1.5	19.7 ± 3.1	
CR000725	16.8 ± 12.9	26.4 ± 2	23.6 ± 2.6	25.2 ± 1.5	22.7 ± 3.4	20.7 ± 1.5	26.6 ± 1.4	20.4 ± 0.9	13.3 ± 0.3	21.6 ± 1.5	18.6 ± 0.5	17 ± 1
CR000726	24.1 ± 3.1	20.3 ± 1.4	21 ± 1.3	23.6 ± 2.6	19.7 ± 1.7	20.3 ± 1.4	15.3 ± 11.3	20.2 ± 1.5	11.7 ± 1.7	20.7 ± 0.7	15.1 ± 0.8	19.7 ± 4.2
CR000727	26.9 ± 0.8	2.4 ± 0.1	28.2 ± 2.4	27.9 ± 0.6	26.4 ± 3.2	22.9 ± 1.2	26.4 ± 1.9	24.8 ± 0.5	18.8 ± 1.8	23.3 ± 1.4	20.3 ± 1.1	23.4 ± 3.7
CR000728	26.3 ± 2.5	30.5 ± 4.6	28.3 ± 2.7	28.6 ± 2	25.3 ± 3.1	24.6 ± 1.6	25 ± 0.3	23.7 ± 0.6	17.1 ± 1.7	21.9 ± 0.5	21 ± 2	22 ± 2
CR000729	18.9 ± 5.3	15.2 ± 3	21.4 ± 1.7	20.1 ± 0.1	8.5 ± 1.7	7.4 ± 0.9	20.4 ± 0.8	20.4 ± 1.4	3 ± 0.1	19.3 ± 0.8	2.5 ± 0.3	17.3 ± 2.1
CR000686	16.2 ± 1	17.3 ± 3.4	18.3 ± 3.3	20.5 ± 5	15.4 ± 1.2	14.8 ± 3	18.9 ± 3.6	20.1 ± 1.7	7.9 ± 2.3	17.5 ± 3.3	15.4 ± 1	14.1 ± 1.6

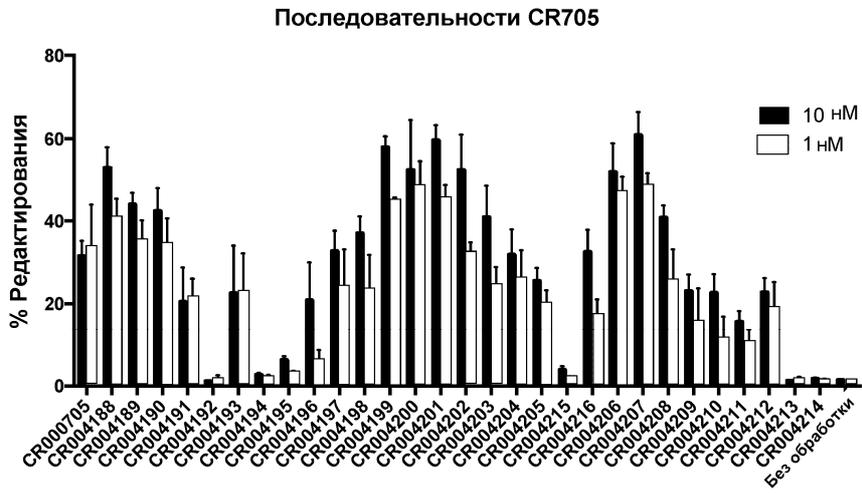
Фиг. 9



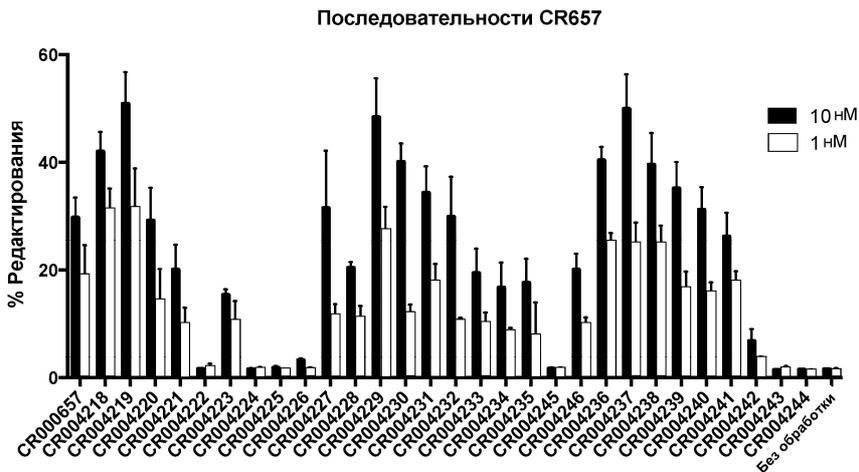
Фиг. 10



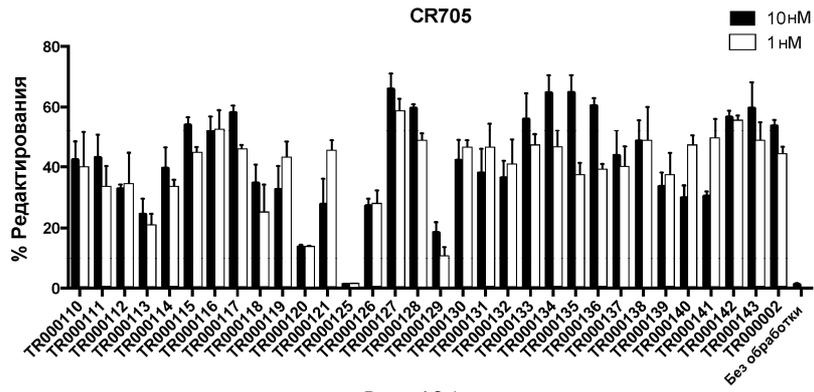
Фиг. 11



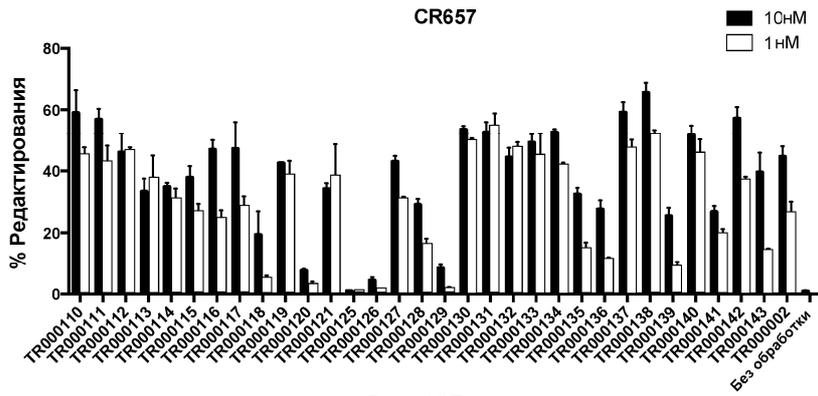
Фиг. 12А



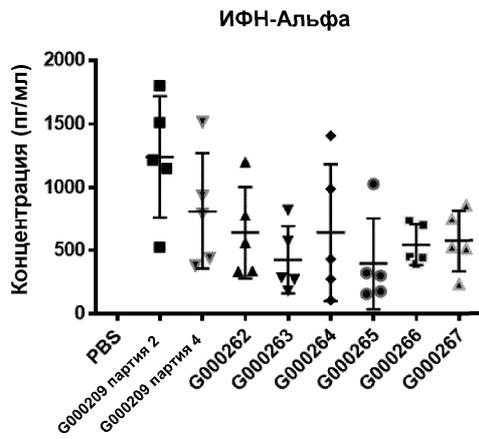
Фиг. 12В



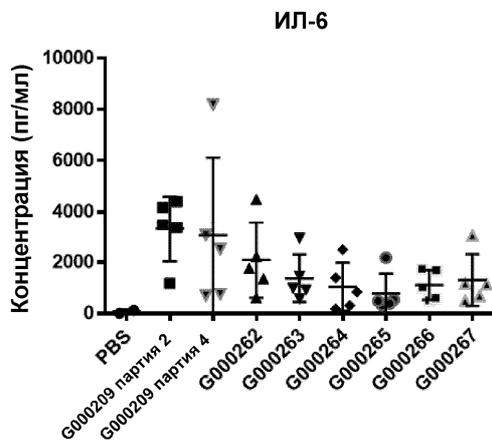
Фиг. 13А



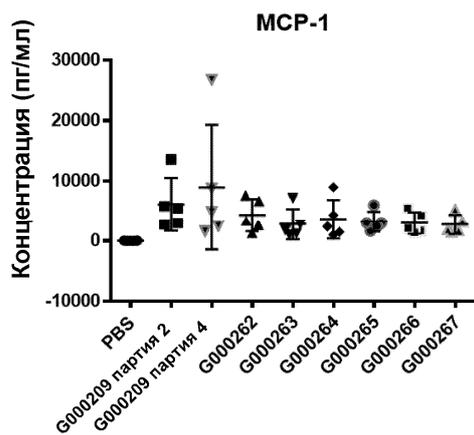
Фиг. 13В



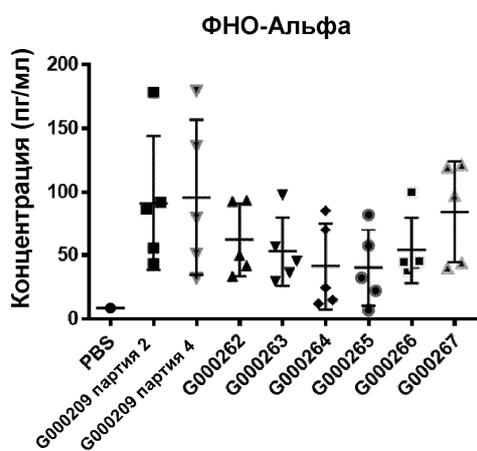
Фиг. 14А



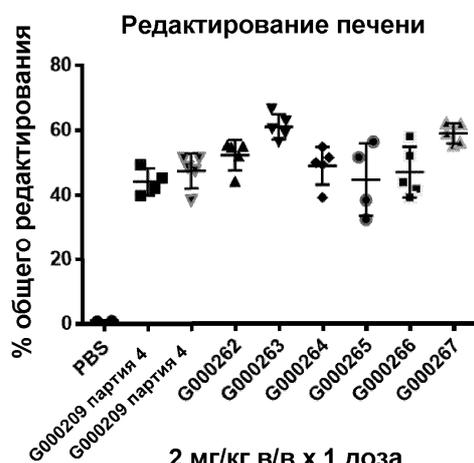
Фиг. 14В



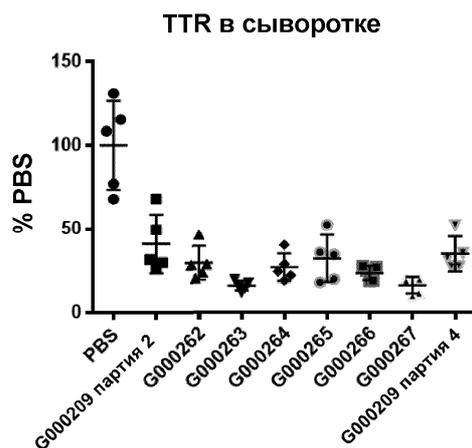
Фиг. 14С



Фиг. 14D



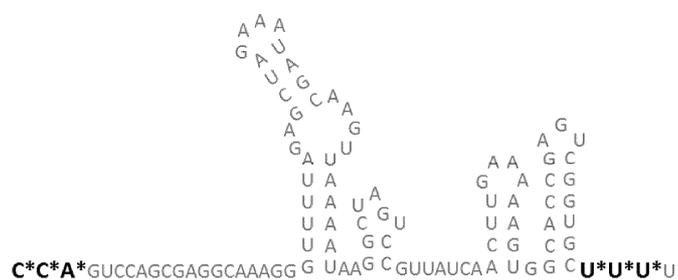
Фиг. 15А



Фиг. 15В

<i>Направляющая</i>	<i>Средний % Редактирования</i>	<i>Стандартное Отклонение</i>
<i>G209 партия №2</i>	<i>44.2</i>	<i>4.1</i>
<i>G209 партия №4</i>	<i>47.5</i>	<i>5.3</i>
<i>G262</i>	<i>52.2</i>	<i>4.7</i>
<i>G263</i>	<i>60.9</i>	<i>3.8</i>
<i>G264</i>	<i>48.9</i>	<i>5.8</i>
<i>G265</i>	<i>44.7</i>	<i>11.1</i>
<i>G266</i>	<i>47.0</i>	<i>7.8</i>
<i>G267</i>	<i>58.9</i>	<i>3.1</i>

Фиг. 15С



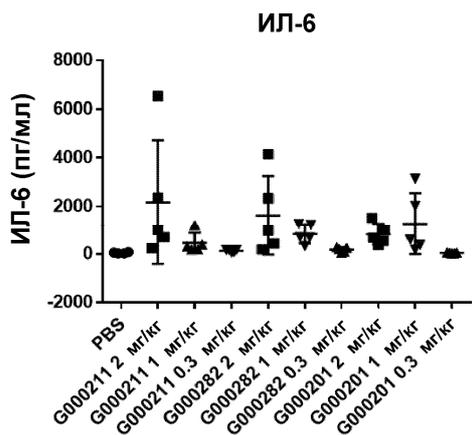
\* = Фосфоротиоат

sgРНК с концевыми модификациями

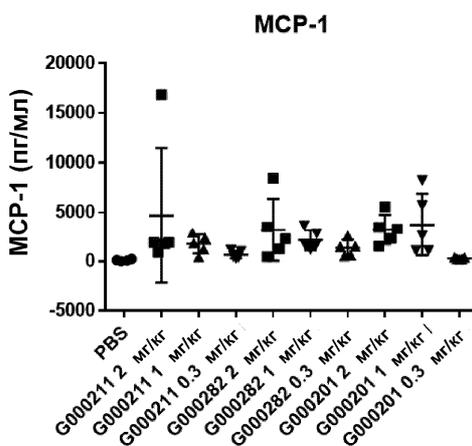
G000209

Фиг. 15D

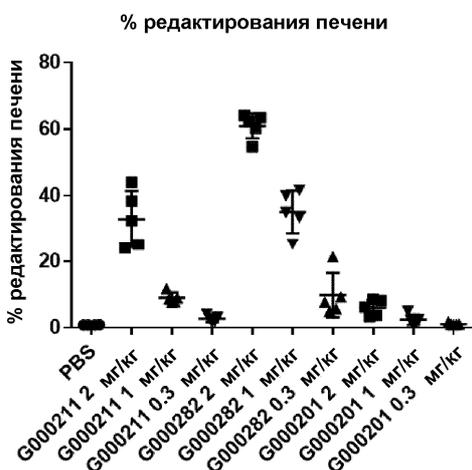




Фиг. 16С



Фиг. 16D

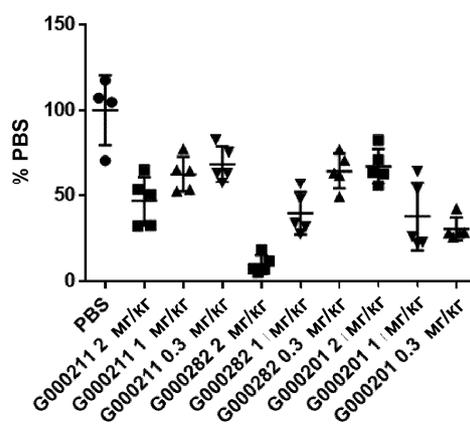


Фиг. 17А

	Средний % Редактирования	Стандартное Отклонение
PBS	0.8370155	0.03184162
G211 2 мг/кг	32.89082	8.520595
G211 1 мг/кг	9.024511	1.640143
G211 0.3 мг/кг	2.762495	0.9668095
G282 2 мг/кг	60.99886	3.792423
G282 1 мг/кг	35.13641	6.434229
G282 0.3 мг/кг	9.812781	6.713302
G284 2 мг/кг	6.007987	2.434861
G284 1 мг/кг	2.413099	1.540902
G284 0.3 мг/кг	1.130903	0.3189707

Фиг. 17B

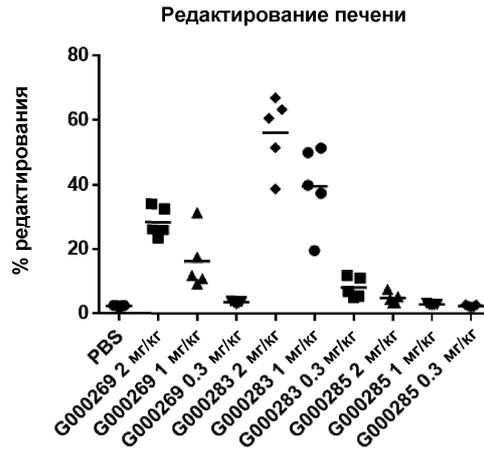
TTR в сыворотке по отношению к PBS



Фиг. 17C

	Средний % Снижения TTR	Стандартное Отклонение
PBS	100.000	20.31276
G211 2 мг/кг	46.73565	14.33137
G211 1 мг/кг	62.66805	10.30656
G211 0.3 мг/кг	68.51203	10.40399
G282 2 мг/кг	9.890765	5.288372
G282 1 мг/кг	39.58118	12.35095
G282 0.3 мг/кг	64.59702	10.51861
G284 2 мг/кг	67.28742	10.217
G284 1 мг/кг	37.76873	19.77835
G284 0.3 мг/кг	30.4822	6.612638

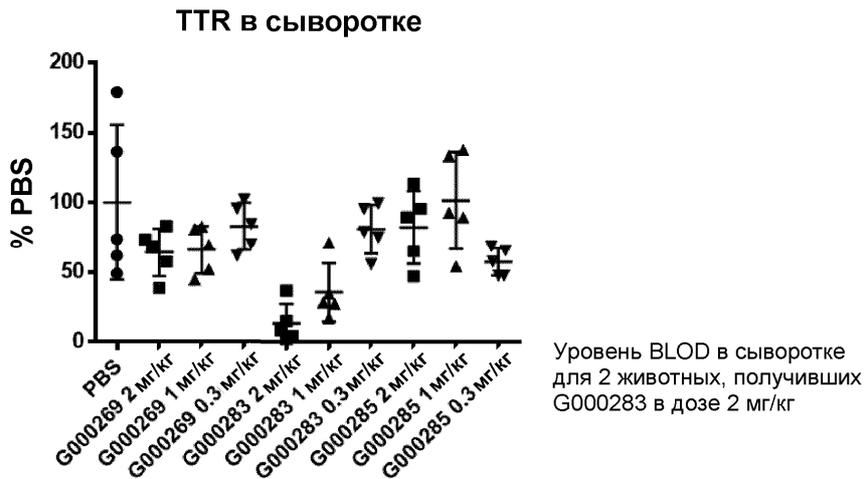
Фиг. 17D



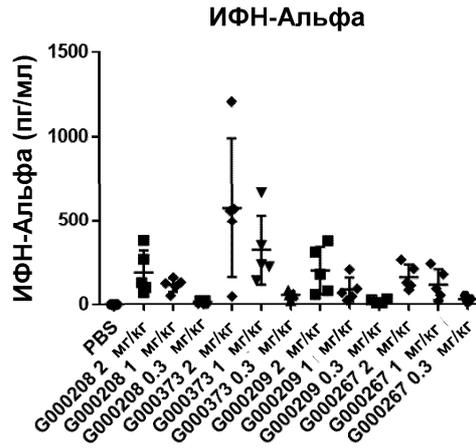
Фиг. 18А

Направляющая	Доза	Средний % Редактирования
PBS		2.38
G269	2 мг/кг	28.57
	1 мг/кг	16.21
	0.3 мг/кг	3.54
G283	2 мг/кг	56.32
	1 мг/кг	39.73
	0.3 мг/кг	8.08
G285	2 мг/кг	4.80
	1 мг/кг	2.90
	0.3 мг/кг	2.44

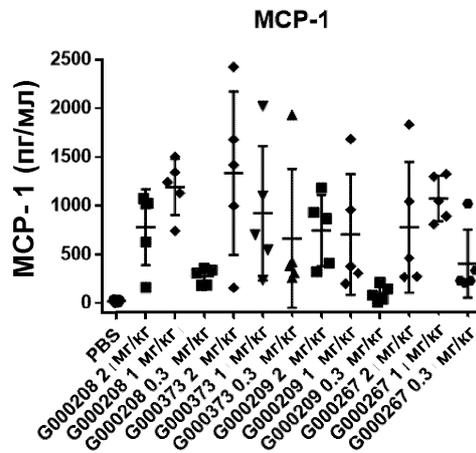
Фиг. 18В



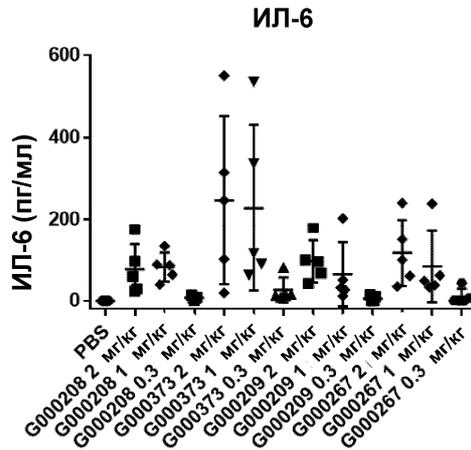
Фиг. 18С



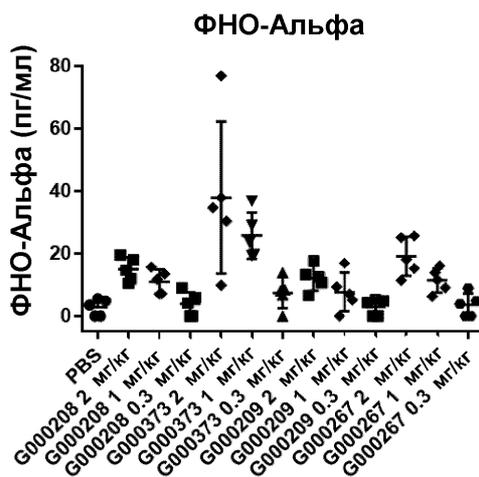
Фиг. 19А



Фиг. 19В

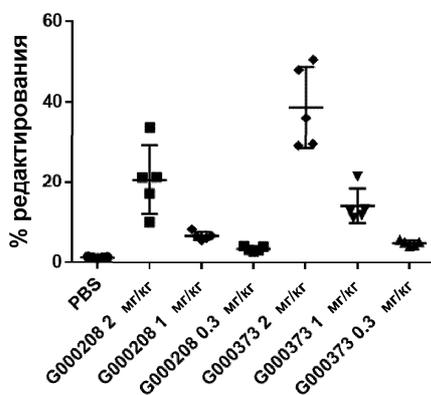


Фиг. 19С



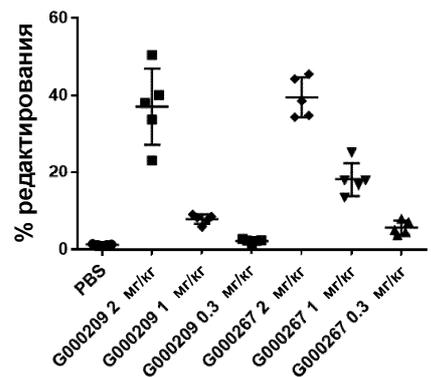
Фиг. 19D

**Редактирование в печени полокусу FVII**

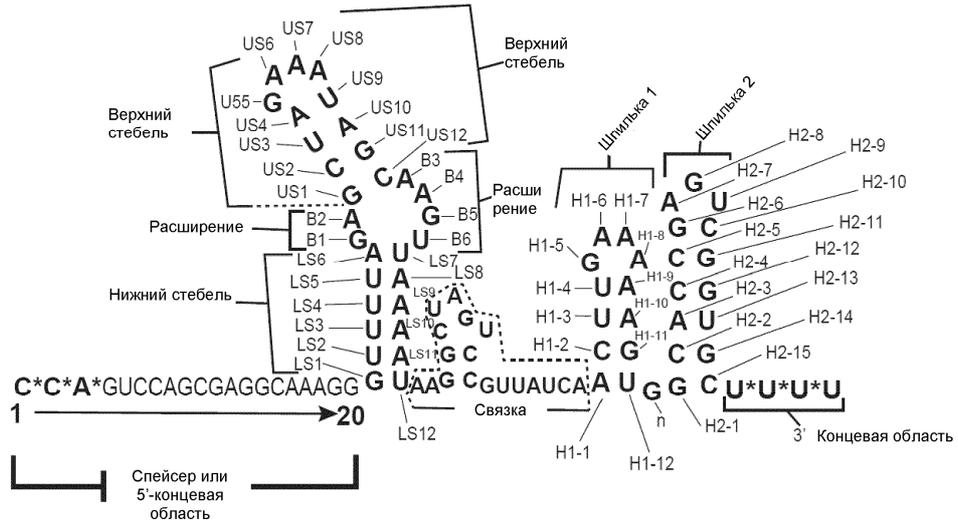


Фиг. 20A

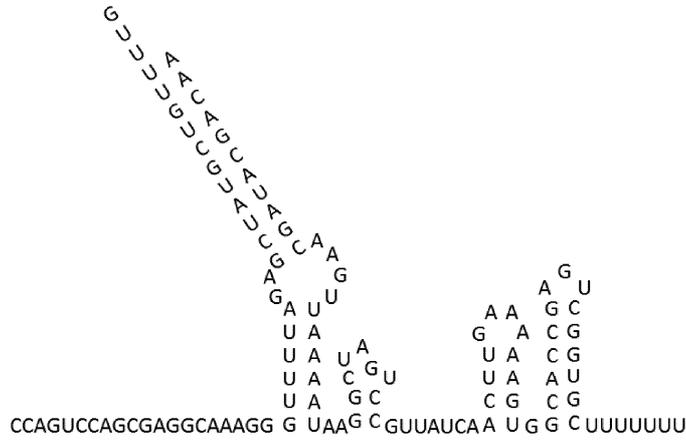
**Редактирование в печени полокусу TTR**



Фиг. 20B

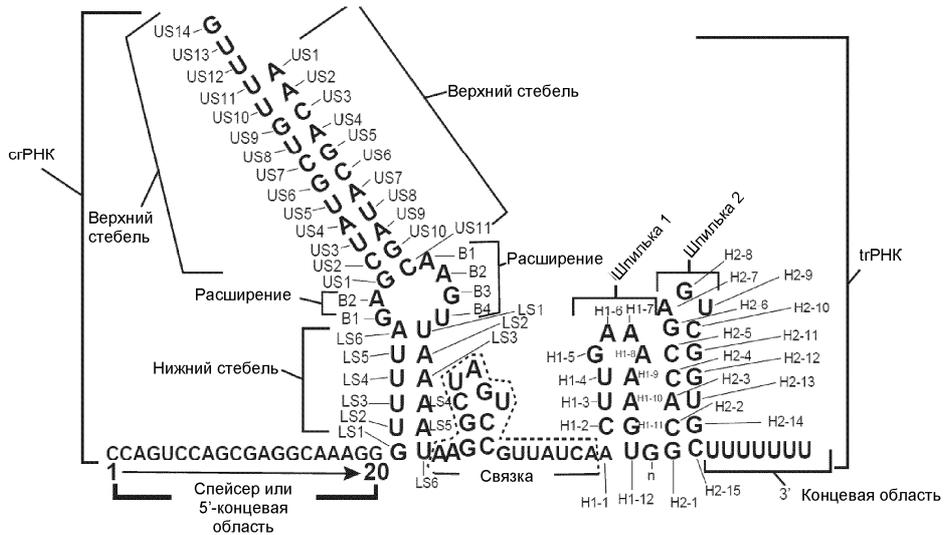


Фиг. 21А



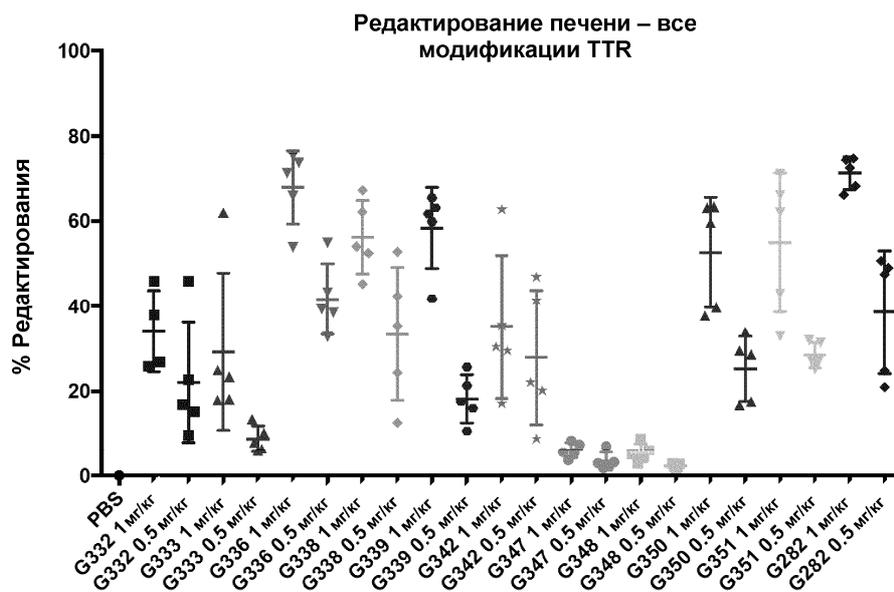
dgPHK  
CR000686 + TR000002

Фиг. 21В



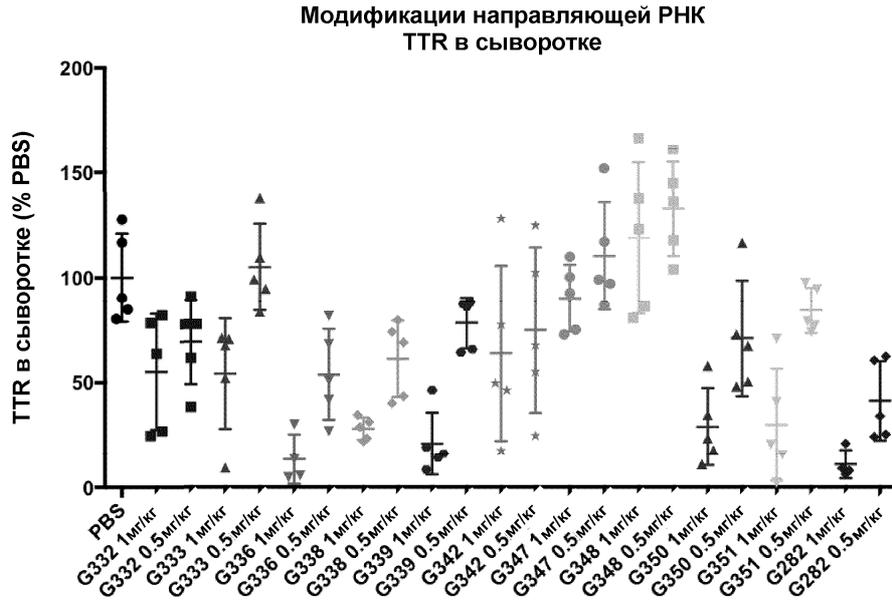
dgPHK  
CR000686 + TR000002

Фиг. 21С

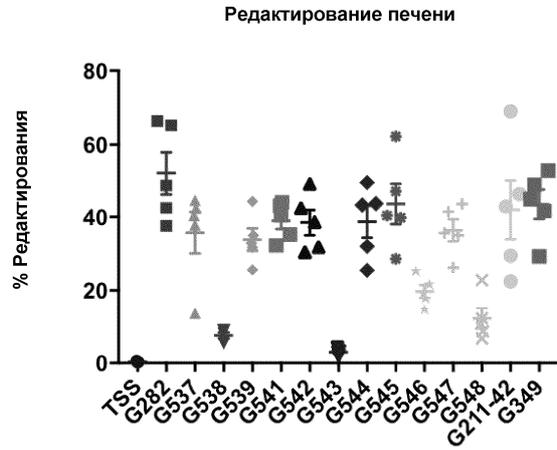


Группа	Средний % Редактирования	Станд. Откл.
PBS	0	0
G332 1 мг/кг	34.14	9.575
G332 0.5 мг/кг	22.08	14.13
G333 1 мг/кг	29.28	18.53
G333 0.5 мг/кг	8.801	3.082
G336 1 мг/кг	67.92	8.609
G336 0.5 мг/кг	41.72	8.277
G338 1 мг/кг	56.25	8.561
G338 0.5 мг/кг	33.48	15.63
G339 1 мг/кг	58.36	9.444
G339 0.5 мг/кг	18.23	5.654
G342 1 мг/кг	35.12	16.84
G342 0.5 мг/кг	27.94	15.83
G347 1 мг/кг	6.073	1.825
G347 0.5 мг/кг	3.399	2.13
G348 1 мг/кг	5.464	2.171
G348 0.5 мг/кг	2.333	0.448
G350 1 мг/кг	52.66	12.88
G350 0.5 мг/кг	25.27	7.695
G351 1 мг/кг	54.94	16.24
G351 0.5 мг/кг	28.52	3.014
G282 1 мг/кг	71.08	3.789
G282 0.5 мг/кг	38.6	14.45

Фиг. 22В



Фиг. 22С

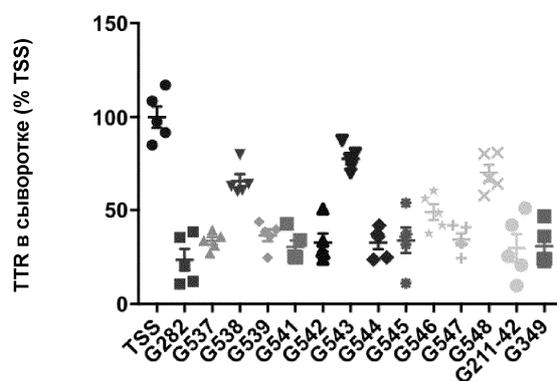


Фиг. 23А

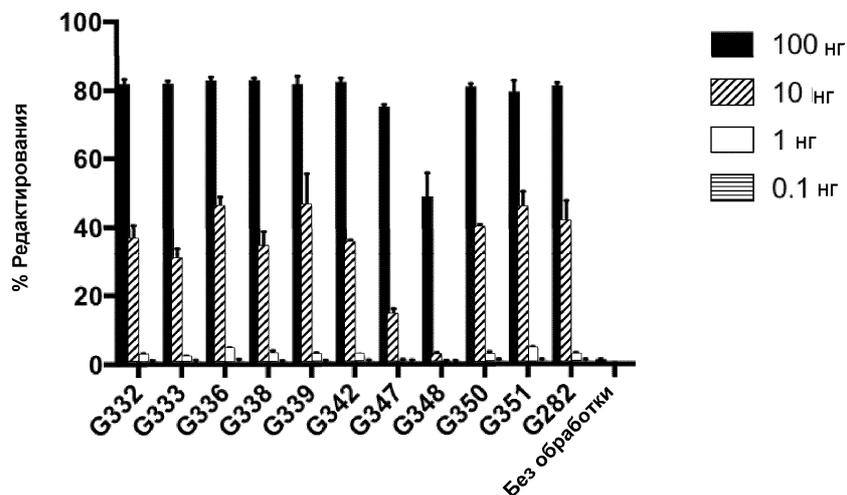
Направляющая	Средний % Редактирования
TSS	0.32
G282	52.06
G537	35.78
G538	7.5
G539	33.9
G541	39.04
G542	38.54
G543	2.96
G544	38.78
G545	43.6
G546	19.74
G547	36.44
G548	12.2
G211-42	42.04
G349	43.48

Фиг. 23В

## TTR в сыворотке (% TSS)

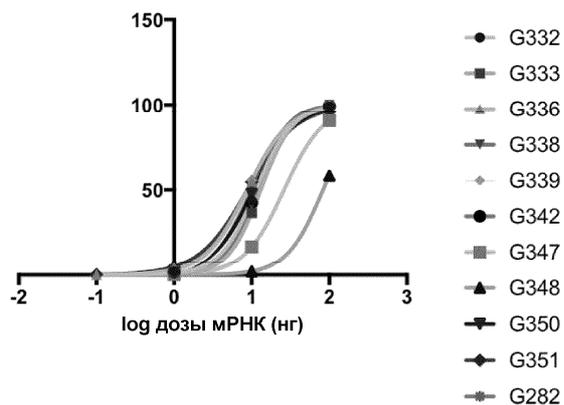


Фиг. 23С



Фиг. 24А

Трансформация с нормировкой для расчета EC50



Фиг. 24В

<i>НАПРАВЛЯЮЩАЯ</i>	<i>EC50</i>
<i>G332</i>	<i>11.42</i>
<i>G333</i>	<i>13.07</i>
<i>G336</i>	<i>8.735</i>
<i>G338</i>	<i>11.80</i>
<i>G339</i>	<i>8.778</i>
<i>G342</i>	<i>11.60</i>
<i>G347</i>	<i>26.07</i>
<i>G348</i>	<i>83.09</i>
<i>G350</i>	<i>10.57</i>
<i>G351</i>	<i>8.797</i>
<i>G282</i>	<i>10.04</i>

Фиг. 24С

