

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **047139**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.06.06

(21) Номер заявки
202090868

(22) Дата подачи заявки
2018.09.28

(51) Int. Cl. **C12N 15/113** (2010.01)
C12N 15/88 (2006.01)
C12N 9/22 (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01)

(54) СОСТАВЫ

(31) **62/566,240**

(32) **2017.09.29**

(33) **US**

(43) **2020.09.16**

(86) **PCT/US2018/053559**

(87) **WO 2019/067992 2019.04.04**

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

(72) Изобретатель:
Вуд Кристи М., Гарднер Ной Пол,
Шах Ручи Рудрапрасад, Скалли
Стивен С., Маджзоб Рэмзи (US)

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

(56) **WO-A1-2017127750**

WO-A1-2017049074

JINGTAO ZHANG ET AL.: "Assessing the Heterogeneity Level in Lipid Nanoparticles for siRNA Delivery: Size-Based Separation, Compositional Heterogeneity, and Impact on Bioperformance", **MOLECULAR PHARMACEUTICS**, vol. 10, no. 1, 4 December 2012 (2012-12-04), pages 397-405, XP055106526, ISSN: 1543-8384, DOI: 10.1021/mp3005337 table 1

WO-A2-2015006747

WO-A1-2015095340

WO-A2-2015089419

US-A1-2014162962

YU XIN ET AL.: "Improved delivery of Cas9 protein/gRNA complexes using lipofectamine CRISPRMAX", **BIOTECHNOLOGY LETTERS**, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, DORDRECHT, 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

CHENG XINWEI ET AL.: "The role of helper lipids in lipid nanoparticles (LNPs) designed for oligonucleotide delivery", **ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS**, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 99, 18 February 2016 (2016-02-18), pages 129-137, XP029445785, ISSN: 0169-409X, DOI: 10.1016/J.ADDR.2016.01.022, the whole document

WO-A1-2017173054

WO-A1-2018119182

(57) В изобретении предложены композиции на основе липидных наночастиц с улучшенными свойствами для доставки биологически активных агентов, сконструированных клеток, и способы доставки таких агентов.

B1

047139

047139

B1

Изобретение испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США № 62/566240, поданной 29 сентября 2017 г., содержание которой полностью включено в данный документ посредством ссылки.

В данном документе предложены композиции липидных наночастиц (LNP) с улучшенными свойствами для доставки биологически активных агентов, в частности РНК, мРНК и гидовых РНК. Композиции LNP облегчают доставку агентов РНК через клеточные мембраны, и в конкретных вариантах осуществления они вводят компоненты и композиции для редактирования генов в живые клетки.

Биологически активные агенты, которые особенно трудно доставить в клетки, включают белки, лекарственные средства на основе нуклеиновых кислот и их производные. Особый интерес представляют композиции для доставки в клетки перспективных технологий редактирования генов, например, для доставки компонентов системы CRISPR/Cas9.

В настоящее время существует целый ряд компонентов и систем для редактирования генов в клетках *in vivo*, обеспечивающих огромный потенциал для лечения заболеваний. Системы редактирования генов CRISPR/Cas активны в клетке в виде рибонуклеопротеиновых комплексов. В клетке РНК-направленная нуклеаза связывается с последовательностью ДНК и направляет ее расщепление. Эта сайт-специфическая активность нуклеазы облегчает редактирование генов посредством собственных естественных процессов клетки. Например, клетка реагирует на двухцепочечные разрывы ДНК (DSB) подверженным ошибкам процессом репарации, известным как негомологичное соединение концов (NHEJ). Во время NHEJ нуклеотиды могут быть добавлены или удалены клеткой с концов ДНК, что приводит к изменению последовательности из расщепленной последовательности. В других случаях клетки восстанавливают DSB с помощью механизмов направляемой гомологией репарации (HDR) или гомологичной рекомбинации (HR), в которых эндогенная или экзогенная матрица может быть использована для прямой репарации разрыва. Некоторые из этих технологий редактирования используют клеточные механизмы для репарации одноцепочечных разрывов (SSB) или DSB.

Существует необходимость в композициях для доставки белковых компонентов и компонентов нуклеиновых кислот CRISPR/Cas в клетку, например в клетку пациента. В частности, особый интерес представляют композиции для доставки мРНК, кодирующей белковый компонент CRISPR, и для доставки гидовых РНК CRISPR. Композиции с полезными свойствами для доставки *in vitro* и *in vivo*, которые могут стабилизировать и доставлять РНК-компоненты, также представляют особый интерес.

В данном документе авторы предоставляют композиции на основе липидных наночастиц с полезными свойствами, в частности, для доставки компонентов для редактирования генов CRISPR/Cas.

В определенных вариантах осуществления композиции LNP содержат: РНК-компонент и липидный компонент, причем липидный компонент содержит: (1) около 50-60 мол.% аминоклипида; (2) около 8-10 мол.% нейтрального липида; и (3) около 2,5-4 мол.% ПЭГ-липид, где остаток липидного компонента представляет собой вспомогательный липид, и где соотношение N/P композиции LNP составляет около 6. В дополнительных вариантах осуществления композиции LNP содержат (1) РНК-компонент; (2) около 50-60 мол.% аминоклипида; (3) около 27-39,5 мол.% вспомогательного липида; (4) около 8-10 мол.% нейтрального липида; и (5) около 2,5-4 мол.% ПЭГ-липид, где соотношение N/P композиции LNP составляет около 5-7.

В других вариантах осуществления композиции LNP содержат РНК-компонент и липидный компонент, причем липидный компонент содержит: (1) около 50-60 мол.% аминоклипида; (2) около 5-15 мол.% нейтрального липида; и (3) около 2,5-4 мол.% ПЭГ-липид, где остаток липидного компонента представляет собой вспомогательный липид, и где соотношение N/P композиции LNP составляет около 3-10. В дополнительных вариантах осуществления композиции LNP содержат липидный компонент, который содержит (1) около 40-60 мол.% аминоклипида; (2) около 5-15 мол.% нейтрального липида; и (3) около 2,5-4 мол.% ПЭГ-липид, где остаток липидного компонента представляет собой вспомогательный липид, и где соотношение N/P композиции LNP составляет около 6. В другом варианте осуществления композиции LNP содержат липидный компонент, который содержит (1) около 50-60 мол.% аминоклипида; (2) около 5-15 мол.% нейтрального липида; и (3) около 1,5-10 мол.% ПЭГ-липид, где остаток липидного компонента представляет собой вспомогательный липид, и где соотношение N/P композиции LNP составляет около 6.

В некоторых вариантах осуществления композиции LNP содержат РНК-компонент и липидный компонент, причем липидный компонент содержит: (1) около 40-60 мол.% аминоклипида; (2) около 0-5 мол.% нейтрального липида, например, фосфолипид; и (3) около 1,5-10 мол.% ПЭГ-липид, где остаток липидного компонента представляет собой вспомогательный липид, и где соотношение N/P композиции LNP составляет около 3-10. В некоторых вариантах осуществления композиции LNP содержат РНК-компонент и липидный компонент, причем липидный компонент содержит: (1) около 40-60 мол.% аминоклипида; (2) менее чем около 1 мол.% нейтрального липида, например, фосфолипид; и (3) около 1,5-10 мол.% ПЭГ-липид, где остаток липидного компонента представляет собой вспомогательный липид, и где соотношение N/P композиции LNP составляет около 3-10. В определенных вариантах осуществления композиции LNP по существу не содержат нейтрального липида. В некоторых вариантах осуществления композиции LNP содержат РНК-компонент и липидный компонент, причем липидный компонент со-

держит: (1) около 40-60 мол.% аминоклипида; и (2) около 1,5-10 мол.% ПЭГ-липид, где остаток липидного компонента представляет собой вспомогательный липид, где соотношение N/P композиции LNP составляет около 3-10, и где композиция LNP не содержит нейтрального липида, например, фосфолипид. В определенных вариантах осуществления композиция LNP по существу не содержит или не содержит нейтральный фосфолипид. В определенных вариантах осуществления композиция LNP по существу не содержит или не содержит нейтральный липид, например, фосфолипид.

В определенных вариантах осуществления РНК-компонент содержит мРНК, такую как РНК-направляемый ДНК-связывающий агент (например, Cas-нуклеазу или Cas-нуклеазу класса 2). В определенных вариантах осуществления РНК-компонент содержит гРНК.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 показан процент редактирования гена TTR, достигнутого в печени мыши после доставки компонентов, мРНК Cas9 и гРНК, для редактирования генов CRISPR/Cas в композициях LNP, как указано при однократном введении 1 мг/кг массы тела (фиг. 1A) или 0,5 мг/кг массы тела (фиг. 1B).

На фиг. 2 показаны данные о распределении частиц для композиций LNP, содержащих мРНК Cas9 и гРНК.

На фиг. 3 показаны физико-химические свойства композиций LNP путем сравнения log производных молярных масс (фиг. 3A) и значений средних молекулярных масс (фиг. 3B) для этих композиций.

На фиг. 4 показаны расчеты полидисперсности (фиг. 4A) и анализ Бурхарда-Штокмайера (фиг. 4B), в котором анализируются композиции LNP из фиг. 3.

На фиг. 5 представлены результаты эксперимента по оценке влияния композиций LNP с повышенными концентрациями ПЭГ-липидов на нокдаун TTR в сыворотке, редактирование генов в печени и уровни цитокинов MCP-1 после введения однократной дозы у крыс. На фиг. 5A показана диаграмма уровней TTR в сыворотке; на фиг. 5B показана диаграмма процента редактирования в образцах печени; и на фиг. 5C представлены уровни MCP-1 в пг/мл.

На фиг. 6 показано, что композиции LNP сохраняют способность к редактированию генов с различными ПЭГ-липидами (как измерено по уровням TTR в сыворотке (фиг. 6A и 6B) и проценту редактирования (фиг. 6C)).

На фиг. 7 показано, что аналоги Липида А эффективно доставляют карго для редактирования генов в композициях LNP, как измерено по % редактирования в печени после введения однократной дозы у мыши.

На фиг. 8 показана кривая зависимости ответа от дозы в процентах редактирования для различных композиций LNP в первичных гепатоцитах яванского макака.

На фиг. 9A и 9B показаны результаты анализа TTR в сыворотке и процент редактирования, когда изменяется соотношение гРНК к мРНК, и на фиг. 9C и фиг. 9D показаны результаты анализа TTR в сыворотке и процент редактирования в печени, когда количество мРНК Cas9 поддерживается постоянным, а гРНК варьируется после однократного введения у мыши.

На фиг. 10A и 10B показаны результаты анализа TTR в сыворотке и редактирования в печени после введения композиций LNP с нейтральным липидом и без него.

Подробное описание сущности изобретения

Данное описание обеспечивает варианты осуществления композиций РНК на основе липидных наночастиц (LNP), включающих РНК-компоненты CRISPR/Cas (карго), для доставки в клетку, и способы их применения. Композиции LNP могут проявлять улучшенные свойства по сравнению с предшествующими технологиями доставки. Композиция LNP может содержать РНК-компонент и липидный компонент, как определено в данном документе. В определенных вариантах осуществления РНК-компонент включает в себя Cas-нуклеазу, такую как Cas-нуклеаза класса 2. В определенных вариантах осуществления компонент карго или РНК-компонент включает в себя мРНК, кодирующую Cas-нуклеазу класса 2, и гидовую РНК или нуклеиновую кислоту, кодирующую гидовые РНК. Также предложены способы редактирования генов и способы создания сконструированных клеток.

Карго CRISPR/Cas.

Карго CRISPR/Cas, доставляемый с помощью состава LNP, может содержать молекулу мРНК, кодирующую представляющий интерес белок. Например, в карго включена мРНК для экспрессии белка, например зеленого флуоресцентного белка (GFP), и РНК-направляемого ДНК-связывающего агента или Cas-нуклеазы. Предложены композиции LNP, которые содержат мРНК Cas-нуклеазы, например мРНК Cas-нуклеазы класса 2, которая обеспечивает экспрессию белка Cas9 в клетке. Кроме того, карго может содержать одну или более гидовых РНК или нуклеиновых кислот, кодирующих гидовые РНК. Матричная нуклеиновая кислота, например, для репарации или рекомбинации, также может быть включена в композицию, или матричная нуклеиновая кислота может быть использована в описанных в данном документе способах.

Термин "мРНК" относится к полинуклеотиду, который содержит открытую рамку считывания, которая может транслироваться в полипептид (то есть может служить субстратом для трансляции с помощью рибосомы и аминокислотированной тРНК). мРНК может содержать сахарофосфатный остов, включающий остатки рибозы или их аналоги, например остатки 2'-метоксирибозы. В некоторых вариантах

осуществления сахара сахарофосфатного остова мРНК состоят по существу из остатков рибозы, остатков 2'-метоксирибозы или их комбинации. Как правило, мРНК не содержат существенного количества остатков тимидина (например, 0 остатков или менее 30, 20, 10, 5, 4, 3 или 2 остатков тимидина; или содержание тимидина менее 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 4, 3, 2, 1, 0,5, 0,2 или 0,1%). мРНК может содержать модифицированные уридины в некоторых или во всех своих положениях уридина.

Нуклеазная система CRISPR/Cas.

Один компонент из раскрытых составов представляет собой мРНК, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, такой как Cas-нуклеаза.

Используемый в данный документ термин "РНК-направляемый ДНК-связывающий агент" означает полипептид или комплекс полипептидов, обладающих активностью связывания РНК и ДНК, или ДНК-связывающую субъединицу такого комплекса, причем ДНК-связывающая активность специфична для последовательности и зависит от последовательности РНК. Иллюстративные РНК-направляемые ДНК-связывающие агенты включают Cas-клевазы/никазы и их инактивированные формы (ДНК-связывающие агенты dCas). Термин "Cas-нуклеаза", используемая в данном документе, охватывает Cas-клевазы, Cas-никазы и ДНК-связывающие агенты dCas. Cas-клевазы/никазы и ДНК-связывающие агенты dCas включают в себя комплекс Csm или Cmr системы CRISPR типа III, ее субъединицу Cas10, Csm1 или Cmr2, комплекс Cascade системы CRISPR типа I, ее субъединицу Cas3 и Cas-нуклеазы класса 2. Используемый в данном документе термин "Cas-нуклеаза класса 2" представляет собой одноцепочечный полипептид с РНК-направляемой ДНК-связывающей активностью. Cas-нуклеазы класса 2 включают Cas-клевазы/никазы класса 2 (например, варианты N840A, D10A или N863A), которые дополнительно обладают РНК-направляемой клевазной или никазной активностью в отношении ДНК, и ДНК-связывающие агенты dCas 2 класса, в которых активность клевазы/никазы инактивируется. Cas-нуклеазы класса 2 включают, например, Cas9, Cpf1, C2c1, C2c2, C2c3, HF Cas9 (например, варианты N497A, R661A, Q695A, Q926A), НураCas9 (например, варианты N692A, M694A, Q695A, H698A), eSPCas9(1.0) (например, варианты K810A, K1003A, R1060A) и eSPCas9(1.1) (например, варианты K848A, K1003A, R1060A) и их модификации. Белок Cpf1, Zetsche et al., Cell, 163: 1-13 (2015), гомологичен Cas9 и содержит RuvC-подобный нуклеазный домен. Последовательности Cpf1 из Zetsche включены посредством ссылки во всей их полноте. См., например, Zetsche, таблицы S1 и S3. См., например, Makarova et al., Nat Rev Microbiol, 13(11): 722-36 (2015); Shmakov et al., Molecular Cell, 60:385-397 (2015).

В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент представляет собой нуклеазу класса 2. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент обладает клевазной активностью, которая также может упоминаться как двухцепочечная эндонуклеазная активность. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит Cas-нуклеазу, такую как Cas-нуклеаза 2 класса (которая может быть, например, Cas-нуклеазой типа II, V или VI). Cas-нуклеазы класса 2 включают в себя, например, белки Cas9, Cpf1, C2c1, C2c2 и C2c3, и их модификации. Примеры нуклеаз Cas9 включают в себя системы CRISPR типа II *S. pyogenes*, *S. aureus* и других прокариот (см., например, перечень в следующем параграфе) и их модифицированные (например, сконструированные или мутантные) варианты. См., например, U.S. 2016/0312198 A1; U.S. 2016/0312199 A1. Другие примеры Cas-нуклеаз включают комплекс Csm или Cmr системы CRISPR типа III или ее субъединицу Cas10, Csm1 или Cmr2; и комплекс Cascade системы CRISPR типа I или ее субъединицу Cas3. В некоторых вариантах осуществления Cas-нуклеаза может происходить из системы типа IIA, типа IIB или типа IIC. Для обсуждения различных систем CRISPR и нуклеаз Cas, см., например, Makarova et al., Nat. Rev. Microbiol. 9:467-477 (2011); Makarova et al., Nat. Rev. Microbiol, 13: 722-36 (2015); Shmakov et al., Molecular Cell, 60:385-397 (2015).

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

В некоторых вариантах осуществления Cas-нуклеаза представляет собой нуклеазу Cas9 из *Streptococcus pyogenes*. В некоторых вариантах осуществления Cas-нуклеаза представляет собой нуклеазу Cas9 из *Streptococcus thermophilus*. В некоторых вариантах осуществления Cas-нуклеаза представляет собой нуклеазу Cas9 из *Neisseria meningitidis*. В некоторых вариантах осуществления Cas-нуклеаза представляет собой нуклеазу Cas9 из *Staphylococcus aureus*. В некоторых вариантах осуществления Cas-нуклеаза представляет собой нуклеазу Cpf1 из *Francisella novicida*. В некоторых вариантах осуществления Cas-нуклеаза представляет собой нуклеазу Cpf1 из *Acidaminococcus* sp. В некоторых вариантах осуществления Cas-нуклеаза представляет собой нуклеазу Cpf1 из *Lachnospiraceae* sp ND2006. В других вариантах осуществления Cas-нуклеаза представляет собой нуклеазу Cpf1 из *Francisella tularensis*, *Lachnospiraceae* sp., *Butyrivibrio proteoclasticus*, *Peregrinibacteria bacterium*, *Parcubacteria bacterium*, *Smithella*, *Acidaminococcus*, *Candidatus Methanoplasma termitum*, *Eubacterium eligens*, *Moraxella bovoculi*, *Leptospira inadai*, *Porphyromonas crevioricanis*, *Prevotella disiens* или *Porphyromonas macacae*. В определенных вариантах осуществления Cas-нуклеаза представляет собой нуклеазу Cpf1 из *Acidaminococcus* или *Lachnospiraceae*.

Cas9 дикого типа имеет два нуклеазных домена RuvC и HNH. Домен RuvC расщепляет нецелевую цепь ДНК, а домен HNH расщепляет целевую цепь ДНК. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза Cas9 содержит более одного домена RuvC и/или более одного домена HNH. В некоторых вариантах нуклеаза Cas9 представляет собой Cas9 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления Cas9 способна индуцировать разрыв двухцепочечной цепи в целевой ДНК. В определенных вариантах осуществления Cas-нуклеаза может расщеплять дцДНК, она может расщеплять одну цепь дцДНК или может не обладать клевазной или никазной активностью в отношении ДНК. Иллюстративная аминокислотная последовательность Cas9 представлена в виде SEQ ID NO: 3. Иллюстративная последовательность ОРС мРНК Cas9, которая содержит старт- и стоп-кодоны, представлена в виде SEQ ID NO: 4. Иллюстративная кодирующая последовательность мРНК Cas9, подходящая для включения в слитый белок, представлена в виде SEQ ID NO: 10.

В некоторых вариантах осуществления применяются химерные Cas-нуклеазы, где один домен или область белка заменены частью другого белка. В некоторых вариантах осуществления домен Cas-нуклеазы может быть заменен доменом из другой нуклеазы, такой как FokI. В некоторых вариантах осуществления Cas-нуклеаза может представлять собой модифицированную нуклеазу.

В других вариантах осуществления Cas-нуклеаза может происходить из системы CRISPR/Cas типа I. В некоторых вариантах осуществления Cas-нуклеаза может представлять собой компонент комплекса Cascade системы CRISPR/Cas типа I. В некоторых вариантах осуществления Cas-нуклеаза может представлять собой белок Cas3. В некоторых вариантах осуществления Cas-нуклеаза может происходить из системы CRISPR/Cas типа III. В некоторых вариантах осуществления Cas-нуклеаза может иметь активность расщепления РНК.

В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент обладает односторонней никазной активностью, то есть может разрезать одну цепь ДНК с образованием разрыва одной цепи, также известного как "односторонний разрыв". В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит Cas-никазу. Никаза представляет собой фермент, который создает односторонний разрыв в дцДНК, то есть разрезает одну цепь, но не другую цепь двойной спирали ДНК. В некоторых вариантах осуществления Cas-никаза представляет собой вариант Cas-нуклеазы (например, Cas-нуклеазы, описанной выше), в котором эндонуклеолитический активный центр инактивирован, например, одним или более изменениями (например, точечными мутациями) в каталитическом домене. См., например, патент США № 8889356 по обсуждению Cas-никаз и иллюстративных изменений каталитического домена. В некоторых вариантах осуществления Cas-никаза, такая как никаза Cas9, имеет инактивированный домен RuvC или HNH. Иллюстративная аминокислотная последовательность никазы Cas9 представлена в виде SEQ ID NO: 6.

Иллюстративная последовательность ОРС мРНК никазы Cas9, которая содержит старт- и стоп-кодоны, представлена в виде SEQ ID NO: 7. Иллюстративная кодирующая последовательность мРНК никазы Cas9, подходящая для включения в слитый белок, представлена в виде SEQ ID NO: 11.

В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент модифицируют так, что он содержит только один функциональный домен нуклеазы. Например, белок-агент может быть модифицирован таким образом, что один из доменов нуклеазы мутирует или полностью, или частично удаляется, чтобы снизить его активность по расщеплению нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления используют никазу, имеющую домен RuvC с пониженной активностью. В некоторых вариантах осуществления используют никазу, имеющую неактивный домен RuvC. В некоторых вариантах осуществления используют никазу, имеющую домен HNH с пониженной активностью. В некоторых вариантах осуществления используют никазу, имеющую неактивный домен HNH.

В некоторых вариантах осуществления консервативную аминокислоту в домене белка-нуклеазы Cas замещают для снижения или изменения нуклеазной активности. В некоторых вариантах осуществления Cas-нуклеаза может содержать аминокислотную замену в RuvC или RuvC-подобном нуклеазном домене. Иллюстративные аминокислотные замены в RuvC или RuvC-подобном нуклеазном домене включают D10A (на основе белка Cas9 *S. pyogenes*). См., например, Zetsche et al. (2015) Cell Oct 22:163(3):

759-771. В некоторых вариантах осуществления Cas-нуклеаза может содержать аминокислотную замену в HNH или HNH-подобном нуклеазном домене. Иллюстративные аминокислотные замены в HNH или HNH-подобном нуклеазном домене включают E762A, N840A, N863 A, N983 A и D986A (на основе белка Cas9 *S. pyogenes*). См., например, Zetsche et al. (2015). Другие иллюстративные аминокислотные замены включают D917A, E1006A и D1255A (на основе последовательности Cpf1 *Francisella novicida* U112 (FnCpf1) (UniProtKB - A0Q7Q2 (CPF1_FRATN))).

В некоторых вариантах осуществления мРНК, кодирующая никазу, предложена в комбинации с парой гидовых РНК, которые комплементарны смысловой и антисмысловой цепям целевой последовательности, соответственно. В данном варианте осуществления гидовые РНК направляют никазу на целевую последовательность и вводят DSB путем образования одноцепочечных разрывов на противоположных цепях целевой последовательности (то есть, двойной одноцепочечный разрыв). В некоторых вариантах осуществления использование двойного одноцепочечного разрыва может улучшать специфичность и уменьшать побочные эффекты. В некоторых вариантах осуществления никаза используется вместе с двумя отдельными гидовыми РНК, нацеленными на противоположные цепи ДНК, для создания двойного одноцепочечного разрыва в целевой ДНК. В некоторых вариантах осуществления никаза используется вместе с двумя отдельными гидовыми РНК, которые выбраны так, чтобы они находились в непосредственной близости, для создания двойного одноцепочечного разрыва в целевой ДНК.

В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент не обладает клезазной и никазной активностью. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит ДНК-связывающий полипептид dCas. Полипептид dCas обладает ДНК-связывающей активностью, при этом по существу не обладает каталитической (клевазной/никазной) активностью. В некоторых вариантах осуществления полипептид dCas представляет собой полипептид dCas9. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, не обладающий клезазной или никазной активностью, или ДНК-связывающий полипептид dCas представляет собой вариант Cas-нуклеазы (например, описанной выше Cas-нуклеазы), в котором ее эндонуклеолитические активные центры инактивированы, например путем одного или более изменений (например, точечных мутаций) в ее каталитических доменах. См., например, U.S. 2014/0186958 A1; U.S. 2015/0166980 A1. Иллюстративная аминокислотная последовательность dCas9 представлена в виде SEQ ID NO: 8. Иллюстративная последовательность ОРС мРНК Cas9, которая содержит старт- и стоп-кодоны, представлена в виде SEQ ID NO: 9. Иллюстративная кодирующая последовательность мРНК Cas9, подходящая для включения в слитый белок, представлена в виде SEQ ID NO: 12.

В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит один или более гетерологичных функциональных доменов (например, представляет собой или содержит слитый полипептид).

В некоторых вариантах осуществления гетерологичный функциональный домен может облегчать транспорт РНК-направляемого ДНК-связывающего агента в ядро клетки. Например, гетерологичный функциональный домен может представлять собой сигнал ядерной локализации (NLS). В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент может быть слит с 1-10 NLS. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент может быть слит с 1-5 NLS. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент может быть слит с одним NLS. Если используется один NLS, то NLS может быть связан на N-конце или С-конце последовательности РНК-направляемого ДНК-связывающего агента. Он также может быть вставлен в последовательность РНК-направляемого ДНК-связывающего агента. В других вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент может быть слит с более чем одним NLS. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент может быть слит с 2, 3, 4 или 5 NLS. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент может быть слит с двумя NLS. В определенных обстоятельствах два NLS могут быть одинаковыми (например, два NLS SV40) или разными. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент сливаются с двумя последовательностями NLS SV40, связанными на С-конце. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент может быть слит с двумя NLS, один из которых связан на N-конце, а другой - на С-конце. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент может быть слит с 3 NLS. В некоторых вариантах осуществления РНК-направленный ДНК-связывающий агент может быть слит без NLS. В некоторых вариантах осуществления NLS может представлять собой одинарную последовательность, такую как, например, SV40 NLS, PKKKRKV или PKKKRRV. В некоторых вариантах NLS может представлять собой двойную последовательность, такую как NLS нуклеоплазмина, KRPAATKKAGQAKKKK. В конкретном варианте осуществления один NLS PKKKRKV может быть связан на С-конце РНК-направляемого ДНК-связывающего агента. В сайт слияния необязательно включены один или более линкеров.

В некоторых вариантах осуществления гетерологичный функциональный домен может быть способен модифицировать внутриклеточное время полужизни РНК-направляемого ДНК-связывающего агента. В некоторых вариантах осуществления период полужизни РНК-направляемого ДНК-связывающего агента может быть увеличен. В некоторых вариантах осуществления период полужизни РНК-направляемого

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

В некоторых вариантах осуществления гетерологичный функциональный домен может представлять собой маркерный домен. Неограничивающие примеры маркерных доменов включают в себя флуоресцентные белки, метки для очистки, эпитопные метки и последовательности репортерных генов. В некоторых вариантах осуществления маркерный домен может представлять собой флуоресцентный белок. Неограничивающие примеры подходящих флуоресцентных белков включают зеленые флуоресцентные белки (например, GFP, GFP-2, tagGFP, turboGFP, sfGFP, EGFP, Emerald, Azami Green, мономерный Azami Green, CopGFP, AceGFP, ZsGreen1), желтые флуоресцентные белки (например, YFP, EYFP, Citrine, Venus, YPet, PhiYFP, ZsYellow1), синие флуоресцентные белки (например, EBFP, EBFP2, Azurite, mKalamal, GFPuv, Sapphire, T-sapphire), голубые флуоресцентные белки (например, ECFP, Cerulean, CyPet, AmCyan1, Midoriishi-Циан), красные флуоресцентные белки (например, mKate, mKate2, mPlum, номер DsRed, mCherry, mRFP1, DsRed-Express, DsRed2, DsRed-Monomer, HcRed-Tandem, HcRed1, AsRed2, eqFP611, mStrawberry, Jred) и оранжевые флуоресцентные белки (mOrange, mKO, Kusabira-Orange, мономерный Kusabira-Orange, mTangerine, tdTomato) или любой другой подходящий флуоресцентный белок. В других вариантах осуществления маркерный домен может представлять собой метку для очистки и/или эпитопную метку. Неограничивающие иллюстративные метки включают глутатион-S-трансферазу (GST), хитин-связывающий белок (СВР), мальтозосвязывающий белок (МВР), тиоредоксин (TRX), поли(NANP), метку для тандемной аффинной очистки (TAP), мус, AcV5, AU1, AU5, E, ECS, E2, FLAG, HA, nus, Softag 1, Softag 3, Strep, SBP, Glu-Glu, HSV, KT3, S, S1, T7, V5, VSV-G, 6xHis, 8xHis, белок-носитель биотин-карбоксила (BCCP), поли-His и кальмодулин. Неограничивающие иллюстративные репортерные гены включают глутатион-S-трансферазу (GST), пероксидазу хрена (HRP), хлорамфеникол-ацетилтрансферазу (CAT), бета-галактозидазу, бета-глокуронидазу, люциферазу или флуоресцентные белки.

В дополнительных вариантах осуществления гетерологичный функциональный домен может нацеливать РНК-направляемый ДНК-связывающий агент на конкретную органеллу, тип клетки, ткань или орган. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный функциональный домен может нацеливать РНК-направляемый ДНК-связывающий агент на митохондрии.

В дополнительных вариантах осуществления гетерологичный функциональный домен может представлять собой эффекторный домен. Если РНК-направляемый ДНК-связывающий агент направлен на его целевую последовательность, например, если Cas-нуклеаза направлена на целевую последовательность с помощью гРНК, эффекторный домен может модифицировать или влиять на целевую последовательность. В некоторых вариантах осуществления эффекторный домен может быть выбран из связывающего нуклеиновые кислоты домена, домена нуклеазы (например, домена отличной от Cas нуклеазы), домена эпигенетической модификации, активирующего транскрипцию домена или домена транскрипционного репрессора. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный функциональный домен представляет собой нуклеазу, такую как нуклеаза FokI. См., например, патент США №. 9023649. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный функциональный домен представляет собой транскрипционный активатор или репрессор. См., например, Qi et al., "Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression," *Cell* 152:1173-83 (2013); Perez-Pinera et al., "RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors," *Nat. Methods* 10:973-6 (2013); Mali et al., "CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering," *Nat. Biotechnol.* 31:833-8 (2013); Gilbert et al., "CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes," *Cell* 154:442-51 (2013). Как таковой, РНК-направляемый ДНК-связывающий агент по существу становится фактором транскрипции, который может быть направлен на связывание

желаемой целевой последовательности с использованием гидовой РНК. В определенных вариантах осуществления домен модификации ДНК представляет собой домен метилирования, такой как домен деметилирования или метилтрансферазы. В определенных вариантах осуществления эффекторный домен представляет собой домен модификации ДНК, такой как домен, редактирующий основания. В конкретных вариантах осуществления домен модификации ДНК представляет собой домен, редактирующий нуклеиновые кислоты, который вводит специфическую модификацию в ДНК, такой как дезаминазный домен. См., например, WO 2015/089406; US. 2016/0304846. Домены, редактирующие нуклеиновую кислоту, дезаминазные домены и варианты Cas9, описанные в WO 2015/089406 и US 2016/0304846, включены в данный документ посредством ссылки.

Нуклеаза может содержать по меньшей мере один домен, который взаимодействует с гидовой РНК (гРНК). Кроме того, нуклеаза может быть направлена на целевую последовательность с помощью гРНК. В системах Cas-нуклеаз класса 2 гРНК взаимодействует с нуклеазой, а также с целевой последовательностью, так что она направляет связывание с целевой последовательностью. В некоторых вариантах осуществления гРНК обеспечивает специфичность для целевого расщепления, и нуклеаза может быть универсальной и в паре с разными гРНК расщеплять разные целевые последовательности. Cas-нуклеаза класса 2 может соединяться с каркасной структурой гРНК типов, ортологов и иллюстративных видов, перечисленных выше.

Гидовая РНК (гРНК).

В некоторых вариантах осуществления данного описания карго для состава LNP содержит по меньшей мере одну гРНК. гРНК может направлять Cas-нуклеазу или Cas-нуклеазу класса 2 к целевой последовательности на молекуле целевой нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления гРНК связывается и обеспечивает специфичность расщепления с помощью Cas-нуклеазы класса 2. В некоторых вариантах осуществления гРНК и Cas-нуклеаза могут образовывать рибонуклеопротеид (РНП), например, комплекс CRISPR/Cas, такой как комплекс CRISPR/Cas9, который может быть доставлен композицией LNP. В некоторых вариантах осуществления комплекс CRISPR/Cas может представлять собой комплекс CRISPR/Cas9 типа II. В некоторых вариантах осуществления комплекс CRISPR/Cas может представлять собой комплекс CRISPR/Cas типа V, такой как комплекс Cpf1/ гидовая РНК. Cas-нуклеазы и родственные гРНК могут быть спарены. Каркасные структуры гРНК, которые связываются с каждой Cas-нуклеазой класса 2, варьируются в зависимости от конкретной системы CRISPR/Cas.

Термины "гидовая РНК", "гРНК" и просто "гид" используются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения или sgРНК (также известной как CRISPR РНК), или комбинации sgРНК и trРНК (также известной как tracrРНК). sgРНК и trРНК могут быть связаны в виде одиночной молекулы РНК (одиночная гидовая РНК, ogРНК) или в виде двух отдельных молекул РНК (двойная гидовая РНК, dgРНК). Термин "гидовая РНК" или "гРНК" относится к каждому типу. trРНК может быть встречающейся в природе последовательностью или последовательностью trРНК с модификациями или вариациями по сравнению со встречающимися в природе последовательностями.

Используемый в данном документе термин "гидовая последовательность" относится к последовательности в гидовой РНК, которая является комплементарной целевой последовательности и функционирует для направления гидовой РНК к целевой последовательности для связывания или модификации (например, расщепления) РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом. "Гидовая последовательность" может также упоминаться как "нацеливающая последовательность" или "спейсерная последовательность". Гидовая последовательность может иметь длину 20 пар оснований, например в случае *Streptococcus pyogenes* (то есть *Spy Cas9*) и родственных гомологов/ортологов Cas9. Более короткие или более длинные последовательности также могут быть использованы в качестве гидов, например длиной 15, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления целевая последовательность, например, находится в гене или в хромосоме и является комплементарной гидовой последовательности. В некоторых вариантах степень комплементарности или идентичности между гидовой последовательностью и соответствующей ей целевой последовательностью может составлять около 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100%. В некоторых вариантах осуществления гидовая последовательность и целевая область могут быть на 100% комплементарны или идентичны. В других вариантах осуществления гидовая последовательность и целевая область могут содержать по меньшей мере одно несовпадение. Например, гидовая последовательность и целевая последовательность могут содержать 1, 2, 3 или 4 несовпадения, причем общая длина целевой последовательности составляет по меньшей мере 17, 18, 19, 20 или более пар оснований. В некоторых вариантах осуществления гидовая последовательность и целевая область могут содержать 1-4 несовпадения, когда гидовая последовательность содержит по меньшей мере 17, 18, 19, 20 или более нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления гидовая последовательность и целевая область могут содержать 1, 2, 3 или 4 несовпадения, когда гидовая последовательность содержит 20 нуклеотидов.

Целевые последовательности для белков Cas включают как положительные, так и отрицательные цепи геномной ДНК (то есть заданную последовательность и обратный комплемент последовательности), поскольку субстрат нуклеиновой кислоты для белка Cas представляет собой двухцепочечную нуклеиновую кислоту. Соответственно, когда говорят, что гидовая последовательность является "компле-

ментарной целевой последовательности", следует понимать, что гидовая последовательность может направлять гидовую РНК для связывания с обратным комплементом целевой последовательности. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, где гидовая последовательность связывает обратный комплемент целевой последовательности, целевая последовательность идентична некоторым нуклеотидам целевой последовательности (например, целевой последовательности, не содержащей PAM), за исключением замены U на T в гидовой последовательности.

Длина целевой последовательности может зависеть от системы CRISPR/Cas и используемых компонентов. Например, разные Cas-нуклеазы класса 2 из разных видов бактерий имеют различные оптимальные длины нацеливающих последовательностей. Соответственно, нацеливающая последовательность может содержать 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50 или более 50 нуклеотидов в длину. В некоторых вариантах осуществления длина нацеливающей последовательности составляет 0, 1, 2, 3, 4 или 5 нуклеотидов длиннее или короче, чем гидовая последовательность из встречающейся в природе системы CRISPR/Cas. В определенных вариантах осуществления каркас Cas-нуклеазы и гРНК будет происходить из одной и той же системы CRISPR/Cas. В некоторых вариантах осуществления нацеливающая последовательность может содержать или состоять из 18-24 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления нацеливающая последовательность может содержать или состоять из 19-21 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления нацеливающая последовательность может содержать или состоять из 20 нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления огРНК представляет собой "огРНК Cas9", способную опосредовать РНК-направляемое расщепление ДНК при помощи белка Cas9. В некоторых вариантах осуществления огРНК представляет собой "огРНК Cpf1", способную опосредовать РНК-направляемое расщепление ДНК при помощи белка Cpf1. В определенных вариантах осуществления гРНК содержит сгРНК и tracrРНК, достаточные для образования активного комплекса с белком Cas9 и опосредования РНК-направляемого расщепления ДНК. В определенных вариантах осуществления гРНК содержит сгРНК, достаточную для образования активного комплекса с белком Cpf1 и опосредования РНК-направляемого расщепления ДНК. См. Zetsche 2015.

Определенные варианты осуществления изобретения также обеспечивают нуклеиновые кислоты, например кассеты экспрессии, кодирующие описанную в данном документе гРНК. "Нуклеиновая кислота гидовой РНК" используется в данном документе для обозначения гидовой РНК (например, огРНК или дгРНК) и кассеты экспрессии гидовой РНК, которая представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует одну или более гидовых РНК.

В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота может представлять собой молекулу ДНК. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую сгРНК. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая сгРНК, содержит нацеливающую последовательность, фланкированную всей или частью повторяющейся последовательности из встречающейся в природе системы CRISPR/Cas. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую tracrРНК. В некоторых вариантах осуществления сгРНК и tracrРНК могут кодироваться двумя отдельными нуклеиновыми кислотами. В других вариантах осуществления сгРНК и tracrРНК могут кодироваться одной нуклеиновой кислотой. В некоторых вариантах осуществления сгРНК и tracrРНК могут кодироваться противоположными цепями одной нуклеиновой кислоты. В других вариантах осуществления сгРНК и tracrРНК могут кодироваться одной и той же цепью одной нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота гРНК кодирует огРНК. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота гРНК кодирует огРНК Cas9-нуклеазы. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота гРНК кодирует огРНК нуклеазы Cpf1.

Нуклеотидная последовательность, кодирующая гидовую РНК, может быть функционально связана с по меньшей мере одной транскрипционной или регуляторной контрольной последовательностью, такой как промотор, 3'-НТО или 5'-НТО. В одном примере промотор может представлять собой промотор гРНК, например, гРНК^{Lys3} или гРНК-химеру. См. Mefferd et al., RNA 2015 21:1683-9; Scherer et al., Nucleic Acids Res. 2007 35: 2620-2628. В некоторых вариантах осуществления промотор может распознаваться РНК-полимеразой III (Pol III). Неограничивающие примеры промоторов Pol III также включают промоторы U6 и H1. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая гидовую РНК, может быть функционально связана с промотором U6 мыши или человека. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота гРНК представляет собой модифицированную нуклеиновую кислоту. В определенных вариантах осуществления нуклеиновая кислота гРНК содержит модифицированный нуклеозид или нуклеотид. В некоторых вариантах нуклеиновая кислота гРНК содержит 5'-концевую модификацию, например модифицированный нуклеозид или нуклеотид для стабилизации и предотвращения интеграции нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота гРНК содержит двухцепочечную ДНК, имеющую 5'-концевую модификацию на каждой цепи. В определенных вариантах осуществления нуклеиновая кислота гРНК содержит в качестве 5'-концевой модификации инвертированный дидезокси-Т или инвертированный нуклеозид с удаленным азотистым основанием или нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота

гРНК содержит метку, такую как биотин, дестиобиотен-ТЕГ, диоксигенин и флуоресцентные маркеры, включая, например, FAM, ROX, TAMRA и AlexaFluor.

В определенных вариантах осуществления с системой CRISPR/Cas-нуклеаз может быть использовано более одной нуклеиновой кислоты гРНК, такой как гРНК.

Каждая нуклеиновая кислота гРНК может содержать различные нацеливающие последовательности, так что система CRISPR/Cas расщепляет более одной целевой последовательности. В некоторых вариантах осуществления одна или более гРНК могут иметь одинаковые или разные свойства, такие как активность или стабильность в комплексе CRISPR/Cas. Если используется более одной гРНК, каждая гРНК может кодироваться одной или разными нуклеиновыми кислотами гРНК. Промоторы, используемые для управления экспрессией более чем одной гРНК, могут быть одинаковыми или разными.

Модифицированные РНК.

В определенных вариантах осуществления композиции LNP содержат модифицированные РНК.

Модифицированные нуклеозиды или нуклеотиды могут присутствовать в РНК, например гРНК или мРНК. гРНК или мРНК, содержащая, например, один или более модифицированных нуклеозидов или нуклеотидов, называется "модифицированной" РНК для описания присутствия одного или более не встречающихся в природе и/или встречающихся в природе компонентов или конфигураций, которые используются вместо или в дополнение к каноническим остаткам А, G, C и U. В некоторых вариантах осуществления модифицированная РНК синтезируется с неканоническим нуклеозидом или нуклеотидом, называемым в данном документе "модифицированным".

Модифицированные нуклеозиды и нуклеотиды могут включать один или более из следующего: (i) изменение, например замена одного или обоих не связывающих кислородов фосфата и/или одного или более связывающих кислородов фосфата в сложной фосфодиэфирной связи остова (иллюстративная модификация остова); (ii) изменение, например замена компонента рибозного сахара, например 2'-гидроксила на рибозном сахаре (иллюстративная модификация сахара); (iii) полная замена фосфатного фрагмента "дефосфо" линкерами (иллюстративная модификация остова); (iv) модификация или замена встречающегося в природе нуклеинового основания, в том числе неканоническим нуклеиновым основанием (иллюстративная модификация основания); (v) замена или модификация рибозофосфатного остова (иллюстративная модификация остова); (vi) модификация 3'-конца или 5'-конца олигонуклеотида, например удаление, модификация или замена концевой фосфатной группы или конъюгация фрагмента, кэпа или линкера (такие модификации 3'- или 5'-кэпа могут включать в себя модификацию сахара и/или остова); и (vii) модификация или замена сахара (иллюстративная модификация сахара). Некоторые варианты осуществления содержат модификацию 5'-конца мРНК, гРНК или нуклеиновой кислоты. Некоторые варианты осуществления содержат модификацию 3'-конца мРНК, гРНК или нуклеиновой кислоты. Модифицированная РНК может содержать модификации 5'-конца и 3'-конца. Модифицированная РНК может содержать один или более модифицированных остатков в нетерминальных положениях. В определенных вариантах осуществления гРНК содержит по меньшей мере один модифицированный остаток. В определенных вариантах осуществления мРНК содержит по меньшей мере один модифицированный остаток.

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

мРНК.

В некоторых вариантах осуществления композиция или состав, раскрытые в данном документе, содержат мРНК, содержащую открытую рамку считывания (ОРС), кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, такой как Cas-нуклеаза или Cas-нуклеаза класса 2, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления предоставляется, используется или вводится мРНК, содержащая ОРС, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, такой как Cas-нуклеаза или Cas-нуклеаза класса 2. В некоторых вариантах осуществления ОРС, кодирующая РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, представляет собой "модифицированную ОРС РНК-направляемого ДНК-связывающего агента" или просто "модифицированную ОРС", которые используются для краткого обозначения того, что ОРС модифицирована одним или более из следующих способов: (1) модифицированная ОРС имеет содержание уридина в диапазоне от минимального содержания уридина до 150% от минимального содержания уридина; (2) модифицированная ОРС имеет содержание уридинового динуклеотида в диапазоне от минимального содержания уридинового динуклеотида до 150% от минимального содержания уридинового динуклеотида; (3) модифицированная ОРС имеет по меньшей мере 90% идентичности с любой из SEQ ID NO: 1, 4, 7, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 17, 18, 20, 21, 23, 24, 26, 27, 29, 30, 50, 52, 54, 65 или 66; (4) модифицированная ОРС состоит из набора кодонов, из которых по меньшей мере 75% кодонов являются кодон(ы) с минимальным содержанием уридинов для данной аминокислоты, например кодон(ы) с наименьшим количеством уридинов (обычно 0 или 1, за исключением кодона для фенилаланина, причем этот кодон с минимальным содержанием уридинов имеет 2 уридина); или (5) модифицированная ОРС содержит по меньшей мере один модифицированный уридин. В некоторых вариантах осуществления модифицированная ОРС модифицируется по меньшей мере двумя, тремя или четырьмя из вышеуказанных способов. В некоторых вариантах осуществления модифицированная ОРС содержит по меньшей мере один модифицированный уридин и модифицирована по меньшей мере одним, двумя, тремя или всеми способами из (1)-(4), описанными выше.

"Модифицированный уридин" используется в данном документе для обозначения нуклеозида, отличного от тимидина, с теми же акцепторами водородных связей, что и уридин, и одним или более структурными отличиями от уридина. В некоторых вариантах осуществления модифицированный уридин представляет собой замещенный уридин, то есть уридин, в котором один или более протонных заместителей (например, алкокси, такой как метокси) занимает место протона. В некоторых вариантах осуществления модифицированный уридин представляет собой псевдоуридин. В некоторых вариантах осуществления модифицированный уридин представляет собой замещенный псевдоуридин, то есть псевдоуридин, в котором один или более протонных заместителей (например, алкил, такой как метил) занимает место протона. В некоторых вариантах осуществления модифицированный уридин представляет собой любой из замещенного уридина, псевдоуридина или замещенного псевдоуридина.

В контексте данного документа "положение уридина" относится к положению в полинуклеотиде, занимаемом уридином или модифицированным уридином. Так, например, полинуклеотид, в котором "100% положений уридина представляют собой модифицированные уридины", содержит модифицированный уридин в каждом положении, которое было бы уридином в обычной РНК (где все основания являются стандартными основаниями А, U, C или G) той же последовательности. Если не указано иное, U в полинуклеотидной последовательности из таблицы последовательностей или перечня последовательностей, включенных в данное описание или сопровождающих его, может представлять собой уридин или модифицированный уридин.

Таблица 1

Кодоны с минимальным содержанием уридина

	Аминокислота	Кодон с минимальным содержанием
--	--------------	---------------------------------

тах осуществления модифицированный уридин представляет собой комбинацию псевдоуридина и 5-йодоуридина. В некоторых вариантах осуществления модифицированный уридин представляет собой комбинацию 5-йодоуридина и 5-метоксиуридина.

В некоторых вариантах по меньшей мере 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% положений уридина в мРНК согласно описанию представляют собой модифицированные уридины. В некоторых вариантах осуществления 10-25%, 15-25%, 25-35%, 35-45%, 45-55%, 55-65%, 65-75%, 75-85%, 85-95% или 90-100% положений уридина в мРНК согласно описанию представляют собой модифицированные уридины, например, 5-метоксиуридин, 5-йодоуридин, N1-метилпсевдоуридин, псевдоуридин или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления 10-25%, 15-25%, 25-35%, 35-45%, 45-55%, 55-65%, 65-75%, 75-85%, 85-95% или 90-100% положений уридина в мРНК согласно описанию представляют собой 5-метоксиуридин. В некоторых вариантах осуществления 10-25%, 15-25%, 25-35%, 35-45%, 45-55%, 55-65%, 65-75%, 75-85%, 85-95% или 90-100% положений уридина в мРНК согласно описанию представляют собой псевдоуридин. В некоторых вариантах осуществления 10-25%, 15-25%, 25-35%, 35-45%, 45-55%, 55-65%, 65-75%, 75-85%, 85-95% или 90-100% положений уридина в мРНК согласно описанию представляют собой N1-метилпсевдоуридин. В некоторых вариантах осуществления 10-25%, 15-25%, 25-35%, 35-45%, 45-55%, 55-65%, 65-75%, 75-85%, 85-95% или 90-100% положений уридина в мРНК согласно описанию представляют собой 5-йодоуридин. В некоторых вариантах осуществления 10-25%, 15-25%, 25-35%, 35-45%, 45-55%, 55-65%, 65-75%, 75-85%, 85-95% или 90-100% положений уридина в мРНК согласно описанию представляют собой 5-метоксиуридин, а остальные представляют собой N1-метилпсевдоуридин. В некоторых вариантах осуществления 10-25%, 15-25%, 25-35%, 35-45%, 45-55%, 55-65%, 65-75%, 75-85%, 85-95% или 90-100% положений уридина в мРНК согласно описанию представляют собой 5-йодоуридин, а остальные представляют собой N1-метилпсевдоуридин.

В любом из вышеупомянутых вариантов осуществления модифицированная ОРС может иметь пониженное содержание уридинового динуклеотида, такое как минимально возможное содержание уридинового динуклеотида (UU), например ОРС, в которой (а) используется кодон с минимальным содержанием уридина (как обсуждалось выше) в каждом положении и (b) кодирует ту же аминокислотную последовательность, что и данная ОРС. Содержание уридинового динуклеотида (UU) может быть выражено в абсолютных единицах в виде суммы динуклеотидов UU в ОРС или на основе частоты в виде процентной доли положений, занимаемых уридинами в уридиновых динуклеотидах (например, AUUAU будет иметь содержание уридинового динуклеотида 40%, потому что 2 из 5 положений занимают уридины уридинового динуклеотида). Модифицированные остатки уридина считаются эквивалентными уридинам с целью оценки минимального содержания уридиновых динуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления мРНК содержит по меньшей мере одну нетранслируемую последовательность (НТО) из экспрессируемой мРНК млекопитающего, такой как конститутивно экспрессируемой мРНК. мРНК считается конститутивно экспрессируемой у млекопитающего, если она непрерывно транскрибируется по меньшей мере в одной ткани здорового взрослого млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления мРНК содержит 5'-НТО, 3'-НТО или 5'- и 3'-НТО из экспрессируемой РНК млекопитающего, такой как конститутивно экспрессируемой мРНК млекопитающего. мРНК актина представляет собой пример конститутивно экспрессируемой мРНК.

В некоторых вариантах осуществления мРНК содержит по меньшей мере одну НТО из 17-гидроксистероид-бета-дегидрогеназы 4 (HSD17B4 или HSD), например, 5'-НТО из HSD. В некоторых вариантах осуществления мРНК содержит по меньшей мере одну НТО из мРНК глобина, например мРНК альфа-глобина человека (HBA), мРНК бета-глобина человека (HBB) или мРНК бета-глобина *Xenopus laevis* (XBG). В некоторых вариантах осуществления мРНК содержит 5'-НТО, 3'-НТО или 5'- и 3'-НТО из мРНК глобина, такого как HBA, HBB или XBG. В некоторых вариантах осуществления мРНК содержит 5'-НТО из бычьего гормона роста, цитомегаловируса (CMV), мышинового Hba-a1, HSD, гена альбумина, HBA, HBB или XBG. В некоторых вариантах осуществления мРНК содержит 3'-НТО из бычьего гормона роста, цитомегаловируса, мышинового Hba-a1, HSD, гена альбумина, HBA, HBB или XBG. В некоторых вариантах осуществления мРНК содержит 5'- и 3'-НТО из бычьего гормона роста, цитомегаловируса, мышинового Hba-a1, HSD, гена альбумина, HBA, HBB, XBG, белка теплового шока 90 (Hsp90), глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH), бета-актина, альфа-тубулина, опухолевого белка (p53) или рецептора эпидермального фактора роста (EGFR).

В некоторых вариантах осуществления мРНК содержит 5'- и 3'-НТО, которые происходят из одного и того же источника, например, конститутивно экспрессируемой мРНК, например, актина, альбумина или глобина, такого как HBA, HBB или XBG.

В некоторых вариантах осуществления мРНК не содержит 5'-НТО, например, нет никаких дополнительных нуклеотидов между 5'-кэпом и старт-кодонам. В некоторых вариантах осуществления мРНК содержит последовательность Козак (описанную ниже) между 5'-кэпом и старт-кодонам, но не имеет никакого дополнительного 5'-НТО. В некоторых вариантах осуществления мРНК не содержит 3'-НТО, например нет никаких дополнительных нуклеотидов между стоп-кодонам и поли(А)-хвостом.

В некоторых вариантах осуществления мРНК содержит последовательность Козак. Последователь-

ность Козак может влиять на инициацию трансляции и общий выход полипептида, транслированного с мРНК. Последовательность Козак содержит кодон метионина, который может функционировать в качестве старт-кодона. Минимальная последовательность Козак представляет собой NNNRUGN, где по меньшей мере одно из следующего является истинным: первый N представляет собой A или G, а второй N представляет собой G. В контексте нуклеотидной последовательности R означает пурин (A или G). В некоторых вариантах осуществления последовательность Козак представляет собой RNNRUGN, NNNRUGG, RNNRUGG, RNNAUGN, NNNAUGG или RNNAUGG. В некоторых вариантах осуществления последовательность Козак имеет вид gccRUGg с нулевым несовпадением или с максимально одним или двумя несовпадениями с положениями в нижнем регистре. В некоторых вариантах осуществления последовательность Козак имеет вид gccAUGg с нулевым несовпадением или максимально с одним или двумя несовпадениями с положениями в нижнем регистре. В некоторых вариантах осуществления последовательность Козак имеет вид gccRccAUGG с нулевым несовпадением или максимально с одним, двумя или тремя несовпадениями с положениями в нижнем регистре. В некоторых вариантах осуществления последовательность Козак имеет вид gccAccAUG с нулевым несовпадением или максимально с одним, двумя, тремя или четырьмя несовпадениями с положениями в нижнем регистре. В некоторых вариантах осуществления последовательность Козак представляет собой GCCACCAUG. В некоторых вариантах осуществления последовательность Козак имеет вид gccgccRccAUGG с нулевым несоответствием или максимально с одним, двумя, тремя или четырьмя несовпадениями с положениями в нижнем регистре.

В некоторых вариантах осуществления мРНК, содержащая OPC, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность с SEQ ID NO: 43, причем необязательно OPC SEQ ID NO: 43 (то есть SEQ ID NO: 4) замещена альтернативной OPC любой из SEQ ID NO: 7, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 17, 18, 20, 21, 23, 24, 26, 27, 29, 30, 50, 52, 54, 65 или 66.

В некоторых вариантах осуществления мРНК, содержащая OPC, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность с SEQ ID NO: 44, причем необязательно OPC SEQ ID NO: 44 (то есть SEQ ID NO: 4) замещена альтернативной OPC любой из SEQ ID NO: 7, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 17, 18, 20, 21, 23, 24, 26, 27, 29, 30, 50, 52, 54, 65 или 66.

В некоторых вариантах осуществления мРНК, содержащая OPC, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность с SEQ ID NO: 56, причем необязательно OPC SEQ ID NO: 56 (то есть SEQ ID NO: 4) замещена альтернативной OPC любой из SEQ ID NO: 7, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 17, 18, 20, 21, 23, 24, 26, 27, 29, 30, 50, 52, 54, 65 или 66.

В некоторых вариантах осуществления мРНК, содержащая OPC, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность с SEQ ID NO: 57, причем необязательно OPC SEQ ID NO: 57 (то есть SEQ ID NO: 4) замещена альтернативной OPC любой из SEQ ID NO: 7, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 17, 18, 20, 21, 23, 24, 26, 27, 29, 30, 50, 52, 54, 65 или 66.

В некоторых вариантах осуществления мРНК, содержащая OPC, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность с SEQ ID NO: 58, причем необязательно OPC SEQ ID NO: 58 (то есть SEQ ID NO: 4) замещена альтернативной OPC любой из SEQ ID NO: 7, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 17, 18, 20, 21, 23, 24, 26, 27, 29, 30, 50, 52, 54, 65 или 66.

В некоторых вариантах осуществления мРНК, содержащая OPC, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность с SEQ ID NO: 59, причем необязательно OPC SEQ ID NO: 59 (то есть SEQ ID NO: 4) замещена альтернативной OPC любой из SEQ ID NO: 7, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 17, 18, 20, 21, 23, 24, 26, 27, 29, 30, 50, 52, 54, 65 или 66.

В некоторых вариантах осуществления мРНК, содержащая OPC, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность с SEQ ID NO: 60, причем необязательно OPC SEQ ID NO: 60 (то есть SEQ ID NO: 4) замещена альтернативной OPC любой из SEQ ID NO: 7, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 17, 18, 20, 21, 23, 24, 26, 27, 29, 30, 50, 52, 54, 65 или 66.

В некоторых вариантах осуществления мРНК, содержащая OPC, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность с SEQ ID NO: 61, причем необязательно OPC SEQ ID NO: 61 (то есть SEQ ID NO: 4) замещена альтернативной OPC любой из SEQ ID NO: 7, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 17, 18, 20, 21, 23, 24, 26, 27, 29, 30, 50, 52, 54, 65 или 66.

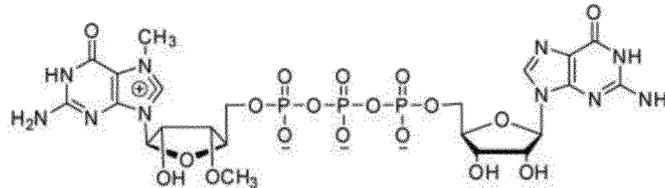
В некоторых вариантах осуществления мРНК содержит альтернативную OPC любой из SEQ ID NO: 7, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 17, 18, 20, 21, 23, 24, 26, 27, 29, 30, 50, 52, 54, 65 или 66.

В некоторых вариантах осуществления степень идентичности с необязательно замещенными по-

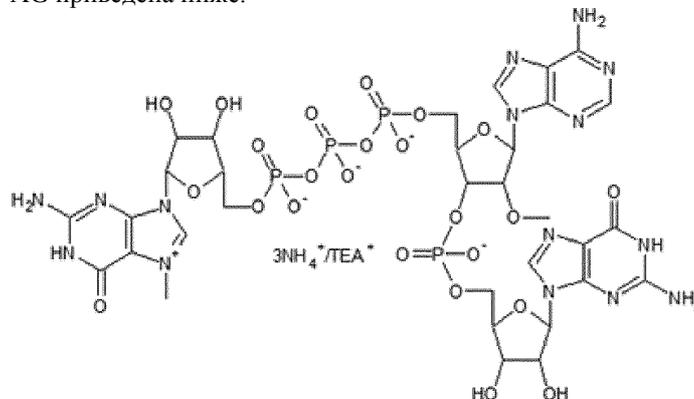
следовательностями SEQ ID NO: 43, 44 или 56-61 составляет 95%. В некоторых вариантах осуществления степень идентичности с необязательно замещенными последовательностями SEQ ID NO: 43, 44 или 56-61 составляет 98%. В некоторых вариантах осуществления степень идентичности с необязательно замещенными последовательностями SEQ ID NO: 43, 44 или 56-61 составляет 99%. В некоторых вариантах осуществления степень идентичности с необязательно замещенными последовательностями SEQ ID NO: 43, 44 или 56-61 составляет 100%.

В некоторых вариантах осуществления мРНК, описанная в данном документе, содержит 5'-кэп, такой как кэп 0, кэп 1 или кэп 2. Как правило, 5'-кэп представляет собой 7-метилгуаниновый рибонуклеотид (который может быть дополнительно модифицирован, как обсуждается ниже, например, в отношении ARCA), связанный через 5'-трифосфат с положением 5' первого нуклеотида 5'-3' цепи мРНК, т. е. первого кэп-проксимального нуклеотида. В кэпе 0 рибозы первого и второго кэп-проксимальных нуклеотидов мРНК содержат 2'-гидроксил. В кэпе 1 рибозы первого и второго транскрибируемых нуклеотидов мРНК содержат 2'-метокси и 2'-гидроксил, соответственно. В кэпе 2 рибозы первого и второго кэп-проксимальных нуклеотидов мРНК содержат 2'-метокси. См., например, Katibah et al. (2014) Proc Natl Acad Sci USA 111(33): 12025-30; Abbas et al. (2017) Proc Natl Acad Sci USA 114(11): E2106-E2115. Большинство эндогенных мРНК высших эукариот, включая мРНК млекопитающих, таких как мРНК человека, содержат кэп 1 или кэп 2. Кэп 0 и другие кэп-структуры, отличающиеся от кэпа 1 и кэпа 2, могут быть иммуногенными для млекопитающих, таких как люди, из-за распознавания как "чужие" компонентами врожденной иммунной системы, такими как IFIT-1 и IFIT-5, что может приводить к повышенным уровням цитокинов, включая интерферон I типа. Компоненты врожденной иммунной системы, такие как IFIT-1 и IFIT-5, могут также конкурировать с eIF4E за связывание мРНК с кэпом, отличным от кэпа 1 или кэпа 2, потенциально ингибируя трансляцию мРНК.

Кэп может быть включен во время транскрипции. Например, ARCA (аналог кэп-структуры с правильной ориентацией; Thermo Fisher Scientific, кат. № AM8045) представляет собой аналог кэпа, содержащий 7'-метилгуанин 3'-метокси-5'-трифосфат, связанный с положением 5' гуанинового рибонуклеотида, который может быть включен *in vitro* в транскрипт во время инициации. ARCA приводит к кэп-структуре кэп 0, в которой положение 2' первого кэп-проксимального нуклеотида представляет собой гидроксил. См., например, Stepinski et al., (2001) "Synthesis and properties of mRNAs containing the novel 'anti-reverse' cap analogs 7-methyl(3'-O-methyl)GpppG and 7-methyl(3'-deoxy)GpppG," RNA7: 1486-1495. Структура ARCA приведена ниже.



CleanCap™ AG (m7G(5')ppp(5')(2'OMeA)pG; TriLink Biotechnologies, кат. № N-7113) или CleanCap™ GG (m7G(5')ppp(5')(2'OMeG)pG; TriLink Biotechnologies, кат. № N-7133) могут использоваться для обеспечения структуры кэп 1 во время транскрипции. 3'-O-метилованные версии CleanCap™ AG и CleanCap™ GG также доступны от TriLink Biotechnologies как кат. №№ N-7413 и N-7433, соответственно. Структура CleanCap™ AG приведена ниже.



Альтернативно, кэп может быть добавлен к РНК после транскрипции. Например, кэпирующий фермент вируса осповакцины является коммерчески доступным (New England Biolabs, кат. № M2080S) и имеет активности РНК-трифосфатазы и гуанилилтрансферазы, обеспечиваемые его субъединицей D1, и гуанинметилтрансферазы, обеспечиваемой его субъединицей D12. Поэтому он может добавлять 7-метилгуанин к РНК, так что образуется кэп 0, в присутствии S-аденозилметионина и GTP. См, например, Guo, P. and Moss, B. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 4023-4027; Mao, X. and Shuman, S. (1994) J. Biol.

Chem. 269, 24472-24479.

В некоторых вариантах осуществления мРНК дополнительно содержит полиадениловый (поли(А)) хвост. В некоторых вариантах осуществления поли(А)-хвост содержит по меньшей мере 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 аденинов, необязательно до 300 аденинов. В некоторых вариантах осуществления поли(А)-хвост содержит 95, 96, 97, 98, 99 или 100 адениновых нуклеотидов. В некоторых случаях поли(А)-хвост "прерывается" одним или более неадениновыми нуклеотидными "якорями" в одном или более местах внутри поли(А)-хвоста. Поли(А)-хвосты могут содержать по меньшей мере 8 последовательных адениновых нуклеотидов, но также могут содержать один или более неадениновых нуклеотидов. Используемый в данном документе термин "неадениновые нуклеотиды" относится к любым природным или не встречающимся в природе нуклеотидам, которые не содержат аденин. Гуаниновые, тиминового и цитозинового нуклеотиды являются примерами неадениновых нуклеотидов. Таким образом, поли(А)-хвосты в мРНК, описанной в данном документе, могут содержать последовательные адениновые нуклеотиды, расположенные на 3'-конце по отношению к нуклеотидам, кодирующим РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или представляющую интерес последовательность. В некоторых случаях поли(А)-хвосты на мРНК содержат непоследовательные адениннуклеотиды, расположенные на 3'-конце по отношению к нуклеотидам, кодирующим РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или представляющую интерес последовательность, причем неадениновые нуклеотиды прерывают адениновые нуклеотиды с регулярными или нерегулярно расположенными интервалами.

В некоторых вариантах осуществления мРНК дополнительно содержит полиадениловый (поли(А)) хвост. В некоторых вариантах осуществления поли(А)-хвост содержит по меньшей мере 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 аденинов, необязательно до 300 аденинов. В некоторых вариантах осуществления поли(А)-хвост содержит 95, 96, 97, 98, 99 или 100 адениновых нуклеотидов. В некоторых случаях поли(А)-хвост "прерывается" одним или более неадениновыми нуклеотидными "якорями" в одном или более местах внутри поли(А)-хвоста. Поли(А)-хвосты могут содержать по меньшей мере 8 последовательных адениновых нуклеотидов, но также могут содержать один или более неадениновых нуклеотидов. Используемый в данном документе термин "неадениновые нуклеотиды" относится к любым природным или не встречающимся в природе нуклеотидам, которые не содержат аденин. Гуаниновые, тиминового и цитозинового нуклеотиды являются примерами неадениновых нуклеотидов. Таким образом, поли(А)-хвосты в мРНК, описанной в данном документе, могут содержать последовательные адениновые нуклеотиды, расположенные на 3'-конце по отношению к нуклеотидам, кодирующим РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или представляющую интерес последовательность. В некоторых случаях поли(А)-хвосты на мРНК содержат непоследовательные адениннуклеотиды, расположенные на 3'-конце по отношению к нуклеотидам, кодирующим РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или представляющую интерес последовательность, причем неадениновые нуклеотиды прерывают адениновые нуклеотиды с регулярными или нерегулярно расположенными интервалами.

В некоторых вариантах осуществления один или более неадениновых нуклеотидов расположены так, чтобы прерывать последовательные адениновые нуклеотиды, так что поли(А) -связывающий белок может связываться с целым рядом последовательных адениновых нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления один или более неадениновых нуклеотидов находятся после по меньшей мере 8, 9, 10, 11 или 12 последовательных адениновых нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления один или более неадениновых нуклеотидов находятся после по меньшей мере 8-50 последовательных адениновых нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления один или более неадениновых нуклеотидов находятся после по меньшей мере 8-100 последовательных адениновых нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления неадениновый нуклеотид находится после одного, двух, трех, четырех, пяти, шести или семи адениновых нуклеотидов и сопровождается по меньшей мере 8 последовательными адениновыми нуклеотидами.

Поли(А)-хвост может содержать одну последовательность последовательных адениновых нуклеотидов, за которыми следуют один или более неадениновых нуклеотидов, за которыми, необязательно, следуют дополнительные адениновые нуклеотиды.

В некоторых вариантах осуществления поли(А)-хвост имеет или содержит один неадениновый нуклеотид или одну последовательную вставку из 2-10 неадениновых нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления неадениновый(е) нуклеотид(ы) находится после по меньшей мере 8, 9, 10, 11 или 12 последовательных адениновых нуклеотидов. В некоторых случаях один или более неадениновых нуклеотидов расположены после по меньшей мере 8-50 последовательных адениновых нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления один или более неадениновых нуклеотидов расположены после по меньшей мере 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50 последовательных адениновых нуклеотидов.

В некоторых вариантах осуществления неадениновый нуклеотид представляет собой гуанин, цитозин или тимин. В некоторых случаях неадениновый нуклеотид представляет собой гуаниновый нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления неадениновый нуклеотид представляет собой цитозинный нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления неадениновый нуклеотид представляет собой тиминный нуклеотид. В некоторых случаях, когда присутствует более одного неаденинового нуклеотида, не-

адениновый нуклеотид может быть выбран из: а) гуаниновых и тиминных нуклеотидов; б) гуаниновых и цитозинных нуклеотидов; в) тиминных и цитозинных нуклеотидов; или д) гуаниновых, тиминных и цитозинных нуклеотидов. Иллюстративный поли(А)-хвост, содержащий неадениновые нуклеотиды, представлен как SEQ ID NO: 62.

В некоторых вариантах осуществления мРНК очищают. В некоторых вариантах осуществления мРНК очищают с использованием способа осаждения (например, осаждения LiCl, осаждения спиртом или эквивалентного способа, например, как описано в данном документе). В некоторых вариантах осуществления мРНК очищают с использованием способа на основе хроматографии, такого как способ на основе ВЭЖХ, или эквивалентный способ (например, как описано в данном документе). В некоторых вариантах осуществления мРНК очищают с использованием как способа осаждения (например, осаждения LiCl), так и способа на основе ВЭЖХ.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна гРНК предложена в комбинации с мРНК, описанной в данном документе. В некоторых вариантах осуществления гРНК предложена в виде молекулы, отдельной от мРНК. В некоторых вариантах осуществления гРНК предложена как часть, такая как часть НТО мРНК, описанной в данном документе.

Химически модифицированная гРНК.

В некоторых вариантах осуществления гРНК является химически модифицированной. гРНК, содержащая один или более модифицированных нуклеозидов или нуклеотидов, называется "модифицированной" гРНК или "химически модифицированной" гРНК для описания присутствия одного или более не встречающихся в природе и/или встречающихся в природе компонентов или конфигураций, которые используются вместо или в дополнение к каноническим остаткам А, G, C и U. В некоторых вариантах осуществления модифицированная гРНК синтезируется с неканоническим нуклеозидом или нуклеотидом, называемым в данном документе "модифицированным". Модифицированные нуклеозиды и нуклеотиды могут включать один или более из следующего: (i) изменение, например замена одного или обоих не связывающих кислородов фосфата и/или одного или более связывающих кислородов фосфата в сложной фосфодиэфирной связи остова (иллюстративная модификация остова); (ii) изменение, например замена компонента рибозного сахара, например 2'-гидроксила на рибозном сахаре (иллюстративная модификация сахара); (iii) полная замена фосфатного фрагмента "дефосфо" линкерами (иллюстративная модификация остова); (iv) модификация или замена встречающегося в природе нуклеинового основания, в том числе неканоническим нуклеиновым основанием (иллюстративная модификация основания); (v) замена или модификация рибозофосфатного остова (иллюстративная модификация остова); (vi) модификация 3'-конца или 5'-конца олигонуклеотида, например удаление, модификация или замена концевой фосфатной группы или конъюгация фрагмента, кэпа или линкера (такие модификации 3'- или 5'-кэпа могут включать в себя модификацию сахара и/или остова); и (vii) модификация или замена сахара (иллюстративная модификация сахара).

В некоторых вариантах осуществления гРНК содержит модифицированный уридин в некоторых или во всех положениях уридина. В некоторых вариантах осуществления модифицированный уридин представляет собой уридин, модифицированный в положении 5, например, галогеном или C1-C6 алкокси. В некоторых вариантах осуществления модифицированный уридин представляет собой псевдоуридин, модифицированный в положении 1, например, C1-C6 алкилом. Модифицированный уридин может представлять собой, например, псевдоуридин, N1-метил-псевдоуридин, 5-метоксиуридин, 5-йодоуридин или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления модифицированный уридин представляет собой 5-метоксиуридин. В некоторых вариантах осуществления модифицированный уридин представляет собой 5-йодоуридин. В некоторых вариантах осуществления модифицированный уридин представляет собой псевдоуридин. В некоторых вариантах осуществления модифицированный уридин представляет собой N1-метил-псевдоуридин. В некоторых вариантах осуществления модифицированный уридин представляет собой комбинацию псевдоуридина и N1-метилпсевдоуридина. В некоторых вариантах осуществления модифицированный уридин представляет собой комбинацию псевдоуридина и 5-метоксиуридина. В некоторых вариантах осуществления модифицированный уридин представляет собой комбинацию N1-метилпсевдоуридина и 5-метоксиуридина. В некоторых вариантах осуществления модифицированный уридин представляет собой комбинацию 5-йодоуридина и N1-метилпсевдоуридина. В некоторых вариантах осуществления модифицированный уридин представляет собой комбинацию псевдоуридина и 5-йодоуридина. В некоторых вариантах осуществления модифицированный уридин представляет собой комбинацию 5-йодоуридина и 5-метоксиуридина.

В некоторых вариантах по меньшей мере 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% положений уридина в гРНК согласно описанию представляют собой модифицированные уридины. В некоторых вариантах осуществления 10-25%, 15-25%, 25-35%, 35-45%, 45-55%, 55-65%, 65-75%, 75-85%, 85-95% или 90-100% положений уридина в гРНК согласно описанию представляют собой модифицированные уридины, например, 5-метоксиуридин, 5-йодоуридин, N1-метилпсевдоуридин, псевдоуридин или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления 10-25%, 15-25%, 25-35%, 35-45%, 45-55%, 55-65%, 65-75%, 75-85%, 85-95% или 90-100% положений уридина в гРНК согласно описанию представляют собой 5-метоксиуридин. В некоторых вариантах осуществления

10-25%, 15-25%, 25-35%, 35-45%, 45-55%, 55-65%, 65-75%, 75-85%, 85-95% или 90-100% положений уридина в гРНК согласно описанию представляют собой псевдоуридин. В некоторых вариантах осуществления 10-25%, 15-25%, 25-35%, 35-45%, 45-55%, 55-65%, 65-75%, 75-85%, 85-95% или 90-100% положений уридина в гРНК согласно описанию представляют собой N1-метилпсевдоуридин. В некоторых вариантах осуществления 10-25%, 15-25%, 25-35%, 35-45%, 45-55%, 55-65%, 65-75%, 75-85%, 85-95% или 90-100% положений уридина в гРНК согласно описанию представляют собой 5-йодоуридин. В некоторых вариантах осуществления 10-25%, 15-25%, 25-35%, 35-45%, 45-55%, 55-65%, 65-75%, 75-85%, 85-95% или 90-100% положений уридина в гРНК согласно описанию представляют собой 5-метоксиуридин, а остальные представляют собой N1-метилпсевдоуридин. В некоторых вариантах осуществления 10-25%, 15-25%, 25-35%, 35-45%, 45-55%, 55-65%, 65-75%, 75-85%, 85-95% или 90-100% положений уридина в гРНК согласно описанию представляют собой 5-йодоуридин, а остальные представляют собой N1-метилпсевдоуридин.

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

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

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

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

Примеры модифицированных фосфатных групп включают фосфоротиоат, фосфороселенаты, боранофосфаты, боранофосфатные сложные эфиры, гидрофосфонаты, фосфоамидааты, алкил- или арилфосфонаты и сложные фосфотриэфиры. Атом фосфора в немодифицированной фосфатной группе является ахиральным. Однако замена одного из мостиковых атомов кислорода на один из указанных выше атомов или групп атомов может сделать атом фосфора хиральным. Стереогенный атом фосфора может иметь или конфигурацию R (в данном документе Rp), или конфигурацию S (в данном документе Sp). Остов также можно модифицировать путем замены мостикового кислорода (то есть кислорода, который связывает фосфат с нуклеозидом) на азот (мостиковые фосфоамидааты), серу (мостиковые фосфоротиоаты) и углерод (мостиковые метиленфосфонаты). Замена может происходить или в линкерном кислороде, или в обоих линкерных кислородах.

В некоторых модификациях остова фосфатная группа может быть заменена соединительными группами, не содержащими фосфор. В некоторых вариантах осуществления заряженная фосфатная группа может быть заменена нейтральным фрагментом. Примеры фрагментов, которые могут заменить фос-

фатную группу, могут включать, без ограничения, например, метилфосфонат, гидроксиламино, силоксан, карбонат, карбоксиметил, карбамат, амид, тиоэфир, этиленоксидный линкер, сульфонат, сульфонамид, тиоформацеталь, формацеталь, оксим, метиленимино, метиленметилено, метиленигидразо, метилениди-метилгидразо и метилениоксиметилено.

Матричная нуклеиновая кислота.

Композиции и способы, описанные в данном документе, могут включать матричную нуклеиновую кислоту. Матрица может быть использована для изменения или вставки последовательности нуклеиновой кислоты в целевой сайт для Cas-нуклеазы или около него. В некоторых вариантах осуществления способы включают введение матрицы в клетку. В некоторых вариантах осуществления может быть предложена одна матрица. В других вариантах осуществления могут быть предложены две или более матриц, так что редактирование может происходить на двух или более целевых сайтах. Например, могут быть предложены разные матрицы для редактирования одного гена в клетке или двух разных генов в клетке.

В некоторых вариантах осуществления матрица может использоваться в гомологичной рекомбинации. В некоторых вариантах осуществления гомологичная рекомбинация может приводить к интеграции последовательности матрицы или части последовательности матрицы в молекулу целевой нуклеиновой кислоты. В других вариантах осуществления матрица может быть использована в направляемой гомологичной репарации, которая включает внедрение цепи ДНК в сайте расщепления в нуклеиновой кислоте. В некоторых вариантах осуществления направляемая гомологичная репарация может приводить к включению последовательности матрицы в отредактированную молекулу целевой нуклеиновой кислоты. В еще других вариантах осуществления матрица может использоваться при редактировании генов, опосредованном негомологичным соединением концов. В некоторых вариантах осуществления последовательность матрицы не имеет сходства с последовательностью нуклеиновой кислоты вблизи сайта расщепления. В некоторых вариантах осуществления включены матрица или часть последовательности матрицы. В некоторых вариантах осуществления матрица содержит фланкирующие последовательности инвертированных концевых повторов (ITR).

В некоторых вариантах осуществления матрица может содержать первое плечо гомологии и второе плечо гомологии (также называемые первой и второй нуклеотидной последовательностью), которые комплементарны последовательностям, расположенным в прямом и обратном направлении от сайта расщепления, соответственно. Когда матрица содержит два плеча гомологии, каждое плечо может иметь одинаковую длину или разные длины, и последовательность между плечами гомологии может быть практически аналогичной или идентичной целевой последовательности между плечами гомологии, или она может быть совершенно неродственной. В некоторых вариантах осуществления степень комплементарности или процент идентичности между первой нуклеотидной последовательностью на матрице и последовательностью в прямом направлении от сайта расщепления и между второй нуклеотидной последовательностью на матрице и последовательностью в обратном направлении от сайта расщепления может обеспечивать гомологичную рекомбинацию, такую как, например, гомологичная рекомбинация высокой точности между матрицей и молекулой целевой нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления степень комплементарности может составлять около 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100%. В некоторых вариантах осуществления степень комплементарности может составлять около 95, 97, 98, 99 или 100%. В некоторых вариантах осуществления степень комплементарности может составлять по меньшей мере 98, 99 или 100%. В некоторых вариантах осуществления степень комплементарности может составлять 100%. В некоторых вариантах осуществления процент идентичности может составлять около 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100%. В некоторых вариантах осуществления процент идентичности может составлять около 95, 97, 98, 99 или 100%. В некоторых вариантах осуществления процент идентичности может составлять по меньшей мере 98%, 99% или 100%. В некоторых вариантах осуществления процент идентичности может составлять 100%.

В некоторых вариантах осуществления последовательность матрицы может соответствовать, содержать или состоять из эндогенной последовательности целевой клетки. Она также может или альтернативно соответствовать, содержать или состоять из экзогенной последовательности целевой клетки. Используемый в данном документе термин "эндогенная последовательность" относится к последовательности, которая является нативной для клетки. Термин "экзогенная последовательность" относится к последовательности, которая не является нативной для клетки, или к последовательности, чье нативное расположение в геноме клетки находится в другом месте. В некоторых вариантах осуществления эндогенная последовательность может представлять собой геномную последовательность клетки. В некоторых вариантах осуществления эндогенная последовательность может представлять собой хромосомную или внехромосомную последовательность. В некоторых вариантах осуществления эндогенная последовательность может представлять собой плазмидную последовательность клетки. В некоторых вариантах осуществления последовательность матрицы может быть по существу идентичной части эндогенной последовательности в клетке в сайте расщепления или около, но содержать по меньшей мере одно нуклеотидное изменение. В некоторых вариантах осуществления редактирование расщепленной молекулы целевой нуклеиновой кислоты с помощью матрицы может приводить к мутации, включающей вставку,

делецию или замену одного или более нуклеотидов молекулы целевой нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления мутация может приводить к одному или более аминокислотным изменениям в белке, экспрессируемом геном, содержащим целевую последовательность. В некоторых вариантах осуществления мутация может приводить к одному или более нуклеотидным изменениям в РНК, экспрессируемой целевым геном. В некоторых вариантах осуществления мутация может изменять уровень экспрессии целевого гена. В некоторых вариантах осуществления мутация может приводить к повышенной или пониженной экспрессии целевого гена. В некоторых вариантах осуществления мутация может приводить к нокауту гена. В некоторых вариантах осуществления мутация может приводить к восстановлению функции гена. В некоторых вариантах осуществления редактирование расщепленной молекулы целевой нуклеиновой кислоты с помощью матрицы может приводить к изменению последовательности экзона, последовательности интрона, регуляторной последовательности, последовательности транскрипционной контрольной последовательности, трансляционной контрольной последовательности, сайта сплайсинга или некодирующей последовательности молекулы целевой нуклеиновой кислоты, такой как ДНК.

В других вариантах осуществления последовательность матрицы может содержать экзогенную последовательность. В некоторых вариантах осуществления экзогенная последовательность может содержать кодирующую белок или РНК последовательность, функционально связанную с экзогенной промоторной последовательностью, так что при интеграции экзогенной последовательности в молекулу целевой нуклеиновой кислоты клетка способна экспрессировать белок или РНК, кодируемую интегрированной последовательностью. В других вариантах осуществления после интеграции экзогенной последовательности в молекулу целевой нуклеиновой кислоты экспрессия интегрированной последовательности может регулироваться эндогенной промоторной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления экзогенная последовательность может обеспечивать последовательность кДНК, кодирующую белок или часть белка. В еще других вариантах осуществления экзогенная последовательность может содержать или состоять из последовательности экзона, последовательности интрона, регуляторной последовательности, транскрипционной контрольной последовательности, трансляционной контрольной последовательности, сайта сплайсинга или некодирующей последовательности. В некоторых вариантах осуществления интеграция экзогенной последовательности может приводить к восстановлению функции гена. В некоторых вариантах осуществления интеграция экзогенной последовательности может приводить к нокину гена. В некоторых вариантах осуществления интеграция экзогенной последовательности может приводить к нокауту гена.

Матрица может быть любой подходящей длины. В некоторых вариантах осуществления матрица может содержать 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000 или более нуклеотидов в длину. Матрица может представлять собой одноцепочечную нуклеиновую кислоту. Матрица может представлять собой двухцепочечную или частично двухцепочечную нуклеиновую кислоту. В определенных вариантах осуществления длина одноцепочечной матрицы составляет 20, 30, 40, 50, 75, 100, 125, 150, 175 или 200 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления матрица может содержать нуклеотидную последовательность, которая комплементарна части молекулы целевой нуклеиновой кислоты, содержащей целевую последовательность (то есть "плечо гомологии"). В некоторых вариантах осуществления матрица может содержать плечо гомологии, которое комплементарно последовательности, расположенной в прямом и обратном направлении от сайта расщепления на молекуле целевой нуклеиновой кислоты.

В некоторых вариантах осуществления матрица содержит оцДНК или дцДНК, содержащие фланкирующие последовательности инвертированных концевых повторов (ITR). В некоторых вариантах осуществления матрица предложена в виде вектора, плазмиды, миникольца, нанокольца или продукта ПЦР.

Очистка нуклеиновых кислот.

В некоторых вариантах осуществления нуклеиновую кислоту очищают. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновую кислоту очищают с использованием метода осаждения (например, осаждения LiCl, осаждения спиртом или эквивалентного способа, например, как описано в данном документе). В некоторых вариантах осуществления нуклеиновую кислоту очищают с использованием метода на основе хроматографии, такого как метод на основе ВЭЖХ, или эквивалентный метод (например, как описано в данном документе). В некоторых вариантах осуществления нуклеиновую кислоту очищают с использованием как метода осаждения (например, осаждения LiCl), так и метода на основе ВЭЖХ.

Целевые последовательности.

В некоторых вариантах осуществления система CRISPR/Cas согласно данному описанию может быть направлена на целевую последовательность в молекуле целевой нуклеиновой кислоты и расщепляет ее. Например, целевая последовательность может распознаваться и расщепляться Cas-нуклеазой. В определенных вариантах осуществления целевая последовательность для Cas-нуклеазы расположена рядом с родственной последовательностью РАМ нуклеазы. В некоторых вариантах осуществления Cas-нуклеаза 2 класса может быть направлена при помощи гРНК на целевую последовательность молекулы целевой нуклеиновой кислоты, где гРНК гибридизуется с целевой последовательностью, и белок Cas

класса 2 расщепляет ее. В некоторых вариантах осуществления гидовую РНК гибридизуют, и Cas-нуклеаза класса 2 расщепляет целевую последовательность, прилегающую к ее родственному PAM или содержащую его. В некоторых вариантах осуществления целевая последовательность может быть комплементарной нацеливающей последовательности гидовой РНК. В некоторых вариантах осуществления степень комплементарности между нацеливающей последовательностью гидовой РНК и частью соответствующей целевой последовательности, которая гибридизуется с гидовой РНК, может составлять около 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100%. В некоторых вариантах осуществления процент идентичности между нацеливающей последовательностью гидовой РНК и частью соответствующей целевой последовательности, которая гибридизуется с гидовой РНК, может составлять около 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 или 100%. В некоторых вариантах осуществления область гомологии мишени является смежной с родственной последовательностью PAM. В некоторых вариантах осуществления целевая последовательность может содержать последовательность на 100% комплементарную нацеливающей последовательности гидовой РНК. В других вариантах осуществления целевая последовательность может содержать по меньшей мере одно несоответствие, делецию или вставку по сравнению с нацеливающей последовательностью гидовой РНК.

Длина целевой последовательности может зависеть от используемой нуклеазной системы. Например, нацеливающая последовательность гидовой РНК для системы CRISPR/Cas может содержать 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50 или более 50 нуклеотидов в длину, и целевую последовательность имеет соответствующую длину, необязательно смежную с последовательностью PAM. В некоторых вариантах осуществления целевая последовательность может содержать 15-24 нуклеотида в длину. В некоторых вариантах осуществления целевая последовательность может содержать 17-21 нуклеотид в длину. В некоторых вариантах осуществления целевая последовательность может содержать 20 нуклеотидов в длину. Когда используются никазы, целевая последовательность может содержать пару целевых последовательностей, распознаваемых парой никаз, которые расщепляют противоположные цепи молекулы ДНК. В некоторых вариантах осуществления целевая последовательность может содержать пару целевых последовательностей, распознаваемых парой никаз, которые расщепляют одни и те же цепи молекулы ДНК. В некоторых вариантах осуществления целевая последовательность может содержать часть целевых последовательностей, распознаваемых одной или более Cas-нуклеазами.

Молекула целевой нуклеиновой кислоты может представлять собой любую молекулу ДНК или РНК, которая является эндогенной или экзогенной для клетки. В некоторых вариантах осуществления молекула целевой нуклеиновой кислоты может представлять собой эписомальную ДНК, плазмиду, геномную ДНК, вирусный геном, митохондриальную ДНК или хромосомную ДНК из клетки или в клетке. В некоторых вариантах осуществления целевая последовательность молекулы целевой нуклеиновой кислоты может представлять собой геномную последовательность из клетки или в клетке, включая клетку человека.

В дополнительных вариантах осуществления целевая последовательность может представлять собой вирусную последовательность. В других вариантах осуществления целевая последовательность может представлять собой последовательность патогена. В еще других вариантах осуществления целевая последовательность может представлять собой синтезированную последовательность. В дополнительных вариантах осуществления целевая последовательность может представлять собой хромосомную последовательность. В определенных вариантах осуществления целевая последовательность может содержать транслокационную вставку, например транслокацию, связанную с раком. В некоторых вариантах осуществления целевая последовательность может находиться на эукариотической хромосоме, такой как человеческая хромосома. В определенных вариантах осуществления целевая последовательность представляет собой специфическую для печени последовательность, в которой она экспрессируется в клетках печени.

В некоторых вариантах осуществления целевая последовательность может быть расположена в кодирующей последовательности гена, интронной последовательности гена, регуляторной последовательности, транскрипционной контрольной последовательности гена, трансляционной контрольной последовательности гена, сайте сплайсинга или некодирующей последовательности между генами. В некоторых вариантах осуществления ген может представлять собой ген, кодирующий белок. В других вариантах осуществления ген может представлять собой ген, который не кодирует РНК. В некоторых вариантах осуществления целевая последовательность может содержать весь ген, ассоциированный с заболеванием, или его часть. В некоторых вариантах осуществления целевая последовательность может быть расположена в негенном функциональном сайте в геноме, например в сайте, который контролирует аспекты организации хроматина, такие как сайт каркаса или локусные регуляторные области.

В вариантах осуществления, включающих Cas-нуклеазу, такую как нуклеаза класса 2, целевая последовательность может быть смежной с мотивом, прилегающим к протоспейсеру (PAM). В некоторых вариантах осуществления PAM может находиться рядом или в пределах 1, 2, 3 или 4 нуклеотидов 3'-конца последовательности. Длина и последовательность PAM могут зависеть от используемого белка Cas. Например, PAM может быть выбран из консенсусной или конкретной последовательности PAM для

конкретного белка Cas9 или ортолога Cas9, включая те, которые приведены на фиг. 1 из Ran et al., Nature, 520: 186-191 (2015) и на фиг. S5 из Zetsche 2015, соответствующее описание каждой из которых включено в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления РАР может иметь длину 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 нуклеотидов. Неограничивающие иллюстративные последовательности РАР включают NGG, NGGNG, NG, NAAAAAN, NAAAAAW, NNNNACA, GNNNCNNA, TTN и NNN-NGATT (где N определен как любой нуклеотид, а W определен или как А, или как Т). В некоторых вариантах осуществления последовательность РАР может представлять собой NGG. В некоторых вариантах осуществления последовательность РАР может представлять собой NGGNG. В некоторых вариантах осуществления последовательность РАР может представлять собой TTN. В некоторых вариантах осуществления последовательность РАР может представлять собой NAAAAAW.

Липидный состав.

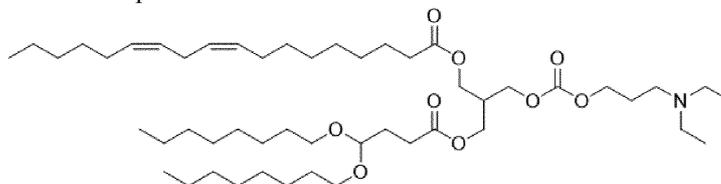
В данном документе описаны различные варианты составов LNP для РНК, включая карго CRISPR/Cas. Такие составы LNP содержат "аминолипид" наряду со вспомогательным липидом, нейтральным липидом и ПЭГ-липидом. В некоторых вариантах осуществления такие составы LNP содержат "аминолипид" вместе с вспомогательным липидом и ПЭГ-липидом. В некоторых вариантах осуществления составы LNP содержат менее 1 процент нейтрального фосфолипида. В некоторых вариантах осуществления составы LNP содержат менее 0,5 процент нейтрального фосфолипида. Под "липидной наночастицей" подразумевается частица, которая содержит множество (то есть более одной) молекул липидов, физически связанных друг с другом межмолекулярными силами.

Аминолипиды.

Композиции LNP для доставки биологически активных агентов содержат "аминолипид", который определяется как Липид А или его эквиваленты, включая ацеталевые аналоги Липида А.

В некоторых вариантах осуществления аминолипид представляет собой Липид А, который представляет собой (9Z, 12Z)-3-((4,4-бис(октилокси)бутаноил)окси)-2-(((3-(диэтиламино)пропокси)карбонил)окси)метил)пропилооктадека-9,12-диеноат, также называемый 3-((4,4-бис(октилокси)бутаноил)окси)-2-(((3-(диэтиламино)пропокси)карбонил)окси)метил)пропил (9Z, 12Z)-октадека-9,12-диеноат.

Липид А может быть изображен как:



Липид А может быть синтезирован в соответствии с WO 2015/095340 (например, с. 84-86). В определенных вариантах осуществления аминолипид представляет собой эквивалент Липида А.

В определенных вариантах осуществления аминолипид представляет собой аналог Липида А. В определенных вариантах осуществления аналог Липида А представляет собой ацеталевый аналог Липида А. В конкретных композициях LNP ацеталевый аналог представляет собой C4-C12 ацеталевый аналог. В некоторых вариантах осуществления ацеталевый аналог представляет собой C5-C12 ацеталевый аналог. В дополнительных вариантах осуществления ацеталевый аналог представляет собой C5-C10 ацеталевый аналог. В других вариантах осуществления ацеталевый аналог выбирают из C4, C5, C6, C7, C9, C10, C11 и C12 ацеталевых аналогов.

Аминолипиды, подходящие для применения в LNP, описанных в данном документе, являются биодеградируемыми *in vivo* и пригодными для доставки биологически активного агента, такого как РНК, в клетку. Аминолипиды имеют низкую токсичность (например, переносятся на животных моделях без вредного воздействия в количестве, превышающем или равном 10 мг/кг РНК-карго). В определенных вариантах осуществления LNP, содержащие аминолипид, включают те, для которых по меньшей мере 75% аминолипида выводится из плазмы в течение 8, 10, 12, 24 или 48 часов или 3, 4, 5, 6, 7 или 10 суток. В определенных вариантах осуществления LNP, содержащие аминолипид, включают те, для которых по меньшей мере 50% мРНК или гРНК выводится из плазмы в течение 8, 10, 12, 24 или 48 часов, или 3, 4, 5, 6, 7 или 10 суток. В определенных вариантах осуществления LNP, содержащие аминолипид, включают те, для которых по меньшей мере 50% LNP выводится из плазмы в течение 8, 10, 12, 24 или 48 часов, или 3, 4, 5, 6, 7 или 10 суток, например, путем измерения липида (например, аминолипида), РНК (например, мРНК) или другого компонента. В определенных вариантах осуществления измеряется инкапсулированный в липид и свободный от липида, компонент из LNP в виде РНК или нуклеиновой кислоты.

Клиренс липидов может быть измерен, как описано в литературе. См. Maier, M.A., et al. Biodegradable Lipids Enabling Rapidly Eliminated Lipid Nanoparticles for Systemic Delivery of RNAi Therapeutics. Mol. Ther. 2013, 21(8), 1570-78 (Maier). Например, в Maier системы LNP-киРНК, содержащие киРНК, нацеленную на люциферазы, вводили самцам мышей C57B1/6 в возрасте от шести до восьми недель в дозе 0,3 мг/кг путем внутривенной болюсной инъекции через латеральную хвостовую вену. Образцы крови,

печени и селезенки отбирали через 0,083, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 24, 48, 96 и 168 ч после введения дозы. Мышей перфузировали физиологическим раствором перед отбором ткани, и образцы крови обрабатывали для получения плазмы. Все образцы обрабатывали и анализировали методом ЖХ/МС. Кроме того, в Maieg описывают процедуру оценки токсичности после введения составов LNP-киРНК. Например, киРНК, нацеленную на люциферазу, вводили в дозах 0, 1, 3, 5 и 10 мг/кг (5 животных на группу) путем однократного внутривенного болюсного введения в объеме дозы 5 мл/кг самцам крыс линии Спрег-Дули. Через 24 ч из яремной вены у бодрствующих животных получали около 1 мл крови и выделяли сыворотку. Через 72 ч после введения дозы всех животных подвергали умерщвлению для вскрытия. Были проведены оценки клинических проявлений, массы тела, химического состава сыворотки, массы органов и гистопатологии. Хотя в Maieg описывают методы оценки составов киРНК-LNP, эти методы могут применяться для оценки клиренса, фармакокинетики и токсичности введения композиций LNP согласно данному изобретению.

Аминолипиды могут приводить к увеличению скорости клиренса. В некоторых вариантах осуществления скорость клиренса представляет собой скорость клиренса липидов, например скорость, с которой липид выводится из крови, сыворотки или плазмы. В некоторых вариантах осуществления скорость клиренса представляет собой скорость клиренса РНК, например скорость, с которой мРНК или гРНК выводится из крови, сыворотки или плазмы. В некоторых вариантах осуществления скорость клиренса представляет собой скорость, с которой LNP выводится из крови, сыворотки или плазмы. В некоторых вариантах осуществления скорость клиренса представляет собой скорость, с которой LNP выводится из ткани, такой как ткань печени или ткани селезенки. В определенных вариантах осуществления высокая скорость клиренса приводит к профилю безопасности без существенных побочных эффектов. Аминолипиды могут уменьшать накопление LNP в системе кровообращения и в тканях. В некоторых вариантах осуществления уменьшение накопления LNP в системе кровообращения и в тканях приводит к профилю безопасности без существенных побочных эффектов.

Аминолипиды согласно данному описанию являются ионизируемыми (например, могут образовывать соль) в зависимости от pH среды, в которой они находятся. Например, в слабнокислой среде аминокислоты могут протонироваться и, таким образом, нести положительный заряд. И наоборот, в слабощелочной среде, такой как, например, кровь, где pH составляет приблизительно 7,35, аминокислоты могут не протонироваться и, следовательно, не нести заряд. В некоторых вариантах осуществления аминокислоты согласно данному описанию могут быть протонированы при pH по меньшей мере около 9. В некоторых вариантах осуществления аминокислоты согласно данному описанию могут быть протонированы при pH по меньшей мере около 9. В некоторых вариантах осуществления аминокислоты согласно данному описанию могут быть протонированы при pH по меньшей мере около 10.

pH, при котором аминокислота преимущественно протонирована, связан с его собственным pKa. В некоторых вариантах осуществления аминокислоты согласно данному изобретению могут, каждый независимо, иметь pKa в диапазоне от около 5,1 до около 7,4. В некоторых вариантах осуществления аминокислоты согласно данному изобретению могут, каждый независимо, иметь pKa в диапазоне от около 5,5 до около 6,6. В некоторых вариантах осуществления аминокислоты согласно данному изобретению могут, каждый независимо, иметь pKa в диапазоне от около 5,6 до около 6,4. В некоторых вариантах осуществления аминокислоты согласно данному изобретению могут, каждый независимо, иметь pKa в диапазоне от около 5,8 до около 6,2. Например, аминокислоты согласно данному изобретению могут, каждый независимо, иметь pKa в диапазоне от около 5,8 до около 6,5. Значение pKa аминокислоты может быть важным фактором при составлении LNP, поскольку было обнаружено, что катионные липиды с pKa в диапазоне от около 5,1 до около 7,4 эффективны для доставки карго *in vivo*, например, в печень. Кроме того, было обнаружено, что катионные липиды с pKa в диапазоне от около 5,3 до около 6,4 эффективны для доставки *in vivo*, например в опухоли. См., например, WO 2014/136086.

Дополнительные липиды.

"Нейтральные липиды", подходящие для применения в липидной композиции согласно описанию, включают, например, различные нейтральные, незаряженные или цвиттер-ионные липиды. Примеры нейтральных фосфолипидов, пригодных для применения в данном описании, включают, но не ограничиваются ими, 5-гептадецилбензол-1,3-диол (резорцин), дипальмитоилфосфатидилхолин (ДПФХ), дистеароилфосфатидилхолин (ДСФХ), фосфохолин (ДФХ), димиристоилфосфатидилхолин (ДМФХ), фосфатидилхолин (ПФХ), 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин (ДФХ), фосфатидилэтаноламин (ФЭ), яичный фосфатидилхолин (ЯФХ), дилаурилоилфосфатидилхолин (ДФХ), димиристоилфосфатидилхолин (ДФХ), 1-миристоил-2-пальмитоилфосфатидилхолин (МДФХ), 1-пальмитоил-2-миристоилфосфатидилхолин (ПДФХ), 1-пальмитоил-2-стеароилфосфатидилхолин (СПФХ), 1,2-диарахидоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (ДФХ) 1-стеароил-2-пальмитоил фосфатидилхолин (СПФХ), 1,2-дизэйкозеноил-sn-глицеро-3-фосфохолин (ДФХ), пальмитоилолеоил фосфатидилхолин (ПОФХ), лизофосфатидилхолин, диолеил фосфатидилэтаноламин (ДФЭ), дилинолеилфосфатидилхолин дистеароилфосфатидилэтаноламин (ДСФЭ), димиристоил фосфатидилэтаноламин (ДФЭ), дипальмитоилфосфатидилэтаноламин (ДФЭ), пальмитоилолеилфосфатидилэтаноламин (ПОФЭ), лизофосфатидилэтаноламин и их комбинации. В одном варианте осуществления нейтральный фосфолипид может быть

выбран из группы, состоящей из дистеароилфосфатидилхолина (ДСФХ) и димиристоилфосфатидилэтаноламина (ДМФЭ). В другом варианте осуществления нейтральный фосфолипид может представлять собой дистеароилфосфатидилхолин (ДСФХ). В другом варианте осуществления нейтральный фосфолипид может представлять собой дипальмитоилфосфатидилхолин (ДПФХ).

"Вспомогательные липиды" включают стеролы, стерины и алкилрезорцины.

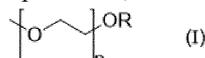
Вспомогательные липиды, подходящие для применения в данном описании, включают, но не ограничиваются ими, холестерин, 5-гептадецилрезорцин и гемисукцинат холестерина. В одном варианте осуществления вспомогательный липид может представлять собой холестерин. В одном варианте осуществления вспомогательный липид может представлять собой гемисукцинат холестерина.

ПЭГ-липиды представляют собой липиды-невидимки, которые изменяют продолжительность времени, в течение которого наночастицы могут существовать *in vivo* (например, в крови). ПЭГ-липиды могут способствовать процессу изготовления состава, например, путем снижения агрегации частиц и контроля размера частиц. Используемые в данном документе ПЭГ-липиды могут модулировать фармакокинетические свойства LNP. Как правило, ПЭГ-липид содержит липидный фрагмент и полимерный фрагмент на основе ПЭГ.

В некоторых вариантах осуществления липидный фрагмент может быть получен из диацилглицерина или диацилглицамида, включая те, которые содержат диалкилглицериновую или диалкилглицамидную группу, имеющую длину алкильной цепи, независимо содержащую от около C4 до около C40 насыщенных или ненасыщенных атомов углерода, причем цепь может содержать одну или более функциональных групп, таких как, например, амид или сложный эфир. В некоторых вариантах осуществления длина алкильной цепи составляет от около C10 до C20. Диалкилглицериновая или диалкилглицамидная группа может дополнительно содержать одну или более замещенных алкильных групп. Длина цепи может быть симметричной или асимметричной.

Если не указано иное, термин "ПЭГ", используемый в данном документе, означает любой полиэтиленгликоль или другой полиалкиленэфирный полимер. В одном варианте осуществления фрагмент ПЭГ представляет собой необязательно замещенный линейный или разветвленный полимер этиленгликоля или этиленоксида. В определенных вариантах осуществления фрагмент ПЭГ представляет собой альтернативно фрагмент ПЭГ может быть замещен, например, одной или более алкильными, алкокси, ацильными, гидроксильными или арильными группами. В одном варианте осуществления фрагмент ПЭГ включает сополимер ПЭГ, такой как ПЭГ-полиуретан или ПЭГ-полипропилен (см., например, J. Milton Harris, Poly(ethylene glycol) chemistry: biotechnical and biomedical applications (1992)); альтернативно, фрагмент ПЭГ не включает сополимеры ПЭГ, например, он может быть монополимером ПЭГ. В одном варианте осуществления ПЭГ имеет молекулярную массу от около 130 до около 50000, в подварианте осуществления от около 150 до около 30000, в подварианте осуществления от около 150 до около 20000, в подварианте осуществления от около 150 до около 15000, в подварианте осуществления от около 150 до около 10000, в подварианте осуществления от около 150 до около 6000, в подварианте осуществления от около 150 до около 5000, в подварианте осуществления от около 150 до около 4000, в подварианте осуществления от около 150 до около 3000, в подварианте осуществления от около 300 до около 3000, в подварианте осуществления от около 1000 до около 3000 и в подварианте осуществления от около 1500 до около 2500.

В определенных вариантах осуществления ПЭГ (например, конъюгированный с липидным фрагментом или липидом, таким как липид-невидимка) представляет собой "ПЭГ-2К", также называемый "ПЭГ 2000", который имеет среднюю молекулярную массу около 2000 дальтон. ПЭГ-2К представлен в данном документе следующей формулой (I), где n равен 45, что означает, что среднечисловая степень



полимеризации составляет около 45 субъединиц. Однако могут быть использованы другие варианты осуществления ПЭГ, известные в данной области техники, включая, например, те, где среднечисловая степень полимеризации составляет около 23 субъединиц ($n=23$) и/или 68 субъединиц ($n=68$). В некоторых вариантах осуществления n может варьироваться от около 30 до около 60. В некоторых вариантах осуществления n может варьироваться от около 35 до около 55. В некоторых вариантах осуществления n может варьироваться от около 40 до около 50. В некоторых вариантах осуществления n может варьироваться от около 42 до около 48. В некоторых вариантах осуществления n может составлять 45. В некоторых вариантах осуществления R может быть выбран из H, замещенного алкила и незамещенного алкила. В некоторых вариантах осуществления R может представлять собой незамещенный алкил. В некоторых вариантах осуществления R может представлять собой метил.

В любом из вариантов осуществления, описанных в данном документе, ПЭГ-липид может быть выбран из ПЭГ-дилауроилглицерина, ПЭГ-димиристоилглицерина (ПЭГ-ДМГ) (кат. № GM-020 от NOF, г. Токио, Япония), ПЭГ-дипальмитоилглицерин, ПЭГ-дистеароилглицерин (ПЭГ-ДСФЭ) (кат. № DSPE-020CN, NOF, г. Токио, Япония), ПЭГ-дилаурилглицамид, ПЭГ-димиристилглицамид, ПЭГ-дипальмитоилглицамид и ПЭГ-дистеароилглицамид, ПЭГ-холестерин (1-[8'-(холест-5-ен-3 [бета]-окси)карбоксамидо-3', 6'-диоксоактанил] карбамоил-[омега]-метил-поли(этиленгликоль)), ПЭГ-ДМБ (3,4-

дитетрадекоксилбензил-[омега]-метилполи(этиленгликолевый)эфир), 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфэтаноламин-N-[метокси(полиэтиленгликоль)-2000] (ПЭГ2к-ДМГ) (кат. № 880150P от Avanti Polar Lipids, г. Алабастер, штат Алабама, США), 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфэтаноламин-N-[метокси(полиэтиленгликоль)-2000] (ПЭГ2к-ДСФЭ) (кат. № 880120C от Avanti Polar Lipids, г. Алабастер, штат Алабама, США), 1,2-дистеароил-sn-глицерин, метоксиполиэтиленгликоль (ПЭГ2к-ДСГ; GS-020, NOF, г. Токио, Япония), поли(этиленгликоль)-2000-диметакрилат (ПЭГ2к-ДМА) и 1,2-дистеарилоксипропил-3-амин-N-[метокси(полиэтиленгликоль)-2000] (ПЭГ2к-ДСА). В одном варианте осуществления ПЭГ-липид может представлять собой ПЭГ2к-ДМГ. В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липид может представлять собой ПЭГ2к-ДСГ. В одном варианте осуществления настоящего изобретения ПЭГ-липид может представлять собой ПЭГ2к-ДСФЭ. В одном варианте осуществления ПЭГ-липид может представлять собой ПЭГ2к-ДМА. В одном варианте осуществления ПЭГ-липид может представлять собой ПЭГ2к-С-ДСФЭ. В одном варианте осуществления ПЭГ-липид может представлять собой соединение S027, описанное в WO2016/010840 в параграфах с [00240] по [00244]. В одном варианте осуществления ПЭГ-липид может представлять собой ПЭГ2к-ДСА. В одном варианте осуществления ПЭГ-липид может представлять собой ПЭГ2к-С11. В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липид может представлять собой ПЭГ2к-С14. В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липид может представлять собой ПЭГ2к-С16. В некоторых вариантах осуществления ПЭГ-липид может представлять собой ПЭГ2к-С18.

Составы LNP.

Варианты осуществления обеспечивают липидные композиции, описанные в соответствии с соответствующими молярными соотношениями компонентов липидов в составе. В одном варианте осуществления мол.% аминоклипида может составлять от около 30 до около 60 мол.%. В одном варианте осуществления мол.% аминоклипида может составлять от около 40 до около 60 мол.%. В одном варианте осуществления мол.% аминоклипида может составлять от около 45 до около 60 мол.%. В одном варианте осуществления мол.% аминоклипида может составлять от около 50 до около 60 мол.%. В одном варианте осуществления мол.% аминоклипида может составлять от около 55 до около 60 мол.%. В одном варианте осуществления мол.% аминоклипида может составлять от около 50 до около 55 мол.%. В одном варианте осуществления мол.% аминоклипида может составлять около 50 мол.%. В одном варианте осуществления мол.% аминоклипида может составлять около 55 мол.%. В некоторых вариантах осуществления мол.% аминоклипида в партии LNP будет составлять $\pm 30\%$, $\pm 25\%$, $\pm 20\%$, $\pm 15\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$ или $\pm 2,5\%$ от целевого мол.%. В некоторых вариантах осуществления мол.% аминоклипида в партии LNP будет составлять ± 4 мол.%, ± 3 мол.%, ± 2 мол.%, $\pm 1,5$ мол.%, ± 1 мол.%, $\pm 0,5$ мол.%, $\pm 0,25$ мол.% от целевого мол.%. Все числа мол.% приведены в виде доли липидного компонента в композициях LNP. В определенных вариантах осуществления вариативность между партиями LNP мол.% аминоклипида будет составлять менее 15%, менее 10% или менее 5%.

В одном варианте осуществления мол.% нейтрального липида, например нейтрального фосфолипиды, может составлять от около 5 до около 15 мол.%. В одном варианте осуществления мол.% нейтрального липида, например нейтрального фосфолипиды, может составлять от около 7 до около 12 мол.%. В одном варианте осуществления мол.% нейтрального липида, например нейтрального фосфолипиды, может составлять от около 0 до около 5 мол.%. В одном варианте осуществления мол.% нейтрального липида, например нейтрального фосфолипиды, может составлять от около 0 мол.% до около 10 мол.%. В одном варианте осуществления мол.% нейтрального липида, например нейтрального фосфолипиды, может составлять от около 5 до около 10 мол.%. В одном варианте осуществления мол.% нейтрального липида, например нейтрального фосфолипиды, может составлять от около 8 мол.% до около 10 мол.%. В одном варианте осуществления мол.% нейтрального липида, например нейтрального фосфолипиды, может составлять от около 5, около 6, около 7, около 8, около 9, около 10, около 11, около 12, около 13, около 14 или около 15 мол.%. В одном варианте осуществления мол.% нейтрального липида, например нейтрального фосфолипиды, может составлять около 9 мол.%. В одном варианте осуществления мол.% нейтрального липида, например нейтрального фосфолипиды, может составлять от около 1 до около 5 мол.%. В одном варианте осуществления мол.% нейтрального липида может составлять от около 0,1 до около 1 мол.%. В одном варианте осуществления мол.% нейтрального липида, такого как нейтральный фосфолипид, может составлять около 0,1, около 0,2, около 0,5, 1, около 1,5, около 2, около 2,5, около 3, около 3,5, около 4, около 4,5 или около 5 мол.%. В одном варианте осуществления мол.% нейтрального липида, например нейтрального фосфолипиды, может составлять менее чем около 1 мол.%. В одном варианте осуществления мол.% нейтрального липида, например нейтрального фосфолипиды, может составлять менее чем 0,5 мол.%. В одном варианте осуществления мол.% нейтрального липида, например нейтрального фосфолипиды, может составлять около 0 мол.%, около 0,1 мол.%, около 0,2 мол.%, около 0,3 мол.%, около 0,4 мол.%, около 0,5 мол.%, около 0,6 мол.%, около 0,7 мол.%, около 0,8 мол.%, около 0,9 мол.% или около 1 мол.%. В некоторых вариантах осуществления составы, описанные в данном документе, не содержат нейтральный липид (то есть 0 мол.% нейтрального липида). В некоторых вариантах осуществления составы, описанные в дан-

ном документе, по существу не содержат нейтральный липид (то есть около 0 мол.% нейтрального липида). В некоторых вариантах осуществления составы, описанные в данном документе, не содержат нейтральный фосфолипид (то есть 0 мол.% нейтрального фосфолипида). В некоторых вариантах осуществления составы, описанные в данном документе, по существу не содержат нейтральный фосфолипид (то есть около 0 мол.% нейтрального фосфолипида).

В некоторых вариантах осуществления мол.% нейтрального липида в партии LNP будет составлять $\pm 30\%$, $\pm 25\%$, $\pm 20\%$, $\pm 15\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$ или $\pm 2,5\%$ от целевого мол.% нейтрального липида. В определенных вариантах осуществления вариabельность между партиями LNP будет составлять менее 15%, менее 10% или менее 5%.

В одном варианте осуществления мол.% вспомогательного липида может составлять от около 20 мол.% до около 60 мол.%. В одном варианте осуществления мол.% вспомогательного липида может составлять от около 25 мол.% до около 55 мол.%. В одном варианте осуществления мол.% вспомогательного липида может составлять от около 25 мол.% до около 50 мол.%. В одном варианте осуществления мол.% вспомогательного липида может составлять от около 25 мол.% до около 40 мол.%. В одном варианте осуществления мол.% вспомогательного липида может составлять от около 30 мол.% до около 50 мол.%. В одном варианте осуществления мол.% вспомогательного липида может составлять от около 30 мол.% до около 40 мол.%. В одном варианте осуществления мол.% вспомогательного липида регулируют на основе концентраций аминоклипида, нейтрального липида и ПЭГ-липиды, чтобы довести липидный компонент до 100 мол.%. В одном варианте осуществления мол.% вспомогательного липида регулируют на основе концентраций аминоклипида и ПЭГ-липиды, чтобы довести липидный компонент до 100 мол.%. В одном варианте осуществления мол.% вспомогательного липида регулируют на основе концентраций аминоклипида и ПЭГ, чтобы довести липидный компонент до 99 мол.%. В некоторых вариантах осуществления мол.% вспомогательного липида в партии LNP будет составлять $\pm 30\%$, $\pm 25\%$, $\pm 20\%$, $\pm 15\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$ или $\pm 2,5\%$ от целевого мол.%. В определенных вариантах осуществления вариabельность между партиями LNP будет составлять менее 15%, менее 10% или менее 5%.

В одном варианте осуществления мол.% ПЭГ-липиды может составлять от около 1 до около 10 мол.%. В одном варианте осуществления мол.% ПЭГ-липиды может составлять от около 2 до около 10 мол.%. В одном варианте осуществления мол.% ПЭГ-липиды может составлять от около 2 до около 8 мол.%. В одном варианте осуществления мол.% ПЭГ-липиды может составлять от около 2 до около 4 мол.%. В одном варианте осуществления мол.% ПЭГ-липиды может составлять от около 2,5 до около 4 мол.%. В одном варианте осуществления мол.% ПЭГ-липиды может составлять около 3 мол.%. В одном варианте осуществления мол.% ПЭГ-липиды может составлять около 2,5 мол.%. В некоторых вариантах осуществления мол.% ПЭГ-липиды в партии LNP будет составлять $\pm 30\%$, $\pm 25\%$, $\pm 20\%$, $\pm 15\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$ или $\pm 2,5\%$ от целевого мол.% ПЭГ-липиды. В определенных вариантах осуществления вариabельность между партиями LNP будет составлять менее 15%, менее 10% или менее 5%.

В определенных вариантах осуществления карго содержит мРНК, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент (например, Cas-нуклеазу, Cas-нуклеазу класса 2 или Cas9), и гРНК или нуклеиновую кислоту, кодирующую гРНК, или комбинацию мРНК и гРНК. В одном варианте осуществления композиция LNP может содержать Липид А или его эквиваленты. В некоторых аспектах аминоклипид представляет собой Липид А. В некоторых аспектах аминоклипид представляет собой эквивалент Липида А, например аналог Липида А. В некоторых аспектах аминоклипид представляет собой ацеталевый аналог Липида А. В различных вариантах осуществления композиция LNP содержит аминоклипид, нейтральный липид, вспомогательный липид и ПЭГ-липид. В определенных вариантах осуществления вспомогательный липид представляет собой холестерин. В определенных вариантах осуществления нейтральный липид представляет собой ДСФХ. В конкретных вариантах осуществления ПЭГ-липид представляет собой ПЭГ₂к-ДМГ. В некоторых вариантах осуществления композиция LNP может содержать Липид А, вспомогательный липид, нейтральный липид и ПЭГ-липид. В некоторых вариантах осуществления композиция LNP содержит аминоклипид, ДСФХ, холестерин и ПЭГ-липид. В некоторых вариантах осуществления композиция LNP содержит ПЭГ-липид, содержащий ДМГ. В определенных вариантах осуществления аминоклипид выбран из Липида А и эквивалента Липида А, включая ацеталевый аналог Липида А. В дополнительных вариантах осуществления композиция LNP содержит Липид А, холестерин, ДСФХ и ПЭГ₂к-ДМГ.

В различных вариантах осуществления композиция LNP содержит аминоклипид, вспомогательный липид, нейтральный липид и ПЭГ-липид. В различных вариантах осуществления композиция LNP содержит аминоклипид, вспомогательный липид, нейтральный фосфолипид и ПЭГ-липид. В различных вариантах осуществления композиция LNP содержит липидный компонент, который состоит из аминоклипида, вспомогательного липида, нейтрального липида и ПЭГ-липиды. В различных вариантах осуществления композиция LNP содержит аминоклипид, вспомогательный липид и ПЭГ-липид. В определенных вариантах осуществления композиция LNP не содержит нейтральный липид, такой как нейтральный фосфолипид. В различных вариантах осуществления композиция LNP содержит липидный компонент, который состоит из аминоклипида, вспомогательного липида и ПЭГ-липиды. В определенных вариантах

осуществления нейтральный липид выбирают из одного или более из ДСФХ, ДПФХ, ДАФХ, ДМФХ, ДОФХ, ДОФЭ, и ДСФЭ. В определенных вариантах осуществления нейтральный липид представляет собой ДСФХ. В определенных вариантах осуществления нейтральный липид представляет собой ДПФХ. В определенных вариантах осуществления нейтральный липид представляет собой ДАФХ. В определенных вариантах осуществления нейтральный липид представляет собой ДМФХ. В определенных вариантах осуществления нейтральный липид представляет собой ДОФХ. В определенных вариантах осуществления нейтральный липид представляет собой ДОФЭ. В определенных вариантах осуществления нейтральный липид представляет собой ДСФЭ. В определенных вариантах осуществления вспомогательный липид представляет собой холестерин. В конкретных вариантах осуществления ПЭГ-липид представляет собой ПЭГ2к-ДМГ. В некоторых вариантах осуществления композиция LNP может содержать Липид А, вспомогательный липид и ПЭГ-липид. В некоторых вариантах осуществления композиция LNP может содержать липидный компонент, который состоит из Липида А, вспомогательного липида и ПЭГ-липид. В некоторых вариантах осуществления композиция LNP содержит аминоклипид, холестерин и ПЭГ-липид. В некоторых вариантах осуществления композиция LNP содержит липидный компонент, который состоит из аминоклипида, холестерина и ПЭГ-липид. В некоторых вариантах осуществления композиция LNP содержит ПЭГ-липид, содержащий ДМГ. В определенных вариантах осуществления аминоклипид выбран из Липида А и эквивалента Липида А, включая ацеталевый аналог Липида А. В определенных вариантах осуществления аминоклипид представляет собой C5-C12 или C4-C12 ацеталевый аналог Липида А. В дополнительных вариантах осуществления композиция LNP содержит Липид А, холестерин и ПЭГ2к-ДМГ.

Варианты осуществления данного изобретения также обеспечивают липидные композиции, описанные в соответствии с молярным соотношением между положительно заряженными аминоклипами аминоклипида (N) и отрицательно заряженными фосфатными группами (P) нуклеиновой кислоты, которая должна быть инкапсулирована. Это может быть математически представлено уравнением N/P. В некоторых вариантах осуществления композиция LNP может содержать липидный компонент, который содержит аминоклипид, вспомогательный липид, нейтральный липид и ПЭГ-липид; и компонент нуклеиновой кислоты, причем соотношение N/P составляет от около 3 до 10. В некоторых вариантах осуществления композиция LNP может содержать липидный компонент, который содержит аминоклипид, вспомогательный липид и ПЭГ-липид; и компонент нуклеиновой кислоты, причем соотношение N/P составляет от около 3 до 10. В некоторых вариантах осуществления композиция LNP может содержать липидный компонент, который содержит аминоклипид, вспомогательный липид, нейтральный липид и вспомогательный липид; и РНК-компонент, причем соотношение N/P составляет от около 3 до 10. В некоторых вариантах осуществления композиция LNP может содержать липидный компонент, который содержит аминоклипид, вспомогательный липид, и ПЭГ-липид; и РНК-компонент, причем соотношение N/P составляет от около 3 до 10. В одном варианте осуществления соотношение N/P может составлять от около 5 до 7. В одном варианте осуществления соотношение N/P может составлять от около 3 до 7. В одном варианте осуществления соотношение N/P может составлять от около 4,5 до 8. В одном варианте осуществления соотношение N/P может составлять около 6. В одном варианте осуществления соотношение N/P может составлять 6 ± 1 . В одном варианте осуществления соотношение N/P может составлять $6 \pm 0,5$. В некоторых вариантах осуществления соотношение N/P будет составлять $\pm 30\%$, $\pm 25\%$, $\pm 20\%$, $\pm 15\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$ или $\pm 2,5\%$ от целевого соотношения N/P. В определенных вариантах осуществления вариативность между партиями LNP будет составлять менее 15%, менее 10% или менее 5%.

В некоторых вариантах осуществления компонент нуклеиновой кислоты, например РНК-компонент, может содержать мРНК, такую как мРНК, кодирующую Cas-нуклеазу. РНК-компонент включает РНК, необязательно с дополнительной нуклеиновой кислотой и/или белком, например, РНП-карго. В одном варианте осуществления РНК содержит мРНК Cas9. В некоторых композициях, содержащих мРНК, кодирующую Cas-нуклеазу, LNP дополнительно содержит нуклеиновую кислоту гРНК, такую как гРНК. В некоторых вариантах осуществления РНК-компонент содержит мРНК Cas-нуклеазы и гРНК. В некоторых вариантах осуществления РНК-компонент содержит мРНК Cas-нуклеазы 2 класса и гРНК.

В определенных вариантах осуществления композиция LNP может содержать мРНК, кодирующую Cas-нуклеазу, такую как Cas-нуклеаза класса 2, аминоклипид, вспомогательный липид, нейтральный липид и ПЭГ-липид. В определенных вариантах осуществления композиция LNP может содержать мРНК, кодирующую Cas-нуклеазу, такую как Cas-нуклеаза класса 2, аминоклипид, вспомогательный липид и ПЭГ-липид. В некоторых композициях LNP, содержащих мРНК, кодирующую Cas-нуклеазу, такую как Cas-нуклеаза класса 2, вспомогательный липид представляет собой холестерин. В других композициях, содержащих мРНК, кодирующую Cas-нуклеазу, такую как Cas-нуклеаза класса 2, нейтральный липид представляет собой ДСФХ. В дополнительных вариантах осуществления, содержащих мРНК, кодирующую Cas-нуклеазу, такую как Cas-нуклеаза 2 класса, ПЭГ-липид представляет собой ПЭГ2к-ДМГ или ПЭГ2к-С11. В конкретных композициях, содержащих мРНК, кодирующую Cas-нуклеазу, такую как Cas-нуклеаза класса 2, аминоклипид выбран из Липида А и его эквивалентов, таких как ацеталевый аналог

Липида А.

В некоторых вариантах осуществления композиция LNP может содержать гРНК. В определенных вариантах осуществления композиция LNP может содержать аминоклипид, гРНК, вспомогательный липид, нейтральный липид и ПЭГ-липид. В определенных вариантах осуществления композиция LNP может содержать аминоклипид, гРНК, вспомогательный липид и ПЭГ-липид. В некоторых композициях LNP, содержащих гРНК, вспомогательный липид представляет собой холестерин. В некоторых композициях, содержащих гРНК, нейтральный липид представляет собой ДСФХ. В дополнительных вариантах осуществления, содержащих гРНК, ПЭГ-липид представляет собой ПЭГ2к-ДМГ или ПЭГ2к-С11. В определенных вариантах осуществления аминоклипид выбран из Липида А и его эквивалентов, таких как ацеталевый аналог Липида А.

В одном варианте осуществления композиция LNP может содержать огРНК. В одном варианте осуществления композиция LNP может содержать огРНК Cas9. В одном варианте осуществления композиция LNP может содержать огРНК Crp1. В некоторых композициях, содержащих огРНК, LNP содержит аминоклипид, вспомогательный липид, нейтральный липид и ПЭГ-липид. В некоторых композициях, содержащих огРНК, LNP содержит аминоклипид, вспомогательный липид и ПЭГ-липид. В определенных композициях, содержащих огРНК, вспомогательный липид представляет собой холестерин. В других композициях, содержащих огРНК, нейтральный липид представляет собой ДСФХ. В дополнительных вариантах осуществления, содержащих огРНК, ПЭГ-липид представляет собой ПЭГ2к-ДМГ или ПЭГ2к-С11. В определенных вариантах осуществления аминоклипид выбран из Липида А и его эквивалентов, таких как ацеталевые аналоги Липида А.

В определенных вариантах осуществления композиция LNP содержит мРНК, кодирующую Cas-нуклеазу, и гРНК, которая может представлять собой огРНК. В одном варианте осуществления композиция LNP может содержать аминоклипид, мРНК, кодирующую Cas-нуклеазу, гРНК, вспомогательный липид, нейтральный липид и ПЭГ-липид. В одном варианте осуществления композиция LNP может содержать липидный компонент, состоящий из аминоклипида, вспомогательного липида, нейтрального липида и ПЭГ-липид; и компонент нуклеиновой кислоты, состоящий из мРНК, кодирующей Cas-нуклеазу, и гРНК. В одном варианте осуществления композиция LNP может содержать липидный компонент, состоящий из аминоклипида, вспомогательного липида и ПЭГ-липид; и компонент нуклеиновой кислоты, состоящий из мРНК, кодирующей Cas-нуклеазу, и гРНК. В некоторых композициях, содержащих мРНК, кодирующую Cas-нуклеазу, и гРНК, вспомогательный липид представляет собой холестерин. В некоторых композициях, содержащих мРНК, кодирующую Cas-нуклеазу, и гРНК, нейтральный липид представляет собой ДСФХ. Некоторые композиции, содержащие мРНК, кодирующую Cas-нуклеазу, и гРНК, содержат менее чем около 1 мол.% нейтрального липида, например нейтрального фосфолипид. Некоторые композиции, содержащие мРНК, кодирующую Cas-нуклеазу, и гРНК, содержат менее чем около 0,5 мол.% нейтрального липида, например нейтрального фосфолипид. В некоторых композициях LNP не содержит нейтральный липид, например нейтральный фосфолипид. В дополнительных вариантах осуществления, содержащих мРНК, кодирующую Cas-нуклеазу, и гРНК, ПЭГ-липид представляет собой ПЭГ2к-ДМГ или ПЭГ2к-С11. В определенных вариантах осуществления аминоклипид выбран из Липида А и его эквивалентов, таких как ацеталевые аналоги Липида А.

В определенных вариантах осуществления композиции LNP содержат мРНК Cas-нуклеазы, такую как мРНК Cas класса 2, и по меньшей мере одну гРНК. В определенных вариантах осуществления композиция LNP имеет соотношение гРНК к мРНК Cas-нуклеазы, такой как мРНК Cas-нуклеазы класса 2, от около 25:1 до около 1:25. В определенных вариантах осуществления состав LNP имеет соотношение гРНК к мРНК Cas-нуклеазы, такой как мРНК Cas-нуклеазы класса 2, от около 10:1 до около 1:10. В определенных вариантах осуществления состав LNP имеет соотношение гРНК к мРНК Cas-нуклеазы, такой как мРНК Cas-нуклеазы класса 2, от около 8:1 до около 1:8. Измеряемые в данном документе соотношения являются массовыми. В некоторых вариантах осуществления состав LNP имеет соотношение гРНК к мРНК Cas-нуклеазы, такой как мРНК Cas класса 2, от около 5:1 до около 1:5. В некоторых вариантах осуществления диапазон соотношений составляет от около 3:1 до 1:3, от около 2:1 до 1:2, от около 5:1 до 1:2, от около 5:1 до 1:1, от около 3:1 до 1:2, от около 3:1 до 1:1, около 3:1, от около 2:1 до 1:1. В некоторых вариантах осуществления соотношение гРНК к мРНК составляет около 3:1 или около 2:1. В некоторых вариантах осуществления соотношение гРНК к мРНК Cas-нуклеазы, такой как Cas-нуклеаза класса 2, составляет около 1:1. Соотношение может составлять около 25:1, 10:1, 5:1, 3:1, 1:1, 1:3, 1:5, 1:10 или 1:25.

Композиции LNP, описанные в данном документе, могут содержать матричную нуклеиновую кислоту. Матричную нуклеиновую кислоту можно комбинировать в составе с мРНК, кодирующей Cas-нуклеазу, такой как мРНК Cas-нуклеазы класса 2. В некоторых вариантах осуществления матричная нуклеиновая кислота может быть совместно составлена с гидовой РНК. В некоторых вариантах осуществления матричная нуклеиновая кислота может быть комбинирована в составе как с мРНК, кодирующей Cas-нуклеазу, так и с гидовой РНК. В некоторых вариантах осуществления матричная нуклеиновая кислота может быть составлена отдельно от мРНК, кодирующей Cas-нуклеазу, или гидовой РНК. Матричная нуклеиновая кислота может быть доставлена вместе или отдельно от композиций LNP. В некоторых

вариантах осуществления матричная нуклеиновая кислота может быть одноцепочечной или двухцепочечной, в зависимости от желаемого механизма репарации. Матрица может иметь области гомологии с целевой ДНК или с последовательностями, смежными с целевой ДНК.

В некоторых вариантах осуществления LNP получают путем смешивания водного раствора РНК с раствором липида на основе органического растворителя, например 100% этанола. Подходящие растворы или растворители включают или могут содержать: воду, PBS, Трис-буфер, NaCl, цитратный буфер, этанол, хлороформ, диэтиловый эфир, циклогексан, тетрагидрофуран, метанол, изопропанол. Может быть использован фармацевтически приемлемый буфер, например, для введения LNP *in vivo*. В определенных вариантах осуществления буфер используется для поддержания pH композиции, содержащей LNP, при pH 6,5 или выше. В определенных вариантах осуществления буфер используется для поддержания pH композиции, содержащей LNP, при pH 7,0 или выше. В определенных вариантах осуществления композиция имеет pH в диапазоне от около 7,2 до около 7,7. В дополнительных вариантах осуществления композиция имеет pH в диапазоне от около 7,3 до около 7,7 или в диапазоне от около 7,4 до около 7,6. В других вариантах осуществления композиция имеет pH около 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6 или 7,7. Значение pH композиции может быть измерено с помощью микродетектора pH. В определенных вариантах осуществления криопротектор включен в композицию. Неограничивающие примеры криопротекторов включают сахарозу, трегалозу, глицерин, ДМСО и этиленгликоль. Иллюстративные композиции могут содержать до 10% криопротектора, такого как, например, сахароза. В определенных вариантах осуществления композиция LNP может содержать около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10% криопротектора. В определенных вариантах осуществления композиция LNP может содержать около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10% сахарозы. В некоторых вариантах осуществления композиция LNP может содержать буфер. В некоторых вариантах осуществления буфер может содержать фосфатный буфер (PBS), Трис-буфер, цитратный буфер или их смеси. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления буфер содержит NaCl. В определенных вариантах осуществления NaCl не используется. Иллюстративные количества NaCl могут варьироваться от около 20 до около 45 mM. Иллюстративные количества NaCl могут варьироваться от около 40 до около 50 mM. В некоторых вариантах осуществления количество NaCl составляет около 45 mM. В некоторых вариантах осуществления буфер представляет собой Трис-буфер. Иллюстративные количества Трис могут варьироваться от около 20 до около 60 mM. Иллюстративные количества Трис могут варьироваться от около 40 до около 60 mM. В некоторых вариантах осуществления количество Трис составляет около 50 mM. В некоторых вариантах осуществления буфер содержит NaCl и Трис. Некоторые иллюстративные варианты осуществления композиций LNP содержат 5% сахарозы и 45 mM NaCl в Трис-буфере. В других иллюстративных вариантах осуществления композиции содержат сахарозу в количестве около 5% мас./об., около 45 mM NaCl и около 50 mM Трис при pH 7,5. Количество соли, буфера и криопротектора может варьироваться таким образом, чтобы поддерживать осмоляльность всего состава. Например, конечная осмоляльность может поддерживаться на уровне менее 450 мОсм/л. В других вариантах осуществления осмоляльность составляет от 350 до 250 мОсм/л. Некоторые варианты осуществления имеют конечную осмоляльность 300 +/- 20 мОсм/л.

В некоторых вариантах осуществления используют микрожидкостное смешивание, Т-смешивание или перекрестное смешивание. В определенных аспектах могут варьироваться скорости потока, размер соединения, геометрия соединения, форма соединения, диаметр трубки, растворы и/или концентрации РНК и липидов. LNP или композиции LNP можно концентрировать или очищать, например, с помощью диализа, тангенциальной поточной фильтрации или хроматографии. LNP могут храниться, например, в виде суспензии, эмульсии или лиофилизированного порошка. В некоторых вариантах осуществления композицию LNP хранят при 2-8°C, в определенных аспектах композиции LNP хранят при комнатной температуре. В дополнительных вариантах осуществления композицию LNP хранят в замороженном виде, например при -20 или -80°C. В других вариантах осуществления композицию LNP хранят при температуре в диапазоне от около 0 до около -80°C. Замороженные композиции LNP можно размораживать перед использованием, например на льду, при комнатной температуре или при 25°C.

LNP могут представлять собой, например, микросферические частицы (включая однослойные и многослойные везикулы, например "липосомы" - липидные бислои с ламеллярной фазой, которые, в некоторых вариантах осуществления, являются по существу сферическими и, в более конкретных вариантах осуществления, могут содержать водное ядро, например, содержащее значительную часть молекул РНК), дисперсную фазу в эмульсии, мицеллы или дисперсную фазу в суспензии.

Более того, композиции LNP являются биоразлагаемыми, поскольку они не накапливаются до цитотоксических уровней *in vivo* в терапевтически эффективной дозе. В некоторых вариантах осуществления композиции LNP не вызывают врожденный иммунный ответ, который приводит к существенным побочным эффектам на уровне терапевтической дозы. В некоторых вариантах осуществления композиции LNP, предложенные в данном документе, не вызывают токсичности на уровне терапевтической дозы.

В некоторых вариантах осуществления значение pdi может находиться в диапазоне от около 0,005 до около 0,75. В некоторых вариантах осуществления pdi может находиться в диапазоне от около 0,01 до

около 0,5. В некоторых вариантах осуществления pd_i может находиться в диапазоне от около нуля до около 0,4. В некоторых вариантах осуществления pd_i может находиться в диапазоне от около нуля до около 0,35. В некоторых вариантах осуществления pd_i может находиться в диапазоне от около нуля до около 0,35. В некоторых вариантах осуществления pd_i может находиться в диапазоне от около нуля до около 0,3. В некоторых вариантах осуществления pd_i может находиться в диапазоне от около нуля до около 0,25. В некоторых вариантах осуществления pd_i может находиться в диапазоне от около нуля до около 0,2. В некоторых вариантах осуществления pd_i может составлять менее чем около 0,08, 0,1, 0,15, 0,2 или 0,4.

Описанные в данном документе LNP имеют размер (например, Z-средний диаметр) от около 1 до около 250 нм. В некоторых вариантах осуществления LNP имеют размер от около 10 до около 200 нм. В дополнительных вариантах осуществления LNP имеют размер от около 20 до около 150 нм. В некоторых вариантах осуществления LNP имеют размер от около 50 до около 150 нм. В некоторых вариантах осуществления LNP имеют размер от около 50 до около 100 нм. В некоторых вариантах осуществления LNP имеют размер от около 50 до около 120 нм. В некоторых вариантах осуществления LNP имеют размер от около 60 до около 100 нм. В некоторых вариантах осуществления LNP имеют размер от около 75 до около 150 нм. В некоторых вариантах осуществления LNP имеют размер от около 75 до около 120 нм. В некоторых вариантах осуществления LNP имеют размер от около 75 до около 100 нм. Если не указано иное, все размеры, упомянутые в данном документе, представляют собой средние размеры (диаметры) полностью сформированных наночастиц, измеренные путем динамического рассеяния света на приборе Malvern Zetasizer. Образец наночастиц разбавляют в фосфатно-солевом буфере (PBS), так что интенсивность составляет приблизительно 200-400 килоимпульсов в секунду. Данные представлены в виде средневзвешенного показателя интенсивности (Z-средний диаметр).

В некоторых вариантах осуществления LNP образуются со средней эффективностью инкапсуляции в диапазоне от около 50 до около 100%. В некоторых вариантах осуществления LNP образуются со средней эффективностью инкапсуляции в диапазоне от около 50 до около 70%. В некоторых вариантах осуществления LNP образуются со средней эффективностью инкапсуляции в диапазоне от около 70 до около 90%. В некоторых вариантах осуществления LNP образуются со средней эффективностью инкапсуляции в диапазоне от около 90 до около 100%. В некоторых вариантах осуществления LNP образуются со средней эффективностью инкапсуляции в диапазоне от около 75 до около 95%.

В некоторых вариантах осуществления LNP образуются со средней молекулярной массой в диапазоне от около $1,00E+05$ г/моль до около $1,00E+10$ г/моль. В некоторых вариантах осуществления LNP образуются со средней молекулярной массой в диапазоне от около $5,00E+05$ г/моль до около $7,00E+07$ г/моль. В некоторых вариантах осуществления LNP образуются со средней молекулярной массой в диапазоне от около $1,00E+06$ г/моль до около $1,00E+10$ г/моль. В некоторых вариантах осуществления LNP образуются со средней молекулярной массой в диапазоне от около $1,00E+07$ г/моль до около $1,00E+09$ г/моль. В некоторых вариантах осуществления LNP образуются со средней молекулярной массой в диапазоне от около $5,00E+06$ г/моль до около $5,00E+09$ г/моль.

В некоторых вариантах осуществления осуществления полидисперсность (M_w/M_n ; соотношение среднемассовой молярной массы (M_w) к среднечисловой молярной массе (M_n)) может составлять от около 1,000 до около 2,000. В некоторых вариантах осуществления M_w/M_n может находиться в диапазоне от около 1,00 до около 1,500. В некоторых вариантах осуществления M_w/M_n может находиться в диапазоне от около 1,020 до около 1,400. В некоторых вариантах осуществления M_w/M_n может находиться в диапазоне от около 1,010 до около 1,100. В некоторых вариантах осуществления M_w/M_n может находиться в диапазоне от около 1,100 до около 1,350.

Способы конструирования клеток; сконструированные клетки.

Композиции LNP, описанные в данном документе, могут быть использованы в способах конструирования клеток посредством редактирования генов как *in vivo*, так и *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления способы включают приведение в контакт клетки с композицией LNP, описанной в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления способы включают приведение в контакт клетки с субъектом, таким как млекопитающее, такое как человек. В некоторых вариантах осуществления клетка находится в органе, таком как печень, такой как печень млекопитающего, такой как печень человека. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку печени, такую как клетка печени млекопитающего, такая как клетка печени человека. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой гепатоцит, такой как гепатоцит млекопитающего, такой как гепатоцит человека. В некоторых вариантах осуществления клетка печени представляет собой стволовую клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка печени человека может представлять собой синусоидальную эндотелиальную клетку печени (LSEC). В некоторых вариантах осуществления клетка печени человека может представлять собой клетку Купфера. В некоторых вариантах осуществления клетка печени человека может представлять собой звездчатую клетку печени. В некоторых вариантах осуществления клетка печени человека может представлять собой опухолевую клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка печени человека может представлять собой стволовую клетку печени. В дополнительных вариантах

осуществления клетка содержит АроЕ-связывающие рецепторы. В некоторых вариантах осуществления клетка печени, такая как гепатоцит, находится *in situ*. В некоторых вариантах осуществления клетку печени, такую как гепатоцит, выделяют, например, в культуре, такой как в первичной культуре. Также предложены способы, соответствующие применениям, раскрытым в данном документе, которые включают введение композиций LNP, описанных в данном документе, субъекту или приведение в контакт клетки, подобной описанным выше, с композициями LNP, описанными в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления предложены сконструированные клетки, например сконструированная клетка, полученная из любого типа клеток в предыдущем абзаце. Такие сконструированные клетки получают в соответствии со способами, описанными в данном документе. В некоторых вариантах осуществления сконструированная клетка находится внутри ткани или органа, например печени у субъекта.

В некоторых способах и клетках, описанных в данном документе, клетка содержит модификацию, например инсерцию или делецию (индел), или замену нуклеотидов в целевой последовательности. В некоторых вариантах осуществления модификация содержит вставку 1, 2, 3, 4 или 5 или более нуклеотидов в целевую последовательность. В некоторых вариантах осуществления модификация содержит вставку 1 или 2 нуклеотидов в целевую последовательность. В других вариантах осуществления модификация содержит делецию 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 или 25 или более нуклеотидов в целевой последовательности. В некоторых вариантах осуществления модификация содержит делецию 1 или 2 нуклеотидов в целевой последовательности. В некоторых вариантах осуществления модификация содержит индел, который приводит к мутации со сдвигом рамки считывания в целевой последовательности. В некоторых вариантах осуществления модификация содержит замену 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 или 25 или более нуклеотидов в целевой последовательности. В некоторых вариантах осуществления модификация содержит замену 1 или 2 нуклеотидов в целевой последовательности. В некоторых вариантах осуществления модификация содержит одну или более из вставки, делеции или замены нуклеотидов, возникающих в результате включения матричной нуклеиновой кислоты, например любой из матричных нуклеиновых кислот, описанных в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления предложена популяция клеток, содержащая сконструированные клетки, например популяция клеток, содержащая клетки, сконструированные в соответствии со способами, описанными в данном документе. В некоторых вариантах осуществления популяция содержит сконструированные клетки, культивируемые *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления популяция находится внутри ткани или органа, например печени у субъекта. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% или более клеток в популяции сконструированы. В определенных вариантах осуществления способ, описанный в данном документе, дает по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% эффективность редактирования (или "процент редактирования"), определяемую обнаружением инделов. В других вариантах осуществления способ, описанный в данном документе, дает по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% эффективности модификации ДНК, определяемой путем обнаружения изменения в последовательности, будь то вставка, делеция, замена или иное. В определенных вариантах осуществления способ, описанный в данном документе, приводит к уровню эффективности редактирования или уровню эффективности модификации ДНК от около 5 до около 100%, от около 10 до около 50%, от около 20 до около 100%, от около 20 до около 80%, от около 40 до около 100% или от около 40 до около 80% в клеточной популяции.

В некоторых способах и клетках, описанных в данном документе, клетки в популяции содержат модификацию, например индел или замену в целевой последовательности. В некоторых вариантах осуществления модификация содержит вставку 1, 2, 3, 4 или 5 или более нуклеотидов в целевую последовательность. В некоторых вариантах осуществления модификация содержит вставку 1 или 2 нуклеотидов в целевую последовательность. В других вариантах осуществления модификация содержит делецию 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 или 25 или более нуклеотидов в целевой последовательности. В некоторых вариантах осуществления модификация содержит делецию 1 или 2 нуклеотидов в целевой последовательности. В некоторых вариантах осуществления модификация приводит к мутации со сдвигом рамки считывания в целевой последовательности. В некоторых вариантах осуществления модификация содер-

жит индел, который приводит к мутации со сдвигом рамки считывания в целевой последовательности. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% или более сконструированных клеток в популяции содержат мутацию со сдвигом рамки считывания. В некоторых вариантах осуществления модификация содержит замену 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 или 25 или более нуклеотидов в целевой последовательности. В некоторых вариантах осуществления модификация содержит замену 1 или 2 нуклеотидов в целевой последовательности. В некоторых вариантах осуществления модификация содержит одну или более из вставки, делеции или замены нуклеотидов, возникающих в результате включения матричной нуклеиновой кислоты, например любой из матричных нуклеиновых кислот, описанных в данном документе.

Способы редактирования генов.

Композиции LNP, описанные в данном документе, могут быть использованы для редактирования генов *in vivo* и *in vitro*. В одном варианте осуществления одну или более композиций LNP, описанных в данном документе, можно вводить субъекту, нуждающемуся в этом. В одном варианте осуществления одна или более композиций LNP, описанных в данном документе, могут быть приведены в контакт с клеткой. В одном варианте осуществления терапевтически эффективное количество композиции, описанной в данном документе, может быть приведено в контакт с клеткой субъекта, нуждающегося в этом. В одном варианте осуществления генетически сконструированная клетка может быть получена путем приведения в контакт клетки с композицией LNP, описанной в данном документе. В различных вариантах осуществления способы включают введение матричной нуклеиновой кислоты в клетку или субъекту, как изложено выше.

В некоторых вариантах осуществления способы включают введение композиции LNP в клетку, связанную с заболеванием печени. В некоторых вариантах осуществления способы включают лечение заболевания печени. В определенных вариантах осуществления способы включают приведение в контакт клетки печени с композицией LNP. В определенных вариантах осуществления способы включают приведение в контакт гепатоцитов с композицией LNP. В некоторых вариантах осуществления способы включают приведение в контакт клетки, связывающей АроЕ, с композицией LNP.

В одном варианте осуществления композицию LNP, содержащую мРНК, кодирующую Cas-нуклеазу класса 2, и гРНК, можно вводить в клетку, такую как клетка, связывающая АроЕ. В дополнительных вариантах осуществления матричную нуклеиновую кислоту также вводят в клетку. В некоторых случаях композицию LNP, содержащую Cas-нуклеазу класса 2 и гРНК, можно вводить в клетку, такую как клетка, связывающая АроЕ. В одном варианте осуществления можно вводить в клетку композицию LNP, содержащую мРНК, кодирующую Cas-нуклеазу класса 2, гРНК и матрицу. В некоторых случаях композицию LNP, содержащую Cas-нуклеазу и гРНК, можно вводить в клетку печени. В некоторых случаях клетка печени находится в субъекте.

В определенных вариантах осуществления субъект может получать однократную дозу композиции LNP. В других примерах субъект может получать многократные дозы композиции LNP. В некоторых вариантах осуществления композицию LNP вводят 2-5 раз. Когда вводится более одной дозы, дозы можно вводить с интервалом в около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14, 21 или 28 суток; с интервалом в около 2, 3, 4, 5 или 6 месяцев; или с интервалом в около 1, 2, 3, 4 или 5 лет. В некоторых вариантах осуществления редактирование улучшается после повторного введения композиции LNP.

В одном варианте осуществления композицию LNP, содержащую мРНК, кодирующую Cas-нуклеазу, такую как Cas-нуклеаза класса 2, можно вводить в клетку отдельно от введения композиции, содержащей гРНК. В одном варианте осуществления композицию LNP, содержащую мРНК, кодирующую Cas-нуклеазу, такую как Cas-нуклеаза класса 2, и гРНК, можно вводить в клетку отдельно от введения матричной нуклеиновой кислоты в клетку. В одном варианте осуществления композицию LNP, содержащую мРНК, кодирующую Cas-нуклеазу, такую как Cas-нуклеаза класса 2, можно вводить в клетку с последующим последовательным введением композиции LNP, содержащей гРНК, а затем введением матрицы в клетку. В вариантах осуществления, в которых композицию LNP, содержащую мРНК, кодирующую Cas-нуклеазу, вводят перед композицией LNP, содержащей гРНК, введения могут быть разделены на около 4, 6, 8, 12 или 24 ч; или 2, 3, 4, 5, 6 или 7 суток.

В одном варианте осуществления композиции LNP можно использовать для редактирования гена, что приводит к нокауту гена. В одном варианте осуществления композиции LNP можно использовать для редактирования гена, приводящего к нокауту гена в популяции клеток. В другом варианте осуществления композиции LNP можно использовать для редактирования гена, что приводит к коррекции гена. В дополнительном варианте осуществления композиции LNP можно использовать для редактирования клетки, что приводит к вставке гена.

В одном варианте осуществления введение композиций LNP может приводить к редактированию генов, что приводит к стойкому ответу. Например, введение может приводить к продолжительности ответа в сутки, месяц, год или более. Используемый в данном документе термин "продолжительность ответа" означает, что после того, как клетки были отредактированы с использованием описанной в данном

документе композиции LNP, получающаяся в результате модификация все еще присутствует в течение определенного периода времени после введения композиции LNP. Модификация может быть обнаружена путем измерения уровней целевого белка. Модификация может быть обнаружена путем обнаружения целевой ДНК. В некоторых вариантах продолжительность ответа может составлять по меньшей мере 1 неделю. В других вариантах продолжительность ответа может составлять по меньшей мере 2 недели. В одном варианте осуществления продолжительность ответа может составлять по меньшей мере 1 месяц. В некоторых вариантах продолжительность ответа может составлять по меньшей мере 2 месяца. В одном варианте осуществления продолжительность ответа может составлять по меньшей мере 4 месяца. В одном варианте осуществления продолжительность ответа может составлять по меньшей мере 6 месяцев. В определенных вариантах осуществления продолжительность ответа может составлять около 26 недель. В некоторых вариантах осуществления продолжительность ответа может составлять по меньшей мере 1 год. В некоторых вариантах продолжительность ответа может составлять по меньшей мере 5 лет. В некоторых вариантах продолжительность ответа может составлять по меньшей мере 10 лет. В некоторых вариантах осуществления стойкий ответ обнаруживается через по меньшей мере 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 18, 21 или 24 месяца, или путем измерения уровней целевого белка или путем обнаружения целевой ДНК. В некоторых вариантах осуществления стойкий ответ обнаруживается через по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18 или 20 лет, или путем измерения уровней целевого белка или путем обнаружения целевой ДНК.

Композиции LNP можно вводить парентерально. Композиции LNP можно вводить непосредственно в кровоток, в ткань, в мышцу или во внутренний орган. Введение может быть системным, например, для инъекции или инфузии. Применение может быть местным. Подходящие пути для введения включают внутривенный, внутриартериальный, интратекальный, интравентрикулярный, интрауретральный, интратеральный, внутричерепной, субретинальный, интравитреальный, в переднюю камеру, внутримышечный, интрасиновиальный, интрадермальный и подкожный. Подходящие устройства для введения включают игольчатые (включая микроиглы) инъекторы, безыгольные инъекторы, осмотические насосы и инфузионные устройства.

Композиции LNP обычно, но не обязательно, вводят в виде состава в комбинации с одним или более фармацевтически приемлемыми наполнителями. Термин "вспомогательное вещество" включает в себя любой ингредиент, отличный от соединения(й) согласно данному описанию, другого(их) липидно-го(ых) компонента(ов) и биологически активного агента. вспомогательное вещество может придавать составу функциональную (например, регуляция скорости высвобождения лекарственного средства) и/или нефункциональную (например, технологическое вспомогательное вещество или разбавитель) характеристики. Выбор вспомогательного вещества будет в значительной степени зависеть от таких факторов, как конкретный способ введения, влияние вспомогательного вещества на растворимость и стабильность, а также природа дозированной формы.

Парентеральные составы обычно представляют собой водные или масляные растворы или суспензии. Когда состав является водным, вспомогательные вещества, такие как сахара (включая, но не ограничиваясь ими, глюкозу, маннит, сорбит и т.д.), соли, углеводы и буферные агенты (предпочтительно для pH от 3 до 9), но для некоторых применений они могут быть более подходящим образом составлены со стерильным неводным раствором или в виде высушенной формы для применения в комбинации с подходящим носителем, таким как стерильная апиrogenная вода (WFI).

Хотя изобретение описано в связи с проиллюстрированными вариантами осуществления, понятно, что они не предназначены для ограничения изобретения этими вариантами осуществления. Напротив, изобретение предназначено для охвата всех альтернатив, модификаций и эквивалентов, включая эквиваленты конкретных признаков, которые могут быть включены в изобретение, как определено в прилагаемой формуле изобретения.

Как вышеприведенное общее описание, так и подробное описание, а также следующие примеры являются только иллюстративными и пояснительными и не ограничивают данное описание. Заголовки разделов, используемые в данном документе, предназначены только для организационных целей и не должны рассматриваться как ограничивающие желаемый объект изобретения каким-либо образом. В случае, если любая литература, включенная посредством ссылки, противоречит любому термину, определенному в данном описании, приведенный в данном описании термин является превалирующим. Все диапазоны, указанные в мол.%, охватывают конечные точки, если не указано иное.

Следует отметить, что, как используется в данном изобретении, формы единственного числа включают ссылку на множественное число, если в контексте явно не указано иное. Таким образом, например, ссылка на "композицию" включает в себя множество композиций, а ссылка на "клетку" включает в себя множество клеток и тому подобное. Использование "или" является включающим и означает "и/или", если не указано иное.

Числовые диапазоны включают числа, определяющие диапазон. Измеряемые и измеримые значения считаются приблизительными с учетом значащих цифр и ошибки, связанной с измерением. Термин "около" или "приблизительно" означает приемлемую ошибку для конкретного значения, как определено специалистом в данной области техники, которая частично зависит от того, как измеряется или опреде-

ляется значение. Использование модификатора, такого как "около" перед диапазоном или перед перечнем значений, изменяет каждую конечную точку диапазона или каждое значение в перечне. "Около" также включает значение или конечную точку. Например, "около 50-55" охватывает "от около 50 до около 55". Кроме того, использование "содержат", "содержит", "содержащий", "состоят из", "состоит из", "состоящий из", "включают", "включает" и "включающий" не является ограничивающим.

Если специально не указано в приведенном выше описании, варианты осуществления в описании, которые упоминаются как "содержащие" различные компоненты, также рассматриваются как "состоящие из" или "состоящие по существу из" упомянутых компонентов; варианты осуществления в описании, которые упоминаются как "состоящие из" различных компонентов, также рассматриваются как "содержащие" или "состоящие по существу из" перечисленных компонентов; варианты осуществления в описании, в которых упоминается "о" различных компонентах, также рассматриваются как "в" перечисленных компонентах; и варианты осуществления в описании, которые упоминают слова "состоящие по существу из" различных компонентов, также рассматриваются как "состоящие из" или "содержащие" перечисленные компоненты (эта взаимозаменяемость не применяется к использованию этих терминов в формуле изобретения).

Примеры

Пример 1. Композиции LNP для редактирования *in vivo* у мышей.

Были получены препараты различных композиций LNP в малом масштабе для исследования их свойств. В анализах процентного редактирования в печени у мышей мРНК Cas9 и химически модифицированная гРНК, нацеленные на последовательность TTR мыши, были составлены в виде LNP с различными мол.% ПЭГ, мол.% Липида А и соотношениями N:P, как описано в табл. 2 ниже.

Таблица 2

Композиции LNP

LNP №	%мол. Липида А	%мол. ПЭГ-ДМГ	Соотношение N:P
(различные)	45	2, 2,5, 3, 4, 5	4,5
(различные)	45	2, 2,5, 3, 4, 5	6
(различные)	50	2, 2,5, 3, 4, 5	4,5
(различные)	50	2, 2,5, 3, 4, 5	6
(различные)	55	2, 2,5, 3, 4, 5	4,5
(различные)	55	2, 2,5, 3, 4, 5	6

На фиг. 1 составы LNP идентифицированы по оси X на основе их мол.% Липида А и соотношений N:P, помеченных как "% CL; N:P". Как указано в условных обозначениях к фиг. 1, концентрации ПЭГ-2к-ДМГ 2, 2,5, 3, 4 или 5 мол.% были составлены с (1) 45 мол.% Липида А; 4,5 N:P ("45; 4,5"); (2) 45 мол.% Липида А; 6 N:P ("45; 6"); (3) 50 мол.% Липида А; 4,5 N:P ("50; 4,5"); (4) 50 мол.% Липида А; 6 N:P ("50; 6"); (5) 55 мол.% Липида А; 4,5 N:P ("55; 4,5"); и (6) 55 мол.% Липида А; 6 N:P ("55; 6"). мол.% ДСФХ поддерживали постоянным на уровне 9 мол.%, и добавляли мол.% холестерина, чтобы довести баланс липидного компонента каждого состава до 100 мол.%. Каждый из 30 составов составляли, как описано ниже, и вводили в виде однократной дозы 1 мг на кг или 0,5 мг на кг доз суммарной РНК (фиг. 1А и фиг. 1В, соответственно).

Состав LNP - NanoAssemblr.

Компоненты липидных наночастиц растворяли в 100% этаноле с молярными соотношениями липидного компонента, приведенными выше. РНК-карго растворяли в 25 мМ цитрате, 100 мМ NaCl, pH 5,0, в результате чего концентрация РНК-карго составляла приблизительно 0,45 мг/мл. LNP составляли с молярным соотношением амнолипидов к фосфату РНК (N:P), равным около 4,5 или около 6, с массовым соотношением мРНК к гРНК, равным 1:1.

LNP были получены путем микрожидкостного смешивания растворов липидов и РНК с использованием настольного прибора Precision Nanosystems NanoAssemblr™ в соответствии с протоколом производителя. Соотношение водного и органического растворителя 2:1 поддерживали во время перемешивания с использованием дифференциальных скоростей потока. После смешивания LNP собирали, разбавляли водой (приблизительно 1:1 об./об.), выдерживали в течение 1 часа при комнатной температуре и дополнительно разбавляли водой (приблизительно 1:1 об./об.) перед конечной заменой буфера. Конечную замену буфера на 50 мМ Трис, 45 мМ NaCl, 5% (мас./об.) сахарозы, pH 7,5 (TSS) завершали с помощью колонок для обессоливания PD-10 (GE). При необходимости составы концентрировали центрифугированием с помощью центробежных фильтров Amicon с отсечением 100 кДа (Millipore). Полученную смесь затем фильтровали с использованием 0,2 мкм стерильного фильтра. Конечный LNP хранили при -80°C до дальнейшего применения.

Анализ составов.

Динамическое рассеяние света (DLS) используется для определения индекса полидисперсности

(pd_i) и размера LNP согласно данному описанию. DLS измеряет рассеяние света, возникающее в результате воздействия образца на источник света. PDI, как определено из измерений DLS, представляет собой распределение размера частиц (относительно среднего размера частиц) в популяции, причем совершенно однородная популяция имеет PDI, равный нулю.

Электрофетическое рассеяние света используется для определения поверхностного заряда LNP при заданном pH. Поверхностный заряд, или дзета-потенциал, является мерой величины электростатического отталкивания/притяжения между частицами в суспензии LNP.

Асимметричное фракционирование потока в поле потока - многоугловое рассеяние света (AF4-MALS) используется для разделения частиц в составе по гидродинамическому радиусу и затем последующего измерения молекулярных масс, гидродинамических радиусов и среднеквадратичных радиусов фракционированных частиц. Это позволяет оценивать молекулярно-массовое распределение и распределение частиц по размеру, а также вторичные характеристики, такие как построение Бурхарда-Штокмайера (соотношение среднеквадратичного значения (СКЗ) радиуса и гидродинамического радиуса во времени, которое указывает на внутреннюю плотность ядра частицы) и конформационную карту (логарифм СКЗ в зависимости от логарифма молекулярного веса, где угловой коэффициент полученной линейной аппроксимации дает степень компактности в зависимости от удлинения).

Анализ траекторий наночастиц (NTA, Malvern Nanosight) можно использовать для определения распределения частиц состава по размеру, а также концентрации частиц. Образцы LNP разбавляют соответствующим образом и наносят на микропрепарат. Камера регистрирует рассеянный свет, когда частицы медленно диффундируют через поле зрения. После записи видео при помощи анализа траекторий наночастиц обрабатывается видео, отслеживая пиксели и вычисляя коэффициент диффузии. Этот коэффициент диффузии может быть преобразован в гидродинамический радиус частицы. Прибор также подсчитывает количество отдельных частиц, подсчитанных в анализе, чтобы определить концентрацию частиц.

Криоэлектронная микроскопия (крио-ЭМ) может быть использована для определения размера частиц, морфологии и структурных характеристик LNP.

Анализ липидного состава LNP можно проводить с помощью жидкостной хроматографии с последующей детекцией заряженного аэрозоля (LC-CAD). Данный анализ может обеспечить сравнение фактического содержания липидов с теоретическим содержанием липидов.

Составы LNP анализируют на средний размер частиц, индекс полидисперсности (pd_i), общее содержание РНК, эффективность инкапсуляции РНК и дзета-потенциал. Составы LNP могут быть дополнительно охарактеризованы с помощью анализа липидов, AF4-MALS, NTA и/или крио-ЭМ. Средний размер частиц и полидисперсность измеряют с помощью динамического рассеяния света (DLS) с использованием прибора для определения DLS Malvern Zetasizer. Образцы LNP разбавляли в 30 раз в PBS перед измерением при помощи DLS. Наряду со среднечисловым диаметром и pd_i был приведен Z-средний диаметр, который является основанным на интенсивности показателем среднего размера частиц. Прибор Malvern Zetasizer также используется для измерения дзета-потенциала LNP. Образцы разбавляют 1:17 (50 мкл на 800 мкл) в ОДХ PBS, pH 7,4 перед измерением.

Анализ на основе флуоресценции (Ribogreen®, ThermoFisher Scientific) используется для определения концентрации общей РНК и свободной РНК. Эффективность инкапсуляции рассчитывается как (Общая РНК - Свободная РНК)/Общая РНК. Образцы LNP разбавляют соответствующим образом 1x буфером TE, содержащим 0,2% Тритон-Х 100, для определения общей РНК или 1x буфером TE для определения свободной РНК. Стандартные кривые получают с использованием исходного раствора РНК, используемого для составления композиций, и разводят в 1x буфере TE +/- 0,2% Тритон-Х 100. Затем добавляют разбавленный краситель RiboGreen® (в соответствии с инструкциями производителя) к каждому из стандартов и образцов и оставляют для инкубации в течение приблизительно 10 минут при комнатной температуре в отсутствие света. Микропланшетный ридер SpectraMax M5 (Molecular Devices) используется для считывания образцов с длинами волн возбуждения, отсечки и излучения, равными 488 нм, 515 нм и 525 нм, соответственно. Общую РНК и свободную РНК определяют по соответствующим стандартным кривым.

Эффективность инкапсуляции рассчитывается как (Общая РНК - Свободная РНК)/Общая РНК. Та же процедура может быть использована для определения эффективности инкапсуляции компонента на основе ДНК или карго, содержащего нуклеиновую кислоту. Для одноцепочечной ДНК можно использовать краситель Oligreen, а для двухцепочечной ДНК - краситель PicoGreen.

AF4-MALS используется для определения распределений по молекулярному весу молекулярной массы и размерам частиц, а также вторичных статистических данных из этих расчетов. LNP разбавляют соответствующим образом и вводят в разделяющий канал AF4 с использованием автосамплера ВЭЖХ, где они фокусируются, а затем элюируются экспоненциальным градиентом в поперечном потоке через канал. Вся жидкость приводится в действие насосом ВЭЖХ и прибором Wyatt Eclipse. Частицы, элюирующиеся из канала AF4, проходят через УФ-детектор, детектор многоугольного лазерного светорассеяния, детектор квазиупругого рассеяния света и дифференциальный рефрактометрический детектор. Не-

обработанные данные обрабатывают с использованием модели Дебая для определения молекулярной массы и СКЗ радиуса по сигналам детекторов.

Липидные компоненты в LNP количественно анализируют с помощью ВЭЖХ с присоединенным детектором заряженных аэрозолей (CAD). Хроматографическое разделение 4 липидных компонентов достигают с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ. CAD представляет собой разрушающий масс-детектор, который обнаруживает все нелетучие соединения, и сигнал является постоянным независимо от структуры аналита.

Карго мРНК Cas9 и гРНК.

Карго мРНК Cas9 получали путем транскрипции *in vitro*. Кэппированная и полиаденилированная мРНК Cas9, содержащая 1X NLS (SEQ ID NO: 48), была получена транскрипцией *in vitro* с использованием линейаризованной плазмидной ДНК-матрицы и РНК-полимеразы T7. Плазмидную ДНК, содержащую промотор T7 и поли(А/Т)-область из 100 нуклеотидов, линейаризовали путем инкубации при 37°C в течение 2 часов с XbaI в следующих условиях: 200 нг/мкл плазмиды, 2 ед/мкл XbaI (NEB), и 1x реакционный буфер. XbaI инактивировали нагреванием реакционной смеси при 65°C в течение 20 минут. Линейаризованную плазмиду очищали от фермента и буферных солей с использованием кремниевой спин-колонки Maxi Spin (Epoch Life Sciences) и анализировали в агарозном геле для подтверждения линейаризации. Реакционную смесь IVT для получения модифицированной мРНК Cas9 инкубировали при 37°C в течение 4 часов в следующих условиях: 50 нг/мкл линейаризованной плазмиды; 2 мМ каждого из GTP, ATP, CTP и N1-метил псевдо-UTP (Trilink); 10 мМ ARCA (Trilink); 5 ед/мкл T7 РНК-полимеразы (NEB); 1 ед/мкл ингибитора мышьяковой РНКазы (NEB); 0,004 ед/мкл неорганической пирофосфатазы E.coli (NEB); и 1x реакционный буфер. После 4-часовой инкубации добавляли ДНКазу TURBO (ThermoFisher) до конечной концентрации 0,01 ед/мкл и реакционную смесь инкубировали в течение дополнительных 30 минут для удаления матрицы ДНК. мРНК Cas9 очищали от фермента и нуклеотидов с использованием набора MegaClear Transcription Clean-up в соответствии с протоколом производителя (ThermoFisher). Альтернативно, мРНК Cas9 очищали методом осаждения LiCl.

В данном примере гРНК была химически синтезирована и получена от коммерческого поставщика. Последовательность sg282 представлена ниже с 2'-О-метильными модификациями и фосфоротиоатными связями, как представлено ниже (m=2'-OMe; * = фосфоротиоат):

mU*mU*mA*CAGCCACGUCUACAGCAGUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmA
 mUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAm
 AmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU.
 (SEQ ID NO:42).

LNP

Конечные LNP были охарактеризованы для определения эффективности инкапсуляции, индекса полидисперсности и среднего размера частиц согласно аналитическим методам, представленным выше.

LNP вводили мышам (однократная доза 1 мг/кг или 0,5 мг/кг) и выделяли геномную ДНК для анализа секвенированием нового поколения (NGS), как описано ниже.

Доставка LNP *in vivo*.

В каждом исследовании использовали самок мышей CD-1 в возрасте от 6 до 10 недель. Животных взвешивали и группировали в соответствии с массой тела для приготовления растворов для дозирования на основе средней массы в группе. LNP вводили через латеральную хвостовую вену в объеме 0,2 мл на животное (приблизительно 10 мл на килограмм массы тела). Животных обследовали на наличие нежелательных явлений приблизительно через 6 ч после введения дозы. Массу тела измеряли через двадцать четыре часа после введения, и животных подвергали эвтаназии в различные моменты времени обескровливанием посредством пункции сердца под изофлурановой анестезией. Кровь собирали в пробирки для отделения сыворотки или в пробирки, содержащие забуференный раствор цитрата натрия, для получения плазмы, как описано в данном документе. Для исследований, включающих редактирование *in vivo*, ткани печени отбирали из средней доли или из трех независимых долей (например, правой медиальной, левой медиальной и левой латеральной доли) у каждого животного для выделения и анализа ДНК.

Когорты мышей исследовали в отношении редактирования в печени с помощью секвенирования нового поколения (NGS) и уровней TTR в сыворотке (данные не представлены).

Анализ транстретина (TTR) методом ИФА.

Кровь отбирали и сыворотку выделяли, как указано. Общие уровни TTR в мышьяковой сыворотке определяли с использованием набора для ИФА на мышьяковой преальбумин (транстретин) (Aviva Systems Biology, кат. OKIA00111). Уровни TTR в сыворотке крови крыс измеряли с использованием специфического для крыс набора для ИФА (Aviva Systems Biology, номер OKIA00159 по каталогу) в соответствии с протоколом изготовления. Вкратце, сыворотки серийно разводили разбавителем для образца из набора до конечного разведения в 10000 раз. Этот разведенный образец затем добавляли в планшеты для ИФА, и затем анализ проводили в соответствии с указаниями.

Секвенирование NGS.

Вкратце, для количественного определения эффективности редактирования в целевом расположе-

ние в геноме была выделена геномная ДНК, и использовано глубокое секвенирование для выявления наличия вставок и делеций, введенных путем редактирования генов.

Праймеры для ПНР конструировали вокруг целевого сайта (например, TTR), и представляющую интерес область генома амплифицировали. Последовательности праймеров приведены ниже. Дополнительную ПЦР проводили в соответствии с протоколами производителя (Illumina) для добавления необходимых химических компонентов для секвенирования. Ампликоны секвенировали на приборе Illumina MiSeq. Чтения были выровнены в отношении эталонного генома человека (например, hg38) после исключения тех, которые имели низкие баллы качества. Полученные файлы, содержащие чтения, были сопоставлены с эталонным геномом (файлы BAM), где были выбраны чтения, которые перекрывали представляющую интерес целевую область, и было рассчитано количество чтений дикого типа по сравнению с количеством чтений, которые содержат вставку, замену или делецию.

Процент редактирования (например, "эффективность редактирования" или "процентное редактирование") определяется как общее количество чтений последовательности со вставками или делециями по отношению к общему количеству чтений последовательности, включая дикий тип.

На фиг. 1 показан процент редактирования в печени мыши, измеренный с помощью NGS. Как показано на фиг. 1A, когда вводится 1 мг на кг РНК, проценты редактирования *in vivo* составляют от около 20 до более 60% редактирования в печени. При дозе 0,5 мг на кг, фиг. 1B, наблюдали редактирование в печени от около 10 до 60%. В этом тесте *in vivo* на мышах все композиции эффективно доставляли мРНК Cas9 и гРНК в клетки печени, что свидетельствует о высокой активности CRISPR/Cas-нуклеазы в целевом сайте, измеренной с помощью NGS для каждой композиции LNP. LNP, содержащие 5% ПЭГ-липида, имели более низкую инкапсуляцию (данные не показаны) и несколько сниженную эффективность.

Пример 2. Анализ композиции LNP.

Аналитическая характеристика LNP демонстрирует улучшенные физико-химические параметры для LNP, составленных с увеличением количества Липида А и ПЭГ-липида. Композиции, которые содержат 2 мол.% или 3 мол.% ПЭГ-липида (ПЭГ2к-ДМГ), представлены в табл. 3 ниже.

Таблица 3

	LNP898	LNP897	LNP966	LNP969
CL/холестерин/ДСФХ/ПЭГ (теоретический %мол.)	45/44/9/2	45/43/9/3	50/38/9/3	55/33/9/3
мРНК	Cas9 SEQ ID NO:48	Cas9 SEQ ID NO:48	Cas9 U-dep SEQ ID NO:43	Cas9 U-dep SEQ ID NO:43
гРНК	G502 SEQ ID NO:70	G502 SEQ ID NO:70	G534 SEQ ID NO:72	G534 SEQ ID NO:72
N/P	4,5	4,5	6,0	6,0

Состав LNP - Поперечный поток.

LNP были получены путем струйного смешивания с соударением липида в этаноле с двумя объемами растворов РНК и одним объемом воды. Липид в этаноле смешивают через узел смешивания с двумя объемами раствора РНК. Четвертый поток воды смешивается с выходным потоком узла через Т-образное соединение. (См. WO 2016010840 на фиг. 2). LNP поддерживали при комнатной температуре в течение 1 часа, а затем дополнительно разбавляли водой (приблизительно 1:1 об./об.). Разбавленные LNP концентрировали, используя тангенциальную поточную фильтрацию, на картридже с плоским листом (Sartorius, НОММ 100 кДа) и затем заменяли буфер путем диафильтрации на 50 мМ Трис, 45 мМ NaCl, 5% (мас./об.) сахарозы, pH 7,5 (TSS). Альтернативно, последний обмен буфера в TSS был завершён с помощью колонок для обессоливания PD-10 (GE). При необходимости составы концентрировали центрифугированием с помощью центробежных фильтров Amicon с отсечением 100 кДа (Millipore). Полученную смесь затем фильтровали с использованием 0,2 мкм стерильного фильтра. Конечный LNP хранили при 4°C или -80°C до дальнейшего применения.

мРНК Cas9 и гРНК получали, как в примере 1, за исключением того, что кэппированная и полиаденилированная U-обедненная мРНК Cas9 (Cas9 Udep) содержит SEQ ID N: 43. Sg282 описана в примере 1, и последовательность для sg534 ("G534") представлена ниже:

mA*mC*mG*CAAAUAUCAGUCCAGCGUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmA
mUmAmGmCAAGUUA AAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmA
AmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU (SEQ
ID NO:72)

Составы LNP анализировали на средний размер частиц, полидисперсность (pdi), содержание общей РНК и эффективность инкапсуляции РНК, как описано в примере 1.

Анализ среднего размера частиц, полидисперсности (PDI), содержания общей РНК и эффективности инкапсуляции РНК приведен в табл. 4. В дополнение к теоретическим концентрациям липидов в композициях LNP, анализ липидов продемонстрировал фактические уровни содержания липидов в мол.%, как указано в табл. 5 ниже.

Таблица 4

LNP ИН №	N/P	Z-сред. (нм)	PDI	Среднечисл. (нм)	Конц. РНК (мг/мл)	Инкапс. (%)
LNP898	4,5	87,91	0,030	71,33	1,53	98
LNP897	4,5	74,05	0,036	58,55	1,43	98
LNP966	6,0	82,78	0,010	67,86	2,12	98
LNP969	6,0	92,97	0,042	75,52	2,09	97

Таблица 5

LNP ИН №	Соотношение липидов (Липид А/холест./ ДСФХ/ПЭГ) (теоретическое и фактическое)	Липид А, мг/мл (теоретическая и фактическая)	Холест., мг/мл (теоретическая и фактическая)	ДСФХ, мг/мл (теоретическая и фактическая)	ПЭГ, мг/мл (теоретическая и фактическая)
LNP8 98	45/44/9/2 46,1/42,6/9,2/2	18,0 18,3	8,0 7,7	3,3 3,4	2,3 2,4
LNP8 97	45/43/9/3 44,8/42,9/9,2/3,1	18,0 17,8	7,8 7,7	3,3 3,4	3,5 3,6
LNP9 66	50/38/9/3 50,0/38,0/8,8/3,1	33,4 35,6	11,5 12,3	5,6 5,8	5,8 6,5
LNP9 69	55/33/9/3 54,8/33,2/8,8/3,2	33,4 31,6	9,1 8,7	5,1 4,7	5,3 5,4

Для дальнейшего анализа физико-химических свойств LNP897, LNP898, LNP966 и LNP969 были подвергнуты анализу методом асимметричного фракционирования потока в поле потока - многоугольного рассеяния света (AF4-MALS). Прибор AF4-MALS измеряет распределение частиц по размеру и молекулярной массе и обеспечивает информацию о конформации и плотности частиц.

LNP вводят в разделяющий канал AF4 с использованием автосамплера ВЭЖХ, где они фокусируются, а затем элюируются экспоненциальным градиентом в поперечном потоке через канал. Вся жидкость приводится в действие насосом ВЭЖХ и прибором Wyatt Eclipse. Частицы, элюирующиеся из канала AF4, проходят через УФ-детектор, детектор многоугольного лазерного светорассеяния Wyatt Heleos II, детектор квазиупругого рассеяния света и дифференциальный рефрактометрический детектор Wyatt Optilab T-rEX. Необработанные данные обрабатывают в программном обеспечении Wyatt Astra 7 с использованием модели Дебая для определения молекулярной массы и СКЗ радиуса из сигналов детектора.

График логарифмической производной молярной массы для LNP приведен на фиг. 2А. Вкратце, по оси X указана молярная масса (г/моль), а по оси Y указана производная мольной доли. График логарифмической производной молярной массы демонстрирует распределение различных молекулярных масс, измеренных для конкретной композиции. Это дает данные о моде молекулярных масс, а также общем распределении молекулярных масс в составе, что обеспечивает лучшую картину гетерогенности частиц, чем средняя молекулярная масса.

Гетерогенность различных составов LNP определяют путем измерения молярной массы в различ-

ные моменты и вычисления соотношения средневзвешенной молярной массы (M_w) к среднечисловой молярной массе (M_n) с получением полидисперсности M_w/M_n . График полидисперсности для этих различных составов представлен на фиг. 2B.

Данные демонстрируют более плотное распределение частиц с 3 мол.% ПЭГ и с 50 и 55 мол.% Липидом А при N/P 6,0, как показано на фиг. 2A. Это отражается в плотной полидисперсности, как показано на фиг. 2B.

Пример 3. Данные AF4 MALS - Дополнительные составы.

Аналитическая характеристика LNP демонстрирует улучшенные физико-химические параметры в LNP, составленных с увеличением количества липида А. Композиции, которые содержат или 45 мол.%, 50 мол.% или 55 мол.% Липида А с двумя разными гРНК, представлены в табл. 6 ниже.

Таблица 6

	LNP1021	LNP1022	LNP1023	LNP1024	LNP1025
CL/холестерин/ДСФХ/ПЭГ (теоретический %мол.)	50/38/9/3	55/33/9/3	45/43/9/3	50/38/9/3	55/33/9/3
мРНК	Cas9 Udep SEQ ID NO:43				
гРНК	G502 SEQ ID NO:70	G502 SEQ ID NO:70	G502 SEQ ID NO:70	G509 SEQ ID NO:71	G509 SEQ ID NO:71
N/P	6,0	6,0	4,5	6,0	6,0

LNP были составлены, как описано в примере 2.

мРНК Cas9 и гРНК получали, как описано выше.

Композиции LNP были охарактеризованы для определения эффективности инкапсуляции, индекса полидисперсности и среднего размера частиц, как описано в примере 1.

Анализ среднего размера частиц, полидисперсности (PDI), содержания общей РНК и эффективности инкапсуляции РНК приведен в табл. 7. В дополнение к теоретическим концентрациям липидов в композициях LNP, анализ липидов продемонстрировал фактические уровни содержания липидов в мол.%, как указано в табл. 8 ниже.

Таблица 7

LNP ИН №	N/P	Z-сред. (нм)	PDI	Среднечисл. (нм)	Конц. РНК (мг/мл)	Инкапс. (%)
LNP1021	6,0	83,18	0,027	67,15	1,63	98
LNP1022	6,0	94,08	0,005	78,28	1,60	97
LNP1023	4,5	74,01	0,017	61,11	1,61	97
LNP1024	6,0	85,37	0,002	70,42	1,59	97
LNP1025	6,0	94,47	0,018	77,71	1,60	98

Таблица 8

LNP ИН №	Соотношение липидов (Липид А/холест./ ДСФХ/ПЭГ) (теоретическое и фактическое)	Липид А, мг/мл (теоретическ ая и фактическая)	Холест., мг/мл (теоретическ ая и фактическая)	ДСФХ, мг/мл (теоретическ ая и фактическая)	ПЭГ, мг/мл (теоретическ ая и фактическая)
LNP1 021	50/38/9/3 50,9/37,4/8,6/3, 1	23,6 21,6	8,1 7,2	3,9 3,4	4,1 3,8
LNP1 022	55/33/9/3 55,2/33,0/8,7/3, 1	23,6 20,4	6,4 5,5	3,6 3,0	3,7 3,4
LNP1 023	45/43/9/3 45,9/42,4/8,6/3, 1	17,7 15,3	7,7 6,4	3,3 2,7	3,4 3,0
LNP1 024	50/38/9/3 50,5/37,9/8,5/3, 0	23,6 22,4	8,1 7,6	3,9 3,5	4,1 3,9
LNP1 024	55/33/9/3 55,5/33,1/8,5/3, 0	23,6 21,3	6,4 5,8	3,6 3,0	3,7 3,4

Для дальнейшего анализа физико-химических свойств LNP1021, LNP1022, LNP1023, LNP1024 и LNP1025 были подвергнуты анализу методом асимметричного фракционирования потока в поле потока - многоугольного рассеяния света (AF4-MALS). Прибор AF4-MALS измеряет распределение частиц по размеру и молекулярной массе и обеспечивает информацию о конформации и плотности частиц.

LNP исследовали при помощи AF4-MALS, как описано в примере 1.

График логарифмической производной молярной массы для LNP приведен на фиг. 3А. Вкратце, по оси X указана молярная масса (г/моль), а по оси Y указана производная мольной доли. График логарифмической производной молярной массы демонстрирует распределение различных молекулярных масс, рассчитанных для конкретной композиции. Это дает данные о моде молекулярных масс, а также общем распределении молекулярных масс в составе, что обеспечивает лучшую картину гетерогенности частиц, чем средняя молекулярная масса.

Средняя молекулярная масса приведена на фиг. 3В. Средняя молекулярная масса является средней по всему распределению, но не дает информации о форме этого распределения. LNP1022 и LNP1025 имеют одинаковую среднюю молекулярную массу, но LNP1022 имеет немного более широкое распределение.

Гетерогенность различных составов LNP рассчитывают путем определения молярной массы в различные моменты и вычисления соотношения средневзвешенной молярной массы (M_w) к среднечисловой молярной массе (M_n) с получением полидисперсности M_w/M_n . График полидисперсности для этих различных составов представлен на фиг. 4А.

Кроме того, построение Бурхарда-Штокмайера для составов LNP представлено на фиг. 4В. Построение Бурхарда-Штокмайера демонстрирует СКЗ радиуса к гидродинамическому радиусу при элюировании состава из канала AF4. Это дает информацию о внутренней плотности липидных наночастиц. На фиг. 4В показано, что LNP1021, LNP1022 и LNP1023 имеют в этом измерении разные профили.

Пример 4. Увеличенное содержание ПЭГ-липидов поддерживает эффективность при уменьшенном цитокиновым ответом.

В другом исследовании липид ПЭГ-ДМГ сравнивали в составах LNP, содержащих 2 мол.% или 3 мол.% ПЭГ-липидов. Композиции, которые содержат или 2 мол.%, или 3 мол.% ПЭГ-ДМГ, представлены в табл. 9 ниже.

Таблица 9

	LNP809	LNP810
CL/холестерин/ДСФХ/ПЭГ (теоретический %мол.)	45/44/9/2	45/43/9/3
мРНК	Cas9 SEQ ID NO:48	Cas9 SEQ ID NO:48
гРНК	G390	G390
	SEQ ID NO:69	SEQ ID NO:69
N/P	4,5	4,5

LNP были получены способом, описанным в примере 2. мРНК Cas9 и гРНК получали, как в примере 1, с последовательностью sg390 (G390), представленной ниже:

mG*mC*mC*mC*GAGUCUGGAGAGCUGCAGUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmA
mUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmA
AmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU (SEQ
ID NO:69).

Составы LNP анализировали на средний размер частиц, полидисперсность (pdi), содержание общей РНК и эффективность инкапсуляции РНК, как описано в примере 1.

Анализ среднего размера частиц, полидисперсности (PDI), содержания общей РНК и эффективности инкапсуляции РНК приведен в табл. 10. В дополнение к теоретическим концентрациям липидов в композициях LNP, анализ липидов продемонстрировал фактические уровни содержания липидов в мол.%, как указано в табл. 11 ниже.

Таблица 10

LNP ИН №	N/P	Z-сред. (нм)	PDI	Среднечисл. (нм)	Конц. РНК (мг/мл)	Инкапс. (%)
LNP809	4,5	89,85	0,060	72,10	2,45	97
LNP810	4,5	75,26	0,025	61,17	2,14	97

Таблица 11

LNP ИН №	Соотношение липидов (Липид А/холест./ ДСФХ/ПЭГ) (теоретическое и фактическое)	Липид А, мг/мл (теоретическ ая и фактическая)	Холест., мг/мл (теоретическ ая и фактическая)	ДСФХ, мг/мл (теоретическ ая и фактическая)	ПЭГ, мг/мл (теоретическ ая и фактическая)
LNP8 09	45/44/9/2 45,7/43,3/9,0/2, 1	28,6 30,5	12,7 13,1	5,3 5,6	3,7 4,0
LNP8 10	45/43/9/3 45,0/42,3/9,7/3, 0	25,2 24,7	10,9 10,5	4,7 4,9	4,9 4,7

Цитокины сыворотки крови крыс оценивали при помощи мультиплексного анализа с использованием магнитных гранул Luminex (анализ магнитных гранул Milliplex MAP от Millipore Sigma, номер RE-CYTMA6-65K по каталогу) с анализом MCP-1, ИЛ-6, ФНО-альфа и ИФН-гамма. Гранулы для анализа считывали на BioRad BioPlex-200, и концентрации цитокинов рассчитывали по стандартной кривой, используя 4-параметрическую логистическую регрессию с программным обеспечением BioPlex Manager версии 6.1. Данные представлены на фиг. 5. См. фиг. 5А (сывороточный TTR), фиг. 5В (редактирование в печени) и фиг. 5С (цитокин р MCP1).

Уровни TTR в сыворотке крови крыс измеряли с использованием специфического для крыс набора для ИФА (Aviva Systems Biology, номер OKIA00159 по каталогу) в соответствии с протоколом изготовления. Вкратце, сыворотки серийно разводили разбавителем для образца из набора до конечного разведения в 10000 раз. Этот разведенный образец затем добавляли в планшеты для ИФА, и затем анализ проводили в соответствии с указаниями.

Геномную ДНК выделяли из приблизительно 10 мг ткани печени и анализировали с использованием NGS, как описано выше. Последовательности праймеров для ПЦР для амплификации описаны ниже.

На фиг. 5A и фиг. 5B показано, что нокдаун TTR в сыворотке и редактирование в печени были достаточными при составах с 2 мол.% и 3 мол.% ПЭГ. На Фиг. 5C показано, что ответ MCP-1 уменьшается с использованием составов с 3 мол.% ПЭГ.

Пример 5. Доставка LNP приматам, не являющимся людьми

Три исследования были проведены с составами LNP, полученными, как описано в примере 1. Конкретные молярные количества и карго приведены в таблицах 12-26. Каждая композиция, содержащая мРНК Cas9 и гидовую РНК (гРНК), имела соотношение мРНК:гРНК 1:1 по массе. Дозы LNP (в мг/кг, содержание общей РНК), способ введения и получение животными предварительного лечения дексаметазоном указаны в таблицах. Для животных, получающих предварительное лечение дексаметазоном (Dex), Dex вводили в дозе 2 мг/кг внутривенной болюсной инъекцией за 1 час до введения LNP или введения носителя.

Для анализа химического состава крови отбирали у животных кровь в моменты времени, указанные в таблицах ниже, для каждого измеряемого фактора. Индукцию цитокинов измеряли до и после обработки NHP. Минимум 0,5 мл цельной крови собирали из периферической вены обездвиженных, бодрствующих животных в пробирку для разделения сыворотки объемом 4 мл. Крови позволяли сворачиваться в течение как минимум 30 минут при комнатной температуре с последующим центрифугированием при 2000 xg в течение 15 минут. Сыворотку аликвотировали в 2 полипропиленовые микропробирки по 120 мкл каждая и хранили при температуре от -60 до -86°C до анализа. Для анализа использовали нестандартный набор U-Plex Cytokine для приматов, отличных от людей, от Meso Scale Discovery (MSD). Следующие параметры были включены в анализ ИФН-гамма, ИЛ-1b, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-12p40, MCP-1 и ФНО-альфа, уделяя особое внимание ИЛ-6 и MCP-1. Реагенты и стандарты набора готовили в соответствии с указаниями в протоколе производителя. Сыворотку NHP использовали в чистом виде. Планшеты считывали на MSD Sector Imager 6000 и анализировали с помощью программного обеспечения MSD Discovery Workbench версии 4012.

Уровни комплемента измеряли у животных до и после лечения при помощи иммуноферментного анализа. Цельную кровь (0,5 мл) собирали из периферической вены обездвиженных, бодрствующих животных в пробирку, содержащую 0,5 мл ЭДТА-K₂-Кровь центрифугировали при 2000 xg в течение 15 минут. Плазму аликвотировали в 2 полипропиленовые микропробирки по 120 мкл каждая и хранили при температуре от -60 до -86°C до анализа. Для анализа использовали набор EIA Quidel MicroVue Complement Plus (C3a -кат. № A031) или (Bb-кат. № A027). Реагенты и стандарты набора получали в соответствии с указаниями в протоколе производителя. Планшеты считывали на MSD Sector Imager 6000 при оптической плотности 450 нм. Результаты были проанализированы с использованием 4-параметрической логистической регрессии.

Данные для индукции цитокинов и активации комплемента представлены в таблицах ниже. "BLQ" означает ниже предела количественного определения.

Исследование 1

Группа лечения	Молярные соотношения (Липид А, холестерин, ДСФХ и ПЭГ2к-ДМГ, соответственно)	N:P	Карго	Объем выборки (n)	Способ введения	Уровень дозы, содержание общей РНК (мг/кг)	Дексаметазон
(1) TSS (носитель)	н/д	н/д	н/д	3	в/в - инфузия	н/д	нет
(2) LNP699 G502	45/44/9/2	4,5	мРНК Cas9 (SEQ ID NO:2); G000502	3	в/в - инфузия	3	нет
(3) LNP688 G506	45/44/9/2	4,5	мРНК Cas9 (SEQ ID NO:2); G000506	3	в/в - инфузия	3	нет
(4) LNP689 G509	45/44/9/2	4,5	мРНК Cas9 (SEQ ID NO:2); G000509	3	в/в - инфузия	3	нет
(5) LNP690 G510	45/44/9/2	4,5	мРНК Cas9 (SEQ ID NO:2); G000510	3	в/в - инфузия	3	нет

Исследование 2

Группа лечения	Молярные соотношения (Липид А, холестерин, ДСФХ и ПЭГ2к-ДМГ, соответственно)	N:P	Карго	Объем выборки (n)	Способ введения	Уровень дозы, содержание общей РНК (мг/кг)	Дексаметазон
(1) TSS (носитель)	н/д	н/д		1	в/в - болюс	н/д	да
(2) TSS (носитель)	н/д	н/д		1	в/в - болюс	н/д	нет
(3) LNP898 G502	45/44/9/2	4,5	мРНК Cas9 (SEQ ID NO:2); G000502	1	в/в - инфузия	3	да
(4)	45/44/9/2	4,5	мРНК	1	в/в -	3	нет

LNP898 G502			Cas9 (SEQ ID NO:2); G000502		инфузи я		
(5) LNP897 G502	45/43/9/3	4,5	мРНК Cas9 (SEQ ID NO:2); G000502	1	в/в - болюс	3	да
(6) LNP897 G502	45/43/9/3	4,5	мРНК Cas9 (SEQ ID NO:2); G000502	1	в/в - болюс	3	нет
(7) LNP897 G502	45/43/9/3	4,5	мРНК Cas9 (SEQ ID NO:2); G000502	1	в/в - инфузи я	3	да
(8) LNP897 G502	45/43/9/3	4,5	мРНК Cas9 (SEQ ID NO:2); G000502	1	в/в - инфузи я	3	нет
(9) LNP916 GFP	45/43/9/3	4,5	мРНК eGFP (SEQ ID NO:)	1	в/в - инфузи я	6	да
(10) LNP916 GFP	45/43/9/3	4,5	мРНК eGFP (SEQ ID NO:)	1	в/в - инфузи я	6	нет

Таблица 14

Исследование 3

Группа лечения	Молярные соотношения	N:P	Карго	Объем выбор	Спос об	Уровень дозы,	Декс амет
-------------------	-------------------------	-----	-------	----------------	------------	------------------	--------------

	(Липид А, холестерин, ДСФХ и ПЭГ2к- ДМГ, соответственно			ки (п)	введе ния	содержа ние общей РНК (мг/кг)	азон
(1) TSS	н/д	н/д	н/д	3	в/в - болю с	н/д	нет
(2) LNP1021 G502	50/38/9/3	6	мРНК Cas9 (SEQ ID NO:1); G00050 2	3	в/в - болю с	1	нет
(3) LNP1021 G502	50/38/9/4	6	мРНК Cas9 (SEQ ID NO:1); G00050 2	1	в/в - болю с	1	да
(4) LNP1022 G502	55/33/9/3	6	мРНК Cas9 (SEQ ID NO:1); G00050 2	3	в/в - болю с	1	нет
(5) LNP1023 G502	45/43/9/3	4,5	мРНК Cas9 (SEQ ID NO:1); G00050	3	в/в - болю с	3	нет

			2				
(6) LNP1024 G509	50/38/9/3	6	МРНК Cas9 (SEQ ID NO:1); G00050 9	3	в/в - болю с	1	нет
(7) LNP1024 G509	50/38/9/4	6	МРНК Cas9 (SEQ ID NO:1); G00050 9	1	в/в - болю с	1	да
(8) LNP1025 G509	55/33/9/3	6	МРНК Cas9 (SEQ ID NO:1); G00050 9	3	в/в - болю с	1	нет
(9) LNP1021 G502	50/38/9/3	6	МРНК Cas9 (SEQ ID NO:1); G00050 2	1	в/в - болю с	3	нет
(10) LNP1022 G502	50/38/9/3	6	МРНК Cas9 (SEQ ID NO:1); G00050	1	в/в - болю с	3	нет
			2				

Таблица 15

Измерения ИЛ-6 из исследования 1

Группа лечения	Предварительный забор крови	6 ч	24 ч
(1) TSS (носитель)	5,71±2,70	29,1±20,37	7,05±3,49
(2) LNP699 G502	9,73±8,34	1296,41±664,71	5,43±7,68
(3) LNP688 G506	16,83±4,08	1749,47±1727,22	38,57±39,39
(4) LNP689 G509	18,11±11,51	1353,49±766,66	32,42±18,40
(5) LNP690 G510	13,95±1,85	11838±17161,74	90,07±96,02

Таблица 16

Измерения МСР-1 из исследования 1

Группа лечения	Предварительный забор крови	6 ч	24 ч
(1) TSS (носитель)	810,49±178,27	1351,16±397,31	745,25±56,49
(2) LNP699 G502	842,31±350,65	19298,49±11981,14	2092,89±171,21
(3) LNP688 G506	1190,79±383,64	13500,17±12691,60	1414,71±422,43
(4) LNP689 G509	838,63±284,42	14427,7±8715,48	1590±813,23
(5) LNP690 G510	785,32±108,97	52557,24±48034,68	6319,77±983,37

Таблица 17

Измерения комплемента С3а из исследования 1

Группа лечения	Предварительный забор крови	6 ч	7 сутки
(1) TSS (носитель)	23,9±11,95	25,51±14,79	30,67±18,36
(2) LNP699 G502	32,36±11,29	94,33±58,45	38,50±12,69
(3) LNP688 G506	22,30±1,73	127,00±22,34	37,80±6,86
(4) LNP689 G509	35,83±21,94	174,00±44,51	50,83±21,92
(5) LNP690 G510	36,30±8,21	163,00±40,60	42,50±12,44

Таблица 18

Измерения комплемента bb из исследования 1

Группа лечения	04-bb	Предварительный забор крови	6 ч	7 сутки
(1) TSS (носитель)	Контроль	1,53±0,19	3,37±2,13	1,43±0,71
(2) LNP699 G502	G502	1,45±0,39	9,01±5,28	1,57±0,54
(3) LNP688 G506	G506	1,45±0,78	11,78±2,33	1,78±0,84
(4) LNP689 G509	G509	1,95±0,99	15,73±2,23	2,83±0,88
(5) LNP690 G510	G510	2,12±0,44	13,57±1,23	2,21±0,72

Таблица 19

Измерения ИЛ-6 из исследования 2

Группа лечения	Предварительный забор крови	90 мин	6 ч	24 ч	7 сутки
(1) TSS (носитель)	1,77	11,46	4,2	2,76	3,01
(2) TSS (носитель)	5,23	18,11	20,36	13,2	6,36
(3) LNP898 G502	2,02	1305,75	1138,22	383,32	16,02
(4) LNP898 G502	2,34	37,19	91,59	14,11	3,07
(5) LNP897 G502	2,1	55,79	6,89	2,26	2,01
(6) LNP897 G502	6,8	10,1	44,72	5,4	2,01
(7) LNP897 G502	1,97	44,87	32,61	2,97	1,11
(8) LNP897 G502	3,14	37,68	73,41	8,58	2,22
(9) LNP916 GFP	1,6	BLQ	95,32	27,58	BLQ
(10) LNP916 GFP	2,43	BLQ	883,01	66,71	BLQ

Таблица 20

Измерения МСР-1 из исследования 2

Группа лечения	Предварительный забор крови	90 мин	6 ч	24 ч	7 сутки
(1) TSS (носитель)	312,12	197,24	145,36	177,02	403,82

(2) TSS (носитель)	232,44	175,08	187,72	136,64	325,69
(3) LNP898 G502	249,1	2183,5	1814,64	1887,41	372,38
(4) LNP898 G502	349,51	430,49	5635,55	953,05	236,6
(5) LNP897 G502	492,3	989,98	409,08	302,97	506,82
(6) LNP897 G502	283,79	225,1	1141,08	484,59	259,46
(7) LNP897 G502	223,16	349,79	398,57	172,67	287,09
(8) LNP897 G502	584,42	853,51	3880,81	1588,46	692,99
(9) LNP916 GFP	325,84	BLQ	1189,97	2279,82	BLQ
(10) LNP916 GFP	175,47	BLQ	3284,16	2023,53	BLQ

Таблица 21

Измерения комплемента C3a из исследования 2

Группа лечения	Предварительный забор крови	90 мин	6 ч	24 ч	7 сутки
(1) TSS (носитель)	0,087	0,096	0,048	0,033	0,038
(2) TSS (носитель)	0,369	0,311	0,146	0,1	0,106
(3) LNP898 G502	0,087	0,953	0,647	0,277	0,065
(4) LNP898 G502	0,099	0,262	0,123	0,049	0,044
(5) LNP897 G502	0,067	0,479	0,209	0,036	0,036
(6) LNP897 G502	0,141	0,433	0,34	0,11	0,074
(7) LNP897 G502	0,1	0,345	0,396	0,096	0,127
(8) LNP897 G502	0,261	0,458	0,409	0,244	0,313
(9) LNP916 GFP	0,149	BLQ	0,714	0,382	BLQ
(10) LNP916 GFP	0,117	BLQ	0,752	0,723	BLQ

Таблица 22

Измерения комплемента bb из исследования 2

Группа лечения	Предварительный забор крови	90 мин	6 ч	24 ч	7 сутки
(1) TSS (носитель)	0,087	0,096	0,048	0,033	0,038
(2) TSS (носитель)	0,369	0,311	0,146	0,1	0,106
(3) LNP898 G502	0,087	0,953	0,647	0,277	0,065
(4) LNP898 G502	0,099	0,262	0,123	0,049	0,044
(5) LNP897 G502	0,067	0,479	0,209	0,036	0,036
(6) LNP897 G502	0,141	0,433	0,34	0,11	0,074
(7) LNP897 G502	0,1	0,345	0,396	0,096	0,127
(8) LNP897 G502	0,261	0,458	0,409	0,244	0,313
(9) LNP916 GFP	0,149	BLQ	0,714	0,382	BLQ
(10) LNP916 GFP	0,117	BLQ	0,752	0,723	BLQ

Таблица 23

Измерения ИЛ-6 из исследования 3

Группа лечения	Предварительный забор крови	90 мин	6 ч	24 ч	7 сутки
(1) TSS	1,89±0,97	2,56±1,41	0,90±0,71	BLQ	0,08
(2) LNP1021 G502	210±0,35	7,44±5,16	6,94±8,45	1,07±1,11	1,76±0,98
(3) LNP1021 G502	0,79	2,96	4,25	0,67	0,27
(4) LNP1022 G502	1,54±1,32	20,42±31,6 0	13,94±10,1 0	0,98±0,41	2,04±0,65
(5) LNP1023 G502	2,92±1,68	6,28±7,18	6,06±2,31	3,62±4,68	2,00±1,21
(6) LNP1024 G509	1,43±0,62	2,64±1,92	7,72±11,96	0,45±0,19	0,88±0,79
(7) LNP1024 G509	1,35±0,74	2,64±2,35	1,71±0,41	0,36±0,58	0,51±0,32
(8) LNP1025 G509	1,64	2,68	25,65	0,58	2,00
(9) LNP1021 G502	0,56	6,15	28,80	0,85	0,61
(10) LNP1022 G502	1,76	8,66	2907,86	11,26	1,72

Измерения МСР-1 из исследования 2

Группа лечения	Предварительный забор крови	90 мин	6 ч	24 ч	7 сутки
(1) TSS	204,01±46,39	197,62±19,54	310,84±45,87	179,07±20,77	234,61±71,79
(2) LNP1021 G502	303,67±36,37	337,63±195,18	755,20±581,45	339,75±206,20	214,82±40,81
(3) LNP1021 G502	229,30	358,10	3182,00	413,56	178,30
(4) LNP1022 G502	393,63±187,81	467,72±221,61	1852,94±2199,66	497,12±412,30	382,19±67,27
(5) LNP1023 G502	213,72±8,85	196,18±62,81	1722,18±1413,90	197,83±74,01	156,16±18,87
(6) LNP1024 G509	237,76±96,36	210,37±95,17	468,53±250,42	22,32±69,06	141,20±71,90
(7) LNP1024 G509	207,36	183,07	1885,66	235,70	163,11
(8) LNP1025 G509	259,57±112,98	299,21±304,89	1193,10±974,04	258,82±88,53	219,86±219,86
(9) LNP1021 G502	199,29	286,04	2001,23	197,57	196,44
(10) LNP1022 G502	305,81	970,65	7039,06	8379,05	203,47

Измерения комплемента С3а из исследования 3

Группа лечения	Предварительный забор крови	90 мин	6 ч	24 ч	7 сутки
(1) TSS	42,47±10,30	55,40±13,58	29,30±14,46	41,70±23,65	27,43±12,43
(2) LNP10 21 G502	34,37±0,50	86,50±3,66	90,07±4,85	56,60±2,25	32,53±0,93
(3) LNP10 21 G502	34,30	128,00	93,30	33,40	28,20
(4) LNP10 22 G502	41,55±13,51	151,37±109,98	82,00±31,82	45,57±18,58	32,77±6,45
(5) LNP10 23 G502	31,67±3,19	74,40±22,08	74,13±48,61	33,83±9,75	27,70±8,05
(6) LNP10 24 G509	56,60±25,61	100,37±77,95	74,73±70,15	55,20±48,34	49,97±39,94
(7) LNP10 24 G509	33,80	33,90	33,70	26,10	20,90
(8) LNP10 25 G509	39,90±13,01	75,73±1,38	46,13±30,56	25,00±3,80	23,90±7,18
(9) LNP10 21 G502	34	85,70	133,00	62,00	25,50
(10) LNP10 22 G502	29,8	68,10	113,00	71,70	23,30

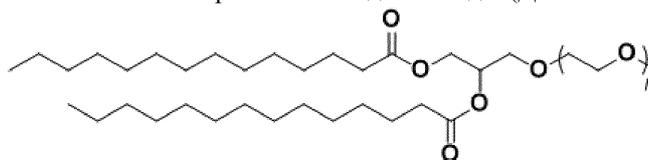
Измерения компонента bb из исследования 3

Группа лечения	Предварительный забор крови	90 мин	6 ч	24 ч	7 сутки
(1) TSS	1,46±0,70	2,18±0,78	1,96±0,64	0,945±0,1	1,34±0,50
(2) LNP1021 G502	1,77±0,60	6,51±3,66	11,00±4,8	3,59±2,25	2,07±0,93
(3) LNP1021 G502	1,24	2,90	11,50	2,97	1,24
(4) LNP1022 G502	1,52±0,34	5,67±2,28	10,2±3,36	3,66±1,68	1,84±0,24
(5) LNP1023 G502	1,65±0,94	4,4±1	7,68±4,67	2,64±1,18	2,08±1,32
(6) LNP1024 G509	1,61±0,13	4,52±1,81	4,50±3,22	1,63±0,84	1,63±0,32
(7) LNP1024 G509	0,96	2,99	2,64	1,13	1,07
(8) LNP1025 G509	1,37±0,17	4,9±4,51	3,79±3,84	1,66±1,43	1,35±0,44
(9) LNP1021 G502	1,41	5,67	11,50	4,64	1,38
(10) LNP1022 G502	1,28	5,22	14,10	5,64	1,87

Пример 6. Скрининг ПЭГ-липидов.

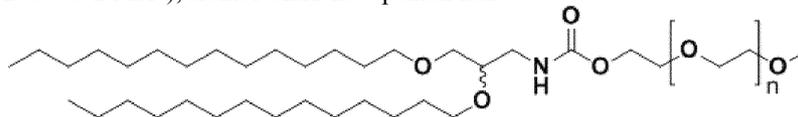
В другом исследовании альтернативные ПЭГ-липиды сравнивались в составах LNP, содержащих 2 мол.% или 3 мол.% ПЭГ-липида.

В исследовании были использованы три ПЭГ-липида: Липид 1 (ДМГ-ПЭГ2к; Nof) изображен как:



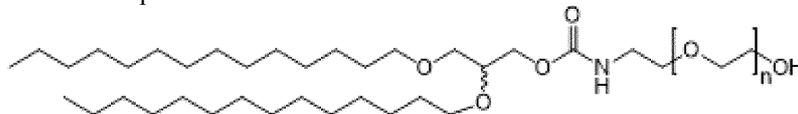
DMG-PEG

Липид 2, синтезированный, как описано в Heyes, et al., J. Controlled Release 107 (2005), pp. 278-279 (см. "Синтез PEG2000-C-DMA"), может быть изображен как:



PEG-C-DMA

и Липид 3, раскрытый в WO 2016/010840 (см. соединение S027, пункты [00240] -[00244]) и WO 2011/076807, может быть изображен как:



Липид А был составлен с каждым ПЭГ-липидом в количестве 2 мол.% и 3 мол.%. Компоненты липидных наночастиц растворяли в 100% этаноле с молярными соотношениями липидного компонента, приведенными выше. Вкратце, РНК-карго получали в 25 мМ цитрате, 100 мМ NaCl, pH 5,0, в результате чего концентрация РНК-карго составляла приблизительно 0,45 мг/мл. LNP составляли с молярным соотношением аминлипида к фосфату РНК (N:P), равным около 4,5 с массовым соотношением мРНК к гРНК, равным 1:1.

Таблица 27

LNP №	LNP 784	LNP 785	LNP 786	LNP 787	LNP 788	LNP 789
СЛ/холестерин/ДСФ Х/ПЭГ (теоретический %мол.)	45/44/9/2	45/43/9/3	45/44/9/2	45/43/9/3	45/44/9/2	45/43/9/3
мРНК	Cas9 SEQ ID NO:48					
гРНК	G282	G282	G282	G282,	G282,	G282
	SEQ ID NO:42					
Тип ПЭГ	Липид 1	Липид 1	Липид 2	Липид 2	Липид 3	Липид 3
N/P	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5

мРНК Cas9, sg282 и LNP получали, как описано в примере 1.

Композиции LNP с липидом 1, липидом 2 или липидом 3 вводили самкам мышей CD-1 и оценивали, как описано в примере 1, в дозах 1 мг/кг и 0,5 мг/кг массы тела. Когорты мышей измеряли для редактирования в печени с помощью секвенирования нового поколения (NGS) и уровней TTR в сыворотке в соответствии со способами из примера 1.

На фиг. 6А и 6В между составами с ПЭГ-липидами сравниваются уровни TTR в сыворотке. На фиг. 6А показан TTR сыворотки в мкг/мл, а на фиг. 6В представлены данные в виде нокдаун в процентах (% TSS). На фиг. 6С показан процент редактирования, достигнутый в печени. Данные указывают на то, что композиции LNP с каждым из тестируемых ПЭГ-липидов исследовали на эффективность при 2 мол.% и 3 мол.%, причем липид 1 неизменно демонстрировал несколько лучшие результаты, чем липид 2 и липид 3.

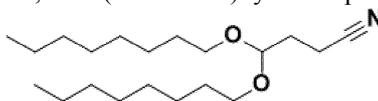
Пример 7. Аналоги Липида А.

Ряд структурных аналогов Липида А был синтезирован и испытан в композициях LNP, описанных в данном документе.

Синтез: Липид А получают взаимодействием 4,4-бис(октилокси)бутановой кислоты ("промежуточное соединение 13b" в примере 13 WO 2015/095340) с (9Z, 12Z)-3-гидрокси-2-(гидроксиметил)пропилооктадека-9,12-диеноатом ("промежуточное соединение 13c") перед добавлением концевой группы путем взаимодействия продукта промежуточного соединения 13b и промежуточного соединения 13c с 3-диэтиламино-1-пропанолом. (См. с. 84-86 WO 2015/095340).

Промежуточное соединение 13b из WO 2015/095340 (4,4-бис(октилокси)бутановая кислота) было синтезировано через 4,4-бис(октилокси)бутаннитрил следующим образом:

Промежуточное соединение 13а: 4,4-бис(октилокси)бутаннитрил

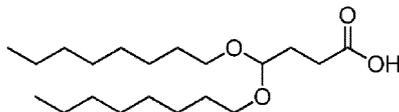


К смеси 4,4-диэтоксидибутаннитрила (9,4 г, 60 ммоль) и октан-1-ола (23,1 г, 178 ммоль) добавляли п-толуолсульфонат пиридиния (748 мг, 3,0 ммоль) при комнатной температуре. Смесь нагревали до 105°C и перемешивали в течение 18 часов в реакционном сосуде, открытом для воздуха, и не снабженным обратным холодильником. Затем реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и очищали на силикагеле (градиент 0-5% этилацетата в гексане) с получением 10,1 г (31,0 ммоль) промежуточного соединения 13а в виде прозрачного масла. ¹H-ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 4,55 (т, J=5,3 Гц, 1H), 3,60 (дт, J=9,2, 6,6 Гц, 2H), 3,43 (дт, J=9,2, 6,6 Гц, 2H), 2,42 (т, J=7,4 Гц, 2H), 1,94 (тд, J=7,4, 5,3 Гц, 2H), 1,63-1,50 (м, 4H), 1,38-1,19 (м, 20H), 0,93-0,82 (м, 6H) м.д.

Затем к раствору промежуточного соединения 13а (8,42 г, 31 ммоль) в этаноле (30 мл) добавляли 31 мл водного гидроксида калия (2,5 М, 30,9 мл, 77,3 ммоль) при комнатной температуре. После оснащения сосуда обратным холодильником смесь нагревали до 110°C и перемешивали в течение 24 ч. Затем смесь охлаждали до комнатной температуры, подкисляли водной хлористоводородной кислотой (1Н) до pH 5 и трижды экстрагировали в гексаны. Объединенные органические экстракты промывали водой (дважды) и соевым раствором, сушат над безводным сульфатом магния и концентрируют в вакууме, получая 8,15 г (23,6 ммоль) промежуточного соединения 13b в виде прозрачного масла, которое использовали без до-

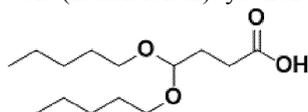
полнительной очистки. ^1H -ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 4,50 (т, $J=5,5$ Гц, 1H), 3,57 (дт, $J=9,4$, 6,7 Гц, 2H), 3,41 (дт, $J=9,3$, 6,7 Гц, 2H), 2,40 (т, $J=7,4$ Гц, 2H), 1,92 (тд, $J=7,4$, 5,3 Гц, 2H), 1,56 (м, 4H), 1,37-1,21 (м, 20H), 0,92-0,83 (м, 6H) м.д. (структура ниже).

Промежуточное соединение 13b



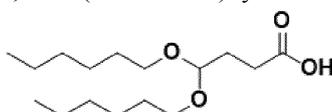
Используя способы, описанные выше, промежуточные соединения C(5, 6, 7, 9 и 10)-ацеталькарбоновой кислоты, называемые промежуточными соединениями В3-F3 и приведенные ниже, были получены с использованием соответствующих алкан-1-оловых реагентов.

Промежуточное соединение В3 4,4-бис(пентилокси)бутановая кислота



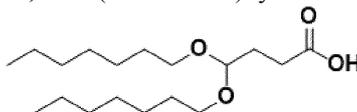
^1H -ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 4,52 (т, $J=5,5$ Гц, 1H), 3,58 (дт, $J=9,3$, 6,6 Гц, 2H), 3,41 (дт, $J=9,3$, 6,7 Гц, 2H), 2,45 (т, $J=7,4$ Гц, 2H), 1,94 (м, 2H), 1,57 (м, 4H), 1,32 (м, $J=3,7$ Гц, 8H), 0,95-0,83 (м, 6H) м.д.

Промежуточное соединение С3: 4,4-бис(гексилокси)бутановая кислота



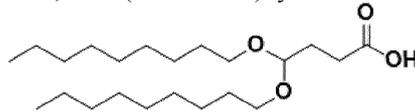
^1H -ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 4,44 (т, $J=5,6$ Гц, 1H), 3,49 (дт, $J=9,3$, 6,9 Гц, 2H), 3,39 (дт, $J=9,3$, 6,8 Гц, 2H), 2,12 (т, $J=7,6$ Гц, 2H), 1,79 (кв, $J=7,0$ Гц, 2H), 1,54 (м, 4H), 1,29 (м, 12H), 0,94-0,82 (м, 6H) м.д.

Промежуточное соединение D3: 4,4-бис(гептилокси)бутановая кислота



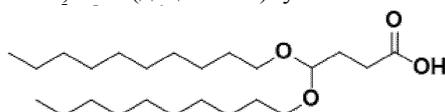
^1H -ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 8,85 (уш. с, 1H), 4,46 (т, $J=5,6$ Гц, 1H), 3,52 (дт, $J=9,4$, 6,8 Гц, 2H), 3,39 (дт, $J=9,3$, 6,8 Гц, 2H), 2,26 (т, $J=7,6$ Гц, 2H), 1,85 (кв, $J=7,0$ Hz, 2H), 1,53 (м, 4H), 1,29 (м, 16H), 0,94-0,80 (м, 6H) м.д.

Промежуточное соединение E3: 4,4-бис(нонилокси)бутановая кислота



^1H -ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 5,32 (уш. с, 1H), 4,44 (т, $J=5,6$ Гц, 1H), 3,49 (дт, $J=9,3$, 6,9 Гц, 2H), 3,38 (дт, $J=9,4$, 6,9 Гц, 2H), 2,10 (т, $J=7,6$ Гц, 2H), 1,78 (кв, $J=7,0$ Гц, 2H), 1,53 (м, 4H), 1,27 (м, 24H), 0,88 (т, $J=6,6$ Гц, 6H) м.д.

Промежуточное соединение F3: 4,4-бис(децилокси)бутановая кислота:



^1H -ЯМР (400 МГц, CDCl_3) δ 4,48 (т, $J=5,5$ Гц, 1H), 3,55 (м, 2H), 3,42 (м, 2H), 2,29 (дд, $J=10,8$, 7,5 Гц, 2H), 1,90-1,82 (м, 2H), 1,55 (м, 4H), 1,27 (м, 28H), 0,88 (т, $J=6,7$ Гц, 6H) м.д.

Ацеталевые аналоги Липида А (С(8)) были синтезированы путем взаимодействия промежуточных соединений C(5, 6, 7, 9 или 10)-ацеталькарбоновой кислоты (В3-F3) с промежуточным соединением 13с перед реакцией продукта этой стадии с 3-диэтиламино-1-пропанолом. (См. с. 84-86 WO2015/095340). Каждый аналог был синтезирован и охарактеризован при помощи ^1H -ЯМР (данные не показаны).

Аналоги С7, С9 и С10 были составлены из 45 моль.% аналога Липида А, 2 моль.% ДМГ-ПЭГ2к, 9 моль.% ДСФХ и 44 моль.% холестерина с соотношением N:P, равным 4,5. Каждый аналог также был составлен из 55 мол.% аналога Липида А, 2,5 мол.% ДМГ-ПЭГ2к, 9 мол.% ДСФХ и 38,5 мол.% холестерина с соотношением N:P, равным 6. Компоненты липидных наночастиц растворяли в 100% этаноле с молярными соотношениями липидного компонента, приведенными выше. РНК-карго получали в 25 мМ цитрате, 100 мМ NaCl, pH 5,0, в результате чего концентрация РНК-карго составляла приблизительно 0,45 мг/мл.

РНК-карго содержит мРНК Cas9, содержащую SEQ ID NO: 43, и sg282, полученную, как описано выше. LNP были составлены, как описано в примере 1.

Расширенная панель ацеталевых аналогов, включая композиции LNP, содержащие C(5) и C(6) аналоги Липида А, были испытаны вместе с предыдущей панелью. Два новых аналога были составлены с 55 мол.% аналога Липида А, 2,5 мол.% ДМГ-ПЭГ2к, 9 мол.% ДСФХ и 33,5 мол.% холестерина с соотношением N/P, равным 6, как описано выше. Анализ продемонстрировал, что размеры всех LNP меньше 120 нм, PDI ниже 0,2 и % инкапсулированной РНК выше 80%. Результаты анализов для составов представлены в табл. 28 ниже.

Таблица 28

ИД LNP	Аналоги Липида А	Аналог, %мол.	ПЭГ %	N/P	РНК Конц. (мг/мл)	%ЕЕ	Z-сред. (нм)	PDI	Среднее значение (нм)
LNP 1122	Аналог C5 (LP000030-001)	55	2,5	6	0,063	88	118,8	0,103	88,17
LNP 1123	Аналог C6 (LP000031-001)	55	2,5	6	0,067	95	107,6	0,038	88,1
LNP 1004	Аналог C7 (LP000020-001)	55	2,5	6	0,068	98	100	0,012	81,55
LNP 1002	LP000001-011	55	2,5	6	0,067	98	95,06	0,01	78,95
LNP 1006	Аналог C9 (LP000021-001)	55	2,5	6	0,067	97	95,43	0,022	80,35
LNP 1008	Аналог C10 (LP000022-001)	55	2,5	6	0,069	95	103,9	0,008	86,79

Аналоги были оценены на рКа с использованием 6-(п-толуидино)-6-нафталинсульфоновой кислоты (TNS), растворенной в воде. В данном анализе 0,1 М фосфатный буфер готовили при различных значениях pH в диапазоне от 4,5 до 10,5. Каждый аналог был отдельно приготовлен в 100% этаноле. Затем липид и TNS добавляли в отдельный pH-буфер и переносили в планшет для анализа на планшет-ридере SpectraMax при длине волны 321-488 нм. Значения были нанесены на график для получения рКа, $\log IC_{50}$ используется в качестве рКа.

Самкам мышей CD-1 вводили дозу, как описано в примере 1, 0,3 мг/кг (фиг. 7A-7E) или 0,1 мг/кг (фиг. 7F-7G). Вкратце, самкам мышей CD-1 из Charles River Laboratories, n=5 на группу, вводили композиции LNP в различных дозах. При вскрытии (7 суток после введения дозы) сыворотку собирали для анализа TTR, а печень собирали для анализа редактирования. Анализ TTR в сыворотке и процент редактирования проводили, как описано в примере 1. Уровни TTR в сыворотке и редактирование в печени из фиг. 7A-7E указывают, что все аналоги действовали сопоставимо с Липидом А при 0,3 миллиграммах на килограмм массы тела. На фиг. 7F-фиг. 7G показано, что, хотя Липид А обладал наибольшей эффективностью, все вновь синтезированные аналоги имеют подходящий нокдаун TTR и редактирование в печени.

Пример 8. Кривая зависимости ответа от дозы - первичные гепатоциты яванского макака

Первичные гепатоциты печени. Первичные гепатоциты печени яванского макака (PCH) (Gibco) оттаивали и ресуспендировали в среде для размораживания гепатоцитов с добавками (Gibco, кат. CM7000) с последующим центрифугированием при 80 g в течение 4 минут. Супернатант отбрасывали, а осаждаемые клетки ресуспендировали в среде для выращивания гепатоцитов с комплексом добавок (Invitrogen, кат. A1217601 и CM3000). Клетки подсчитывали и высевали на 96-луночные планшеты BioCoat Collagen I (ThermoFisher, кат. 877272) при плотности 50000 клеток/луночка. Высеянным клеткам давали осесть и прилипнуть в течение 24 часов в инкубаторе для тканевых культур (37°C и в атмосфере 5% CO₂) до применения LNP. После инкубации клетки проверяли на образование монослоя и среду заменяли на культуральную среду для гепатоцитов с бессывороточным комплексом добавок (Invitrogen, кат. A1217601 и CM4000).

Составы LNP для этого исследования (LNP1021, LNP1022, LNP1023, LNP1024, LNP1025 и LNP897) получали, как описано выше.

Различные дозы составов липидных наночастиц, содержащих модифицированные гРНК, тестировали на первичных гепатоцитах яванского макака для получения кривой зависимости ответа от дозы. После посева и 24-часового культивирования LNP инкубировали в среде для поддержания гепатоцитов, содержащей 6% сыворотки яванского макака, при 37°C в течение 5 минут. После инкубации LNP добавляли к первичным гепатоцитам яванского макака в виде 8-точечной кривой зависимости ответа от 2-кратной дозы, начиная со 100 нг мРНК. Клетки лизировали через 72 часа после обработки для анализа NGS, как описано в примере 1. Процент редактирования был определен для различных композиций LNP, и данные представлены на фиг. 8А. Значение % редактирования с помощью мРНК Cas9 (SEQ ID NO 48) и U-обедненной мРНК Cas9 (SEQ ID NO: 43) представлен на фиг. 8В. Композиции LNP описаны в табл. 2 (LNP 897) и табл. 5 (LNP 1021, 1022, 1023, 1024 и 1025).

Результаты демонстрируют результаты количественного анализа для сравнительных оценок эффективности, которые демонстрируют, что как мРНК, так и состав LNP влияют на эффективность.

Пример 9. РНК-карго: совместные составы мРНК и гРНК.

В этом исследовании оценивали *in vivo* эффективность у мышей различных соотношений гРНК и мРНК. CleanCap™ кэпированные мРНК Cas9 с OPC SEQ ID NO: 4, 5'-НТО HSD, человеческий альбумин 3'-НТО, последовательность Козак и поли-А-хвост были получены с помощью синтеза IVT, как указано в примере 1, с трифосфатом N1-метилпсевдоуридина вместо трифосфата уридина.

Составы LNP получали из описанной мРНК и sg282 (SEQ ID NO: 42; G282), как описано в примере 2, с Липидом А, холестерином, ДСФХ и ПЭГ2к-ДМГ в молярном соотношении 50:38:9:3 и соотношении N:P, равном 6. Массовые соотношения мРНК Cas9:гРНК в составах были такими, как показано в табл. 29.

Таблица 29

ИИ LNP	Соотношение Гид: мРНК Cas9 (мас./мас.)	Конц. РНК (мг/мл)	ЕЕ (%)	Z-средний размер (нм)	PDI частиц	Среднечисл (нм)
1110	8:1	0,92	99	69,52	0,022	56,47
1111	4:1	0,86	97	76,65	0,065	57,36
1112	2:1	0,90	99	76,58	0,036	63,11
1113	1:1	0,97	99	76,60	0,071	58,92
1114	1:2	1,05	99	76,34	0,018	62,82
1115	1:4	0,65	99	82,64	0,018	66,63
1116	1:8	0,75	100	82,01	0,039	65,05

Для характеристики *in vivo* вышеуказанные LNP вводили мышам в количестве 0,1 мг общей РНК (мг геновой РНК+мг мРНК) на кг (n=5 на группу). Через 7-9 суток после введения дозы животных умерщвляли, отбирали кровь и печень и измеряли TTR в сыворотке и редактирование в печени, как описано в примере 1. TTR сыворотки и результаты редактирования в печени показаны на фиг. 9А и 9В. Мышам отрицательного контроля вводили носитель TSS.

Кроме того, вышеуказанные LNP вводили мышам в постоянной дозе мРНК 0,05 мг мРНК на кг (n=5 на группу), при этом варьируя дозу мРНК от 0,06 мг на кг до 0,4 мг на кг. Через 7-9 суток после введения дозы животных умерщвляли, отбирали кровь и печень и измеряли TTR в сыворотке и редактирование в печени. TTR сыворотки и результаты редактирования в печени показаны на фиг. 9С и 9D. Мышам отрицательного контроля вводили носитель TSS.

Пример 10. Нейтральные липиды.

Для оценки эффективности LNP *in vivo* получали составы LNP с мРНК из примера 2 и sg534 (SEQ ID NO: 72; G534), как описано в примере 2. Компоненты липидных наночастиц растворяли в 100% этаноле с молярными соотношениями липидного компонента, приведенными ниже. Вкратце, РНК-карго получали в буфере из 25 mM цитрата и 100 mM NaCl при pH 5,0, в результате чего концентрация РНК-карго составляла приблизительно 0,45 мг/мл. LNP составляли с молярным соотношением аминоклипида к фосфату РНК (N:P), равным около 6 с массовым соотношением гРНК к мРНК, равным 1:2.

Составы LNP анализировали на средний размер частиц, полидисперсность (pdi), содержание общей

РНК и эффективность инкапсуляции РНК, как описано в примере 1. Анализ среднего размера частиц, полидисперсности (PDI), содержания общей РНК и эффективности инкапсуляции РНК приведен в табл. 30. Молярные соотношения липидов представлены в виде аминоклипида (Липид А)/нейтрального липида/вспомогательного липида (холестерина)/ПЭГ-липид (ПЭГ2к-ДМГ). Нейтральный липид представлял собой ДСФ, ДПФХ или отсутствовал, как указано.

Таблица 30

Композиции LNP и их данные. (Молярные соотношения липидов представлены в виде аминоклипида (Липид А)/нейтрального липида/вспомогательного липида (холестерина)/ПЭГ-липид (ПЭГ2к-ДМГ))

ИН образца	Нейтральный липид	Молярные соотношения	РНК конц. (мг/мл)	%EE	Z-сред. (нм)	PDI	Среднее значение (нм)	% редакт ирован тия в печени	TTR сыворотки (мкг/мл)	% нокдауна TTR
Контроль TSS								0,0	1248,9	
CO241	-	50,0/0,0/ 47,0/3,0	1,46	94	75,64	0,090	54,21	1,8	1070,2	14,3
CO242	-	59,0/0,0/ 38,0/3,0	1,51	94	92,25	0,019	75,56	12,0	819,6	34,4
CO243	-	54,5/0,0/ 42,5/3,0	1,62	94	78,90	0,052	61,49	3,3	1260,5	-0,9
CO244	ДСФХ	50,0/9,0/ 39,0/2,0	1,50	93	101,3	0,044	80,73	27,4	741,0	40,7
CO034	ДСФХ	50,0/9,0/ 38,0/3,0	1,48	97	84,23	0,040	66,96	34,2	630,1	49,6
CO245	ДСФХ	52,5/4,0/ 42,5/3,0	1,55	95	81,88	0,054	64,54	5,8	846,6	32,2
CO246	ДПФХ	50,0/9,0/ 38,0/3,0	1,52	96	87,11	0,040	70,04	35,9	528,6	57,7
CO247	ДПФХ	52,5/4,0/ 42,5/3,0	1,54	97	83,67	0,050	66,43	18,3	726,6	41,8

Для характеристики *in vivo* вышеуказанные LNP вводили внутривенно самкам крыс линии Спрег-Доули в количестве 0,3 мг общей РНК (гидовой РНК и мРНК) на кг массы тела. В группе было пять крыс. Через семь суток после введения дозы животных умерщвляли, отбирали кровь и печень и измеряли TTR в сыворотке и редактирование в печени, как описано в примере 1. Животным отрицательного контроля вводили носитель TSS. TTR сыворотки и результаты редактирования в печени показаны на фиг. 10А и 10В, и в табл. 30 (выше).

Краткое описание раскрытых последовательностей

SEQ ID NO	Описание
1	Кодирующая последовательность ДНК Cas9 с использованием аналога тимидина для кодонов с минимальным содержанием уридина, перечисленных в таблице 3, со старт- и стоп- кодонами
2	ДНК-кодирующая последовательность Cas9 с использованием кодонов с обычно высокой экспрессией у людей
3	Аминокислотная последовательность Cas9 с одним сигналом ядерной локализации (1xNLS) в качестве С-концевых 7 аминокислот
4	ОПС мРНК Cas9 с использованием кодонов с минимальным содержанием уридина, как указано в таблице 3, со старт- и стоп- кодонами
5	ОПС мРНК Cas9 с использованием кодонов с обычно высокой экспрессией у людей, со старт- и стоп-кодонами
6	Аминокислотная последовательность никазы Cas9 с 1xNLS в качестве С-концевых 7 аминокислот
7	ОПС мРНК никазы Cas9, кодирующая SEQ ID NO: 6, с использованием кодонов с минимальным содержанием уридина, как указано в таблице 3, со старт- и стоп-кодонами
8	Аминокислотная последовательность dCas9 с 1xNLS в качестве С-концевых 7 аминокислот
9	ОПС мРНК dCas9, кодирующая SEQ ID NO: 8, с использованием

	кодонов с минимальным содержанием уридина, как указано в таблице 3, со старт- и стоп-кодонами
10	Кодирующая последовательность мРНК Cas9 с использованием кодонов с минимальным содержанием уридина, перечисленных в таблице 3 (без старт- или стоп-кодонов; подходит для включения в последовательность, кодирующую слитый белок)
11	Кодирующая последовательность мРНК никазы Cas9 с использованием кодонов с минимальным содержанием уридина, перечисленных в таблице 3 (без старт- или стоп-кодонов; подходит для включения в последовательность, кодирующую слитый белок)
12	Кодирующая последовательность мРНК dCas9 с использованием кодонов с минимальным содержанием уридина, перечисленных в таблице 3 (без старт- или стоп-кодонов; подходит для включения в последовательность, кодирующую слитый белок)
13	Аминокислотная последовательность Cas9 (без NLS)
14	ОПС мРНК Cas9, кодирующая SEQ ID NO: 13, с использованием кодонов с минимальным содержанием уридина, как указано в таблице 3, со старт- и стоп-кодонами
15	Cas9-кодирующая последовательность, кодирующая SEQ ID NO: 13, с использованием кодонов с минимальным содержанием уридина, перечисленных в таблице 3 (без старт- или стоп-кодонов; подходит для включения в последовательность, кодирующую слитый белок)
16	Аминокислотная последовательность никазы Cas9 (без NLS)
17	ОПС мРНК никазы Cas9, кодирующая SEQ ID NO: 16, с использованием кодонов с минимальным содержанием уридина, как указано в таблице 3, со старт- и стоп-кодонами
18	Кодирующая никазу Cas9 последовательность, кодирующая SEQ ID NO: 16, с использованием кодонов с минимальным содержанием уридина, перечисленных в таблице 3 (без старт- или стоп-кодонов; подходит для включения в последовательность, кодирующую слитый белок)

19	Аминокислотная последовательность dCas9 (без NLS)
20	ОПС мРНК dCas9, кодирующая SEQ ID NO: 13, с использованием кодонов с минимальным содержанием уридина, как указано в таблице 3, со старт- и стоп-кодонами
21	dCas9-кодирующая последовательность, кодирующая SEQ ID NO: 13, с использованием кодонов с минимальным содержанием уридина, перечисленных в таблице 3 (без старт- или стоп-кодонов; подходит для включения в последовательность, кодирующую слитый белок)
22	Аминокислотная последовательность Cas9 с двумя сигналами ядерной локализации (2xNLS) в качестве С-концевых аминокислот
23	ОПС мРНК Cas9, кодирующая SEQ ID NO: 13, с использованием кодонов с минимальным содержанием уридина, как указано в таблице 3, со старт- и стоп-кодонами
24	Cas9-кодирующая последовательность, кодирующая SEQ ID NO: 13, с использованием кодонов с минимальным содержанием уридина, перечисленных в таблице 3 (без старт- или стоп-кодонов; подходит для включения в последовательность, кодирующую слитый белок)
25	Аминокислотная последовательность никазы Cas9 с двумя сигналами ядерной локализации в качестве С-концевых аминокислот
26	ОПС мРНК никазы Cas9, кодирующая SEQ ID NO: 16, с использованием кодонов с минимальным содержанием уридина, как указано в таблице 3, со старт- и стоп-кодонами
27	Кодирующая никазу Cas9 последовательность, кодирующая SEQ ID NO: 16, с использованием кодонов с минимальным содержанием уридина, перечисленных в таблице 3 (без старт- или стоп-кодонов; подходит для включения в последовательность, кодирующую слитый белок)
28	Аминокислотная последовательность dCas9 с двумя сигналами ядерной локализации в качестве С-концевых аминокислот
29	ОПС мРНК dCas9, кодирующая SEQ ID NO: 13, с использованием кодонов с минимальным содержанием уридина, как указано в таблице

	3, со старт- и стоп-кодонами
30	dCas9-кодирующая последовательность, кодирующая SEQ ID NO: 13, с использованием кодонов с минимальным содержанием уридина, перечисленных в таблице 3 (без старт- или стоп-кодонов; подходит для включения в последовательность, кодирующую слитый белок)
31	Промотор T7
32	5'-НТО человеческого бета-глобина
33	3'-НТО человеческого бета-глобина
34	5'-НТО человеческого альфа-глобина
35	3'-НТО человеческого альфа-глобина
36	5'-НТО бета-глобина <i>Xenopus laevis</i>
37	3'-НТО бета-глобина <i>Xenopus laevis</i>
38	5'-НТО гормона роста крупного рогатого скота
39	3'-НТО гормона роста крупного рогатого скота
40	3'-НТО альфа, зрелой цепи 1 гемоглобина <i>Mus musculus</i> (Hba-a1)
41	5'-НТО HSD17B4
42	Одиночная гидовая РНК G282, нацеленная на ген TTR мыши
43	Транскрипт Cas9 с 5'-НТО HSD, OPC, соответствующая SEQ ID NO: 4, последовательность Козак и 3'-НТО ALB
44	Транскрипт Cas9 с 5'-НТО HSD, OPC, соответствующая SEQ ID NO: 4, и 3'-НТО ALB
45	Альтернативная OPC Cas9 с содержанием U 19,36%
46	Транскрипт Cas9 с 5'-НТО HSD, OPC, соответствующая SEQ ID NO: 45, последовательность Козак и 3'-НТО ALB
47	Транскрипт Cas9 с 5'-НТО HSD, OPC, соответствующая SEQ ID NO: 45, и 3'-НТО ALB
48	Транскрипт Cas9, содержащий OPC Cas9 с использованием кодонов с обычно высокой экспрессией у людей

49	Транскрипт Cas9, содержащий последовательность Козак с OPC Cas9 с использованием кодонов с обычно высокой экспрессией у людей
50	OPC Cas9 с удаленными точками сплайсинга; содержание U 12,75%
51	Транскрипт Cas9 с 5'-НТО HSD, OPC, соответствующая SEQ ID NO: 50, последовательность Козак и 3'-НТО ALB
52	OPC Cas9 с кодонами с минимальным содержанием уридина, часто используемыми у людей в целом; содержание U 12,75%
53	Транскрипт Cas9 с 5'-НТО HSD, OPC, соответствующая SEQ ID NO: 52, последовательность Козак и 3'-НТО ALB
54	OPC Cas9 с кодонами с минимальным содержанием уридина, редко используемыми у людей в целом; содержание U 12,75%
55	Транскрипт Cas9 с 5'-НТО HSD, OPC, соответствующая SEQ ID NO: 54, последовательность Козак и 3'-НТО ALB
56	Транскрипт Cas9 с AGG в качестве первых трех нуклеотидов для использования с CleanCap TM , 5'-НТО HSD, OPC, соответствующая SEQ ID NO: 4, последовательность Козак и 3'-НТО ALB
57	Транскрипт Cas9 с 5'-НТО от CMV, OPC, соответствующая SEQ ID NO: 4, последовательность Козак и 3'-НТО ALB
58	Транскрипт Cas9 с 5'-НТО от HBB, OPC, соответствующая SEQ ID NO: 4, последовательность Козак и 3'-НТО HBB
59	Транскрипт Cas9 с 5'-НТО от XBG, OPC, соответствующая SEQ ID NO: 4, последовательность Козак и 3'-НТО XBG
60	Транскрипт Cas9 с AGG в качестве первых трех нуклеотидов для использования с CleanCap TM , 5'-НТО от XBG, OPC, соответствующая SEQ ID NO: 4, последовательность Козак и 3'-НТО XBG
61	Транскрипт Cas9 с AGG в качестве первых трех нуклеотидов для использования с CleanCap TM , 5'-НТО от HSD, OPC, соответствующая SEQ ID NO: 4, последовательность Козак и 3'-НТО ALB
62	30/30/39 последовательность поли-А
63	последовательность поли-А 100

64	Одиночная гидовая РНК G209, нацеленная на ген TTR мыши
65	ОПС, кодирующая Cas9 <i>Neisseria meningitidis</i> , с использованием кодонов с минимальным содержанием уридина, как указано в таблице 3, со старт- и стоп-кодонами
66	ОПС, кодирующая Cas9 <i>Neisseria meningitidis</i> , с использованием кодонов с минимальным содержанием уридина, перечисленных в таблице 3 (без старт- или стоп-кодонов; подходит для включения в последовательность, кодирующую слитый белок)
67	Транскрипт, содержащий SEQ ID NO: 65 (кодирующую Cas9 <i>Neisseria meningitidis</i>)
68	Аминокислотная последовательность Cas9 <i>Neisseria meningitidis</i>
69	Одиночная гидовая РНК G390, нацеленная на ген TTR крысы
70	Одиночная гидовая РНК G502, нацеленная на ген TTR яванского макака
71	Одиночная гидовая РНК G509, нацеленная на ген TTR яванского макака
72	Одиночная гидовая РНК G534, нацеленная на ген TTR крысы

См. таблицу последовательностей ниже для самих последовательностей. Последовательности транскриптов, как правило, содержат GGG в качестве первых трех нуклеотидов для использования с ARCA или AGG в качестве первых трех нуклеотидов для использования с CleanCap™. Соответственно, первые три нуклеотида могут быть модифицированы для использования с другими подходами кэпирования, например, кэпирующим ферментом вируса коровьей оспы. Промоторы и последовательности поли-А не включены в последовательности транскрипта. Промотор, такой как промотор T7 (SEQ ID NO: 31), и последовательность поли-А, такая как SEQ ID NO: 62 или 63, могут быть присоединены к описанным последовательностям транскриптов на 5'- и 3'-концах, соответственно. Большинство нуклеотидных последовательностей представлены в виде ДНК, но могут быть легко преобразованы в РНК путем изменения Т на U.

Таблица последовательностей.

Следующая таблица последовательностей обеспечивает перечень последовательностей, описанных в данном документе. Понятно, что если последовательность ДНК (содержащая Т) упоминается относительно РНК, то Т следует заменять на U (которые могут быть модифицированы или немодифицированы в зависимости от контекста), и наоборот.

Описание	Последовательность	SEQ ID No.
Кодирующая последовательность 2 ДНК Cas9	ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAAC AAACAGCGTCGGATGGGCAGTCATCACAGACGAATACA AGGTCCCGAGCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAAACACA GACAGACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACT GCTGTTTCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGAC TGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAA GAACAGAATCTGCTACCTGCAGGAAATCTTCAGCAACG AAATGGCAAAGGTCGACGACAGCTTCTTCCACAGACTG GAAGAAAGCTTCCTGGTCAAGAAGACAAGAAGCACGA AAGACACCCGATCTTCGAAACATCGTCGACGAAGTCG CATACCACGAAAAGTACCCGACAATCTACCACCTGAGA AAGAAGCTGGTCGACAGCACAGACAAGGCAGACCTGAG ACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCAAGTTCAG AGGACACTTCCTGATCGAAGGAGACCTGAACCCGGACA ACAGCGACGTCGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTCCAGA CATACAACCAGCTGTTTCGAAGAAAACCCGATCAACGCA AGCGGAGTCGACGCAAAGGCAATCCTGAGCGCAAGACT GAGCAAGAGCAGAAGACTGGAAAACCTGATCGCACAGC TGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACTGTTTCGAAACCTG ATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACCGAACTTCAAGAG CAACTTCGACCTGGCAGAAGACGCAAAGCTGCAGCTGA GCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCTG GCACAGATCGGAGACCAGTACGCAGACCTGTTCTGTC AGCAAAGAACCCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACA TCCTGAGAGTCAACACAGAAATCACAAAGGCACCGCTG AGCGCAAGCATGATCAAGAGATACGACGAACACCACCA GGACCTGACACTGCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGC TGCCGAAAAGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGC AAGAACGGATACGCAGGATACATCGACGGAGGAGCAAG CCAGGAAGAATTCTACAAGTTCATCAAGCCGATCCTGGA AAAGATGGACGGAACAGAAGAACTGCTGGTCAAGCTGA ACAGAGAAGACCTGCTGAGAAAGCAGAGAACATTTCGAC	1

AACGGAAGCATCCCGCACCAGATCCACCTGGGAGAACT GCACGCAATCCTGAGAAGACAGGAAGACTTCTACCCGTT CCTGAAGGACAACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGA CATTCAGAATCCCGTACTACGTCCGACCGCTGGCAAGAG GAAACAGCAGATTTCGCATGGATGACAAGAAAGAGCGAA GAAACAATCACACCGTGGAACCTCGAAGAAGTCGTCTGA CAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAAGAAATGA CAAACCTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAAAGGTCCTG CCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTACAGTCTAC AACGAACTGACAAAGGTCAAGTACGTACAGAAAGGAAT GAGAAAGCCGGCATTCTGAGCGGAGAACAGAAGAAGG CAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTC ACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGAT CGAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAG ACAGATTCAACGCAAGCCTGGGAACATAACCACGACCTG CTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCTGGACAACGA AGAAAACGAAGACATCCTGGAAGACATCGTCTGACAC TGACACTGTTTGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGA CTGAAGACATAACGCACACCTGTTTCGACGACAAGGTCATG AAGCAGCTGAAGAGAAGAAGATACACAGGATGGGGAA GACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGAATCAGAGACAAG CAGAGCGGAAAGACAATCCTGGACTTCTGAAGAGCGA CGGATTCGCAAACAGAACTTCATGCAGCTGATCCACGA CGACAGCCTGACATTCAAGGAAGACATCCAGAAAGGCAC AGGTCAGCGGACAGGGAGACAGCCTGCACGAACACATC GCAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCAATCAAGAAGGGAAT CCTGCAGACAGTCAAGGTCGTCGACGAACTGGTCAAGG TCATGGGAAGACACAAGCCGGAAAACATCGTCATCGAA ATGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAGA AGAACAGCAGAGAAAGAATGAAGAGAATCGAAGAAGG AATCAAGGAACTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACC CGGTGCAAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTAC CTGTACTACCTGCAGAACGGAAGAGACATGTACGTCTGA CCAGGAACTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACG TCGACCACATCGTCCCGCAGAGCTTCTGAAGGACGACA

<p>GCATCGACAACAAGGTCCTGACAAGAAGCGACAAGAAC AGAGGAAAGAGCGACAACGTCCCGAGCGAAGAAGTCGT CAAGAAGATGAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACG CAAAGCTGATCACACAGAGAAAGTTTCGACAACCTGACA AAGGCAGAGAGAGGAGGACTGAGCGAACTGGACAAGG CAGGATTCATCAAGAGACAGCTGGTTCGAAACAAGACAG ATCACAAAAGCACGTTCGCACAGATCCTGGACAGCAGAAT GAACACAAAAGTACGACGAAAACGACAAGCTGATCAGAG AAGTCAAGGTCATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGC GACTTCAGAAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTCAGAGA AATCAACAACCTACCACCACGCACACGACGCATACCTGA ACGCAGTCGTTCGGAACAGCACTGATCAAGAAGTACCCG AAGCTGGAAAGCGAATTTCGTCTACGGAGACTACAAGGT CTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAGAGCGAACAGG AAATCGGAAAGGCAACAGCAAAGTACTTCTTCTACAGC AACATCATGAACTTCTTCAAGACAGAAATCACACTGGCA AACGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAAA CGGAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAGGGAAGA GACTTCGCAACAGTCAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGCA GGTCAACATCGTCAAGAAGACAGAAGTCCAGACAGGAG GATTCAGCAAGGAAAGCATCCTGCCGAAGAGAAACAGC GACAAGCTGATCGCAAGAAAGAAGGACTGGGACCCGAA GAAGTACGGAGGATTTCGACAGCCCGACAGTCGCATACA GCGTCCTGGTCGTTCGCAAGGTCGAAAAGGGAAAAGAGC AAGAAGCTGAAGAGCGTCAAGGAACTGCTGGGAATCAC AATCATGGAAAGAAGCAGCTTCGAAAAGAACCCGATCG ACTTCCTGGAAGCAAAGGGATACAAGGAAGTCAAGAAG GACCTGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCTGTTTCGAA CTGGAAAACGGAAGAAAGAGAATGCTGGCAAGCGCAGG AGAACTGCAGAAGGGAAACGAACTGGCACTGCCGAGCA AGTACGTCAACTTCCTGTACCTGGCAAGCCACTACGAAA AGCTGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCA GCTGTTTCGTGCAACAGCACAAAGCACTACCTGGACGAAAT CATCGAACAGATCAGCGAATTCAGCAAGAGAGTCATCC TGGCAGACGCAAACCTGGACAAGGTCCTGAGCGCATAC</p>
--

	<p>AACAAGCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAG AAAACATCATCCACCTGTTCACTGACAAACCTGGGAG CACCGGCAGCATTCAAGTACTTCGACACAACAATCGACA GAAAGAGATACACAAGCACAAGGAAGTCCTGGACGCA ACACTGATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAAC AAGAATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAG GAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAAGGTCTAG</p>	
<p>Кодирующая последователь ность 1 ДНК Cas9</p>	<p>ATGGATAAGAAGTACTCAATCGGGCTGGATATCGGAAC TAATTCCGTGGGTTGGGCAGTGATCACGGATGAATACAA AGTGCCGTCCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGGAACACCG ATAGACACAGCATCAAGAAAAATCTCATCGGAGCCCTG CTGTTTGACTCCGGCGAAACCGCAGAAGCGACCCGGCTC AAACGTACCGCGAGGCGACGCTACACCCGGCGGAAGAA TCGCATCTGCTATCTGCAAGAGATCTTTTCGAACGAAAT GGCAAAGGTCGACGACAGCTTCTTCCACCGCCTGGAAG AATCTTTCCTGGTGGAGGAGACAAGAAGCATGAACGG CATCCTATCTTTGGAAACATCGTCGACGAAGTGGCGTAC CACGAAAAGTACCCGACCATCTACCATCTGCGGAAGAA GTTGGTTGACTCAACTGACAAGGCCGACCTCAGATTGAT CTAATTGGCCCTCGCCCATATGATCAAATTCGCGGACA CTTCCTGATCGAAGGCGATCTGAACCTGATAACTCCGA CGTGGATAAGCTTTTTCATTCAACTGGTGCAGACCTACAA CCAACTGTTCGAAGAAAACCAATCAATGCTAGCGGCGT CGATGCCAAGGCCATCCTGTCCGCCCGGCTGTGCAAGTC GCGGCGCCTCGAAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAG AGAAAAAGAACGGACTTTTCGGCAACTTGATCGCTCTCT CACTGGGACTCACTCCCAATTTCAAGTCCAATTTTGACC TGGCCGAGGACGCGAAGCTGCAACTCTCAAAGGACACC TACGACGACGACTTGGACAATTTGCTGGCACAATTTGGC GATCAGTACGCGGATCTGTTCCCTTGCCGCTAAGAACCTT TCGGACGCAATCTTGCTGTCCGATATCCTGCGCGTGAAC ACCGAAATAACCAAAGCGCCGCTTAGCGCCTCGATGATT AAGCGGTACGACGAGCATCACCAGGATCTCACGCTGCTC AAAGCGCTCGTGAGACAGCAACTGCCTGAAAAGTACAA GGAGATCTTCTTCGACCAGTCCAAGAATGGGTACGCAGG</p>	<p>2</p>

<p> GTACATCGATGGAGGCGCTAGCCAGGAAGAGTTCTATA AGTTCATCAAGCCAATCCTGGAAAAGATGGACGGAACC GAAGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGGGAGGATCTGCT CCGGAAACAGAGAACCTTTGACAACGGATCCATTCCCCA CCAGATCCATCTGGGTGAGCTGCACGCCATCTTGCGGCG CCAGGAGGACTTTTACCCATTCTCAAGGACAACCGGGA AAAGATCGAGAAAATTCTGACGTTCCGCATCCCGTATTA CGTGGGCCCACTGGCGCGCGCAATTCGCGCTTCGCGTG GATGACTAGAAAATCAGAGGAAACCATCACTCCTTGGA ATTCGAGGAAGTTGTGGATAAGGGAGCTTCGGCACAA AGCTTCATCGAACGAATGACCAACTTCGACAAGAATCTC CCAAACGAGAAGGTGCTTCCTAAGCACAGCCTCCTTTAC GAATACTTCACTGTCTACAACGAACTGACTAAAGTGAAA TACGTTACTGAAGGAATGAGGAAGCCGGCCTTTCTGTCC GGAGAACAGAAGAAAGCAATTGTGATCTGCTGTTCAA GACCAACCGCAAGGTGACCGTCAAGCAGCTTAAAGAGG ACTACTTCAAGAAGATCGAGTGTTCGACTCAGTGAAAA TCAGCGGGGTGGAGGACAGATTCAACGCTTCGCTGGGA ACCTATCATGATCTCCTGAAGATCATCAAGGACAAGGAC TTCCTTGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAAGA TATCGTCCTGACCTTGACCCTTTTCGAGGATCGCGAGAT GATCGAGGAGAGGCTTAAGACCTACGCTCATCTCTCGA CGATAAGGTCATGAAACAACCTCAAGCGCCGCCGGTACA CTGGTTGGGGCCGCTCTCCCGCAAGCTGATCAACGGTA TTCGCGATAAACAGAGCGGTAAAACCTATCCTGGATTTC TCAAATCGGATGGCTTCGCTAATCGTAACTTCATGCAAT TGATCCACGACGACAGCCTGACCTTTAAGGAGGACATCC AAAAAGCACAAAGTGTCCGACAGGGAGACTCACTCCAT GAACACATCGGAATCTGGCCGGTTCGCCGGCGATTAAG AAGGGAATTCTGCAAACCTGTGAAGGTGGTCGACGAGCT GGTGAAGGTCATGGGACGGCACAACCGGAGAATATCG TGATTGAAATGGCCCCGAGAAAACCAGACTACCCAGAAG GGCCAGAAAAACTCCCGCGAAAGGATGAAGCGGATCGA AGAAGGAATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAAG AGCACCCGGTGAAAACACGCAGCTGCAGAACGAGAAG </p>	
--	--

<p> CTCTACCTGTACTATTTGCAAATGGACGGGACATGTAC GTGGACCAAGAGCTGGACATCAATCGGTTGTCTGATTAC GACGTGGACCACATCGTTCCACAGTCCTTTCTGAAGGAT GACTCGATCGATAACAAGGTGTTGACTCGCAGCGACAA GAACAGAGGGAAGTCAGATAATGTGCCATCGGAGGAGG TCGTGAAGAAGATGAAGAATTACTGGCGGCAGCTCCTG AATGCGAAGCTGATTACCCAGAGAAAAGTTTGACAATCTC ACTAAAGCCGAGCGCGGCGGACTCTCAGAGCTGGATAA GGCTGGATTCATCAAACGGCAGCTGGTCGAGACTCGGC AGATTACCAAGCACGTGGCGCAGATCTTGGACTCCC TGAACACTAAATACGACGAGAACGATAAGCTCATCCGG GAAGTGAAGGTGATTACCCTGAAAAGCAAACCTGTGTC GGACTTTCGGAAGGACTTTCAGTTTTACAAAGTGAGAGA AATCAACAACACTACCATCACGCGCATGACGCATACCTCAA CGCTGTGGTCGGTACCGCCCTGATCAAAAAGTACCCTAA ACTTGAATCGGAGTTTGTGTACGGAGACTACAAGGTCTA CGACGTGAGGAAGATGATAGCCAAGTCCGAACAGGAAA TCGGGAAAGCAACTGCGAAATACTTCTTTACTCAAACA TCATGAACTTTTTCAAGACTGAAATTACGCTGGCCAATG GAGAAATCAGGAAGAGGCCACTGATCGAAACTAACGGA GAAACGGGCGAAATCGTGTGGGACAAGGGCAGGGACTT CGCAACTGTTTCGAAAGTGCTCTCTATGCCGCAAGTCAA TATTGTGAAGAAAACCGAAGTGCAAACCGGCGGATTTTC AAAGGAATCGATCCTCCCAAAGAGAAATAGCGACAAGC TCATTGCACGCAAGAAAGACTGGGACCCGAAGAAGTAC GGAGGATTCGATTCGCCGACTGTCGCATACTCCGTCCTC GTGGTGGCCAAGGTGGAGAAGGGAAAGAGCAAAAAGCT CAAATCCGTCAAAGAGCTGCTGGGGATTACCATCATGGA ACGATCCTCGTTTCGAGAAGAACCCGATTGATTTCTCGA GGCGAAGGGTTACAAGGAGGTGAAGAAGGATCTGATCA TCAAACCCCCAAGTACTACTGTTTCGAACTGGAAAATG GTCGGAAGCGCATGCTGGCTTCGGCCGAGAACTCCAA AAAGGAAATGAGCTGGCCTTGCCTAGCAAGTACGTCAA CTTCTCTATCTTGCTTCGCACTACGAAAACTCAAAGG GTCACCGGAAGATAACGAACAGAAGCAGCTTTTCGTGG </p>

	AGCAGCACAAAGCATTATCTGGATGAAATCATCGAACA ATCTCCGAGTTTTCAAAGCGCGTGATCCTCGCCGACGCC AACCTCGACAAAGTCCTGTGCGCCTACAATAAGCATAGA GATAAGCCGATCAGAGAACAGGCCGAGAACATTATCCA CTTGTTACCCCTGACTAACCTGGGAGCCCCAGCCGCCTT CAAGTACTTCGATACTACTATCGATCGCAAAAGATACAC GTCCACCAAGGAAGTTCTGGACGCGACCCTGATCCACCA AAGCATCACTGGACTCTACGAACTAGGATCGATCTGTC GCAGCTGGGTGGCGATGGCGGTGGATCTCCGAAAAAGA AGAGAAAGGTGTAATGA	
Аминокислот ная последователь ность Cas9	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLGNTDR HSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICY LQEIFSNEMAKVDDSFHRLSEESFLVEEDKKHERHPIFGNIV DEVAYHEKYPTIYHLRKKLVSDTKADLRLIYLALAHMIK FRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFQVLVQTYNQLFEENPINASG VDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNLFGNLIASLG LTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDLYDDDLNLLAQIGDQYA DLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHH QDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQ EEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKNREDLLRKQRTFDNGSIP HQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTRIPYYVGP LARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIER MTNFDKNLPNEKVLPKHSLLEYEFTVYNELTKVKYVTEG MRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIE CFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIKDKDFLDNEENEDI LEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRR YTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDFANRNFMQ LIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGI LQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIAMARENQTTQKGQKN SRERMKRIIEGKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQ NGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVL TRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRK FDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDS RMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVREI NNYHHAHDAYLNAVVGTAIIKKYPKLESEFVYGDYKVID	3

	<p>VRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRK RPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSPQVNVKYTE VQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTV AYSVLVVAKVEKGKSKLKSVKELLGITIMERSSEKPNID FLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQ KGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLGSPEDNEQKQLFVEQ HKHYLDEIIEQISEFSKRVLADANLDKVLSAYNKHRDKPIR EQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDA TLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDGGGSPKKKRKV</p>	
<p>Открытая рамка считывания (OPC) 2 мРНК Cas9</p>	<p>AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGACAUCGGAA CAAACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUA CAAGGUCCCGAGCAAGAAGUUAAGGUCCUGGGAAAC ACAGACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGAG CACUGCUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAAC AAGACUGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGAUACACAAGA AGAAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUCUUCA GCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUCCA CAGACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAG AAGCACGAAAGACACCCGAUCUUCGGAACAUCGUCG ACGAAGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCGACAAUCUAC CACCUGAGAAAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGG CAGACCUGAGACUGAUCUACCUGGCACUGGCACACAUG AUCAAGUUCAGAGGACACUCCUGAUCGAAGGAGACC UGAACCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUAUC CAGCUGGUCCAGACAUACAACCAGCUGUUCGAAGAAA ACCCGAUCAACGCAAGCGGAGUCGACGCAAAGGCAAUC CUGAGCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUGGAAA ACCUGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGG ACUGUUCGGAAACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUG ACACCGAACUUAAGAGCAACUUCGACCUGGCAGAAG ACGCAAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACGACGA CGACCUGGACAACCUGCUGGCACAGAUCCGAGACCAGU ACGCAGACCUGUUCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGAC GCAAUCCUGCUGAGCGACAUCUGAGAGUCAACACAG AAAUCACAAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAA</p>	<p>4</p>

<p> GAGAUACGACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGA AGGCACUGGUCAGACAGCAGCUGCCGGAAAAGUACAA GGAAAUCUUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGAUACGCA GGAUACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCU ACAAGUUCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGG AACAGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAGAC CUGCUGAGAAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGAAAGCA UCCCGCACCAAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUC CUGAGAAGACAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGG ACAACAGAGAAAAGAUCGAAAAGAUCUGACAUCAG AAUCCCGUACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAAC AGCAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAGAAA CAAUCACACCGUGGAACUUCGAAGAAGUCGUCGACAA GGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGAAUGACA AAUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCC GAAGCACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUAC AACGAACUGACAAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAA UGAGAAAGCCGGCAUUCUGAGCGGAGAACAGAAGAA GGCAAUCGUCGACCUGCUGUUAAGACAAACAGAAAAG GUCACAGUCAAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUCAAGA AGAUCGAAUGCUUCGACAGCGUCGAAAUCAGCGGAGU CGAAGACAGAUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUACCAC GACCUGCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCCUGG ACAACGAAGAAAACGAAGACAUCUGGAAGACAUCGU CCUGACACUGACACUGUUCGAAGACAGAGAAAUGAUC GAAGAAAGACUGAAGACAUCGCACACCUGUUCGACG ACAAGGUCAUGAAGCAGCUGAAGAGAAGAAGAUACAC AGGAUGGGGAAGACUGAGCAGAAAGCUGAUCAACGGA AUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUGGACU UCCUGAAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAU GCAGCUGAUCCACGACGACAGCCUGACAUCUUAAGGAA GACAUCCAGAAGGCACAGGUCAGCGGACAGGGAGACA GCCUGCACGAACACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCC GCAAUCAAGAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCG UCGACGAACUGGUCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCC </p>
--

GGAAAACAUCGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCAG ACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAA UGAAGAGAAUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAG CCAGAUCUGAAGGAACACCCGGUCGAAAACACACAGC UGCAGAACGAAAAGCUGUACCUAGUACUACCUAGCAGAA CGGAAGAGACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUC AACAGACUGAGCGACUACGACGUCGACCACAUCGUCCC GCAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGACAACAAG GUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCG ACAACGUCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAGAAGAUGAA GAACUACUGGAGACAGCUGCUGAACGCAAAGCUGAUC ACACAGAGAAAGUUCGACAACCUGACAAAGGCAGAGA GAGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAU CAAGAGACAGCUGGUCGAAAACAAGACAGAUCAAAAG CACGUCGCACAGAUCCUGGACAGCAGAAUGAACACAA AGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUCAGAGAAGUCA GGUCAUCACACUGAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUC AGAAAGGACUCCAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCA ACAACUACCACCACGCACACGACGCAUACCUGAACGCA GUCGUCGGAACAGCACUGAUCAGAAGUACCCGAAGC UGGAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGUCUA CGACGUCAGAAAGAUGAUCGCAAAGAGCGAACAGGAA AUCGGAAAGGCAACAGCAAAGUACUUCUUCUACAGCA ACAUCAUGAACUUCUUAAGACAGAAAUCACACUGGC AAACGGAGAAAUCAGAAAGAGACCGCUGAUCGAAACA AACGGAGAAACAGGAGAAAUCGUCUGGGACAAGGGAA GAGACUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCAUGCC GCAGGUCAACAUCGUCAAGAAGACAGAAGUCCAGACA GGAGGAUUCAGCAAGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAA ACAGCGACAAGCUGAUCGCAAGAAAGAAGGACUGGGA CCCGAAGAAGUACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUC GCAUACAGCGUCCUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGG GAAAGAGCAAGAAGCUGAAGAGCGUCAAGGAACUGCU GGGAAUCACAAUCAUGGAAAAGAAGCAGCUUCGAAAAG AACCCGAUCGACUUCUGGAAGCAAAGGGAUACAAGG
--

	<p>AAGUCAAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUA CAGCCUGUUCGAACUGGAAAACGGAAGAAAGAGAAUG CUGGCAAGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAAC UGGCACUGCCGAGCAAGUACGUCAACUCCUGUACCUG GCAAGCCACUACGAAAAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAG ACAACGAACAGAAGCAGCUGUUCGUCGAACAGCACAA GCACUACCUGGACGAAAUCAUCGAACAGAUACAGCGAA UUCAGCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAAACCUUG ACAAGGUCCUGAGCGCAUACAACAAGCACAGAGACAA GCCGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUCCACCUG UUCACACUGACAAACCUGGGAGCACCGGCAGCAUUCAA GUACUUCGACACAACAUCGACAGAAAGAGAUACACA AGCACAAAGGAAGUCCUGGACGCAACACUGAUCCACCA GAGCAUCACAGGACUGUACGAAACAAGAAUCGACCUG AGCCAGCUGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGAAGA AGAAGAGAAAGGUCUAG</p>	
<p>OPC 1 mPHK Cas9</p>	<p>AUGGAUAAGAAGUACUCAAUCCGGGCUGGAUAUCGGAA CUAAUCCGUGGGUUGGGCAGUGAUCACGGAUGAAUA CAAAGUGCCGUCCAAGAAGUUAAGGUCCUGGGGAAC ACCGAUAGACACAGCAUCAAGAAAAAUCUCAUCGGAG CCCUGCUGUUUGACUCCGGCGAAACCGCAGAAGCGACC CGGCUCAAACGUACCGCGAGGGCAGCGUACACCCGGCG GAAGAAUCGCAUCUGCUAUCUGCAAGAGAUCUUUUCG AACGAAAUGGCAAAAGGUCGACGACAGCUUCUCCACC GCCUGGAAGAAUCUUUCCUGGUGGAGGAGGACAAGAA GCAUGAACGGCAUCCUAUCUUUGGAAACAUCGUCGAC GAAGUGGCGUACCACGAAAAGUACCCGACCAUCUACCA UCUGCGGAAGAAGUUGGUUGACUCAACUGACAAGGCC GACCUCAGAUUGAUCUACUUGGCCUCGCCCAUAUGAU CAAAUCCGCGGACACUCCUGAUCGAAGGCGAUCUG AACCCUGAUAAUCCGACGUGGAUAAGCUUUUCAUUC AACUGGUGCAGACCUACAACCAACUGUUCGAAGAAAA CCCAAUCAAUUGCUAGCGGGCUGCAUGCCAAGGCCAUCC UGUCCGCCCGGCUGUCGAAGUCGCGGGCCUCGAAAAC CUGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAGAAAAAGAACGGAC</p>	<p>5</p>

UUUUCGGCAACUUGAUCGCUCUCACUGGGACUCACU CCCAAUUUCAAGUCCAAUUUUGACCUGGCCGAGGACGC GAAGCUGCAACUCUCAAAAGGACACCUACGACGACGACU UGGACAAUUUGCUGGCACAAAUUGGCGAUCAGUACGC GGAUCUGUCCUUGCCGCUAAGAACCUUUCGGACGCA AUCUUGCUGUCCGAUAUCCUGCGCGUGAACACCGAAA UAACCAAAGCGCCGCUUAGCGCCUCGAUGAUUAAGCG GUACGACGAGCAUCACCAGGAUCUCACGCUGCUCAAA CGCUCGUGAGACAGCAACUGCCUGAAAAGUACAAGGA GAUCUUCUUCGACCAGUCCAAGAAUGGGUACGCAGGG UACAUCGAUGGAGGCGCUAGCCAGGAAGAGUUCUAUA AGUUCAUCAAGCCAAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAAC CGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGGGAGGAUCUG CUCCGGAAACAGAGAACCUUUGACAACGGAUCCAUUC CCACCAGAUCCAUCUGGGUGAGCUGCACGCCAUCUUGC GGCGCCAGGAGGACUUUUACCAUCCUCAAGGACAAC CGGGAAAAGAUCGAGAAAUUCUGACGUUCCGCAUCC CGUAUUACGUGGGCCACUGGCGCGGGCAAUUCGCGC UUCGCGUGGAUGACUAGAAAUCAGAGGAAACCAUCA CUCCUUGGAAUUUCGAGGAAGUUGUGGAUAAGGGAGC UUCGGCACAAGCUUCAUCGAACGAAUGACCAACUUC GACAAGAAUCUCCCAAACGAGAAGGUGCUUCCUAAGC ACAGCCUCCUUACGAAUACUUCACUGUCUACAACGAA CUGACUAAAGUGAAAUACGUUACUGAAGGAAUGAGGA AGCCGGCCUUUCUGUCCGGAGAACAGAAGAAAGCAAU UGUCGAUCUGCUGUUAAGACCAACCGCAAGGUGACC GUCAAGCAGCUUAAAGAGGACUACUUCAAGAAGAUUCG AGUGUUUCGACUCAGUGGAAAUCAGCGGGGUGGAGGA CAGAUUCAACGCUUCGCUGGGAACCUAUCAUGAUCUCC UGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUCCUUGACAACGA GGAGAACGAGGACAUCCUGGAAGAUUCGUCCUGACC UUGACCCUUUCGAGGAUCGCGAGAUGAUCGAGGAGA GGCUUAAGACCUACGCUAUCUCUUCGACGAUAAGGU CAUGAAACAACUCAAGCGCCCGCGGUACACUGGUUGG GGCCGCCUCUCCGCAAGCUGAUAACGGUAUUCGCGA
--

<p> UAAACAGAGCGGUAAAACUAUCCUGGAUUUCCUCAAA UCGGAUGGCUUCGCUAAUCGUAACUUCAUGCAAUUGA UCCACGACGACAGCCUGACCUUUAAGGAGGACAUCCAA AAAGCACAAGUGUCCGGACAGGGAGACUCACUCCAUG AACACAUCGCGAAUCUGGCCGGUUCGCCGGCGAUUAA GAAGGGAAUUCUGCAAACUGUGAAGGUGGUCGACGAG CUGGUGAAGGUCAUGGGACGGCACAAACCGGAGAAUA UCGUGAUUGAAAUGGCCCCGAGAAAACCAGACUACCCA GAAGGGCCAGAAAACUCCCGCGAAAGGAUGAAGCGG AUCGAAGAAGGAAUCAAGGAGCUGGGCAGCCAGAUC UGAAAGAGCACCCGGUGGAAAACACGCAGCUGCAGAA CGAGAAGCUCUACCGUACUAAUUGCAAAAUGGACGG GACAUGUACGUGGACCAAGAGCUGGACAUCAUACGGU UGUCUGAUUACGACGUGGACCACAUCGUUCCACAGUCC UUUCUGAAGGAUGACUCGAUCGAUAACAAGGUGUUGA CUCGCAGCGACAAGAACAGAGGGAAGUCAGAUAAUGU GCCAUCGGAGGAGGUCGUGAAGAAGAUGAAGAAUAC UGGCGGCAGCUCUGAAUGCGAAGCUGAUUACCCAGA GAAAGUUUGACAAUCUCACUAAAGCCGAGCGCGCGG ACUCUCAGAGCUGGAUAAGGCUGGAUUCAUCAAACGG CAGCUGGUCGAGACUCGGCAGAUUACCAAGCACGUGG CGCAGAUCUUGGACUCCCGCAUGAACACUAAAUACGAC GAGAACGAUAAGCUCAUCCGGGAAGUGAAGGUGAUUA CCCUGAAAAGCAAACUUGUGUCGGACUUUCGGAAGGA CUUUCAGUUUACAAAGUGAGAGAAAUCAACAACUAC CAUCACGCGCAUGACGCAUACCUCAACGCUGUGGUCGG UACCGCCCUGAUCAAAAAGUACCCUAAACUUGAAUCG GAGUUUGUGUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUGA GGAAGAUGAUAGCCAAGUCCGAACAGGAAAUCGGGAA AGCAACUGCGAAAUACUUCUUUACUCAAAACAUCAUG AACUUUUUCAAGACUGAAAUAACGCUGGCCAAUGGAG AAAUCAGGAAGAGGCCACUGAUCGAAACUAACGGAGA AACGGGCGAAAUCGUGUGGGACAAGGGCAGGGACUUC GCAACUGUUCGCAAAGUGCUCUCUAUGCCGCAAGUCA AUAUUGUGAAGAAAACCGAAGUGCAAACCGGCGGAUU </p>
--

	<p>UUCAAGGAAUCGAUCCUCCCAAAGAGAAAUAGCGAC AAGCUCAUUGCACGCAAGAAAGACUGGGACCCGAAGA AGUACGGAGGAUUCGAUUCGCCGACUGUCGCAUACUC CGUCCUCGUGGUGGCCAAGGUGGAGAAGGGAAAGAGC AAAAAGCUCAAUCCGUCAAAGAGCUGCUGGGGAUUA CCAUCAUGGAACGAUCCUCGUUCGAGAAGAACCCGAU UGAUUUCUCGAGGCGAAGGGUUACAAGGAGGUGAAG AAGGAUCUGAUCAUCAAACUCCCCAAGUACUCACUGU UCGAACUGGAAAUGGUCGGAAGCGCAUGCUGGCUUC GGCCGGAGAACUCCAAAAAGGAAAUGAGCUGGCCUUG CCUAGCAAGUACGUACAACUCCUCUAUCUUGCUUCGCA CUACGAAAAACUCAAGGGUCACCCGGAAGUAACGAA CAGAAGCAGCUUUUCGUGGAGCAGCACAAGCAUUAUC UGGAUGAAAUCAUCGAACAAAUCUCCGAGUUUCAA GCGCGUGAUCCUCGCCGACGCCAACCUCGACAAAGUCC UGUCGGCCUACAUAAGCAUAGAGAUAAAGCCGAUCAG AGAACAGGCCGAGAACAUUAUCCACUUGUUCACCCUG ACUAACCUGGGAGCCCCAGCCGCCUUAAGUACUUCGA UACUACUAUCGAUCGCAAAAGAUACACGUCCACCAAG GAAGUUCUGGACGCGACCCUGAUCCACCAAAGCAUCAC UGGACUCUACGAAACUAGGAUCGAUCUGUCGCAGCUG GGUGGCGAUGGCGGUGGAUCUCCGAAAAGAAGAGAA AGGUGUAAUGA</p>	
<p>Аминокислот ная последователь ность никазы Cas9 (D10A)</p>	<p>MDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDR HSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICY LQEIFSNEMAKVDDSFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIV DEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIK FRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASG VDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNLFGNLIASLG LTPNFKSNFDLAEDAQLQSKDTYDDDLNLLAQIGDQYA DLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHH QDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQ EEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKNREDLLRKQRTFDNGSIP HQIHLGELHAILRRQEDFYFPFLKDNREKIEKILFRIPYYVGP LARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIER</p>	<p>6</p>

	<p>MTNFDK NLPNEKVL PKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEG MRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIE CFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDI LEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRR YTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQ LIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGI LQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKN SRERMKRIIEGKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQ NGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVL TRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRK FDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDS RMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVREI NNYHHAHDAYLNAVVGTA LIKKYPKLESEFVYGDYKVYD VRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRK RPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVL SMPQVNIVKKTE VQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTV AYSVLVVAKVEKGKSKLKS VKELLGITIMERSSEKFNPID FLEAKGYKEVKKDLI IKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQ KGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLGSPEDNEQKQLFVEQ HKHYLDEIIEQISEFSKR VILADANLDKVL SAYNKHRDKPIR EQAENIIHLFTLTNLGAPAAF KYFDTTIDRKRYTSTKEVLDA TLIHSITGLYETRIDLSQLGGDGGGSPKKKRKV</p>	
<p>ОПС мРНК никазы Cas9 (D10A)</p>	<p>AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGCAAUCGGAA CAAACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUA CAAGGUCCCCGAGCAAGAAGUUCAAGGUCCUGGGAAAC ACAGACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGAG CACUGCUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAAC AAGACUGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGAUACACAAGA AGAAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUCUUCA GCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUCCA CAGACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAG AAGCACGAAAGACACCCGAUCUUCGAAACAUCGUCG ACGAAGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCGACAAUCUAC CACCUGAGAAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGG CAGACCUGAGACUGAUCUACCUGGCACUGGCACACAUG</p>	<p>7</p>

<p> AUCAAGUUCAGAGGACACUCCUGAUCGAAGGAGACC UGAACCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUAUC CAGCUGGUCCAGACAUACAACCAGCUGUUCGAAGAAA ACCCGAUCAACGCAAGCGGAGUCGACGCAAAGGCAAUC CUGAGCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUGGAAA ACCUGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGG ACUGUUCGGAAACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUG ACACCGAACUUAAGAGCAACUUCGACCUGGCAGAAG ACGCAAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACGACGA CGACCUGGACAACCUGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGU ACGCAGACCUGUCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGAC GCAAUCCUGCUGAGCGACAUCCUGAGAGUCAACACAG AAAUCACAAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAA GAGAUACGACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGA AGGCACUGGUCAGACAGCAGCUGCCGGAAAAGUACAA GGAAAUCUUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGAUACGCA GGAUACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCU ACAAGUUCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGG AACAGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAGAC CUGCUGAGAAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGAAGCA UCCCGCACCAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUC CUGAGAAGACAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGG ACAACAGAGAAAAGAUCGAAAAGAACCUGACAUUCAG AAUCCCGUACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAAC AGCAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAGAAA CAAUCACACCGUGGAACUUCGAAGAAGUCGUCGACAA GGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGAAUGACA AACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCC GAAGCACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUAC AACGAACUGACAAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAA UGAGAAAAGCCGGCAUCCUGAGCGGAGAACAGAAGAA GGCAAUCGUCGACCUGCUGUUAAGACAAACAGAAAG GUCACAGUCAAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUCAAGA AGAUCGAAUGCUUCGACAGCGUCGAAAUCAGCGGAGU CGAAGACAGAUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUACCAC </p>

<p> GACCUGCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUCCUGG ACAACGAAGAAAACGAAGACAUCCUGGAAGACAUCGU CCUGACACUGACACUGUUCGAAGACAGAGAAAUGAUC GAAGAAAGACUGAAGACAUACGCACACCUGUUCGACG ACAAGGUCAUGAAGCAGCUGAAGAGAAGAAGAUACAC AGGAUGGGGAAGACUGAGCAGAAAGCUGAUCAACGGA AUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUGGACU UCCUGAAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAU GCAGCUGAUCCACGACGACAGCCUGACAUUAAGGAA GACAUCCAGAAGGCACAGGUCAGCGGACAGGGAGACA GCCUGCACGAACACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCC GCAAUCAAGAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCG UCGACGAACUGGUCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCC GGAAAACAUCGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCAG ACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAAGAA UGAAGAGAAUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAG CCAGAUCCUGAAGGAACACCCGGUCGAAAACACACAGC UGCAGAACGAAAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAA CGGAAGAGACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUC AACAGACUGAGCGACUACGACGUCGACCACAUCGUCCC GCAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGACAACAAG GUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCG ACAACGUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAGAAGAUGAA GAACUACUGGAGACAGCUGCUGAACGCAAAGCUGAUC ACACAGAGAAAGUUCGACAACCUGACAAAGGCAGAGA GAGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAU CAAGAGACAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCACAAAG CACGUCGCACAGA UCCUGGACAGCAGAAUGAACACAA AGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUCAGAGAAGUCA GGUCAUCACACUGAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUC AGAAAGGACUCCAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCA ACAACUACCACCACGCACACGACGCAUACCUGAACGCA GUCGUCGGAACAGCACUGAUC AAGAAGUACCCGAAGC UGGAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGUCUA CGACGUCAGAAAGAUGAUCGCAAAGAGCGAACAGGAA </p>

	<p>LTPNFKSNFDLAEDAQLQLSKDTYDDDDLNDLLAQIGDQYA DLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHH QDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQ EEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKNLREDLLRKQRTFDNGSIP HQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPYYVGP LARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIER MTNFDKNLPNEKVLPHSLLYEFYFTVYNELTKVKYVTEG MRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIE CFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDI LEDIVLTLTLFEDREMIEERLKYAHLFDDKVMKQLKRRR YTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDFANRNFMQ LIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGI LQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIAMARENQTTQKGQKN SRERMKRIIEGKELGSQLKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQ NGRDMYVDQELDINRLSDYDVAIVPQSFLKDDSIDNKVL TRSDKNRGKSDNVPSEEVVKMKNYWRQLLNAKLITQRK FDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDS RMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVREI NNYHHAHDAYLNAVVGTAIIKKYPKLESEFVYGDYKYVD VRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRK RPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSPQVNIKKTE VQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTV AYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSEKPNID FLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQ KGNELALPSKYVNFYLYASHYEKLGSPEDNEQKQLFVEQ HKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVL SAYNKHRDKPIR EQAENIIHLFTLNLGAPAAFYFDTTIDRKRYTSTKEVLDA TLIHSITGLYETRIDLSQLGGDGGGSPKKKRKV</p>	
<p>OPC mPHK dCas9 (D10A H840A)</p>	<p>AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGCAAUCGGAA CAAACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUA CAAGGUCCCCGAGCAAGAAGUUAAGGUCCUGGGAAAC ACAGACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGAG CACUGCUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAAC AAGACUGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGAUACACAAGA AGAAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUCUUCA</p>	<p>9</p>

<p> GCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUCCA CAGACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAG AAGCACGAAAGACACCCGAUCUUCGAAACAUCGUCG ACGAAGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCGACAAUCUAC CACCUGAGAAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGG CAGACCUGAGACUGAUCUACCUGGCACUGGCACACAUG AUCAAGUUCAGAGGACACUCCUGAUCGAAGGAGACC UGAACCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUAUC CAGCUGGUCCAGACAUAACAACCAGCUGUUCGAAGAAA ACCCGAUCAACGCAAGCGGAGUCGACGCAAAGGCAAUC CUGAGCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUGGAAA ACCUGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGG ACUGUUCGAAACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUG ACACCGAACUUCAAGAGCAACUUCGACCUGGCAGAAG ACGCAAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACGACGA CGACCUGGACAACCUGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGU ACGCAGACCUGUCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGAC GCAAUCCUGCUGAGCGACAUCCUGAGAGUCAACACAG AAAUCACAAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAA GAGAUACGACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGA AGGCACUGGUCAGACAGCAGCUGCCGAAAAGUACAA GGAAAUCUUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGAUACGCA GGAUACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCU ACAAGUUCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGG AACAGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAGAC CUGCUGAGAAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGAAGCA UCCCGCACCAAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUC CUGAGAAGACAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGG ACAACAGAGAAAAGAUUCGAAAAGAUCCUGACAUCAG AAUCCCGUACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAAC AGCAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAGAAA CAAUCACACCGUGGAACUUCGAAGAAGUCGUCGACAA GGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGAAUGACA AAUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCC GAAGCACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUAC </p>
--

AACGAACUGACAAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAA UGAGAAAGCCGGCAUUCCUGAGCGGAGAACAGAAGAA GGCAAUCGUCGACCUGCUGUUCAAGACAAACAGAAAAG GUCACAGUCAAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUCAAGA AGAUCGAAUGCUUCGACAGCGUCGAAAUCAGCGGAGU CGAAGACAGAUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUACCAC GACCUGCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCCUGG ACAACGAAGAAAACGAAGACAUCCUGGAAGACAUCGU CCUGACACUGACACUGUUCGAAGACAGAGAAAUGAUC GAAGAAAAGACUGAAGACAUCGCACACCUGUUCGACG ACAAGGUCAUGAAGCAGCUGAAGAGAAGAAGAUACAC AGGAUGGGGAAGACUGAGCAGAAAGCUGAUCAACGGA AUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUGGACU UCCUGAAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAU GCAGCUGAUCCACGACGACAGCCUGACAUUCAAGGAA GACAUCCAGAAGGCACAGGUCAGCGACAGGGAGACA GCCUGCACGAACACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCC GCAAUCAAGAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCG UCGACGAACUGGUCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCC GGAAAACAUCGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCAG ACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAAGAA UGAAGAGAAUCGAAGAAGGAUCAAGGAACUGGGAAG CCAGAUCCUGAAGGAACACCCGGUCGAAAACACACAGC UGCAGAACGAAAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAA CGGAAGAGACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUC AACAGACUGAGCGACUACGACGUCGACGCAAUCGUCCC GCAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGACAACAAG GUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCG ACAACGUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAGAAGAUGAA GAACUACUGGAGACAGCUGCUGAACGCAAAGCUGAUC ACACAGAGAAAGUUCGACAACCUGACAAAGGCAGAGA GAGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAU CAAGAGACAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCACAAAG CACGUCGCACAGA UCCUGGACAGCAGAAUGAACACAA AGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUCAGAGAAGUCAA

GGUCAUCACACUGAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUC AGAAAGGACUUCCAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCA ACAACUACCACCACGCACACGACGCAUACCUGAACGCA GUCGUCGGAACAGCACUGAUCUAGAAGUACCCGAAGC UGGAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGUCUA CGACGUCAGAAAGAUGAUCGCAAAGAGCGAACAGGAA AUCGGAAAGGCAACAGCAAAGUACUUCUUCUACAGCA ACAUCAUGAACUUCUUAAGACAGAAAUCACACUGGC AAACGGAGAAAUCAGAAAGAGACCGCUGAUCGAAACA AACGGAGAAACAGGAGAAAUCGUCUGGGACAAGGGAA GAGACUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCAUGCC GCAGGUCAACAUCGUCAAGAAGACAGAAGUCCAGACA GGAGGAUUCAGCAAGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAA ACAGCGACAAGCUGAUCGCAAGAAAGAAGGACUGGGA CCCGAAGAAGUACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUC GCAUACAGCGUCCUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGG GAAAGAGCAAGAAGCUGAAGAGCGUCAAGGAACUGCU GGGAAUCACAAUCAUGGAAAGAAGCAGCUUCGAAAAG AACCCGAUCGACUCCUGGAAGCAAAGGGAUACAAGG AAGUCAAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUA CAGCCUGUUCGAACUGGAAAACGGAAGAAAGAGAAUG CUGGCAAGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAAC UGGCACUGCCGAGCAAGUACGUCAACUCCUGUACCUG GCAAGCCACUACGAAAAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAG ACAACGAACAGAAGCAGCUGUUCGUCGAACAGCACAA GCACUACCUGGACGAAAUCAUCGAACAGAUCAGCGAA UUCAGCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAAACCUGG ACAAGGUCCUGAGCGCAUACAACAAGCACAGAGACAA GCCGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUCCACCUG UUCACACUGACAAACCUGGGAGCACCGGCAGCAUUCAA GUACUUCGACACAACAUCGACAGAAAGAGAUACACA AGCACAAAGGAAGUCCUGGACGCAACACUGAUCCACCA GAGCAUCACAGGACUGUACGAAACAAGAAUCGACCUG AGCCAGCUGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGAAGA AGAAGAGAAAGGUCUAG

<p>Голая кодирующая последователь- ность Cas9</p>	<p>GACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGACAUCGGAACAA ACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUACAA GGUCCCGAGCAAGAAGUUCAAGGUCCUGGGAAACACA GACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGAGCAC UGCUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAG ACUGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGAUACACAAGAAGA AAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUCUUCAGCA ACGAAAUGGCAAAGGUUCGACGACAGCUUCUCCACAG ACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAGAAG CACGAAAGACACCCGAUCUUCGGAAACAUCGUCGACGA AGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCGACAAUCUACCACC UGAGAAAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGA CCUGAGACUGAUCUACCUGGCACUGGCACACAUGAUCA AGUUCAGAGGACACUCCUGAUCGAAGGAGACCUGAA CCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUCAUCCAGC UGGUCCAGACAUACAACCAGCUGUUCGAAGAAAACCC GAUCAACGCAAGCGGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUG AGCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUGGAAAACC UGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACU GUUCGGAAACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACA CCGAACUUCAAGAGCAACUUCGACCUGGCAGAAGACGC AAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACGACGACGAC CUGGACAACCUGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGUACGC AGACCUGUCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCA AUCCUGCUGAGCGACAUCUGAGAGUCAACACAGAAA UCACAAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAGAG AUACGACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGG CACUGGUCAGACAGCAGCUGCCGAAAAGUACAAGGA AAUCUUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGAUACGCAGGA UACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACA AGUUCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAAC AGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAGACCUG CUGAGAAAGCAGAGAACAUCGACAACGGAAGCAUCC CGCACCAGAUCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUG AGAAGACAGGAAGACUUCUACCCGUCCUGAAGGACA</p>	<p>10</p>
--	--	-----------

ACAGAGAAAAGAUUCGAAAAGAUCCUGACAUUCAGAAU CCCGUACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAACAGCA GAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAAGAGCGAAGAAACAAU CACACCGUGGAACUUCGAAGAAGUCGUCGACAAGGGA GCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAAAAGAAUGACAAACU UCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAA GCACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACG AACUGACAAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAAUGAG AAAGCCGGCAUUCUGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCA AUCGUCGACCUGCUGUUCAAGACAAACAGAAAGGUCA CAGUCAAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUCAAGAAGAU CGAAUGCUUCGACAGCGUCGAAAUCAGCGGAGUCGAA GACAGAUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUACCACGACCU GCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCUGGACAAC GAAGAAAACGAAGACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGA CACUGACACUGUUCGAAGACAGAGAAAUGAUCGAAGA AAGACUGAAGACAUACGCACACCUGUUCGACGACAAG GUCAUGAAGCAGCUGAAGAGAAGAAGAUACACAGGAU GGGGAAGACUGAGCAGAAAGCUGAUAACGGAAUCAG AGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUGGACUUCUG AAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAUGCAGC UGAUCCACGACGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGACAU CCAGAAGGCACAGGUCAGCGGACAGGGAGACAGCCUG CACGAACACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCGGCAAU CAAGAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGAC GAACUGGUCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAA ACAUCGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCAGACAAC ACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAAG AGAAUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAGCCAGA UCCUGAAGGAACACCCGGUCGAAAACACACAGCUCGAG AACGAAAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGAA GAGACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACAG ACUGAGCGACUACGACGUCGACCACAUCGUCCCGCAGA GCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGACAACAAGGUCCU GACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAAC
--

<p> GUCCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAGAAGAUGAAGAACU ACUGGAGACAGCUGCUGAACGCAAAGCUGAUCACACA GAGAAAGUUCGACAACCUGACAAAGGCAGAGAGAGGA GGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAGA GACAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCACAAAGCACGU CGCACAGAUCCUGGACAGCAGAAUGAACACAAAGUAC GACGAAAACGACAAGCUGAUCAGAGAAGUCAAGGUCA UCACACUGAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAA GGACUUCCAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAAC UACCACCACGCACACGACGCAUACCUGAACGCAGUCGU CGGAACAGCACUGAUCAAGAAGUACCCGAAGCUGGAA AGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACG UCAGAAAGAUGAUCGCAAAGAGCGAACAGGAAAUCGG AAAGGCAACAGCAAAGUACUUCUUCUACAGCAACAUC AUGAACUUCUUAAGACAGAAAUCACACUGGCAAACG GAGAAAUCAGAAAGAGACCGCUGAUCGAAACAAACGG AGAAACAGGAGAAAUCGUCUGGGACAAGGGAAAGAGAC UUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCAUGCCGCAGG UCAACAUCGUCAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGG AUUCAGCAAGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGC GACAAGCUGAUCGCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGA AGAAGUACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUA CAGCGUCCUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAG AGCAAGAAGCUGAAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAA UCACAAUCAUGGAAAGAAGCAGCUUCGAAAAGAACCC GAUCGACUCCUGGAAGCAAAGGGAUACAAGGAAGUC AAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCC UGUUCGAACUGGAAAACCGGAAGAAAGAGAAUGCUGGC AAGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAACUGGCA CUGCCGAGCAAGUACGUCAACUCCUGUACCUGGCAAG CCACUACGAAAAGCUGAAGGGAAAGCCCGGAAGACAAC GAACAGAAGCAGCUGUUCGUCGAACAGCACAAGCACU ACCUGGACGAAAUCAUCGAACAGAUACGCGAAUUCAG CAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAG GUCCUGAGCGCAUACAACAAGCACAGAGACAAGCCGA </p>

	<p>UCAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUCCACCUGUUCAC ACUGACAAACCUGGGAGCACCGGCAGCAUUCAAGUAC UUCGACACAACAAUCGACAGAAAGAGAUACACAAGCA CAAAGGAAGUCCUGGACGCAACACUGAUCCACCAGAGC AUCACAGGACUGUACGAAACAAGAAUCGACCUGAGCC AGCUGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGAAGAAGAA GAGAAAGGUC</p>	
<p>Голая кодирующая последователь ность никазы Cas9</p>	<p>GACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGCAAUCGGAACAA ACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUACAA GGUCCCGAGCAAGAAGUUCAAGGUCCUGGGAAACACA GACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCCGGAGCAC UGCUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAG ACUGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGAUACACAAGAAGA AAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUCUUCAGCA ACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUCCACAG ACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAGAAG CACGAAAGACACCCGAUCUUCGGAACAUCGUCGACGA AGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCGACAAUCUACCACC UGAGAAAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGA CCUGAGACUGAUCUACCUGGCACUGGCACACAUGAUCA AGUUCAGAGGACACUUCUGAUCGAAGGAGACCUGAA CCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUCAUCCAGC UGGUCCAGACAUACAACCAGCUGUUCGAAGAAAACCC GAUCAACGCAAGCGGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUG AGCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUGGAAAACC UGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACU GUUCGGAAACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACA CCGAACUUCAAGAGCAACUUCGACCUGGCAGAAGACGC AAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACGACGACGAC CUGGACAACCUGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGUACGC AGACCUGUUCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCA AUCCUGCUGAGCGACAUCCUGAGAGUCAACACAGAAA UCACAAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAGAG AUACGACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGG CACUGGUCAGACAGCAGCUGCCGGAAAAGUACAAGGA</p>	<p>11</p>

AAUCUUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGAUACGCAGGA UACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACA AGUUCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAAC AGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAGACCUG CUGAGAAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGAAGCAUCC CGCACCAGA UCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUG AGAAGACAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACA ACAGAGAAAAGAUCGAAAAGA UCCUGACAUUCAGAAU CCCGUACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAACAGCA GAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAAGAGCGAAGAAACA CACACCGUGGAACUUCGAAGAAGUCGUCGACAAGGGA GCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAAAAGAAUGACAAACU UCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAA GCACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACG AACUGACAAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAAUGAG AAAGCCGGCAUCCUGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCA AUCGUCGACCUGCUGUUCAAGACAAACAGAAAGGUCA CAGUCAAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUCAAGAAGAU CGAAUGCUUCGACAGCGUCGAAAUCAGCGGAGUCGAA GACAGAUUCAACGCAAGCCUGGGAACA UACCACGACCU GCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACU UCCUGGACAAC GAAGAAAACGAAGACA UCCUGGAAGACAUCGUCCUGA CACUGACACUGUUCGAAGACAGAGAAAUGAUCGAAGA AAGACUGAAGACA UACGCACACCUGUUCGACGACAAG GUCAUGAAGCAGCUGAAGAGAAGAAGAUACACAGGAU GGGAAGACUGAGCAGAAAGCUGAUCAACGGAAUCAG AGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUGGACU UCCUG AAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAUGCAGC UGAUCCACGACGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGACA CCAGAAGGCACAGGUCAGCGGACAGGGAGACAGCCUG CACGAACACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCGGCAA CAAGAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGAC GAACUGGUCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAA ACAUCGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACAGACAAC ACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAAGAAUGAAG
--

AGAAUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAGCCAGA UCCUGAAGGAACACCCGGUCGAAAACACACAGCUCGAG AACGAAAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGAA GAGACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACAG ACUGAGCGACUACGACGUCGACCACAUCGUCCCGCAGA GCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGACAACAAGGUCCU GACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAAC GUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAGAAGAUGAAGAACU ACUGGAGACAGCUCUGAACGCAAAGCUGAUCACACA GAGAAAGUUCGACAACCUGACAAAAGGCAGAGAGAGGA GGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAGA GACAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCAAAAGCACGU CGCACAGA UCCUGGACAGCAGAAUGAACACAAAGUAC GACGAAAACGACAAGCUGAUCAGAGAAGUCAAGGUCA UCACACUGAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAA GGACU UCCAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAAC UACCACCACGCACACGACGCAUACCUGAACGCAGUCGU CGGAACAGCACUGAUCAAGAAGUACCCGAAGCUGGAA AGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACG UCAGAAAGAUGAUCGCAAAGAGCGAACAGGAAAUCGG AAAGGCAACAGCAAAGUACUUCUUCUACAGCAACAUC AUGAACUUCUUAAGACAGAAAUCACACUGGCAAACG GAGAAAUCAGAAAGAGACCGCUGAUCGAAACAAACGG AGAAACAGGAGAAAUCGUCUGGGACAAGGGAAAGAGAC UUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCAUGCCGCAGG UCAACAUCGUCAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGG AUUCAGCAAGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGC GACAAGCUGAUCGCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGA AGAAGUACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUA CAGCGUCCUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAG AGCAAGAAGCUGAAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAA UCACAAUCAUGGAAAGAAGCAGCUUCGAAAAGAACCC GAUCGACU UCCUGGAAGCAAAGGGAUACAAGGAAGUC AAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCC UGUUCGAACUGGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGC
--

	<p>AAGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAACUGGCA CUGCCGAGCAAGUACGUCAACUCCUGUACCUGGCAAG CCACUACGAAAAGCUGAAGGGGAAGCCCGGAAGACAAC GAACAGAAGCAGCUGUUCGUCGAACAGCACAAGCACU ACCUGGACGAAAUCAUCGAACAGAUCAGCGAAUUCAG CAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAG GUCCUGAGCGCAUACAACAAGCACAGAGACAAGCCGA UCAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUCCACCUGUUCAC ACUGACAAACCUGGGAGCACCGGCAGCAUUCAAGUAC UUCGACACAACAUCGACAGAAAGAGAUACACAAGCA CAAAGGAAGUCCUGGACGCAACACUGAUCCACCAGAGC AUCACAGGACUGUACGAAACAAGAAUCGACCUGAGCC AGCUGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGAAGAAGAA GAGAAAGGUC</p>	
<p>Голая кодирующая последователь ность dCas9</p>	<p>GACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGCAAUCGGAACAA ACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUACAA GGUCCCGAGCAAGAAGUUCAAGGUCCUGGGAAACACA GACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGAGCAC UGCUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAG ACUGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGAUACACAAGAAGA AAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUCUUCAGCA ACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUCCACAG ACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAGAAG CACGAAAGACACCCGAUCUUCGGAACAUCGUCGACGA AGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCGACAAUCUACCACC UGAGAAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGA CCUGAGACUGAUCUACCUGGCACUGGCACACAUGAUCA AGUUCAGAGGACACUUCUGAUCGAAGGAGACCUGAA CCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUCAUCCAGC UGGUCCAGACAUACAACCAGCUGUUCGAAGAAAACCC GAUCAACGCAAGCGGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUG AGCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUGGAAAACC UGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACU GUUCGGAACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACA CCGAACUUCAAGAGCAACUUCGACCUGGCAGAAGACGC</p>	<p>12</p>

AAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACGACGACGAC CUGGACAACCUGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGUACGC AGACCUGUCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCA AUCCUGCUGAGCGACAUCUGAGAGUCAACACAGAAA UCACAAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAGAG AUACGACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGG CACUGGUCAGACAGCAGCUGCCGGAAAAGUACAAGGA AAUCUUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGAUACGCAGGA UACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACA AGUUCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAAC AGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAGACCUG CUGAGAAAAGCAGAGAACAUCGACAACGGAAAGCAUCC CGCACCAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUG AGAAGACAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACA ACAGAGAAAAGAUCGAAAAGAUCUGACAUUCAGAAU CCCGUACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAACAGCA GAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAAU CACACCGUGGAACUUCGAAGAAGUCGUCGACAAGGGA GCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGAAUGACAAACU UCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAA GCACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACG AACUGACAAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAAUGAG AAAGCCGGCAUUCUGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCA AUCGUCGACCUGCUGUUCAAGACAAACAGAAAAGGUCA CAGUCAAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUCAAGAAGAU CGAAUGCUUCGACAGCGUCGAAAUCAGCGGAGUCGAA GACAGAUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUACCACGACCU GCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCUGGACAAC GAAGAAAACGAAGACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGA CACUGACACUGUUCGAAGACAGAGAAAUGAUCGAAGA AAGACUGAAGACAUACGCACACCUGUUCGACGACAAG GUCAUGAAGCAGCUGAAGAGAAGAAGAUACACAGGAU GGGGAAGACUGAGCAGAAAGCUGAUCAACGGAAUCAG AGACAAGCAGAGCGGAAAAGACAAUCCUGGACUUCUG AAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAUGCAGC
--

<p> UGAUCCACGACGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGACAU CCAGAAGGCACAGGUCAGCGGACAGGGAGACAGCCUG CACGAACACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCGGCAAU CAAGAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGAC GAACUGGUCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAA ACAUCGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCAGACAAC ACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAAGAAUGAAG AGAAUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAGCCAGA UCCUGAAGGAACACCCGGUCGAAAACACACAGCUCGAG AACGAAAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGAA GAGACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACAG ACUGAGCGACUACGACGUCGACGCAAUCGUCCCGCAGA GCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGACAACAAGGUCCU GACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAAC GUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAGAAGAUGAAGAACU ACUGGAGACAGCUCGUAACGCAAAGCUGAUCACACA GAGAAAGUUCGACAACCUGACAAAGGCAGAGAGAGGA GGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAGA GACAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCAACAAGCACGU CGCACAGAUCCUGGACAGCAGAAUGAACACAAAGUAC GACGAAAACGACAAGCUGAUCAGAGAAGUCAAGGUCA UCACACUGAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAA GGACUCCAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAAC UACCACCACGCACACGACGCAUACCUGAACGCAGUCGU CGGAACAGCACUGAUCAAGAAGUACCCGAAGCUGGAA AGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACG UCAGAAAAGAUCAUCGCAAAGAGCGAACAGGAAAUCGG AAAGGCAACAGCAAAGUACUUCUUCUACAGCAACAUC AUGAACUUCUUAAGACAGAAAUCACACUGGCAAACG GAGAAAUCAGAAAGAGACCGCUGAUCGAAACAAACGG AGAAACAGGAGAAAUCGUCUGGGACAAGGGAAGAGAC UUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCAUGCCGCAGG UCAACAUCGUCAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGG AUUCAGCAAGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAAACGC GACAAGCUGAUCGCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGA </p>

	<p>AGAAGUACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUA CAGCGUCCUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAG AGCAAGAAGCUGAAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAA UCACAAUCAUGGAAAGAAGCAGCUUCGAAAAGAACCC GAUCGACUCCUGGAAGCAAAGGGAUACAAGGAAGUC AAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCC UGUUCGAACUGGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGC AAGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAACUGGCA CUGCCGAGCAAGUACGUCAACUCCUGUACCUGGCAAG CCACUACGAAAAGCUGAAGGGGAAGCCCGGAAGACAAC GAACAGAAGCAGCUGUUCGUCGAACAGCACAAGCACU ACCUGGACGAAAUCAUCGAACAGAUACAGCGAAUUCAG CAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAG GUCCUGAGCGCAUACAACAAGCACAGAGACAAGCCGA UCAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUCCACCUGUUCAC ACUGACAAACCUGGGAGCACCGGCAGCAUUCAAGUAC UUCGACACAACAUCGACAGAAAGAGAUACACAAGCA CAAAGGAAGUCCUGGACGCAACACUGAUCCACCAGAGC AUCACAGGACUGUACGAAACAAGAAUCGACCUGAGCC AGCUGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGAAGAAGAA GAGAAAGGUC</p>	
<p>Аминокислот ная последователь ность Cas9 (без NLS)</p>	<p>MDKKYSIGLDIGTNSVGVAVITDEYKVPSKFKVLGNTDR HSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICY LQEIFSNEMAKVDDSFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIV DEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIK FRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFEENPINASG VDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIASLG LTPNFKSNFDLAEDAQLQSKDQYDDDDLDNLLAQIGDQYA DLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHH QDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQ EEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIP HQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTRIPYYVGP LARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIER MTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEG MRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIE</p>	<p>13</p>

	<p>CFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDI LEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRR YTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFQM LIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGI LQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKN SRERMKRIIEGKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQ NGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVL TRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRK FDNLTKAERGGELSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDS RMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVREI NNYHHAHDAYLNAVVGTAIIKKYPKLESEFVYGDYKVYD VRKMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRK RPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVL SMPQVNIVKKTE VQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTV AYSVLVVAKVEKGKSKLKS VKELLGITIMERSSEKPNID FLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQ KGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLGSPEDNEQKQLFVEQ HKHYLDEIIEQISEFSKRVLADANLDKVL SAYNKHRDKPIR EQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDA TLIHQ SITGLYETRIDLSQLGGD</p>	
<p>ОРС мРНК Cas9, кодирующая SEQ ID NO: 13, с использование м кодонов с минимальным содержанием уридина, как указано в таблице 3, со старт- и стоп- кодонами</p>	<p>AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGACAUCGGAA CAAACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUA CAAGGUCCCCGAGCAAGAAGUUCAAGGUCCUGGGAAAC ACAGACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGAG CACUGCUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAAC AAGACUGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGAUACACAAGA AGAAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUCUUCA GCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUCCA CAGACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAG AAGCACGAAAGACACCCGAUCUUCGGAACAUCGUCG ACGAAGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCGACAAUCUAC CACCUGAGAAAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGG CAGACCUGAGACUGAUCUACCUGGCACUGGCACACAUG AUCAAGUUCAGAGGACACUCCUGAUCGAAGGAGACC UGAACCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUAUC</p>	<p>14</p>

<p> CAGCUGGUCCAGACAUACAACCAGCUGUUCGAAGAAA ACCCGAUCAACGCAAGCGGAGUCGACGCAAAGGCAAUC CUGAGCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUGGAAA ACCUGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGG ACUGUUCGGAAACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUG ACACCGAACUUAAGAGCAACUUCGACCUGGCAGAAG ACGCAAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACGACGA CGACCUGGACAACCUGCUGGCACAGAUCCGAGACCAGU ACGCAGACCUGUUCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGAC GCAAUCCUGCUGAGCGACAUCUGAGAGUCAACACAG AAAUCACAAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAA GAGAUACGACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGA AGGCACUGGUCAGACAGCAGCUGCCGAAAAGUACAA GGAAAUCUUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGAUACGCA GGAUACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCU ACAAGUUCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGG AACAGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAGAC CUGCUGAGAAAAGCAGAGAACAUCGACAACGGAAGCA UCCCGCACCAAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUC CUGAGAAGACAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGG ACAACAGAGAAAAGAUUCGAAAAGAUCCUGACAUCAG AAUCCCGUACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAAC AGCAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAAGAGCGAAGAAA CAAUCACACCGUGGAACUUCGAAGAAGUCGUCGACAA GGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGAAUGACA AACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCC GAAGCACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUAC AACGAACUGACAAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAA UGAGAAAAGCCGGCAUUCUGAGCGGAGAACAGAAGAA GGCAAUCGUCGACCUGCUGUUAAGACAAACAGAAAAG GUCACAGUCAAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUAAGA AGAUCGAAUGCUUCGACAGCGUCGAAAUCAGCGGAGU CGAAGACAGAUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUACCAC GACCUGCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUCCUGG ACAACGAAGAAAACGAAGACAUCUGGAAGACAUCGU </p>

<p> CCUGACACUGACACUGUUCGAAGACAGAGAAAUGAUC GAAGAAAGACUGAAGACAUACGCACACCCUGUUCGACG ACAAGGUCAUGAAGCAGCUGAAGAGAAGAAGAUACAC AGGAUGGGGAAGACUGAGCAGAAAAGCUGAUCAACGGA AUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAAGACAAUCCUGGACU UCCUGAAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAU GCAGCUGAUCCACGACGACAGCCUGACAUUCAAGGAA GACAUCCAGAAGGCACAGGUCAGCGGACAGGGAGACA GCCUGCACGAACACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCC GCAAUCAAGAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCG UCGACGAACUGGUCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCC GGAAAACAUCGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCAG ACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAAGAA UGAAGAGAAUCGAAGAAGGAUCAAGGAACUGGGAAG CCAGAUCCUGAAGGAACACCCGGUCGAAAACACACAGC UGCAGAACGAAAAGCUGUACCCUGUACUACCUGCAGAA CGGAAGAGACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUC AACAGACUGAGCGACUACGACGUCGACCACAUCGUCCC GCAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGACAACAAG GUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCG ACAACGUCCCAGCGAAGAAGUCGUCAAGAAGAUGAA GAACUACUGGAGACAGCUGCUGAACGCAAAGCUGAUC ACACAGAGAAAAGUUCGACAACCUGACAAAGGCAGAGA GAGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAU CAAGAGACAGCUGGUCGAAAACAAGACAGAUCACAAAG CACGUCGCACAGAUCUGGACAGCAGAAUGAACACAA AGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUCAGAGAAGUCA GGUCAUCACACUGAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUC AGAAAGGACUCCAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCA ACAACUACCACCACGCACACGACGCAUACCUGAACGCA GUCGUCGGAACAGCACUGAUCUACAAGUACCCGAAGC UGGAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGUCUA CGACGUCAGAAAGAUGAUCGCAAAGAGCGAACAGGAA AUCGGAAGGCAACAGCAAAGUACUUCUUCUACAGCA ACAUCAUGAACUUCUUCUACAAGACAGAAAUCACACUGGC </p>
--

	<p>AAACGGAGAAAUCAGAAAGAGACCGCUGAUCGAAACA AACGGAGAAACAGGAGAAAUCGUCUGGGACAAGGGAA GAGACUUCGCAACAGUCAGAAAAGGUCCUGAGCAUGCC GCAGGUCAACAUCGUCAAGAAGACAGAAGUCCAGACA GGAGGAUUCAGCAAGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAA ACAGCGACAAGCUGAUCGCAAGAAAGAAGGACUGGGA CCCGAAGAAGUACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUC GCAUACAGCGUCCUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGG GAAAGAGCAAGAAGCUGAAGAGCGUCAAGGAACUGCU GGGAAUCACAAUCAUGGAAAAGAAGCAGCUUCGAAAAG AACCCGAUCGACUUCUGGAAGCAAAGGGAUACAAGG AAGUCAAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUA CAGCCUGUUCGAACUGGAAAACGGAAGAAAGAGAAUG CUGGCAAGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAAC UGGCACUGCCGAGCAAGUACGUCAACUCCUGUACCUG GCAAGCCACUACGAAAAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAG ACAACGAACAGAAGCAGCUGUUCGUCGAACAGCACAA GCACUACCUGGACGAAAUCAUCGAACAGAUCAGCGAA UUCAGCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAAACCUUG ACAAGGUCCUGAGCGCAUACAACAAGCACAGAGACAA GCCGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUCCACCUG UUCACACUGACAAACCUGGGAGCACCGGCAGCAUUCAA GUACUUCGACACAACAUCGACAGAAAGAGAUACACA AGCACAAGGAAGUCCUGGACGCAACACUGAUCCACCA GAGCAUCACAGGACUGUACGAAACAAGAAUCGACCUG AGCCAGCUGGGAGGAGACUAG</p>	
<p>Cas9- кодирующая последователь- ность, кодирующая SEQ ID NO: 13, с использование м кодонов с</p>	<p>GACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGACAUCGGAACAA ACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUACAA GGUCCCGAGCAAGAAGUUCAAGGUCCUGGGAAACACA GACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGAGCAC UGCUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAG ACUGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGAUACACAAGAAGA AAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUCUUCAGCA ACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUCCACAG ACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAGAAG</p>	<p>15</p>

<p>минимальным содержанием уридина, перечисленных в таблице 3 (без старт- или стоп-кодонов; подходит для включения в последовательность, кодирующую слитый белок)</p>	<p>CACGAAAGACACCCGAUCUUCGGAAACAUCGUCGACGA AGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCGACAAUCUACCACC UGAGAAAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGA CCUGAGACUGAUCUACCUGGCACUGGCACACAUGAUCA AGUUCAGAGGACACUUCUGAUCGAAGGAGACCUGAA CCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUCAUCCAGC UGGUCCAGACAUAACAACCAGCUGUUCGAAGAAAACCC GAUCAACGCAAGCGGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUG AGCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUGGAAAACC UGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACU GUUCGGAAACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACA CCGAACUUCAAGAGCAACUUCGACCUGGCAGAAGACGC AAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACGACGACGAC CUGGACAACCUGCUGGCACAGAUCCGAGACCAGUACGC AGACCUGUCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCA AUCCUGCUGAGCGACAUCUGAGAGUCAACACAGAAA UCACAAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUAAGAG AUACGACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGG CACUGGUCAGACAGCAGCUGCCGGAAAAGUACAAGGA AAUCUUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGAUACGCAGGA UACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACA AGUUCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAAAC AGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAGACCUG CUGAGAAAGCAGAGAACAUCGACAACGGAAGCAUCC CGCACCAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUG AGAAGACAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACA ACAGAGAAAAGAUUCGAAAAGAUCCUGACAUUCAGAAU CCCGUACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAACAGCA GAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAAU CACACCGUGGAACUUCGAAGAAGUCGUCGACAAGGGA GCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGAAUGACAAACU UCGACAAGAACCUGCCGAAACGAAAAGGUCCUGCCGAA GCACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACG AACUGACAAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAAUGAG AAAGCCGGCAUCCUGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCA</p>
--	---

<p> AUCGUCGACCUGCGUUCAAGACAAACAGAAAGGUCA CAGUCAAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUCAAGAAGAU CGAAUGCUUCGACAGCGUCGAAAUCAGCGGAGUCGAA GACAGAUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUACCACGACCU GCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUCCUGGACAAC GAAGAAAACGAAGACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGA CACUGACACUGUUCGAAGACAGAGAAAUGAUCGAAGA AAGACUGAAGACAUACGCACACCUGUUCGACGACAAG GUCAUGAAGCAGCUGAAGAGAAGAAGAUACACAGGAU GGGGAAGACUGAGCAGAAAGCUGAUAACGGAAUCAG AGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUGGACUCCUG AAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAUGCAGC UGAUCCACGACGACAGCCUGACAUUAAGGAAGACAU CCAGAAGGCACAGGUCAGCGGACAGGGAGACAGCCUG CACGAACACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCGGCAAU CAAGAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGAC GAACUGGUCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAA ACAUCGUAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCAGACAAC ACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAAG AGAAUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAGCCAGA UCCUGAAGGAACACCCGGUCGAAAACACACAGCUCGAG AACGAAAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGAA GAGACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACAG ACUGAGCGACUACGACGUCGACCACAUCGUCCCGCAGA GCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGACAACAAGGUCCU GACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAAC GUCCCGAGCGAAGAAGUCGUAAGAAGAUGAAGAACU ACUGGAGACAGCUCGUAACGCAAAGCUGAUCACACA GAGAAAGUUCGACAACCUGACAAAGGCAGAGAGAGGA GGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUAUCAAGA GACAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCACAAAGCACGU CGCACAGAUCCUGGACAGCAGAAUGAACACAAAGUAC GACGAAAACGACAAGCUGAUCAGAGAAGUCAAGGUCA UCACACUGAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAA GGACUCCAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUACAAC </p>
--

	<p>UACCACCACGCACACGACGCAUACCUGAACGCAGUCGU CGGAACAGCACUGAUAAGAAGUACCCGAAGCUGGAA AGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACG UCAGAAAGAUGAUCGCAAAGAGCGAACAGGAAAUCGG AAAGGCAACAGCAAAGUACUUCUUCUACAGCAACAUC AUGAACUUCUUAAGACAGAAAUCACACUGGCAAACG GAGAAAUCAGAAAGAGACCGCUGAUCGAAACAAACGG AGAAACAGGAGAAAUCGUCUGGGACAAGGGAAAGAGAC UUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCAUGCCGCAGG UCAACAUCGUCAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGG AUUCAGCAAGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAAACAGC GACAAGCUGAUCGCAAGAAAAGGACUGGGACCCGA AGAAGUACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUA CAGCGUCCUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAG AGCAAGAAGCUGAAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAA UCACAAUCAUGGAAAGAAGCAGCUUCGAAAAGAACCC GAUCGACUCCUGGAAGCAAAGGGAUACAAGGAAGUC AAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCC UGUUCGAACUGGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGC AAGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAACUGGCA CUGCCGAGCAAGUACGUCAACUCCUGUACCUGGCAAG CCACUACGAAAAGCUGAAGGGAAAGCCCGGAAGACAAC GAACAGAAGCAGCUGUUCGUCGAACAGCACAAGCACU ACCUGGACGAAAUCAUCGAACAGAUACAGCGAAUUCAG CAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAG GUCCUGAGCGCAUACAACAAGCACAGAGACAAGCCGA UCAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUCCACCUGUUCAC ACUGACAAACCUGGGAGCACCGGCAGCAUUCAAGUAC UUCGACACAACAUCGACAGAAAGAGAUACACAAGCA CAAAGGAAGUCCUGGACGCAACACUGAUCCACCAGAGC AUCACAGGACUGUACGAAACAAGAAUCGACCUGAGCC AGCUGGGAGGAGAC</p>	
Аминокислот ная последователь	<p>MDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDR HSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICY LQEIFSNEMAKVDDSFHRLLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIV</p>	16

НОСТЬ никазы Cas9 (без NLS)	DEVAAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIK FRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASG VDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNLFGNLIASLG LTPNFKSNFDLAEDAQLQSKDQYDDDDLDNLLAQIGDQYA DLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHH QDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQ EEFYKFIKPILEKMDGTEELVKNLREDLLRKQRTFDNGSIP HQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTRIPYYVGP LARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIER MTNFDKNLPNEKVLPHKSHLLYEFYFTVYNELTKVKYVTEG MRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIE CFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDI LEDIVLTLTLFEDREMIEERLKYAHLFDDKVMKQLKRRR YTGWRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQ LIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQDLSHEHIANLAGSPAIKKGI LQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIAMARENQTTQKGQKN SRERMKRIIEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQ NGRDMYVDQELDINRLSDYDVHDHIVPQSFLKDDSIDNKVL TRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRK FDNLTKAERGGSELKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDS RMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVREI NNYHHAHDAYLNAVVGALIKKYPKLESEFVYGDKVYD VRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRK RPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSPQVNVKQTE VQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKDWDPKKYGGFDSPTV AYSVLVVAKVEKGKSKLKSVKELLGITIMERSSEKPNID FLEAKGYKEVKKDLIILPKYSLFELENGRKRMLASAGELQ KGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLGSPEDNEQKQLFVEQ HKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVL SAYNKHHRDKPIR EQAENIIHLFTLNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDA TLIHSITGLYETRIDLSQLGGD	
ОПС мРНК никазы Cas9, кодирующая SEQ ID NO:	AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGCAAUCGGAA CAAACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUA CAAGGUCCCGAGCAAGAAGUUAAGGUCCUGGGAAAC ACAGACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGAG	17

<p>16, с использование м кодонов с минимальным содержанием уридина, как указано в таблице 3, со старт- и стоп- кодонами</p>	<p>CACUGCUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAAC AAGACUGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGAUACACAAGA AGAAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUCUUCA GCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUCCA CAGACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAG AAGCACGAAAGACACCCGAUCUUCGGAAACAUCGUCG ACGAAGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCGACAAUCUAC CACCUGAGAAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGG CAGACCUGAGACUGAUCUACCUGGCACUGGCACACAUG AUCAAGUUCAGAGGACACUUCUGAUCGAAGGAGACC UGAACCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUAUC CAGCUGGUCCAGACAUAACAACCAGCUGUUCGAAGAAA ACCCGAUCAACGCAAGCGGAGUCGACGCAAAGGCAAUC CUGAGCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUGGAAA ACCUGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGG ACUGUUCGGAAACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUG ACACCGAACUUAAGAGCAACUUCGACCUGGCAGAAG ACGCAAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUAACGACGA CGACCUGGACAACCUGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGU ACGCAGACCUGUUCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGAC GCAAUCCUGCUGAGCGACAUCCUGAGAGUCAACACAG AAAUCACAAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAA GAGAUACGACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGA AGGCACUGGUCAGACAGCAGCUGCCGGAAAAGUACAA GGAAAUCUUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGAUACGCA GGAUACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCU ACAAGUUCAUAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGG AACAGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAGAC CUGCUGAGAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGAAGCA UCCCGCACCAAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUC CUGAGAAGACAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGG ACAACAGAGAAAAGAUCGAAAAGAUCUGACAUCUUCAG AAUCCCGUACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAAC AGCAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAGAAA CAAUCACACCGUGGAACUUCGAAGAAGUCGUCGACAA</p>	
---	--	--

<p> GGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGAAUGACA AACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCC GAAGCACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUAC AACGAACUGACAAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAA UGAGAAAGCCGGCAUUCUGAGCGGAGAACAGAAGAA GGCAAUCGUCGACCUGCUGUUAAGACAAACAGAAAAG GUCACAGUCAAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUAAGA AGAUCGAAUGCUUCGACAGCGUCGAAAUCAGCGGAGU CGAAGACAGAUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUACCAC GACCUGCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUCCUGG ACAACGAAGAAAACGAAGACAUCCUGGAAGACAUCGU CCUGACACUGACACUGUUCGAAGACAGAGAAAUGAUC GAAGAAAGACUGAAGACAUACGCACACCUGUUCGACG ACAAGGUCAUGAAGCAGCUGAAGAGAAGAAGAUACAC AGGAUGGGGAAGACUGAGCAGAAAGCUGAUCAACGGAA AUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUGGACU UCCUGAAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAU GCAGCUGAUCCACGACGACAGCCUGACAUUCAAGGAA GACAUCCAGAAGGCACAGGUCAGCGACAGGGAGACA GCCUGCACGAACACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCG GCAAUCAAGAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCG UCGACGAACUGGUAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCC GGAAAACAUCGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACAG ACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAA UGAAGAGAAUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAG CCAGAUCCUGAAGGAACACCCGGUCGAAAACACACAGC UGCAGAACGAAAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAA CGGAAGAGACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUC AACAGACUGAGCGACUACGACGUCGACCACAUCGUCCC GCAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGACAACAAG GUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCG ACAACGUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAGAAGAUGAA GAACUACUGGAGACAGCUGCUGAACGCAAAGCUGAUC ACACAGAGAAAGUUCGACAACCUGACAAAGGCAGAGA GAGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAU </p>

<p> CAAGAGACAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCACAAAG CACGUCGCACAGAUCUGGACAGCAGAAUGAACACAA AGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUCAGAGAAGUCA GGUCAUCACACUGAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUC AGAAAGGACUCCAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCA ACAACUACCACCACGCACACGACGCAUACCUGAACGCA GUCGUCGGAACAGCACUGAUCGAAGAAGUACCCGAAGC UGGAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGUCUA CGACGUCAGAAAGAUGAUCGCAAAGAGCGAACAGGAA AUCGGAAAGGCAACAGCAAAGUACUUCUUCUACAGCA ACAUCAUGAACUUCUUAAGACAGAAAUCACACUGGC AAACGGAGAAAUCAGAAAGAGACCGCUGAUCGAAAACA AACGGAGAAACAGGAGAAAUCGUCUGGGACAAGGGAA GAGACUUCGCAACAGUCAGAAAAGGUCCUGAGCAUGCC GCAGGUCAACAUCGUCAAGAAGACAGAAGUCCAGACA GGAGGAUUCAGCAAGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAA ACAGCGACAAGCUGAUCGCAAGAAAGAAGGACUGGGA CCCGAAGAAGUACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUC GCAUACAGCGUCCUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGG GAAAGAGCAAGAAGCUGAAGAGCGUCAAGGAACUGCU GGGAAUCACAAUCAUGGAAAGAAGCAGCUUCGAAAAG AACCCGAUCGACUUCUGGAAGCAAAGGGAUACAAGG AAGUCAAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUA CAGCCUGUUCGAACUGGAAAACGGAAAGAAAGAGAAUG CUGGCAAGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAAC UGGCACUGCCGAGCAAGUACGUCAACUCCUGUACCUG GCAAGCCACUACGAAAAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAG ACAACGAACAGAAGCAGCUGUUCGUCGAACAGCACAA GCACUACCUGGACGAAAUCAUCGAACAGAUACAGCGAA UUCAGCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAAACCUGG ACAAGGUCCUGAGCGCAUACAACAAGCACAGAGACAA GCCGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUCCACCUG UUCACACUGACAAACCUGGGAGCACCGGCAGCAUUCAA GUACUUCGACACAACAUCGACAGAAAGAGAUACACA AGCACAAAGGAAGUCCUGGACGCAACACUGAUCCACCA </p>
--

	GAGCAUCACAGGACUGUACGAAACAAGAAUCGACCUG AGCCAGCUGGGAGGAGACUAG	
Кодирующая никазу Cas9 последователь- ность, кодирующая SEQ ID NO: 16, с использование м кодонов с минимальным содержанием уридина, перечисленны х в таблице 3 (без старт- или стоп-кодонов; подходит для включения в последователь- ность, кодирующую слитый белок)	GACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGCAAUCGGAACAA ACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUACAA GGUCCCGAGCAAGAAGUUCAAGGUCCUGGGAAACACA GACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGAGCAC UGCUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAG ACUGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGAUACACAAGAAGA AAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUCUUCAGCA ACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUCCACAG ACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAGAAG CACGAAAGACACCCGAUCUUCGGAACAUCGUCGACGA AGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCGACAAUCUACCACC UGAGAAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGA CCUGAGACUGAUCUACCUGGCACUGGCACACAUGAUCA AGUUCAGAGGACACUCCUGAUCGAAGGAGACCUGAA CCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUCAUCCAGC UGGUCCAGACAUACAACCAGCUGUUCGAAGAAAACCC GAUCAACGCAAGCGGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUG AGCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUGGAAAACC UGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACU GUUCGGAACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACA CCGAACUUAAGAGCAACUUCGACCUGGCAGAAGACGC AAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACGACGACGAC CUGGACAACCUGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGUACGC AGACCUGUCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCA AUCCUGCUGAGCGCAUCCUGAGAGUCAACACAGAAA UCACAAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAGAG AUACGACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGG CACUGGUCAGACAGCAGCUGCCGAAAAGUACAAGGA AAUCUUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGAUACGCAGGA UACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACA AGUUCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAAC AGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAGACCUG CUGAGAAAGCAGAGAACAUCGACAACGGAAGCAUCC	18

<p> CGCACCAGAUCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUG AGAAGACAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACA ACAGAGAAAAGAUUCGAAAAGAUCCUGACAUUCAGAAU CCCGUACUACGUCGACCGCUGGCAAGAGGAAACAGCA GAUUCGCAUUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAAU CACACCGUGGAACUUCGAAGAAGUCGUCGACAAGGGA GCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGAAUGACAAACU UCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAA GCACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACG AACUGACAAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAAUGAG AAAGCCGGCAUUCUGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCA AUCGUCGACCUGCUGUUAAGACAAACAGAAAGGUCA CAGUCAAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUCAAGAAGAU CGAAUGCUUCGACAGCGUCGAAAUCAGCGGAGUCGAA GACAGAUUCAACGCAAGCCUGGGAAACAUACCACGACCU GCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCUGGACAAC GAAGAAAACGAAGACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGA CACUGACACUGUUCGAAGACAGAGAAAUGAUCGAAGA AAGACUGAAGACAUACGCACACCUGUUCGACGACAAG GUCAUGAAGCAGCUGAAGAGAAGAAGAUACACAGGAU GGGGAAGACUGAGCAGAAAGCUGAUAACGGAAUCAG AGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUGGACUUCUG AAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAUGCAGC UGAUCCACGACGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGACAU CCAGAAGGCACAGGUCAGCGGACAGGGAGACAGCCUG CACGAACACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCGGCAAU CAAGAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGAC GAACUGGUCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAA ACAUCGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCAGACAAC ACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAAG AGAAUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAGCCAGA UCCUGAAGGAACACCCGUCGAAAACACACAGCUCGAG AACGAAAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGAA GAGACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACAG ACUGAGCGACUACGACGUCGACCACAUCGUCCCGCAGA </p>
--

<p> GCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGACAACAAGGUCCU GACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAAC GUCCCCGAGCGAAGAAGUCGUAAGAAGAUGAAGAACU ACUGGAGACAGCUGCUGAACGCAAAGCUGAUCACACA GAGAAAGUUCGACAACCUGACAAAGGCAGAGAGAGGA GGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAGA GACAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUACAAAAGCACGU CGCACAGAUCCUGGACAGCAGAAUGAACACAAAGUAC GACGAAAACGACAAGCUGAUCAGAGAAGUCAAGGUCA UCACACUGAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAA GGACUUCCAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAAC UACCACCACGCACACGACGCAUACCUGAACGCAGUCGU CGGAACAGCACUGAUCAAGAAGUACCCGAAGCUGGAA AGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACG UCAGAAAGAUGAUCGCAAAGAGCGAACAGGAAAUCGG AAAGGCAACAGCAAAGUACUUCUUCUACAGCAACAUC AUGAACUUCUUAAGACAGAAAUCACACUGGCAAACG GAGAAAUCAGAAAGAGACCGCUGAUCGAAACAAACGG AGAAACAGGAGAAAUCGUCUGGGACAAGGGAAAGAGAC UUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCAUGCCGCAGG UCAACAUCGUAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGG AUUCAGCAAGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGC GACAAGCUGAUCGCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGA AGAAGUACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUA CAGCGUCCUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAG AGCAAGAAGCUGAAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAA UCACAAUCAUGGAAAGAAGCAGCUUCGAAAAGAACCC GAUCGACUCCUGGAAGCAAAGGGAUACAAGGAAGUC AAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCC UGUUCGAACUGGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGC AAGCGCAGGAGAACUGCAGAAAGGGAAACGAACUGGCA CUGCCGAGCAAGUACGUAACUCCUGUACCUGGCAAG CCACUACGAAAAGCUGAAGGGAAAGCCCGAAGACAAC GAACAGAAGCAGCUGUUCGUCGAACAGCACAAGCACU ACCUGGACGAAAUCAUCGAACAGAUACAGCGAAUUCAG </p>
--

	CAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAG GUCCUGAGCGCAUACAACAAGCACAGAGACAAGCCGA UCAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUCCACCUGUUCAC ACUGACAAACCUGGGAGCACCGGCAGCAUUCAAGUAC UUCGACACAACAUCGACAGAAAGAGAUACACAAGCA CAAAGGAAGUCCUGGACGCAACACUGAUCCACCAGAGC AUCACAGGACUGUACGAAACAAGAAUCGACCUGAGCC AGCUGGGAGGAGAC	
Аминокислот ная последователь ность dCas9 (без NLS)	MDKKYSIGLAIGTNSVGVAVITDEYKVPSSKFKVLGNTDR HSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICY LQEIFSNEMAKVDDSSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIV DEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIK FRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASG VDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNLFGNLIALSLG LTPNFKSNFDLAEDAQLQSKDITYDDDLNLLAQIGDQYA DLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHH QDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQ EEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKNLREDLLRKQRTFDNGSIP HQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTRIPYYVGP LARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIER MTNFDKNLPNEKVLPHKSLLEYFTVYNELTKVKYVTEG MRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIE CFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDI LEDIVLTLTLFEDREMIEERLKYAHLFDDKVMKQLKRRR YTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQ LIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGI LQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIAMARENQTTQKGQKN SRERMKRIEIEGKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQ NGRDMYVDQELDINRLSDYDVAIVPQSFLKDDSIDNKVL TRSDKNRGKSDNPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRK FDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDS RMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVEI NNYHHAHDA YLNAVVGTA LIKKY PKLESEFVYGDYKVYD VRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRK RPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVL SMPQVNIVKKTE	19

	<p>VQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTV AYSVLVVAKVEKGKSKLKSVKELLGITIMERSSEKNPID FLEAKGYKEVKKDLIJKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQ KGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLGSPEDNEQKQLFVEQ HKHYLDEIIEQISEFSKRVLADANLDKVLSAYNKHRDKPIR EQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDA TLIHQSITEGLYETRIDLSQLGGD</p>	
<p>OPC мРНК dCas9, кодирующая SEQ ID NO: 19, с использование м кодонов с минимальным содержанием уридина, как указано в таблице 3, со старт- и стоп- кодонами</p>	<p>AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGCAAUCGGAA CAAACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUA CAAGGUCCCCGAGCAAGAAGUUCAAGGUCCUGGGAAAC ACAGACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGAG CACUGCUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAAC AAGACUGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGAUACACAAGA AGAAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUCUUCA GCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUCCA CAGACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAG AAGCACGAAAGACACCCGAUCUUCGGAACAUCGUCG ACGAAGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCGACAAUCUAC CACCUGAGAAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGG CAGACCUGAGACUGAUCUACCUGGCACUGGCACACAUG AUCAAGUUCAGAGGACACUCCUGAUCGAAGGAGACC UGAACCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUAUC CAGCUGGUCCAGACAUACAACCAGCUGUUCGAAGAAA ACCCGAUCAACGCAAGCGGAGUCGACGCAAAGGCAAUC CUGAGCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUGGAAA ACCUGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGG ACUGUUCGGAAACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUG ACACCGAACUUCAAGAGCAACUUCGACCUGGCAGAAG ACGCAAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACGACGA CGACCUGGACAACCUGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGU ACGCAGACCUGUCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGAC GCAAUCCUGCUGAGCGACAUCUGAGAGUCAACACAG AAAUCACAAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAA GAGAUACGACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGA AGGCACUGGUCAGACAGCAGCUGCCGAAAAGUACAA</p>	<p>20</p>

GGAAAUCUUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGAUACGCA GGAUACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCU ACAAGUUCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGG AACAGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAGAC CUGCUGAGAAAAGCAGAGAAACAUUCGACAACGGAAGCA UCCCGCACCAAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUC CUGAGAAGACAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGG ACAACAGAGAAAAGAUCGAAAAGAUCUGACAUCAG AAUCCCGUACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAAC AGCAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAGAAA CAAUCACACCGUGGAACUUCGAAGAAGUCGUCGACAA GGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGAAUGACA AAUUCGACAAGAACCUGCCGAAACGAAAAGGUCCUGCC GAAGCACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUAC AACGAACUGACAAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAA UGAGAAAGCCGGCAUUCUGAGCGGAGAACAGAAGAA GGCAAUCGUCGACCUGCUGUUAAGACAAACAGAAAAG GUCACAGUCAAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUAAGA AGAUCGAAUGCUUCGACAGCGUCGAAAUCAGCGGAGU CGAAGACAGAUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUACCAC GACCUGCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCUCCUG ACAACGAAGAAAACGAAGACAUCUCCUGGAAGACAUCGU CCUGACACUGACACUGUUCGAAGACAGAGAAAUGAUC GAAGAAAGACUGAAGACAUCGACACACCCUGUUCGACG ACAAGGUCAUGAAGCAGCUGAAGAGAAGAAGAUACAC AGGAUGGGGAAGACUGAGCAGAAAGCUGAUAACGGA AUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUGGACU UCCUGAAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAU GCAGCUGAUCCACGACGACAGCCUGACAUCUUAAGGAA GACAUCCAGAAGGCACAGGUCAGCGGACAGGGAGACA GCCUGCACGAACACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCC GCAAUCAAGAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCG UCGACGAACUGGUCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCC GGAAAACAUCGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCAG ACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAAGAA
--

<p> UGAAGAGAAUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAG CCAGAUCCUGAAGGAACACCCGGUCGAAAACACACAGC UGCAGAACGAAAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAA CGGAAGAGACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUC AACAGACUGAGCGACUACGACGUCGACGCAAUCGUCC GCAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGACAACAAG GUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCG ACAACGUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAGAAGAUGAA GAACUACUGGAGACAGCUGCUGAACGCAAAGCUGAUC ACACAGAGAAAAGUUCGACAACCUGACAAAGGCAGAGA GAGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAU CAAGAGACAGCUGGUCGAAAACAAGACAGAUCAAAAG CACGUCGCACAGAUCCUGGACAGCAGAAUGAACACAA AGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUCAGAGAAGUCA GGUCAUCACACUGAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUC AGAAAGGACUCCAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCA ACAACUACCACCACGCACACGACGCAUACCUGAACGCA GUCGUCGGAACAGCACUGAUC AAGAAGUACCCGAAGC UGGAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGUCUA CGACGUCAGAAAAGAUGAUCGCAAAGAGCGAACAGGAA AUCGGAAGGCAACAGCAAAGUACUUCUUCUACAGCA ACAUCAUGAACUUCUUAAGACAGAAAUCACACUGGC AAACGGAGAAAUCAGAAAGAGACCGCUGAUCGAAACA AACGGAGAAACAGGAGAAAUCGUCUGGGACAAGGGAA GAGACUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCAUGCC GCAGGUCAACAUCGUCAAGAAGACAGAAGUCCAGACA GGAGGAUUCAGCAAGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAA ACAGCGACAAGCUGAUCGCAAGAAAGAAGGACUGGGA CCCGAAGAAGUACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUC GCAUACAGCGUCCUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGG GAAAGAGCAAGAAGCUGAAGAGCGUCAAGGAACUGCU GGGAAUCACAAUCAUGGAAAGAAGCAGCUUCGAAAAG AACCCGAUCGACUCCUGGAAGCAAAGGGAUACAAGG AAGUCAAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUA CAGCCUGUUCGAACUGGAAAACGGAAGAAAGAGAAUG </p>
--

	<p>CUGGCAAGCGCAGGAGAACUGCAGAAAGGGAAACGAAC UGGCACUGCCGAGCAAGUACGUCAACUCCUGUACCUG GCAAGCCACUACGAAAAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAG ACAACGAACAGAAGCAGCUGUUCGUCGAACAGCACAA GCACUACCUGGACGAAAUCAUCGAACAGAUAGCGAA UUCAGCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAAACCCUGG ACAAGGUCCUGAGCGCAUACAACAAGCACAGAGACAA GCCGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUCCACCUG UUCACACUGACAAACCUGGGAGCACCCGGCAGCAUUCAA GUACUUCGACACAACAUCGACAGAAAGAGAUACACA AGCACAAAGGAAGUCCUGGACGCAACACUGAUCCACCA GAGCAUCACAGGACUGUACGAAACAAGAAUCGACCUG AGCCAGCUGGGAGGAGACUAG</p>	
<p>dCas9- кодирующая последователь ность, кодирующая SEQ ID NO: 19, с использование м кодонов с минимальным содержанием уридина, перечисленны х в таблице 3 (без старт- или стоп-кодонов; подходит для включения в последователь ность, кодирующую слитый белок)</p>	<p>GACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGCAAUCGGAACAA ACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUACAA GGUCCCGAGCAAGAAGUUCAAGGUCCUGGGAAACACA GACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCCGAGCAC UGCUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAG ACUGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGAUACACAAGAAGA AAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUCUUCAGCA ACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUCCACAG ACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGAAAGAAGACAAGAAG CACGAAAGACACCCGAUCUUCGGAACAUCGUCGACGA AGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCGACAAUCUACCACC UGAGAAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGA CCUGAGACUGAUCUACCUGGCACUGGCACACAUGAUCA AGUUCAGAGGACACUUCUGAUCGAAAGGAGACCUGAA CCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUCAUCCAGC UGGUCCAGACAUAACAACCAGCUGUUCGAAGAAAACCC GAUCAACGCAAGCGGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUG AGCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUGGAAAACC UGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACU GUUCGGAACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACA CCGAACUUCAAGAGCAACUUCGACCUGGCAGAAGACGC AAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUAACGACGACGAC</p>	<p>21</p>

<p> CUGGACAACCUGCUGGGCACAGAUCGGAGACCAGUACGC AGACCUGUCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCA AUCCUGCUGAGCGACAUCCUGAGAGUCAACACAGAAA UCACAAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUC AAGAG AUACGACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGG CACUGGUCAGACAGCAGCUGCCGGAAAAGUACAAGGA AAUCUUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGAUACGCAGGA UACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACA AGUUCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAAC AGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAGACCUG CUGAGAAAAGCAGAGAACAUCGACAACGGAAGCAUCC CGCACCAGA UCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUG AGAAGACAGGAAGACUUCUACCCGUCCUGAAGGACA ACAGAGAAAAGAUCGAAAAGA UCCUGACAUUCAGAAU CCCGUACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAACAGCA GAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAAGAGCGAAGAAACA U CACACCGUGGAACUUCGAAGAAGUCGUCGACAAGGGA GCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAAAAGAAUGACAAACU UCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAA GCACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACG AACUGACAAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAAUGAG AAAGCCGGCAUCCUGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCA AUCGUCGACCUGCUGUUCAAGACAAACAGAAAGGUCA CAGUCAAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUCAAGAAGAU CGAAUGCUUCGACAGCGUCGAAAUCAGCGGAGUCGAA GACAGAUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUACCACGACCU GCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUCCUGGACAAC GAAGAAAACGAAGACA UCCUGGAAGACAUCGUCCUGA CACUGACACUGUUCGAAGACAGAGAAAUGAUCGAAGA AAGACUGAAGACAUACGCACACCUGUUCGACGACAAG GUCAUGAAGCAGCUGAAGAGAAGAAGAUACACAGGAU GGGGAAGACUGAGCAGAAAAGCUGAUCAACGGAAUCAG AGACAAGCAGAGCGGAAAAGACAAUCCUGGACUCCUG AAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAUGCAGC UGAUCCACGACGACAGCCUGACA UUCAAGGAAGACAU </p>

<p> CCAGAAGGCACAGGUCAGCGGACAGGGAGACAGCCUG CACGAACACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCGGCAAU CAAGAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGAC GAACUGGUCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAA ACAUCGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCAGACAAC ACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAAGAAUGAAG AGAAUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAGCCAGA UCCUGAAGGAACACCCGGUCGAAAACACACAGCUCGAG AACGAAAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGAA GAGACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACAG ACUGAGCGACUACGACGUCGACGCAAUCGUCCCGCAGA GCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGACAACAAGGUCCU GACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAAC GUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAGAAGAUGAAGAACU ACUGGAGACAGCUCGUAACGCAAAGCUGAUCACACA GAGAAAGUUCGACAACCUGACAAAGGCAGAGAGAGGA GGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAGA GACAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCAAAAGCACGU CGCACAGAUCCUGGACAGCAGAAUGAACACAAAGUAC GACGAAAACGACAAGCUGAUCAGAGAAGUCAAGGUCA UCACACUGAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAA GGACUUCAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAAC UACCACCACGCACACGACGCAUACCUGAACGCAGUCGU CGGAACAGCACUGAUCAAGAAGUACCCGAAGCUGGAA AGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACG UCAGAAAGAUGAUCGCAAAGAGCGAACAGGAAAUCGG AAAGGCAACAGCAAAGUACUUCUUCUACAGCAACAUC AUGAACUUCUUAAGACAGAAAUCACACUGGCAAACG GAGAAAUCAGAAAGAGACCGCUGAUCGAAACAAACGG AGAAACAGGAGAAAUCGUCUGGGACAAGGGAAGAGAC UUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCAUGCCCGCAGG UCAACAUCGUCAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGG AUUCAGCAAGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGC GACAAGCUGAUCGCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGA AGAAGUACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUA </p>
--

	<p>CAGCGUCCUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAG AGCAAGAAGCUGAAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAA UCACAAUCAUGGAAAGAAGCAGCUUCGAAAAGAACCC GAUCGACUCCUGGAAGCAAAGGGAUACAAGGAAGUC AAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCC UGUUCGAACUGGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGC AAGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAACUGGCA CUGCCGAGCAAGUACGUCAACUCCUGUACCUGGCAAG CCACUACGAAAAGCUGAAGGGGAAGCCCGGAAGACAAC GAACAGAAGCAGCUGUUCGUCGAACAGCACAAGCACU ACCUGGACGAAAUCAUCGAACAGAUACAGCGAAUUCAG CAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAG GUCCUGAGCGCAUACAACAAGCACAGAGACAAGCCGA UCAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUCCACCUGUUCAC ACUGACAAACCUGGGAGCACCGGCAGCAUUCAAGUAC UUCGACACAACAUCGACAGAAAGAGAUACACAAGCA CAAAGGAAGUCCUGGACGCAACACUGAUCCACCAGAGC AUCACAGGACUGUACGAAACAAGAAUCGACCUGAGCC AGCUGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGC</p>	
<p>Аминокислот ная последователь ность Cas9 с двумя сигналами ядерной локализации в качестве C- концевых аминокислот</p>	<p>MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKFKVLGNTDR HSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICY LQEIFSNEMAKVDDSFHRLSEESFLVEEDKKHERHPIFGNIV DEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIK FRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASG VDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNLFGNLIASLG LTPNFKSNFDLAEDAQLQSKDQYDDDLNLLAQIGDQYA DLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHN QDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQ EEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKNREDLLRKQRTFDNGSIP HQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILFRIPYYVGP LARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASQSFIER MTNFDKNLPNEKVLPHSLLEYFTVYNELTKVKYVTEG MRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIE CFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIKDKDFLDNEENEDI LEDIVLTLTLFEDREMIEERLKYAHLFDDKVMKQLKRRR</p>	<p>22</p>

	<p>YTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQ LIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGI LQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKN SRERMKRIIEGKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQ NGRDMYVDQELDINRLSDYDVHDHIVPQSFLKDDSIDNKVL TRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRK FDNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDS RMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVREI NNYHHAHDAYLNAVVGTAIIKKYPKLESEFVYGDYKVYD VRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRK RPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSPQVNIKKTE VQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKGFFDSPTV AYSVLVVAKVEKGKSKLKSVKELLGITIMERSSEKFNPID FLEAKGYKEVKKDLIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQ KGNELALPSKYVNFYLYASHYEKLGSPEDNEQKQLFVEQ HKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIR EQAENIIHLFTLNLGAPAAFYFDTTIDRKRYTSTKEVLDA TLIHQSTGLYETRIDLSQLGGD GSGSPKKKRKVDGSPKKKRKVDSDG</p>	
<p>ОПС мРНК Cas9, кодирующая SEQ ID NO: 22, с использование м кодонов с минимальным содержанием уридина, как указано в таблице 3, со старт- и стоп- кодонами</p>	<p>AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGACAUCGGAA CAAACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUA CAAGGUCCCGAGCAAGAAGUUAAGGUCCUGGGAAAC ACAGACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGAG CACUGCUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAAC AAGACUGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGAUACACAAGA AGAAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUCUUCA GCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUCCA CAGACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAG AAGCACGAAAGACACCCGAUCUUCGGAACAUCGUCG ACGAAGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCGACAAUCUAC CACCUGAGAAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGG CAGACCUGAGACUGAUCUACCUGGCACUGGCACACAUG AUCAAGUUCAGAGGACACUCCUGAUCGAAGGAGACC UGAACCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUAUC CAGCUGGUCCAGACAUACAACCAGCUGUUCGAAGAAA</p>	<p>23</p>

<p> ACCCGAUCAACGCAAGCGGAGUCGACGCAAAGGCAAUC CUGAGCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUGGAAA ACCUGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGG ACUGUUCGGAAACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUG ACACCGAACUUCAAGAGCAACUUCGACCUGGCAGAAG ACGCAAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACGACGA CGACCUGGACAACCUGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGU ACGCAGACCUGUCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGAC GCAAUCCUGCUGAGCGACAUCCUGAGAGUCAACACAG AAAUCACAAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAA GAGAUACGACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGA AGGCACUGGUCAGACAGCAGCUGCCGAAAAGUACAA GGAAAUCUUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGAUACGCA GGAUACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCU ACAAGUUCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGG AACAGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAGAC CUGCUGAGAAAAGCAGAGAACAUUCGACAACCGGAAGCA UCCCGCACCAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUC CUGAGAAGACAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGG ACAACAGAGAAAAGAUCGAAAAGAUCUGACAUCAG AAUCCCGUACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAAC AGCAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAGAAA CAAUCACACCGUGGAACUUCGAAGAAGUCGUCGACAA GGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGAAUGACA AACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCC GAAGCACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUAC AACGAACUGACAAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAA UGAGAAAGCCGGCAUUCUGAGCGGAGAACAGAAGAA GGCAAUCGUCGACCUGCUGUUAAGACAAACAGAAAAG GUCACAGUCAAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUAAGA AGAUCGAAUGCUUCGACAGCGUCGAAAUCAGCGGAGU CGAAGACAGAUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUACCAC GACCUGCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCUCCUG ACAACGAAGAAAACGAAGACAUCCUGGAAGACAUCGU CCUGACACUGACACUGUUCGAAGACAGAGAAAUGAUC </p>

<p> GAAGAAAGACUGAAGACAUACGCACACCUGUUCGACG ACAAGGUCAUGAAGCAGCUGAAGAGAAGAAGAUACAC AGGAUGGGGAAGACUGAGCAGAAAAGCUGAUAACGGA AUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUGGACU UCCUGAAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAU GCAGCUGAUCCACGACGACAGCCUGACAUUCAAGGAA GACAUCCAGAAGGCACAGGUCAGCGGACAGGGAGACA GCCUGCACGAACACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCC GCAAUCAAGAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCG UCGACGAACUGGUAAGGUAUGGGAAGACACAAGCC GGAAAACAUCGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCAG ACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAAGAA UGAAGAGAAUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAG CCAGAUCUGAAGGAACACCCGGUCGAAAACACACAGC UGCAGAACGAAAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAA CGGAAGAGACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUC AACAGACUGAGCGACUACGACGUCGACCACAUCGUCCC GCAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGACAACAAG GUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCG ACAACGUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAGAAGAUGAA GAACUACUGGAGACAGCUGCUGAACGCAAAGCUGAUC ACACAGAGAAAGUUCGACAACCUGACAAAGGCAGAGA GAGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAU CAAGAGACAGCUGGUCGAAAACAAGACAGAUACAAAAG CACGUCGCACAGAUCUCCUGGACAGCAGAAUGAACACAA AGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUCAGAGAAGUCAA GGUCAUCACACUGAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUC AGAAAGGACUUCAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCA ACAACUACCACCACGCACACGACGCAUACCUGAACGCA GUCGUCGGAACAGCACUGAUC AAGAAGUACCCGAAGC UGGAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGUCUA CGACGUCAGAAAGAUGAUCGCAAAGAGCGAACAGGAA AUCGGAAAGGCAACAGCAAAGUACUUCUUCUACAGCA ACAUCAUGAACUUCUUAAGACAGAAAUCACACUGGC AAACGGAGAAAUCAGAAAGAGACCGCUGAUCGAAACA </p>
--

	AACGGAGAAACAGGAGAAAUCGUCUGGGACAAGGGAA GAGACUUCGCAACAGUCAGAAAAGGUCCUGAGCAUGCC GCAGGUCAACAUCGUCAAGAAGACAGAAGUCCAGACA GGAGGAUUCAGCAAGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAA ACAGCGACAAGCUGAUCGCAAGAAAGAAGGACUGGGA CCCGAAGAAGUACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUC GCAUACAGCGUCCUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGG GAAAGAGCAAGAAGCUGAAGAGCGUCAAGGAACUGCU GGGAAUCACAAUCAUGGAAAAGAAGCAGCUUCGAAAAG AACCCGAUCGACUCCUGGAAGCAAAGGGAUACAAGG AAGUCAAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUA CAGCCUGUUCGAACUGGAAAACGGAAGAAAGAGAAUG CUGGCAAGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAAC UGGCACUGCCGAGCAAGUACGUCAACUCCUGUACCUG GCAAGCCACUACGAAAAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAG ACAACGAACAGAAGCAGCUGUUCGUCGAACAGCACAA GCACUACCUGGACGAAAUCAUCGAACAGAUACAGCGAA UUCAGCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAAACCUUG ACAAGGUCCUGAGCGCAUACAACAAGCACAGAGACAA GCCGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUCCACCUG UUCACACUGACAAACCUGGGAGCACCCGGCAGCAUUCAA GUACUUCGACACAACAUCGACAGAAAGAGAUACACA AGCACAAAGGAAGUCCUGGACGCAACACUGAUCCACCA GAGCAUCACAGGACUGUACGAAAACAAGAAUCGACCUG AGCCAGCUGGGAGGAGACGGAAGCGGAAGCCCGAAGA AGAAGAGAAAGGUCGACGGAAGCCCGAAGAAGAAGAG AAAGGUCGACAGCGGAUAG	
Cas9- кодирующая последователь- ность, кодирующая SEQ ID NO: 23, с использование	GACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGACAUCGGAACAA ACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUACAA GGUCCCGAGCAAGAAGUUCAAGGUCCUGGGAAACACA GACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGAGCAC UGCUGUUCGACAGCGGAGAAAACAGCAGAAGCAACAAG ACUGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGAUACACAAGAAGA AAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUCUUCAGCA ACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUCCACAG	24

<p>м кодонов с минимальным содержанием уридина, перечисленных в таблице 3 (без старт- или стоп-кодонов; подходит для включения в последовательность, кодирующую слитый белок)</p>	<p>ACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAGAAG CACGAAAGACACCCGAUCUUCGGAAACAUCGUCGACGA AGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCGACAAUCUACCACC UGAGAAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGA CCUGAGACUGAUCUACCUGGCACUGGCACACAUGAUCA AGUUCAGAGGACACUUCCUGAUCGAAGGAGACCUGAA CCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUCAUCCAGC UGGUCCAGACAUAACAACCAGCUGUUCGAAGAAAACCC GAUCAACGCAAGCGGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUG AGCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUGGAAAACC UGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACU GUUCGGAAACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACA CCGAACUUCAAGAGCAACUUCGACCUGGCAGAAGACGC AAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUAACGACGACGAC CUGGACAACCUGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGUACGC AGACCUGUUCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCA AUCCUGCUGAGCGACAUCCUGAGAGUCAACACAGAAA UCACAAAGGCACCCGUGAGCGCAAGCAUGAUCAAGAG AUACGACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGG CACUGGUCAGACAGCAGCUGCCGAAAAGUACAAGGA AAUCUUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGAUACGCAGGA UACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACA AGUUCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAAC AGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAGACCUG CUGAGAAAGCAGAGAACAUCGACAACGGAAGCAUCC CGCACCAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUG AGAAGACAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACA ACAGAGAAAAGAUUCGAAAAGAUCCUGACAUUCAGAAU CCCGUACUACGUCGGACCCGUGGCAAGAGGAAACAGCA GAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAGAAACA CACACCGUGGAACUUCGAAGAAGUCGUCGACAAGGGA GCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGAAUGACAAACU UCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAA GCACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACG AACUGACAAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAAUGAG</p>	
--	--	--

AAAGCCGGCAUUCCUGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCA AUCGUCGACCUGCUGUUCAAGACAAACAGAAAGGUCA CAGUCAAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUCAAGAAGAU CGAAUGCUUCGACAGCGUCGAAAUCAGCGGAGUCGAA GACAGAUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUACCACGACCU GCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCCUGGACAAC GAAGAAAACGAAGACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGA CACUGACACUGUUCGAAGACAGAGAAAUGAUCGAAGA AAGACUGAAGACAUACGCACACCUGUUCGACGACAAG GUCAUGAAGCAGCUGAAGAGAAGAAGAUACACAGGAU GGGGAAGACUGAGCAGAAAGCUGAUAACGGAAUCAG AGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUGGACUUCCUG AAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAUGCAGC UGAUCCACGACGACAGCCUGACAUUAAGGAAGACAU CCAGAAGGCACAGGUCAGCGGACAGGGAGACAGCCUG CACGAACACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCGGCAAU CAAGAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGAC GAACUGGUCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAA ACAUCGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCAGACAAC ACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAAG AGAAUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAGCCAGA UCCUGAAGGAACACCCGGUCGAAAACACACAGCUCGAG AACGAAAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGAA GAGACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACAG ACUGAGCGACUACGACGUCGACCACAUCGUCCCGCAGA GCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGACAACAAGGUCCU GACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAAC GUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAGAAGAUGAAGAACU ACUGGAGACAGCUCUGAACGCAAAGCUGAUCACACA GAGAAAGUUCGACAACCUGACAAAGGCAGAGAGAGGA GGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAGA GACAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCAACAAGCACGU CGCACAGAUCCUGGACAGCAGAAUGAACACAAAGUAC GACGAAAACGACAAGCUGAUCAGAGAAGUCAAGGUCA UCACACUGAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAA
--

GGACUCCAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAAC
 UACCACCACGCACACGACGCAUACCUGAACGCAGUCGU
 CGGAACAGCACUGAUC AAGAAGUACCCGAAGCUGGAA
 AGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACG
 UCAGAAAAGAUCAUCGCAAAGAGCGAACAGGAAAUCGG
 AAAGGCAACAGCAAAGUACUUCUUCUACAGCAACAUC
 AUGAACUUCUUAAGACAGAAAUCACACUGGCAAACG
 GAGAAAUCAGAAAGAGACCGCUGAUCGAAACAAACGG
 AGAAACAGGAGAAAUCGUCUGGGACAAGGGAAGAGAC
 UUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCAUGCCGCAGG
 UCAACAUCGUCAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGG
 AUUCAGCAAGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGC
 GACAAGCUGAUCGCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGA
 AGAAGUACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUA
 CAGCGUCCUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAG
 AGCAAGAAGCUGAAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAA
 UCACAAUCAUGGAAAGAAGCAGCUUCGAAAAGAACCC
 GAUCGACUUCUGGAAGCAAAGGGAUACAAGGAAGUC
 AAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCC
 UGUUCGAACUGGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGC
 AAGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAACUGGCA
 CUGCCGAGCAAGUACGUCAACUCCUGUACCUGGCAAG
 CCACUACGAAAAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACAAC
 GAACAGAAGCAGCUGUUCGUCGAACAGCACAAAGCACU
 ACCUGGACGAAAUCAUCGAACAGAUCAAGCGAAUUCAG
 CAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAG
 GUCCUGAGCGCAUACAACAAGCACAGAGACAAGCCGA
 UCAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUCCACCUGUUCAC
 ACUGACAAAACCUGGGAGCACCGGCAGCAUUCAAGUAC
 UUCGACACAACAUCGACAGAAAGAGAUACACAAGCA
 CAAAGGAAGUCCUGGACGCAACACUGAUCCACCAGAGC
 AUCACAGGACUGUACGAAACAAGAAUCGACCUGAGCC
 AGCUGGGAGGAGACGGAAGCGGAAGCCCGAAGAAGAA
 GAGAAAGGUCGACGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAG
 GUCGACAGCGGA

<p>Аминокислотная последовательность нуклеотидов Cas9 с двумя сигналами ядерной локализации в качестве C-концевых аминокислот</p>	<p>MDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDR HSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICY LQEIFSNEMAKVDDSFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIV DEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIK FRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASG VDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIASLG LTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLNLLAQIGDQYA DLFLAAKNLSDAILSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHH QDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQ EEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIP HQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTRIPYYVGP LARGNSRFAMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIER MTNFDKNLPNEKVLPHKSLLEYFTVYNELTKVKYVTEG MRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIE CFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIKDKDFLDNEENEDI LEDIVLTLTLFEDREMIEERLKYAHLFDDKVMKQLKRRR YTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFQM LIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGI LQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIAMARENQTTQKGQKN SRERMKRIIEGKELGSQLKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQ NGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVL TRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRK FDNLTKAERGGSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDS RMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVREI NNYHHAHDAYLNAVVGTAIIKYPKLESEFVYGDYKVDY VRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRK RPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSPQVNIKKTE VQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTV AYSVLVVAKVEKGKSKLKSVKELLGITIMERSSEKPNPID FLEAKGYKEVKKDLIILPKYSLFELENGRKRMLASAGELQ KGNELALPSKYVNFYLYLASHYEKLGSPEDNEQKQLFVEQ HKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVL SAYNKHRRDKPIR EQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDA TLIHSITGLYETRIDLSQLGGDGSQPKKKRKYVDSGPKKK RKVDSG</p>	<p>25</p>
--	--	-----------

<p>ОПС мРНК никазы Cas9, кодирующая SEQ ID NO: 25, с использование м кодонов с минимальным содержанием уридина, как указано в таблице 3, со старт- и стоп- кодонами</p>	<p>AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGCAAUCGGAA CAAACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUA CAAGGUCCCGAGCAAGAAGUUCAAGGUCCUGGGAAAC ACAGACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGAG CACUGCUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAAC AAGACUGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGAUACACAAGA AGAAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUCUUCA GCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUCCA CAGACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAG AAGCACGAAAGACACCCGAUCUUCGAAACAUCGUCG ACGAAGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCGACAAUCUAC CACCUGAGAAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGG CAGACCUGAGACUGAUCUACCUGGCACUGGCACACAUG AUCAAGUUCAGAGGACACUUCUGAUCGAAGGAGACC UGAACCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUAUC CAGCUGGUCCAGACAUAACAACCAGCUGUUCGAAGAAA ACCCGAUCAACGCAAGCGGAGUCGACGCAAAGGCAAUC CUGAGCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUGGAAA ACCUGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGG ACUGUUCGGAAACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUG ACACCGAACUUCAAGAGCAACUUCGACCUGGCAGAAG ACGCAAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACGACGA CGACCUGGACAACCUGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGU ACGCAGACCUGUUCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGAC GCAAUCCUGCUGAGCGACAUCCUGAGAGUCAACACAG AAAUCACAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAA GAGAUACGACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGA AGGCACUGGUCAGACAGCAGCUGCCGAAAAGUACAA GGAAAUCUUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGAUACGCA GGAUACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCU ACAAGUUCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGG AACAGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAGAC CUGCUGAGAAAGCAGAGAACAUCGACAACCGAAGCA UCCCGCACCAAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUC CUGAGAAGACAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGG</p>	<p>26</p>
--	--	-----------

<p> ACAACAGAGAAAAGAUCGAAAAGAUCUGACAUUCAG AAUCCCGUACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAAC AGCAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAAGAGCGAAGAAA CAAUCACACCGUGGAACUUCGAAGAAGUCGUCGACAA GGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAAAAGAAUGACA AACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCC GAAGCACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUAC AACGAACUGACAAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAA UGAGAAAGCCGGCAUUCUGAGCGGAGAACAGAAGAA GGCAAUCGUCGACCUGCUGUUAAGACAAACAGAAAAG GUCACAGUCAAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUAAGA AGAUCGAAUGCUUCGACAGCGUCGAAAUCAGCGGAGU CGAAGACAGAUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUACCAC GACCUGCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUCCUGG ACAACGAAGAAAACGAAGACAUCCUGGAAGACAUCGU CCUGACACUGACACUGUUCGAAGACAGAGAAAUGAUC GAAGAAAAGACUGAAGACAUACGCACACCUGUUCGACG ACAAGGUCAUGAAGCAGCUGAAGAGAAGAAGAUACAC AGGAUGGGGAAGACUGAGCAGAAAAGCUGAUCAACGGAA AUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUGGACU UCCUGAAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAU GCAGCUGAUCCACGACGACAGCCUGACAUUCAAGGAA GACAUCCAGAAGGCACAGGUCAGCGACAGGGAGACA GCCUGCACGAACACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCCG GCAAUCAAGAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCG UCGACGAACUGGUCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCC GGAAAACAUCGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCAG ACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAAGAA UGAAGAGAAUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAG CCAGAUCCUGAAGGAACACCCGGUCGAAAACACACAGC UGCAGAACGAAAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAA CGGAAGAGACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUC AACAGACUGAGCGACUACGACGUCGACCACAUCGUCCC GCAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGACAACAAG GUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCG </p>
--

<p> ACAACGUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAGAAGAUGAA GAACUACUGGAGACAGCUGCUGAACGCAAAGCUGAUC ACACAGAGAAAAGUUCGACAACCUGACAAAGGCAGAGA GAGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAU CAAGAGACAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCACAAAAG CACGUCGCACAGAUCCUGGACAGCAGAAUGAACACAA AGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUCAGAGAAGUCA GGUCAUCACACUGAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUC AGAAAGGACUCCAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCA ACAACUACCACCAGCACACGACGCAUACCUGAACGCA GUCGUCGGAACAGCACUGAUC AAGAAGUACCCGAAGC UGGAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGUCUA CGACGUCAGAAAAGAUCAUCGCAAAGAGCGAACAGGAA AUCGGAAAGGCAACAGCAAAGUACUUCUUCUACAGCA ACAUCAUGAACUUCUUAAGACAGAAAUCACACUGGC AAACGGAGAAAUCAGAAAGAGACCGCUGAUCGAAACA AACGGAGAAACAGGAGAAAUCGUCUGGGACAAGGGAA GAGACUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCAUGCC GCAGGUCAACAUCGUCAAGAAGACAGAAGUCCAGACA GGAGGAUUCAGCAAGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAA ACAGCGACAAGCUGAUCGCAAGAAAGAAGGACUGGGA CCCGAAGAAGUACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUC GCAUACAGCGUCCUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGG GAAAGAGCAAGAAGCUGAAGAGCGUCAAGGAACUGCU GGGAAUCACAAUCAUGGAAAGAAGCAGCUUCGAAAAG AACCCGAUCGACUCCUGGAAGCAAAGGGAUACAAGG AAGUCAAGAAGGACCUGAUAUCAAGCUGCCGAAGUA CAGCCUGUUCGAACUGGAAAACGGAAGAAAGAGAAUG CUGGCAAGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAAC UGGCACUGCCGAGCAAGUACGUCAACUCCUGUACCUG GCAAGCCACUACGAAAAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAG ACAACGAACAGAAGCAGCUGUUCGUCGAACAGCACAA GCACUACCUGGACGAAAUCAUCGAACAGAUCAGCGAA UUCAGCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAAACCUGG ACAAGGUCCUGAGCGCAUACAACAAGCACAGAGACAA </p>

	<p>GCCGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUCCACCUG UUCACACUGACAAACCUGGGAGCACCGGCAGCAUUCAA GUACUUCGACACAACAAUCGACAGAAAGAGAUACACA AGCACAAGGAAGUCCUGGACGCAACACUGAUCCACCA GAGCAUCACAGGACUGUACGAAACAAGAAUCGACCUG AGCCAGCUGGGAGGAGACGGAAGCGGAAGCCCGAAGA AGAAGAGAAAGGUCGACGGAAGCCCGAAGAAGAAGAG AAAGGUCGACAGCGGAUAG</p>	
<p>Кодирующая никазу Cas9 последователь ность, кодирующая SEQ ID NO: 25, с использование м кодонов с минимальным содержанием уридина, перечисленны х в таблице 3 (без старт- или стоп-кодонов; подходит для включения в последователь ность, кодирующую слитый белок)</p>	<p>GACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGCAAUCGGAACAA ACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUACAA GGUCCCGAGCAAGAAGUUCAAGGUCCUGGGAAACACA GACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCCGAGCAC UGCUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAG ACUGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGAUACACAAGAAGA AAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUCUUCAGCA ACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUCCACAG ACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAGAAG CACGAAAGACACCCGAUCUUCGGAACAUCGUCGACGA AGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCGACAAUCUACCACC UGAGAAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGA CCUGAGACUGAUCUACCUGGCACUGGCACACAUGAUCA AGUUCAGAGGACACUUCUGAUCGAAGGAGACCUGAA CCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUAUCCAGC UGGUCCAGACAUACAACCAGCUGUUCGAAGAAAACCC GAUCAACGCAAGCGGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUG AGCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUGGAAAACC UGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACU GUUCGGAACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACA CCGAACUUAAGAGCAACUUCGACCUGGCAGAAGACGC AAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACGACGACGAC CUGGACAACCUGCUGGCACAGAUCGGAGACCAGUACGC AGACCUGUUCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCA AUCCUGCUGAGCGACAUCUGAGAGUCAACACAGAAA UCACAAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAGAG AUACGACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGG</p>	27

<p> CACUGGUCAGACAGCAGCUGCCGGAAAAGUACAAGGA AAUCUUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGAUACGCAGGA UACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACA AGUUCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAAC AGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAGACCUG CUGAGAAAAGCAGAGAACAUCGACAACGGAAGCAUCC CGCACCAGAUCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUG AGAAGACAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACA ACAGAGAAAAGAUUCGAAAAGAUCCUGACAUUCAGAAU CCCGUACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAACAGCA GAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAGAAACA CACACCGUGGAACUUCGAAGAAGUCGUCGACAAGGGA GCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGAAUGACAAACU UCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAA GCACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACG AACUGACAAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAAUGAG AAAGCCGGCAUCCUGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCA AUCGUCGACCUGCUGUUAAGACAAACAGAAAGGUCA CAGUCAAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUCAAGAAGAU CGAAUGCUUCGACAGCGUCGAAAUCAGCGGAGUCGAA GACAGAUUCAACGCAAGCCUGGGAAACAUACCACGACCU GCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCUGGACAAC GAAGAAAACGAAGACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGA CACUGACACUGUUCGAAGACAGAGAAAUGAUCGAAGA AAGACUGAAGACAUACGCACACCUGUUCGACGACAAG GUCAUGAAGCAGCUGAAGAGAAGAAGAUACACAGGAU GGGGAAGACUGAGCAGAAAGCUGAUC AACGGAUCAG AGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUGGACUUCUG AAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAUGCAGC UGAUCCACGACGACAGCCUGACA UUCAAGGAAGACA CCAGAAGGCACAGGUCAGCGGACAGGGAGACAGCCUG CACGAACACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCGGCAAU CAAGAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGAC GAACUGGUCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAA ACAUCGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCAGACAAC </p>
--

ACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAUGAAG AGAAUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAGCCAGA UCCUGAAGGAACACCCGGUCGAAAACACACAGCUCGAG AACGAAAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGAA GAGACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUCAACAG ACUGAGCGACUACGACGUCGACCACAUCGUCCCCGAGA GCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGACAACAAGGUCCU GACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAAC GUCCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAGAAGAUGAAGAACU ACUGGAGACAGCUCGUAACGCAAAGCUGAUCACACA GAGAAAGUUCGACAACCUGACAAAAGGCAGAGAGAGGA GGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAUCAAGA GACAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUACAAAAGCACGU CGCACAGAUCCUGGACAGCAGAAUGAACACAAAGUAC GACGAAAACGACAAGCUGAUCAGAGAAGUCAAGGUCA UCACACUGAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAA GGACUUCCAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAAC UACCACCACGCACACGACGCAUACCUGAACGCAGUCGU CGGAACAGCACUGAUCAAGAAGUACCCGAAGCUGGAA AGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACG UCAGAAAGAUGAUCGCAAAGAGCGAACAGGAAAUCGG AAAGGCAACAGCAAAGUACUUCUUCUACAGCAACAUC AUGAACUUCUUAAGACAGAAAUCACACUGGCAAACG GAGAAAUCAGAAAGAGACCCGUGAUCGAAACAAACGG AGAAACAGGAGAAAUCGUCUGGGACAAGGGAAGAGAC UUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCAUGCCGCAGG UCAACAUCGUAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGG AUUCAGCAAGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGC GACAAGCUGAUCGCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGA AGAAGUACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUA CAGCGUCCUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAG AGCAAGAAGCUGAAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAA UCACAAUCAUGGAAAGAAGCAGCUUCGAAAAGAACCC GAUCGACUCCUGGAAGCAAAGGGAUACAAGGAAGUC AAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCC
--

	<p>UGUUCGAACUGGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGC AAGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAACUGGCA CUGCCGAGCAAGUACGUCAACUCCUGUACCUGGCAAG CCACUACGAAAAGCUGAAGGGGAAGCCCGGAAGACAAC GAACAGAAGCAGCUGUUCGUGAACAGCACAAGCACU ACCUGGACGAAAUCAUCGAACAGAUACAGCGAAUUCAG CAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAG GUCCUGAGCGCAUACAACAAGCACAGAGACAAGCCGA UCAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUCCACCUGUUCAC ACUGACAAAACCUGGGAGCACCGGCAGCAUUCAAGUAC UUCGACACAACAUCGACAGAAAGAGAUACACAAGCA CAAAGGAAGUCCUGGACGCAACACUGAUCCACCAGAGC AUCACAGGACUGUACGAAAACAAGAAUCGACCUGAGCC AGCUGGGAGGAGAC GGAAGCGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGUCGACG GAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGUCGACAGCGGA</p>	
<p>Аминокислот ная последователь ность dCas9 с двумя сигналами ядерной локализации в качестве С- концевых аминокислот</p>	<p>MDKKYSIGLAIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDR HSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICY LQEIFSNEMAKVDDSFHRLSEESFLVEEDKKHERHPIFGNIV DEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIK FRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASG VDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNLFGNLIALSLG LTPNFKSNFDLAEDAQLQSKDQYDDDLNLLAQIGDQYA DLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHN QDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQ EEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKNLREDLLRKQRTFDNGSIP HQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPYYVGP LARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEVVDKGASAQSFIER MTNFDKNLPNEKVLPHSLLEYFTVYNELTKVKYVTEG MRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIE CFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIKDKDFLDNEENEDI LEDIVLTLTLFEDREMIEERLKYAHLFDDKVMKQLKRRR YTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANRNFMQ LIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGI LQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIAMARENQTTQKGQKN</p>	28

	<p>SRERMKRIEIEGKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQ NGRDMYVDQELDINRLSDYDVDAIVPQSFLKDDSIDNKVL TRSDKNRGKSDNPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRK FDNLTKAERGGSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDS RMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVREI NNYHHAHDAYLNAVVGTAIIKKYPKLESEFVYGDYKVYD VRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRK RPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSPQVNVKKT VQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTV AYSVLVVAKVEKGSKKLKSVKELLGITIMERSSEKFNPID FLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELENGRKRMLASAGELQ KGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLGSPEDNEQQLFVEQ HKHYLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVL SAYNKH RDKPIR EQAENIIHLFTLNLGAPAAFYFDTTIDRKRYTSTKEV LDA TLIHSITGLYETRIDLSQLGGDGS GSPKKRKKVDGSPKKK RKVDSG</p>	
<p>ОПС мРНК dCas9, кодирующая SEQ ID NO: 28, с использование м кодонов с минимальным содержанием уридина, как указано в таблице 3, со старт- и стоп- кодонами</p>	<p>AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGCAAUCGGAA CAAACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUA CAAGGUCCCGAGCAAGAAGUUAAGGUCCUGGAAAC ACAGACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGAG CACUGCUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAAC AAGACUGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGAUACACAAGA AGAAAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUCUUCA GCAACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUCCA CAGACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAG AAGCACGAAAGACACCCGAUCUUCGAAACAUCGUCG ACGAAGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCGACAAUCUAC CACCUGAGAAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGG CAGACCUGAGACUGAUCUACCUGGCACUGGCACACAUG AUCAAGUUCAGAGGACACUCCUGAUCGAAGGAGACC UGAACCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUAUC CAGCUGGUCCAGACAUACAACCAGCUGUUCGAAGAAA ACCCGAUCAACGCAAGCGGAGUCGACGCAAAGGCAAUC CUGAGCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUGGAAA ACCUGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGG</p>	<p>29</p>

ACUGUUCGGAAACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUG
 ACACCGAACUUCAAGAGCAACUUCGACCUGGCAGAAG
 ACGCAAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACGACGA
 CGACCUGGACAACCUGCUGGCACAGAUCCGAGACCAGU
 ACGCAGACCUGUCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGAC
 GCAAUCCUGCUGAGCGACAUCCUGAGAGUCAACACAG
 AAAUCACAAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAA
 GAGAUACGACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGA
 AGGCACUGGUCAGACAGCAGCUGCCGAAAAGUACAA
 GGAAAUCUUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGAUACGCA
 GGUAACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCU
 ACAAGUUCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGG
 AACAGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAGAC
 CUGCUGAGAAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGGAAGCA
 UCCCGCACCAAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUC
 CUGAGAAGACAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGG
 ACAACAGAGAAAAGAUCGAAAAGAUCUGACAUCAG
 AAUCCCGUACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAAC
 AGCAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAGAAA
 CAAUCACACCGUGGAACUUCGAAGAAGUCGUCGACAA
 GGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGAAUGACA
 AACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCC
 GAAGCACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUAC
 AACGAACUGACAAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAA
 UGAGAAAAGCCGGCAUUCUGAGCGGAGAACAGAAGAA
 GGCAAUCGUCGACCUGCUGUUAAGACAAACAGAAAG
 GUCACAGUCAAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUAAGA
 AGAUCGAAUGCUUCGACAGCGUCGAAAUCAGCGGAGU
 CGAAGACAGAUUCAACGCAAGCCUGGGAACAUACCAC
 GACCUGCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUCCUGG
 ACAACGAAGAAAACGAAGACAUCCUGGAAGACAUCGU
 CCUGACACUGACACUGUUCGAAGACAGAGAAAUGAUC
 GAAGAAAGACUGAAGACAUCGCACACCUGUUCGACG
 ACAAGGUCAUGAAGCAGCUGAAGAGAAGAAGAUACAC
 AGGAUGGGGAAGACUGAGCAGAAAGCUGAUCAACGGA

<p> AUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAGACAAUCCUGGACU UCCUGAAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAU GCAGCUGAUCCACGACGACAGCCUGACAUUCAAGGAA GACAUCCAGAAGGCACAGGUCAGCGGACAGGGAGACA GCCUGCACGAACACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCG GCAAUCAAGAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCG UCGACGAACUGGUCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCC GGAAAACAUCGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCAG ACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAA UGAAGAGAAUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAG CCAGAUCCUGAAGGAACACCCGGUCGAAAACACACAGC UGCAGAACGAAAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAA CGGAAGAGACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUC AACAGACUGAGCGACUACGACGUCGACGCAAUCGUCCC GCAGAGCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGACAACAAG GUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCG ACAACGUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAGAAGAUGAA GAACUACUGGAGACAGCUGCUGAACGCAAAGCUGAUC ACACAGAGAAAGUUCGACAACCUGACAAAGGCAGAGA GAGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUCAU CAAGAGACAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCACAAAG CACGUCGCACAGAUCUCCUGGACAGCAGAAUGAACACAA AGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUCAGAGAAGUCA GGUCAUCACACUGAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUC AGAAAGGACUCCAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCA ACAACUACCACCACGCACACGACGCAUACCUGAACGCA GUCGUCGGAACAGCACUGAUCUAGAAGUACCCGAAGC UGGAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGUCUA CGACGUCAGAAAGAUGAUCGCAAAGAGCGAACAGGAA AUCGGAAAGGCAACAGCAAAGUACUUCUUCUACAGCA ACAUCAUGAACUUCUUAAGACAGAAAUCACACUGGC AAACGGAGAAAUCAGAAAGAGACCGCUGAUCGAAAACA AACGGAGAAACAGGAGAAAUCGUCUGGGACAAGGGAA GAGACUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCAUGCC GCAGGUCAACAUCGUCAAGAAGACAGAAGUCCAGACA </p>
--

	<p>GGAGGAUUCAGCAAGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAA ACAGCGACAAGCUGAUCGCAAGAAAGAAGGACUGGGA CCCGAAGAAGUACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUC GCAUACAGCGUCCUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGG GAAAGAGCAAGAAGCUGAAGAGCGUCAAGGAACUGCU GGGAAUCACAAUCAUGGAAAGAAGCAGCUUCGAAAAG AACCCGAUCGACUUCUGGAAGCAAAGGGAUACAAGG AAGUCAAGAAGGACCUGAUAUCAAGCUGCCGAAGUA CAGCCUGUUCGAACUGGAAAACGGAAGAAAGAGAAUG CUGGCAAGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAAACGAAC UGGCACUGCCGAGCAAGUACGUCAACUCCUGUACCUG GCAAGCCACUACGAAAAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAG ACAACGAACAGAAGCAGCUGUUCGUCGAACAGCACAA GCACUACCUGGACGAAAUCAUCGAACAGAUCAGCGAA UUCAGCAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAAACCUUG ACAAGGUCCUGAGCGCAUACAACAAGCACAGAGACAA GCCGAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUCCACCUG UUCACACUGACAAACCUGGGAGCACCCGGCAGCAUUCA GUACUUCGACACAACAUCGACAGAAAGAGAUACACA AGCACAAGGAAGUCCUGGACGCAACACUGAUCCACCA GAGCAUCACAGGACUGUACGAAACAAGAAUCGACCUG AGCCAGCUGGGAGGAGAC GGAAGCGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGUCGACG GAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGUCGACAGCGGAUA G</p>	
<p>dCas9- кодирующая последователь- ность, кодирующая SEQ ID NO: 28, с использование м кодонов с минимальным</p>	<p>GACAAGAAGUACAGCAUCGGACUGGCAAUCGGAACAA ACAGCGUCGGAUGGGCAGUCAUCACAGACGAAUACAA GGUCCCGAGCAAGAAGUUCAAGGUCCUGGGAAACACA GACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGAGCAC UGCUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAG ACUGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGAUACACAAGAAGA AAGAACAGAAUCUGCUACCUGCAGGAAAUCUUCAGCA ACGAAAUGGCAAAGGUCGACGACAGCUUCUCCACAG ACUGGAAGAAAGCUUCCUGGUCGAAGAAGACAAGAAG CACGAAAGACACCCGAUCUUCGGAACAUCGUCGACGA</p>	<p>30</p>

<p>содержанием уридина, перечисленны х в таблице 3 (без старт- или стоп-кодонав; подходит для включения в последователь ность, кодирующую слитый белок)</p>	<p>AGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCGACAAUCUACCACC UGAGAAAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGA CCUGAGACUGAUCUACCUGGCACUGGCACACAUGAUCA AGUUCAGAGGACACUUCUGAUCGAAGGAGACCUGAA CCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUCAUCCAGC UGGUCCAGACAUACAACCAGCUGUUCGAAGAAAACCC GAUCAACGCAAGCGGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUG AGCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUGGAAAACC UGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACU GUUCGGAAAACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACA CCGAACUUAAGAGCAACUUCGACCUGGCAGAAGACGC AAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUACGACGACGAC CUGGACAACCUGCUGGCACAGAUCCGAGACCAGUACGC AGACCUGUCCUGGCAGCAAAGAACCUGAGCGACGCA AUCCUGCUGAGCGACAUCCUGAGAGUCAACACAGAAA UCACAAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUCAAGAG AUACGACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGG CACUGGUCAGACAGCAGCUGCCGGAAAAGUACAAGGA AAUCUUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGAUACGCAGGA UACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACA AGUUCAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAAC AGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAGAGAAGACCUG CUGAGAAAGCAGAGAACAUCGACAACGGAAGCAUCC CGCACCAGAUCACCUGGGGAGAACUGCACGCAAUCCUG AGAAGACAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACA ACAGAGAAAAGAUCGAAAAGAUCUGACAUUCAGAAU CCCGUACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAACAGCA GAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAAU CACACCGUGGAACUUCGAAGAAGUCGUCGACAAGGGA GCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGAAUGACAAACU UCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAA GCACAGCCUGCUGUACGAAUACUUCACAGUCUACAACG AACUGACAAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAAUGAG AAAGCCGGCAUCCUGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCA AUCGUCGACCUGCUGUUAAGACAAACAGAAAGGUCA</p>	
---	--	--

<p> CAGUCAAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUCAAGAAGAU CGAAUGCUUCGACAGCGUCGAAAUCAGCGGAGUCGAA GACAGAUUCAACGCAAGCCUGGGAAACAUACCACGACCU GCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUUCCUGGACAAC GAAGAAAACGAAGACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGA CACUGACACUGUUCGAAGACAGAGAAAUGAUCGAAGA AAGACUGAAGACAUACGCACACCUGUUCGACGACAAG GUCAUGAAGCAGCUGAAGAGAAGAAGAUACACAGGAU GGGGAAGACUGAGCAGAAAGCUGAUAACGGAAUCAG AGACAAGCAGAGCGGAAAAGACAAUCCUGGACUUCUG AAGAGCGACGGAUUCGAAACAGAAACUUCAUGCAGC UGAUCCACGACGACAGCCUGACAUUAAGGAAGACAU CCAGAAGGCACAGGUCAGCGGACAGGGAGACAGCCUG CACGAACACAUCGCAAACCUGGCAGGAAGCCCGGCAAU CAAGAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGAC GAACUGGUCAAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGGAAA ACAUCGUCAUCGAAAUGGCAAGAGAAAACCAGACAAC ACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAAGAAUGAAG AGAAUCGAAGAAGGAAUCAAGGAACUGGGAAGCCAGA UCCUGAAGGAACACCCGGUCGAAAACACACAGCUCGAG AACGAAAAGCUGUACCUGUACUACCUGCAGAACGGAA GAGACAUGUACGUCGACCAGGAACUGGACAUAACAG ACUGAGCGACUACGACGUCGACGCAAUCGUCCCCGAGA GCUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGACAACAAGGUCCU GACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAAC GUCCCGAGCGAAGAAGUCGUCAAGAAGAUGAAGAACU ACUGGAGACAGCUCUGAACGCAAAGCUGAUCACACA GAGAAAGUUCGACAACCUGACAAAGGCAGAGAGAGGA GGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUAUCAAGA GACAGCUGGUCGAAACAAGACAGAUCACAAAGCACGU CGCACAGAUCCUGGACAGCAGAAUGAACACAAAGUAC GACGAAAACGACAAGCUGAUCAGAGAAGUCAAGGUCA UCACACUGAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAA GGACUCCAGUUCUACAAGGUCAGAGAAAUCAACAAC UACCACCACGCACACGACGCAUACCUGAACGCAGUCGU </p>
--

	CGGAACAGCACUGAUCAAGAAGUACCCGAAGCUGGAA AGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACG UCAGAAAGAUGAUCGCAAAGAGCGAACAGGAAAUCGG AAAGGCAACAGCAAAGUACUUCUUCUACAGCAACAUC AUGAACUUCUUAAGACAGAAAUCACACUGGCAAACG GAGAAAUCAGAAAGAGACCGCUGAUCGAAACAAACGG AGAAACAGGAGAAAUCGUCUGGGACAAGGGAAGAGAC UUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGCAUGCCGCAGG UCAACAUCGUCAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGG AUUCAGCAAGGAAAGCAUCCUGCCGAAGAGAAACAGC GACAAGCUGAUCGCAAGAAAGAAGGACUGGGACCCGA AGAAGUACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUA CAGCGUCCUGGUCGUCGCAAAGGUCGAAAAGGGAAAG AGCAAGAAGCUGAAGAGCGUCAAGGAACUGCUGGGAA UCACAAUCAUGGAAAGAAGCAGCUUCGAAAAGAACCC GAUCGACUCCUGGAAGCAAAGGGAUCAAGGAAGUC AAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCGAAGUACAGCC UGUUCGAACUGGAAAACGGAAGAAAGAGAAUGCUGGC AAGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAACGAACUGGCA CUGCCGAGCAAGUACGUCAACUCCUGUACCUGGCAAG CCACUACGAAAAGCUGAAGGGAAGCCCGAAGACAAC GAACAGAAGCAGCUGUUCGUCGAACAGCACAAGCACU ACCUGGACGAAAUCAUCGAACAGAUACAGCGAAUUCAG CAAGAGAGUCAUCCUGGCAGACGCAAACCUGGACAAG GUCCUGAGCGCAUACAACAAGCACAGAGACAAGCCGA UCAGAGAACAGGCAGAAAACAUCAUCCACCUGUUCAC ACUGACAAACCUGGGAGCACCGGCAGCAUUCAAGUAC UUCGACACAACAUCGACAGAAAGAGAUACACAAGCA CAAAGGAAGUCCUGGACGCAACACUGAUCCACCAGAGC AUCACAGGACUGUACGAAAACAAGAAUCGACCUGAGCC AGCUGGGAGGAGAC GGAAGCGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGUCGACG GAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGUCGACAGCGGA	
Промотор T7	TAATACGACTCACTATA	31
5'-HTO	ACATTTGCTTCTGACACAACACTGTGTTCACTAGCAACCTC	32

человеческого бета-глобина	AAACAGACACC	
3'-НТО человеческого бета-глобина	GCTCGCTTTCTTGCTGTCCAATTTCTATTAAAGGTTTCCTT TGTTCCCTAAGTCCAACACTAAACTGGGGGATATTATG AAGGGCCTTGAGCATCTGGATTCTGCCTAATAAAAAACA TTTATTTTCATTGC	33
5'-НТО человеческого альфа- глобина	CATAAACCCCTGGCGCGCTCGCGGCCCGGCACTCTTCTGG TCCCCACAGACTCAGAGAGAACCCACC	34
3'-НТО человеческого альфа- глобина	GCTGGAGCCTCGGTGGCCATGCTTCTTGCCCCTTGGGCC TCCCCCAGCCCCTCCTCCCCTCCTGCACCCGTACCCCC GTGGTCTTTGAATAAAGTCTGAGTGGGCGGC	35
5'-НТО бета- глобина <i>Xenopus laevis</i>	AAGCTCAGAATAAACGCTCAACTTTGGCC	36
3'-НТО бета- глобина <i>Xenopus laevis</i>	ACCAGCCTCAAGAACACCCGAATGGAGTCTCTAAGCTAC ATAATACCAACTTACACTTTACAAAATGTTGTCCCCCAA AATGTAGCCATTTCGTATCTGCTCCTAATAAAAAGAAAGT TTCTTCACATTCT	37
5'-НТО гормона роста крупного рогатого скота	CAGGGTCCTGTGGACAGCTCACCAGCT	38
3'-НТО гормона роста крупного рогатого скота	TTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCCTCCCCCGTGCCTTCC TTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCCTTTCCTAAT AAAATGAGGAAATTGCATCGCA	39
3'-НТО альфа, зрелой цепи 1 гемоглобина <i>Mus musculus</i> (Hba-a1)	GCTGCCTTCTGCGGGGCTTGCCTTCTGGCCATGCCCTTCT TCTCTCCCTGACCTGTACCTCTGGTCTTTGAATAAAG CCTGAGTAGGAAG	40

5'-НТО HSD17B4	TCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTTCGTGTG TGTGTCGTTGCAGGCCTTATTC	41
Гидовая РНК G282, нацеленная на TTR	mU*mU*mA*CAGCCACGUCUACAGCAGUUUUAGAmGmC mUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*m U*mU*mU	42
Транскрипт Cas9 с 5'-НТО HSD, ОРС, соответствую щая SEQ ID NO: 4, последователь ность Козак и 3'-НТО ALB	GGGTCCCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTTCGT GTGTGTGTCGTTGCAGGCCTTATTCGGATCCGCCACCAT GGACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAA ACAGCGTCGGATGGGCAGTCATCACAGACGAATACAAG GTCCCAGCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAAACACAGA CAGACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGC TGTTGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACTG AAGAGAACAGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAAGA ACAGAATCTGCTACCTGCAGGAAATCTTCAGCAACGAA ATGGCAAAGGTCGACGACAGCTTCTCCACAGACTGGA AGAAAGCTTCTGGTCTGAAGAAGACAAGAAGCACGAAA GACACCCGATCTTCGGAACATCGTCGACGAAGTCGCAT ACCACGAAAAGTACCCGACAATCTACCACCTGAGAAAAG AAGCTGGTCGACAGCACAGACAAGGCAGACCTGAGACT GATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCAAGTTCAGAGG ACACTTCCTGATCGAAGGAGACCTGAACCCGGACAACA GCGACGTCGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTCCAGACAT ACAACCAGCTGTTCTGAAGAAAACCCGATCAACGCAAGC GGAGTCGACGCAAAGGCAATCCTGAGCGCAAGACTGAG CAAGAGCAGAAGACTGGAAAACCTGATCGCACAGCTGC CGGGAGAAAAGAAGAACGGACTGTTTCGGAAACCTGATC GCACTGAGCCTGGGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAA CTTCGACCTGGCAGAAGACGCAAAGCTGCAGCTGAGCA AGGACACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCA CAGATCGGAGACCAGTACGCAGACCTGTTCTTGGCAGC AAAGAACCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCC TGAGAGTCAACACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGC GCAAGCATGATCAAGAGATACGACGAACACCACCAGGA	43

<p> CCTGACACTGCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCC GGAAAAGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGA ACGGATACGCAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAG GAAGAATTCTACAAGTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAA GATGGACGGAACAGAAGAAGTCTGGTCAAGCTGAACA GAGAAGACCTGCTGAGAAAGCAGAGAACATTCGACAAC GGAAGCATCCCCGACCAGATCCACCTGGGAGAACTGCA CGCAATCCTGAGAAGACAGGAAGACTTCTACCCGTTCT GAAGGACAACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGACAT TCAGAATCCCGTACTACGTCGGACCGCTGGCAAGAGGA AACAGCAGATTCGCATGGATGACAAGAAAGAGCGAAGA AACAAATCACACCGTGGAACCTCGAAGAAGTCGTCGACA AGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAAGAATGACA AACTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAAAGTCTCGCC GAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTCTACAA CGAACTGACAAAGGTCAAGTACGTCACAGAAGGAATGA GAAAGCCGGCATTCTGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCA ATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTCAC AGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATCG AATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGAC AGATTCAACGCAAGCCTGGGAACATAACCACGACCTGCT GAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCTGGACAACGAAG AAAACGAAGACATCCTGGAAGACATCGTCTGACACTG ACACTGTTTCAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACT GAAGACATACGCACACCTGTTTCGACGACAAGGTCATGA AGCAGCTGAAGAGAAGAAGATACACAGGATGGGGAAG ACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGAATCAGAGACAAGC AGAGCGGAAAGACAATCCTGGACTTCTGAAGAGCGAC GGATTCGAAAACAGAACTTCATGCAGCTGATCCACGAC GACAGCCTGACATTCAAGGAAGACATCCAGAAGGCACA GGTCAGCGGACAGGGAGACAGCCTGCACGAACACATCG CAAACCTGGCAGGAAGCCCGCAATCAAGAAGGGAATC CTGCAGACAGTCAAGGTCGTCGACGAACTGGTCAAGGT CATGGGAAGACACAAGCCGAAAAACATCGTCATCGAAA TGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAA </p>
--

<p> GAACAGCAGAGAAAGAATGAAGAGAATCGAAGAAGGA ATCAAGGAACTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCC GGTCGAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACC TGTACTACCTGCAGAACGGAAGAGACATGTACGTCGAC CAGGAAGTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGT CGACCACATCGTCCCGCAGAGCTTCTGAAGGACGACA GCATCGACAACAAGGTCCTGACAAGAAGCGACAAGAAC AGAGGAAAGAGCGACAACGTCCCGAGCGAAGAAGTCGT CAAGAAGATGAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACG CAAAGCTGATCACACAGAGAAAGTTTCGACAACCTGACA AAGGCAGAGAGAGGAGGACTGAGCGAACTGGACAAGG CAGGATTCATCAAGAGACAGCTGGTCGAAAACAAGACAG ATCACAAAGCACGTCGCACAGATCCTGGACAGCAGAAT GAACACAAAGTACGACGAAAACGACAAGCTGATCAGAG AAGTCAAGGTCATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGC GACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTCAGAGA AATCAACAACCTACCACCACGCACACGACGCATACCTGA ACGCAGTCGTCGGAACAGCACTGATCAAGAAGTACCCG AAGCTGGAAAGCGAATTCGTCTACGGAGACTACAAGGT CTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAGAGCGAACAGG AAATCGGAAAGGCAACAGCAAAGTACTTCTTCTACAGC AACATCATGAACTTCTTCAAGACAGAAATCACACTGGCA AACGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAAA CGGAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAGGGAAGA GACTTCGCAACAGTCAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGCA GGTCAACATCGTCAAGAAGACAGAAGTCCAGACAGGAG GATTCAGCAAGGAAAGCATCCTGCCGAAGAGAAAACAGC GACAAGCTGATCGCAAGAAAGAAGGACTGGGACCCGAA GAAGTACGGAGGATTCGACAGCCCGACAGTCGCATACA GCGTCCTGGTCGTCGCAAAGGTCGAAAAGGGAAAAGAGC AAGAAGCTGAAGAGCGTCAAGGAACTGCTGGGAATCAC AATCATGGAAAGAAAGCAGCTTCGAAAAGAACCCGATCG ACTTCCTGGAAGCAAAGGGATACAAGGAAGTCAAGAAG GACCTGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCTGTTCGAA CTGGAAAACGGAAGAAAGAGAATGCTGGCAAGCGCAGG </p>

	AGAACTGCAGAAGGGAAACGAACTGGCACTGCCGAGCA AGTACGTCAACTTCCTGTACCTGGCAAGCCACTACGAAA AGCTGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCA GCTGTTTCGTCGAACAGCACAAGCACTACCTGGACGAAAT CATCGAACAGATCAGCGAATTCAGCAAGAGAGTCATCC TGGCAGACGCAAACCTGGACAAGGTCCTGAGCGCATAAC AACAAAGCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAG AAAACATCATCCACCTGTTCACTGACAAACCTGGGAG CACCGGCAGCATTCAAGTACTTCGACACAACAATCGACA GAAAGAGATACACAAGCACAAGGAAGTCTGGACGCA ACACTGATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAAC AAGAATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAG GAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGTCTAGCTAGCCATC ACATTTAAAAGCATCTCAGCCTACCATGAGAATAAGAG AAAGAAAATGAAGATCAATAGCTTATTCATCTCTTTTTTC TTTTTCGTTGGTGTAAGCCAACACCCTGTCTAAAAAAC ATAAATTTCTTTAATCATTTCCTCTTTCTCTGTGCTTC AATTAATAAAAAATGGAAAGAACCTCGAG	
Транскрипт Cas9 с 5'-НТО HSD, OPC, соответствую щая SEQ ID NO: 4, и 3'- НТО ALB	GGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCGT GTGTGTGTCGTTGCAGGCCTTATTCGGATCCATGGACAA GAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAAACAGCG TCGGATGGGCAGTCATCACAGACGAATACAAGGTCCCG AGCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAAACACAGACAGACA CAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTTCG ACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACTGAAGAG AACAGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAAGAACAGA ATCTGCTACCTGCAGGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCA AAGGTCGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAAAG CTTCCTGGTCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACC CGATCTTCGGAACATCGTCGACGAAGTCGCATAACCACG AAAAGTACCCGACAATCTACCACCTGAGAAAGAAGCTG GTCGACAGCACAGACAAGGCAGACCTGAGACTGATCTA CCTGGCACTGGCACACATGATCAAGTTCAGAGGACACTT CCTGATCGAAGGAGACCTGAACCCGGACAACAGCGACG TCGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTCCAGACATAACAACC	44

AGCTGTTCTGAAGAAAACCCGATCAACGCAAGCGGAGTC GACGCAAAGGCAATCCTGAGCGCAAGACTGAGCAAGAG CAGAAGACTGGAAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAG AAAAGAAGAACGGACTGTTCCGAAACCTGATCGCACTG AGCCTGGGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTTCGA CCTGGCAGAAGACGCAAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACA CATACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCACAGATC GGAGACCAGTACGCAGACCTGTTCTGGCAGCAAAGAA CCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGT CAACACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCA TGATCAAGAGATACGACGAACACCACCAGGACCTGACA CTGCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGAAAA GTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGAT ACGCAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAA TTCTACAAGTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGAC GGAACAGAAGAAGTCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGA CCTGCTGAGAAAAGCAGAGAACATTCGACAACGGAAGCA TCCCGCACCAGATCCACCTGGGAGAAGTGCACGCAATCC TGAGAAGACAGGAAGACTTCTACCCGTTCTGAAGGAC AACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGACATTCAGAAT CCCGTACTACGTCGGACCGCTGGCAAGAGGAAACAGCA GATTCGCATGGATGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAATC ACACCGTGGAAGTTCGAAGAAGTCGTCGACAAGGGAGC AAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGAATGACAAACTTCG ACAAGAACCTGCCGAACGAAAAGGTCCTGCCGAAGCAC AGCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTCTACAACGAAGT ACAAAGGTCAAGTACGTCACAGAAGGAATGAGAAAGCC GGCATTCTGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAATCGTGC ACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTCACAGTCAAG CAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATCGAATGCTT CGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGATTCA ACGCAAGCCTGGGAACATACCACGACCTGCTGAAGATC ATCAAGGACAAGGACTTCTGGACAACGAAGAAAACGA AGACATCCTGGAAGACATCGTCCTGACACTGACACTGTT CGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACAT
--

ACGCACACCTGTTTCGACGACAAGGTCATGAAGCAGCTG AAGAGAAGAAGATACACAGGATGGGGAAGACTGAGCA GAAAGCTGATCAACGGAATCAGAGACAAGCAGAGCGGA AAGACAATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGACGGATTTCG AAACAGAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCC TGACATTCAAGGAAGACATCCAGAAGGCACAGGTCAGC GGACAGGGGAGACAGCCTGCACGAACACATCGCAAACCT GGCAGGAAGCCCGCAATCAAGAAGGGAATCCTGCAGA CAGTCAAGGTCGTCGACGAACTGGTCAAGGTCATGGGA AGACACAAGCCGAAAACATCGTCATCGAAATGGCAAG AGAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGC AGAGAAAGAATGAAGAGAATCGAAGAAGGAATCAAGG AACTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCGAA AACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGTACTA CCTGCAGAACGGAAGAGACATGTACGTCGACCAGGAAC TGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGACCAC ATCGTCCCGCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGAC ACAAGGTCCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAA AGAGCGACAACGTCCCGAGCGAAGAAGTCGTCAAGAAG ATGAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAAGCT GATCACACAGAGAAAGTTCGACAACCTGACAAAGGCAG AGAGAGGAGGACTGAGCGAACTGGACAAGGCAGGATTC ATCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAGACAGATCACAAA GCACGTCGCACAGATCCTGGACAGCAGAATGAACACAA AGTACGACGAAAACGACAAGCTGATCAGAGAAGTCAAG GTCATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGCGACTTCAG AAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTCAGAGAAATCAACA ACTACCACCACGCACACGACGCATACCTGAACGCAGTC GTCGGAACAGCACTGATCAAGAAGTACCCGAAGCTGGA AAGCGAATTCGTCTACGGAGACTACAAGGTCTACGACGT CAGAAAGATGATCGCAAAGAGCGAACAGGAAATCGGAA AGGCAACAGCAAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGA ACTTCTCAAGACAGAAATCACACTGGCAAACGGAGAA ATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAAACGGAGAAAC AGGAGAAATCGTCTGGGACAAGGGAAGAGACTTCGCAA
--

	<p>CAGTCAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGCAGGTCAACATC GTCAAGAAGACAGAAGTCCAGACAGGAGGATTCAGCAA GGAAAGCATCCTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCTGA TCGCAAGAAAGAAGGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGA GGATTCGACAGCCCGACAGTCGCATACAGCGTCCTGGTC GTCGCAAAGGTCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTGA AGAGCGTCAAGGAACTGCTGGGAATCACAATCATGGAA AGAAGCAGCTTCGAAAAGAACCCGATCGACTTCTTGG AGCAAAGGGATACAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCA TCAAGCTGCCGAAGTACAGCCTGTTTGAAGTGGAAAAAC GGAAGAAAGAGAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAAGTCA GAAGGGAAACGAACTGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCA ACTTCTGTACCTGGCAAGCCACTACGAAAAGCTGAAGG GAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCTGTTTCGTC GAACAGCACAAGCACTACCTGGACGAAATCATCGAACA GATCAGCGAATTCAGCAAGAGAGTCATCCTGGCAGACG CAAACCTGGACAAGGTCCTGAGCGCATACAACAAGCAC AGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGAAAACATCAT CCACCTGTTTCACTGACAAACCTGGGAGCACCCGGCAGC ATTCAAGTACTTCGACACAACAATCGACAGAAAGAGAT ACACAAGCACAAGGAAGTCTGGACGCAACACTGATC CACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAACAAGAATCGA CCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGA AGAAGAAGAGAAAAGGTCTAGCTAGCCATCACATTTAAA AGCATCTCAGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAAGAAAAT GAAGATCAATAGCTTATTCATCTCTTTTTCTTTTCGTTG GTGTAAAGCCAACACCCTGTCTAAAAAACATAAATTTCT TTAATCATTTTGCCTCTTTTCTCTGTGCTTCAATTAATAA AAAATGGAAAGAACCTCGAG</p>	
<p>Альтернативна я OPC Cas9 с содержанием U 19,36%</p>	<p>ATGGATAAGAAGTACTCGATCGGGCTGGATATCGGAAC TAATTCGGTGGGTTGGGCAGTGATCACGGATGAATACAA AGTGCCGTCCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGGAACACCG ATAGACACAGCATCAAGAAGAATCTCATCGGAGCCCTG CTGTTTACTCCGGCGAAACCCGAGAAGCGACCCGGCTC AAACGTACCGGAGGCGACGCTACACCCGGCGGAAGAA</p>	<p>45</p>

<p>TCGCATCTGCTATCTGCAAGAAATCTTTTCGAACGAAAT GGCAAAGGTGGACGACAGCTTCTTCCACCGCCTGGAAG AATCTTTCCTGGTGGAGGAGGACAAGAAGCATGAACGG CATCCTATCTTTGAAACATCGTGGACGAAGTGGCGTAC CACGAAAAGTACCCGACCATCTACCATCTGCGGAAGAA GTTGGTTGACTCAACTGACAAGGCCGACCTCAGATTGAT CTACTGGCCCTCGCCCATATGATCAAATTCCGCGGACA CTTCCTGATCGAAGGCGATCTGAACCCTGATAACTCCGA CGTGGATAAGCTGTTCACTCAACTGGTGCAGACCTACAA CCAACTGTTGAAAGAAAACCCAATCAATGCCAGCGGCG TCGATGCCAAGGCCATCCTGTCCGCCCGGCTGTGCAAGT CGCGGGCCTCGAAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGGA GAGAAGAAGAACGGACTTTTCGGCAACTTGATCGCTCTC TCACTGGGACTCACTCCAATTTCAAGTCCAATTTTGAC CTGGCCGAGGACGCGAAGCTGCAACTCTCAAAGGACAC CTACGACGACGACTTGGACAATTTGCTGGCACAATTTGG CGATCAGTACGCGGATCTGTTCTTGCCGCTAAGAACCT TTCGGACGCAATCTTGCTGTCCGATATCCTGCGCGTGAA CACCGAAATAACCAAAGCGCCGCTTAGCGCCTCGATGAT TAAGCGGTACGACGAGCATCACCAGGATCTCACGCTGCT CAAAGCGCTCGTGAGACAGCAACTGCCTGAAAAGTACA AGGAGATTTTCTTCGACCAGTCCAAGAATGGGTACGCAG GGTACATCGATGGAGGCGCCAGCCAGGAAGAGTTCTAT AAGTTCATCAAGCCAATCCTGGAAAAGATGGACGGAAC CGAAGAAGTCTGGTCAAGCTGAACAGGGAGGATCTGC TCCGCAAACAGAGAACCTTTGACAACGGAAGCATTCCA CACCAGATCCATCTGGGTGAGCTGCACGCCATCTTGCGG CGCCAGGAGGACTTTTACCCATTCTCAAGGACAACCGG GAAAAGATCGAGAAAATTCTGACGTTCCGCATCCCGTAT TACGTGGGCCCCTGGCGCGCGCAATTCGCGCTTCGCG TGGATGACTAGAAAATCAGAGGAAACCATCACTCCTTG GAATTTGAGGAAGTTGTGGATAAGGGAGCTTCGGCAC AATCCTTCATCGAACGAATGACCAACTTCGACAAGAATC TCCCAAACGAGAAGGTGCTTCCTAAGCACAGCCTCCTTT ACGAATACTTCACTGTCTACAACGAACTGACTAAAGTGA</p>

<p> AATACGTTACTGAAGGAATGAGGAAGCCGGCCTTTCTGA GCGGAGAACAGAAGAAAGCGATTGTTCGATCTGCTGTTC AAGACCAACCGCAAGGTGACCGTCAAGCAGCTTAAAGA GGACTACTTCAAGAAGATCGAGTGTTTCGACTCAGTGGA AATCAGCGGAGTGGAGGACAGATTCAACGCTTCGCTGG GAACCTATCATGATCTCCTGAAGATCATCAAGGACAAGG ACTTCCTTGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAA GATATCGTCCTGACCTTGACCCTTTTCGAGGATCGCGAG ATGATCGAGGAGAGGCTTAAGACCTACGCTCATCTCTTC GACGATAAGGTCATGAAACAACCTCAAGCGCCGCCGTA CACTGGTTGGGGCCGCCTCTCCCGCAAGCTGATCAACGG TATTCGCGATAAACAGAGCGGTAAACTATCCTGGATTT CCTCAAATCGGATGGCTTCGCTAATCGTAACTTCATGCA GTTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTTAAGGAGGACAT CCAGAAAGCACAAAGTGAGCGGACAGGGAGACTCACTCC ATGAACACATCGCGAATCTGGCCGGTTCGCCGGCGATTA AGAAGGGAATCCTGCAAACGTGAAGGTGGTGGACGAG CTGGTGAAGGTCATGGGACGGCACAAACCGGAGAATAT CGTGATTGAAATGGCCCAGAAAACCCAGACTACCCAGA AGGGCCAGAAGAACTCCCGCGAAAGGATGAAGCGGATC GAAGAAGGAATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAA AGAGCACCCGGTGGAAAACACGCAGCTGCAGAACGAGA AGCTCTACCTGTACTATTTGCAAAATGGACGGGACATGT ACGTGGACCAAGAGCTGGACATCAATCGGTTGTCTGATT ACGACGTGGACCACATCGTTCCACAGTCCTTTCTGAAGG ATGACTCCATCGATAACAAGGTGTTGACTCGCAGCGACA AGAACAGAGGGAAGTCAGATAATGTGCCATCGGAGGAG GTCGTGAAGAAGATGAAGAATTACTGGCGGCAGCTCCT GAATGCGAAGCTGATTACCCAGAGAAAGTTTGACAATCT CACTAAAGCCGAGCGCGCGGACTCTCAGAGCTGGATA AGGCTGGATTCATCAAACGGCAGCTGGTCGAGACTCGG CAGATTACCAAGCACGTGGCGCAGATCCTGGACTCCCG ATGAACACTAAATACGACGAGAACGATAAGCTCATCCG GGAAGTGAAGGTGATTACCCTGAAAAGCAAACCTGTGT CGGACTTTCGGAAGGACTTTCAGTTTTACAAAGTGAGAG </p>
--

	AAATCAACAACCTACCATCACGCGCATGACGCATACCTCA ACGCTGTGGTTCGGCACCCCTGATCAAGAAGTACCCTA AACTTGAATCGGAGTTTGTGTACGGAGACTACAAGGTCT ACGACGTGAGGAAGATGATAGCCAAGTCCGAACAGGAA ATCGGGAAAAGCAACTGCGAAATACTTCTTTTACTCAAAC ATCATGAACTTCTTCAAGACTGAAATTACGCTGGCCAAT GGAGAAATCAGGAAGAGGCCACTGATCGAAACTAACGG AGAAACGGGCGAAATCGTGTGGGACAAGGGCAGGGACT TCGCAACTGTTTCGCAAAGTGCTCTCTATGCCGCAAGTCA ATATTGTGAAGAAAACCGAAGTGCAAACCGGCGGATTT TCAAAGGAATCGATCCTCCCAAAGAGAAATAGCGACAA GCTCATTGCACGCAAGAAAGACTGGGACCCGAAGAAGT ACGGAGGATTTCGATTTCGCCGACTGTCGCATACTCCGTCC TCGTGGTGGCCAAGGTGGAGAAGGGAAAAGAGCAAGAAG CTCAAATCCGTCAAAGAGCTGCTGGGGATTACCATCATG GAACGATCCTCGTTTCGAGAAGAACCCGATTGATTTCTG GAGGCGAAGGGTTACAAGGAGGTGAAGAAGGATCTGAT CATCAAACCTGCCCAAGTACTCACTGTTTCGAACTGGAAAA TGGTCGGAAGCGCATGCTGGCTTCGGCCGGAGAACTCCA GAAAGGAAATGAGCTGGCCTGCCTAGCAAGTACGTCA ACTTCCTCTATCTTGCTTCGCACTACGAGAAACTCAAAG GGTCAACCGAAGATAACGAACAGAAGCAGCTTTTCGTG GAGCAGCACAAGCATTATCTGGATGAAATCATCGAACA AATCTCCGAGTTTTCAAAGCGCGTGATCCTCGCCGACGC CAACCTCGACAAAGTCCTGTTCGGCCTACAATAAGCATAG AGATAAGCCGATCAGAGAACAGGCCGAGAACATTATCC ACTTGTTACCCCTGACTAACCTGGGAGCTCCAGCCGCCT TCAAGTACTTCGATACTACTATCGACCCGAAAAGATACA CGTCCACCAAGGAAGTTCTGGACGCGACCCTGATCCACC AAAGCATCACTGGACTCTACGAAACTAGGATCGATCTGT CGCAGCTGGGTGGCGATGGTGGCGGTGGATCCTACCCAT ACGACGTGCCTGACTACGCCTCCGGAGGTGGTGGCCCA AGAAGAAACGGAAGGTGTGATAG	
Транскрипт Cas9 с 5'-НТО	GGGTCCCAGTTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCGT GTGTGTGTCGTTGCAGGCCTTATTCGGATCTGCCACCAT	46

HSD, OPC, соответствую щая SEQ ID NO: 45, последователь ность Козак и 3'-НТО ALB	GGATAAGAAGTACTCGATCGGGCTGGATATCGGAACTA ATTCCGTGGGTTGGGCAGTGATCACGGATGAATACAAA GTGCCGTCCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGGAACACCGA TAGACACAGCATCAAGAAGAATCTCATCGGAGCCCTGCT GTTTGA CTCCGGCGAAACCGCAGAAGCGACCCGGCTCA AACGTACCGCGAGGCGACGCTACACCCGGCGGAAGAAT CGCATCTGCTATCTGCAAGAAATCTTTTCGAACGAAATG GCAAAGGTGGACGACAGCTTCTTCCACCGCCTGGAAGA ATCTTTCCTGGTGGAGGAGGACAAGAAGCATGAACGGC ATCCTATCTTTGAAAACATCGTGGACGAAAGTGGCGTACC ACGAAAAGTACCCGACCATCTACCATCTGCGGAAGAAG TTGGTTGA CTCAACTGACAAGGCCGACCTCAGATTGATC TACTTGGCCCTCGCCATATGATCAAATTCCGCGGACAC TTCCTGATCGAAGGCGATCTGAACCCTGATAACTCCGAC GTGGATAAGCTGTTCACTTCAACTGGTGCAGACCTACAAC CAACTGTTTGAAGAAAACCCAATCAATGCCAGCGGCGT CGATGCCAAGGCCATCCTGTCCGCCCGGCTGTGGAAGTC GCGGCGCCTCGAAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAG AGAAGAAGAACGGACTTTTCGGCAACTTGATCGCTCTCT CACTGGGACTCACTCCCAATTTCAAGTCCAATTTTGACC TGGCCGAGGACGCGAAGCTGCAACTCTCAAAGGACACC TACGACGACGACTTGGACAATTTGCTGGCACAATTTGGC GATCAGTACGCGGATCTGTTTCTTGCCGCTAAGAACCTT TCGGACGCAATCTTGCTGTCCGATATCCTGCGCGTGAAC ACCGAAATAACCAAAGCGCCGCTTAGCGCCTCGATGATT AAGCGGTACGACGAGCATCACAGGATCTCACGCTGCTC AAAGCGCTCGTGAGACAGCAACTGCCTGAAAAGTACAA GGAGATTTTCTTCGACCAGTCCAAGAATGGGTACGCAGG GTACATCGATGGAGGCGCCAGCCAGGAAGAGTTCTATA AGTTCATCAAGCCAATCCTGGAAAAGATGGACGGAACC GAAGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGGGAGGATCTGCT CCGCAAACAGAGAACCTTTGACAACGGAAGCATTCCAC ACCAGATCCATCTGGGTGAGCTGCACGCCATCTTGGCGC GCCAGGAGGACTTTTACCCATTCTCAAGGACAACCGGG AAAAGATCGAGAAAATTCTGACGTTCCGCATCCCCTATT
---	--

ACGTGGGCCCACTGGCGCGCGGCAATTCGCGCTTCGCGT
 GGATGACTAGAAAATCAGAGGAAACCATCACTCCTTGG
 AATTCGAGGAAGTTGTGGATAAGGGAGCTTCGGCACA
 ATCCTTCATCGAACGAATGACCAACTTCGACAAGAATCT
 CCCAAACGAGAAGGTGCTTCCTAAGCACAGCTCCTTTA
 CGAATACTTCACTGTCTACAACGAACTGACTAAAGTGAA
 ATACGTTACTGAAGGAATGAGGAAGCCGGCCTTTCTGAG
 CGGAGAACAGAAGAAAGCGATTGTGATCTGCTGTTCA
 AGACCAACCGCAAGGTGACCGTCAAGCAGCTTAAAGAG
 GACTACTTCAAGAAGATCGAGTGTTTCGACTCAGTGGA
 ATCAGCGGAGTGGAGGACAGATTCAACGCTTCGCTGGG
 AACCTATCATGATCTCCTGAAGATCATCAAGGACAAGGA
 CTTCTTGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAAG
 ATATCGTCCTGACCTTGACCCTTTTCGAGGATCGCGAGA
 TGATCGAGGAGAGGCTTAAGACCTACGCTCATCTCTTCG
 ACGATAAGGTTCATGAAACAACCTCAAGCGCCCGGTAC
 ACTGGTTGGGGCCGCTCTCCCGCAAGCTGATCAACGGT
 ATTCGCGATAAACAGAGCGGTAAAACCTATCCTGGATTC
 CTCAAATCGGATGGCTTCGCTAATCGTAACTTCATGCAG
 TTGATCCACGACGACAGCCTGACCTTTAAGGAGGACATC
 CAGAAAGCACAAGTGAGCGGACAGGGAGACTCACTCCA
 TGAACACATCGGAATCTGGCCGGTTCGCCGGCGATTAA
 GAAGGGAATCCTGCAAACCTGTGAAGGTGGTGGACGAGC
 TGGTGAAGGTCATGGGACGGCACAACCCGGAGAATATC
 GTGATTGAAATGGCCGAGAAAACCAGACTACCCAGAA
 GGGCCAGAAGAACTCCCGCGAAAGGATGAAGCGGATCG
 AAGAAGGAATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAA
 GAGCACCCGGTGGAAAACACGCAGCTGCAGAACGAGAA
 GCTCTACCTGTACTATTTGCAAAATGGACGGGACATGTA
 CGTGGACCAAGAGCTGGACATCAATCGGTTGTCTGATTA
 CGACGTGGACCACATCGTTCCACAGTCCTTTCTGAAGGA
 TGAATCCATCGATAACAAGGTGTTGACTCGCAGCGACAA
 GAACAGAGGGAAGTCAGATAATGTGCCATCGGAGGAGG
 TCGTGAAGAAGATGAAGAATTACTGGCGGCAGCTCCTG
 AATGCGAAGCTGATTACCCAGAGAAAGTTTGACAATCTC

<p> ACTAAAGCCGAGCGCGGCGGACTCTCAGAGCTGGATAA GGCTGGATTCATCAAACGGCAGCTGGTCGAGACTCGGC AGATTACCAAGCACGTGGCGCAGATCCTGGACTCCCGCA TGAACACTAAATACGACGAGAACGATAAGCTCATCCGG GAAGTGAAGGTGATTACCCTGAAAAGCAAACCTGTGTC GGACTTTCGGAAGGACTTTCAGTTTTACAAAGTGAGAGA AATCAACAACCTACCATCACGCGCATGACGCATACCTCAA CGCTGTGGTCGGCACCGCCCTGATCAAGAAGTACCCTAA ACTTGAATCGGAGTTTGTGTACGGAGACTACAAGGTCTA CGACGTGAGGAAGATGATAGCCAAGTCCGAACAGGAAA TCGGGAAAGCAACTGCGAAATACTTCTTTACTCAAACA TCATGAACTTCTCAAGACTGAAATTACGCTGGCCAATG GAGAAATCAGGAAGAGGCCACTGATCGAAACTAACGGA GAAACGGGCGAAATCGTGTGGGACAAGGGCAGGGACTT CGCAACTGTTTCGCAAAGTGCTCTCTATGCCGCAAGTCAA TATTGTGAAGAAAACCGAAGTGCAAACCGGCGGATTTTC AAAGGAATCGATCCTCCCAAAGAGAAATAGCGACAAGC TCATTGCACGCAAGAAAGACTGGGACCCGAAGAAGTAC GGAGGATTCGATTCGCCGACTGTCGCATACTCCGTCCTC GTGGTGGCCAAGGTGGAGAAGGGAAAGCAAGAAGCT CAAATCCGTCAAAGAGCTGCTGGGGATTACCATCATGGA ACGATCCTCGTTCGAGAAGAACCCGATTGATTTCTGGA GGCGAAGGGTTACAAGGAGGTGAAGAAGGATCTGATCA TCAAACCTGCCCAAGTACTCACTGTTTCGAACTGGAAAATG GTCGGAAGCGCATGCTGGCTTCGGCCGAGAACTCCAG AAAGGAAATGAGCTGGCCTTGCCTAGCAAGTACGTCAA CTTCCTCTATCTTGCTTCGCACTACGAGAACTCAAAGG GTCACCGGAAGATAACGAACAGAAGCAGCTTTTCGTGG AGCAGCACAAGCATTATCTGGATGAAATCATCGAACAA ATCTCCGAGTTTTCAAAGCGCGTGATCCTCGCCGACGCC AACCTCGACAAAGTCTGTCCGCCTACAATAAGCATAGA GATAAGCCGATCAGAGAACAGGCCGAGAACATTATCCA CTTGTTACCCCTGACTAACCTGGGAGCTCCAGCCGCCTT CAAGTACTTCGATACTACTATCGACCGCAAAGATACAC GTCCACCAAGGAAGTTCTGGACGCGACCCTGATCCACCA </p>

	<p>AAGCATCACTGGACTCTACGAACTAGGATCGATCTGTC GCAGCTGGGTGGCGATGGTGGCGGTGGATCCTACCCATA CGACGTGCCTGACTACGCCTCCGGAGGTGGTGGCCCCAA GAAGAAACGGAAGGTGTGATAGCTAGCCATCACATTA AAAGCATCTCAGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAAGAAA ATGAAGATCAATAGCTTATTCATCTCTTTTTCTTTTTTCGT TGGTGTAAGCCAACACCCTGTCTAAAAAACATAAAATTT CTTTAATCATTTTGCCTCTTTTCTCTGTGCTTCAATTAATA AAAAATGGAAAGAACCTCGAG</p>	
<p>Транскрипт Cas9 с 5'-НТО HSD, OPC, соответствую щая SEQ ID NO: 45, и 3'- НТО ALB</p>	<p>GGGTCCCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCGT GTGTGTGTCGTTGCAGGCCTTATTCGGATCTATGGATAA GAAGTACTCGATCGGGCTGGATATCGGAACTAATTCCGT GGGTTGGCAGTGATCACGGATGAATACAAAGTGCCGT CCAAGAAGTTCAAGTCCCTGGGGAACACCGATAGACAC AGCATCAAGAAGAATCTCATCGGAGCCCTGCTGTTTGAC TCCGGCGAAACCGCAGAAGCGACCCGGCTCAAACGTAC CGCGAGGCGACGCTACACCCGGCGGAAGAATCGCATCT GCTATCTGCAAGAAATCTTTTCGAACGAAATGGCAAAGG TGGACGACAGCTTCTTCCACCGCCTGGAAGAATCTTTC TGGTGGAGGAGGACAAGAAGCATGAACGGCATCCTATC TTTGGAAACATCGTGGACGAAGTGGCGTACCACGAAAA GTACCCGACCATCTACCATCTGCGGAAGAAGTTGGTTGA CTCAACTGACAAGGCCGACCTCAGATTGATCTACTTGGC CCTCGCCCATATGATCAAATTCGCGGACACTTCCTGAT CGAAGGCGATCTGAACCCTGATAACTCCGACGTGGATA AGCTGTTCAATCAACTGGTGCAGACCTACAACCAACTGT TCGAAGAAAACCCAATCAATGCCAGCGGCGTCGATGCC AAGGCCATCCTGTCCGCCCGCTGTGCAAGTCGCGGCGC CTCGAAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGAGAAGAA GAACGGACTTTTCGGCAACTTGATCGCTCTCTCACTGGG ACTCACTCCAATTTCAAGTCCAATTTTGACCTGGCCGA GGACGCGAAGCTGCAACTCTCAAAGGACACCTACGACG ACGACTTGGACAATTTGCTGGCACAAATTGGCGATCAGT ACGCGGATCTGTTCTTGGCGTAAGAACCCTTCGGACG CAATCTTGCTGTCCGATATCCTGCGCGTGAACACCGAAA</p>	<p>47</p>

TAACCAAAGCGCCGCTTAGCGCCTCGATGATTAAGCGGT
 ACGACGAGCATCACCAGGATCTCACGCTGCTCAAAGCG
 CTCGTGAGACAGCAACTGCCTGAAAAGTACAAGGAGAT
 TTTCTTCGACCAGTCCAAGAATGGGTACGCAGGGTACAT
 CGATGGAGGCGCCAGCCAGGAAGAGTTCTATAAGTTCA
 TCAAGCCAATCCTGGAAAAGATGGACGGAACCGAAGAA
 CTGCTGGTCAAGCTGAACAGGGAGGATCTGCTCCGCAA
 ACAGAGAACCTTTGACAACGGAAGCATTCCACACCAGA
 TCCATCTGGGTGAGCTGCACGCCATCTTGCGGCGCCAGG
 AGGACTTTTACCCATTCTCAAGGACAACCGGGAAAAG
 ATCGAGAAAATTTGACGTTCCGCATCCCGTATTACGTG
 GGCCCACTGGCGCGCGCAATTCGCGCTTCGCGTGGATG
 ACTAGAAAATCAGAGGAAACCATCACTCCTTGGAATTC
 GAGGAAGTTGTGGATAAGGGAGCTTCGGCACAATCCTTC
 ATCGAACGAATGACCAACTTCGACAAGAATCTCCAAA
 CGAGAAGGTGCTTCCTAAGCACAGCCTCCTTTACGAATA
 CTCACTGTCTACAACGAACTGACTAAAGTGAAATACGT
 TACTGAAGGAATGAGGAAGCCGGCCTTTCTGAGCGGAG
 AACAGAAGAAAGCGATTGTGCGATCTGCTGTTCAAGACC
 AACCGCAAGGTGACCGTCAAGCAGCTTAAAGAGGACTA
 CTCAAGAAGATCGAGTGTTTCGACTCAGTGGAATCAG
 CGGAGTGGAGGACAGATTCAACGCTTCGCTGGGAACCT
 ATCATGATCTCCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCC
 TTGACAACGAGGAGAACGAGGACATCCTGGAAGATATC
 GTCCTGACCTTGACCCTTTTCGAGGATCGCGAGATGATC
 GAGGAGAGGCTTAAGACCTACGCTCATCTCTTCGACGAT
 AAGGTCATGAAACAACCTCAAGCGCCGCGGTACACTGG
 TTGGGGCCGCTCTCCCAGCTGATCAACGGTATTTCG
 CGATAAACAGAGCGGTAAAACCTATCCTGGATTTCTCAA
 ATCGGATGGCTTCGCTAATCGTAACTTCATGCAGTTGAT
 CCACGACGACAGCCTGACCTTAAAGGAGGACATCCAGA
 AAGCACAAGTGAGCGGACAGGGAGACTCACTCCATGAA
 CACATCGCGAATCTGGCCGGTTCGCCGGCGATTAAGAAG
 GGAATCCTGCAAACTGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGT
 GAAGGTCATGGGACGGCACAAACCGGAGAATATCGTGA

TTGAAATGGCCCGAGAAAACCAGACTACCCAGAAGGGC CAGAAGAACTCCCGCGAAAGGATGAAGCGGATCGAAGA AGGAATCAAGGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAAGAGC ACCCGGTGGAAAACACGCAGCTGCAGAACGAGAAGCTC TACCTGTACTATTTGCAAATGGACGGGACATGTACGTG GACCAAGAGCTGGACATCAATCGGTTGTCTGATTACGAC GTGGACCACATCGTTCCACAGTCCTTTCTGAAGGATGAC TCCATCGATAACAAGGTGTTGACTCGCAGCGACAAGAA CAGAGGGAAGTCAGATAATGTGCCATCGGAGGAGGTGCG TGAAGAAGATGAAGAATTACTGGCGGCAGCTCCTGAAT GCGAAGCTGATTACCCAGAGAAAGTTTGACAATCTCACT AAAGCCGAGCGCGGCGGACTCTCAGAGCTGGATAAGGC TGGATTCATCAAACGGCAGCTGGTCGAGACTCGGCAGAT TACCAAGCACGTGGCGCAGATCCTGGACTCCCGCATGAA CACTAAATACGACGAGAACGATAAGCTCATCCGGGAAG TGAAGGTGATTACCCTGAAAAGCAAAC TTGTGTCGGACT TTCGGAAGGACTTTCAGTTTTACAAAGTGAGAGAAATCA ACA ACTACCATCACGCGCATGACGCATACCTCAACGCTG TGGTCGGCACCCCTGATCAAGAAGTACCCTAAACTTG AATCGGAGTTTGTGTACGGAGACTACAAGGTCTACGACG TGAGGAAGATGATAGCCAAGTCCGAACAGGAAATCGGG AAAGCAACTGCGAAATACTTCTTTTACTCAAACATCATG AACTTCTTCAAGACTGAAATTACGCTGGCCAATGGAGAA ATCAGGAAGAGGCCACTGATCGAAACTAACGGAGAAAC GGGCGAAATCGTGTGGGACAAGGGCAGGGACTTCGCAA CTGTTGCGAAAGTGCTCTCTATGCCGCAAGTCAATATTG TGAAGAAAACCGAAGTGCAAACCGGCGGATTTTCAAAG GAATCGATCCTCCCAAAGAGAAATAGCGACAAGCTCAT TGCACGCAAGAAAGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAG GATTCGATTCGCCGACTGTGTCATACTCCGTCTCTGTGG TGGCCAAGGTGGAGAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTCAA ATCCGTCAAAGAGCTGCTGGGGATTACCATCATGGAACG ATCCTCGTTCGAGAAGAACCCGATTGATTCCTGGAGGC GAAGGGTTACAAGGAGGTGAAGAAGGATCTGATCATCA AACTGCCCAAGTACTACTGTTTCGAACTGGAAAATGGTC
--

	<p>GGAAGCGCATGCTGGCTTCGGCCGGAGAACTCCAGAAA GGAAATGAGCTGGCCTTGCCTAGCAAGTACGTCAACTTC CTCTATCTTGCTTCGCACTACGAGAACTCAAAGGGTCA CCGGAAGATAACGAACAGAAGCAGCTTTTCGTGGAGCA GCACAAGCATTATCTGGATGAAATCATCGAACAAATCTC CGAGTTTTCAAAGCGCGTGATCCTCGCCGACGCCAACCT CGACAAAGTCCTGTGGCCTACAATAAGCATAGAGATA AGCCGATCAGAGAACAGGCCGAGAACATTATCCACTTG TTCACCCTGACTAACCTGGGAGCTCCAGCCGCCTTCAAG TACTTCGATACTACTATCGACCGCAAAAGATACACGTCC ACCAAGGAAGTTCTGGACGCGACCCTGATCCACCAAAG CATCACTGGACTCTACGAAACTAGGATCGATCTGTGCGA GCTGGGTGGCGATGGTGGCGGTGGATCCTACCCATACGA CGTGCCTGACTACGCCTCCGGAGGTGGTGGCCCAAGAA GAAACGGAAGGTGTGATAGCTAGCCATCACATTTAAAA GCATCTCAGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAAGAAAATG AAGATCAATAGCTTATTCATCTCTTTTTCTTTTCGTTGG TGTAAGCAACACCCTGTCTAAAAAACATAAATTTCTT TAATCATTTGCTCTTTTCTCTGTGCTTCAATTAATAAA AAATGGAAAGAACCTCGAG</p>	
<p>Транскрипт Cas9, содержащий ОРС Cas9 с использование м кодонов с обычно высокой экспрессией у людей</p>	<p>GGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCGT GTGTGTGTCGTTGCAGGCCTTATTCGGATCCATGCCTAA GAAAAAGCGGAAGGTGCACGGGGATAAGAAGTACTCAA TCGGGCTGGATATCGGAACTAATTCGGTGGGTGGGCAG TGATCACGGATGAATACAAAGTGCCGTCCAAGAAGTTC AAGGTCCTGGGGAACACCGATAGACACAGCATCAAGAA AAATCTCATCGGAGCCCTGCTGTTTGACTCCGGCGAAAC CGCAGAAGCGACCCGGCTCAAACGTACCGCGAGGCGAC GCTACACCCGGCGGAAGAATCGCATCTGCTATCTGCAAG AGATCTTTTCGAACGAAATGGCAAAGGTCGACGACAGC TTCTTCCACCGCCTGGAAGAATCTTTCCTGGTGGAGGAG GACAAGAAGCATGAACGGCATCCTATCTTTGGAAACATC GTCGACGAAGTGGCGTACCACGAAAAGTACCCGACCAT CTACCATCTGCGGAAGAAGTTGGTTGACTCAACTGACAA GGCCGACCTCAGATTGATCTACTTGGCCCTCGCCCATAT</p>	<p>48</p>

<p> GATCAAATTCGCGGACACTTCCTGATCGAAGGCGATCT GAACCCTGATAACTCCGACGTGGATAAGCTTTTCATTCA ACTGGTGCAGACCTACAACCAACTGTTCCAAGAAAACC CAATCAATGCTAGCGGCGTCGATGCCAAGGCCATCCTGT CCGCCCGGCTGTCGAAGTCGCGGCGCCTCGAAAACCTGA TCGCACAGCTGCCGGGAGAGAAAAAGAACGGACTTTTC GGCAACTTGATCGCTCTCTCACTGGGACTCACTCCCAAT TTCAAGTCCAATTTTGACCTGGCCGAGGACGCGAAGCTG CAACTCTCAAAGGACACCTACGACGACGACTTGGACAA TTTGCTGGCACAATTGGCGATCAGTACGCGGATCTGTT CCTTGCCGCTAAGAACCTTTCGGACGCAATCTTGCTGTC CGATATCCTGCGCGTGAACACCGAAATAACCAAAGCGC CGCTTAGCGCCTCGATGATTAAGCGGTACGACGAGCATC ACCAGGATCTCACGCTGCTCAAAGCGCTCGTGAGACAGC AACTGCCTGAAAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGT CCAAGAATGGGTACGCAGGGTACATCGATGGAGGCGCT AGCCAGGAAGAGTTCTATAAGTTCATCAAGCCAATCCTG GAAAAGATGGACGGAACCGAAGAACTGCTGGTCAAGCT GAACAGGGAGGATCTGCTCCGGAAACAGAGAACCTTTG ACAACGGATCCATTCCCCACCAGATCCATCTGGGTGAGC TGCACGCCATCTTGCGGCGCCAGGAGGACTTTTACCCAT TCCTCAAGGACAACCGGAAAAGATCGAGAAAATTCTG ACGTTCCGCATCCCGTATTACGTGGGCCCACTGGCGCGC GGCAATTCGCGCTTCGCGTGGATGACTAGAAAATCAGA GGAAACCATCACTCCTTGGAATTCGAGGAAGTTGTGGA TAAGGGAGCTTCGGCACAAGCTTCATCGAACGAATGA CCAACTTCGACAAGAATCTCCCAAACGAGAAGGTGCTTC CTAAGCACAGCCTCCTTTACGAATACTTCACTGTCTACA ACGAACTGACTAAAGTGAAATACGTTACTGAAGGAATG AGGAAGCCGGCCTTTCTGTCCGAGAACAGAAGAAAGC AATTGTGATCTGCTGTTCAAGACCAACCGCAAGGTGAC CGTCAAGCAGCTTAAAGAGGACTACTTCAAGAAGATCG AGTGTTTCGACTCAGTGGAATCAGCGGGGTGGAGGAC AGATTCAACGCTTCGCTGGGAACCTATCATGATCTCCTG AAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTTGACAACGAGGA </p>

<p> GAACGAGGACATCCTGGAAGATATCGTCCTGACCTTGAC CCTTTTCGAGGATCGCGAGATGATCGAGGAGAGGCTTAA GACCTACGCTCATCTCTTCGACGATAAGGTCATGAAACA ACTCAAGCGCCCGGTACTGTTGGGGCCGCCTCTC CCGCAAGCTGATCAACGGTATTCGCGATAAACAGAGCG GTAAACTATCCTGGATTTCTCAAATCGGATGGCTTCG CTAATCGTAACTTCATGCAATTGATCCACGACGACAGCC TGACCTTTAAGGAGGACATCCAAAAAGCACAAGTGTC GGACAGGGAGACTACTCCATGAACACATCGCGAATCT GGCCGGTTCCGGCGGATTAAGAAGGGAATTCTGAAA CTGTGAAGGTGGTCGACGAGCTGGTGAAGGTCATGGGA CGGCACAAACCGGAGAATATCGTGATTGAAATGGCCCG AGAAAACCAGACTACCCAGAAGGGCCAGAAAACTCCC GCGAAAGGATGAAGCGGATCGAAGAAGGAATCAAGGA GCTGGGCAGCCAGATCCTGAAAGAGCACCCGGTGGA ACACGCAGCTGCAGAACGAGAAGCTCTACCTGTACTATT TGCAAATGGACGGGACATGTACGTGGACCAAGAGCTG GACATCAATCGGTTGTCTGATTACGACGTGGACCACATC GTTCCACAGTCCTTTCTGAAGGATGACTCGATCGATAAC AAGGTGTTGACTCGCAGCGACAAGAACAGAGGGAAGTC AGATAATGTGCCATCGGAGGAGGTCGTGAAGAAGATGA AGAATTACTGGCGCAGCTCCTGAATGCGAAGCTGATTA CCCAGAGAAAGTTTGACAATCTCACTAAAGCCGAGCGC GGCGGACTCTCAGAGCTGGATAAGGCTGGATTCATCAA ACGGCAGCTGGTCGAGACTCGGCAGATTACCAAGCACG TGGCGCAGATCTTGACTCCCGCATGAACACTAAATACG ACGAGAACGATAAGCTCATCCGGGAAGTGAAGGTGATT ACCCTGAAAAGCAAACCTTGTGTCGGACTTTCGGAAGGAC TTTCAGTTTACAAAGTGAGAGAAATCAACAACCTACCAT CACGCGCATGACGCATACCTCAACGCTGTGGTCGGTACC GCCCTGATCAAAAAGTACCCTAAACTTGAATCGGAGTTT GTGTACGGAGACTACAAGGTCTACGACGTGAGGAAGAT GATAGCCAAGTCCGAACAGGAAATCGGGAAAGCAACTG CGAAATACTTCTTTACTCAAACATCATGAACTTTTCAA GACTGAAATTACGCTGGCCAATGGAGAAATCAGGAAGA </p>

	GGCCACTGATCGAAACTAACGGAGAAACGGGCGAAATC GTGTGGGACAAGGGCAGGGACTTCGCAACTGTTTCGCAA AGTGCTCTCTATGCCGCAAGTCAATATTGTGAAGAAAAC CGAAGTGCAAACCGGCGGATTTTCAAAGGAATCGATCCT CCCAAAGAGAAATAGCGACAAGCTCATTGCACGCAAGA AAGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGATTCGATTTCG CCGACTGTGCATACTCCGTCCTCGTGGTGGCCAAGGTG GAGAAGGGAAGAGCAAAAAGCTCAAATCCGTCAAAGA GCTGCTGGGGATTACCATCATGGAACGATCCTCGTTCGA GAAGAACCCGATTGATTTCCCTCGAGGCGAAGGGTTACA AGGAGGTGAAGAAGGATCTGATCATCAAACCCCCAAG TACTACTGTTTCGAACTGGAAAATGGTCGGAAGCGCATG CTGGCTTCGGCCGGAGAACTCCAAAAAGGAAATGAGCT GGCCTTGCTAGCAAGTACGTCAAACCTCCTCTATCTTGCT TCGCACTACGAAAACTCAAAGGGTCACCGGAAGATAA CGAACAGAAGCAGCTTTTCGTGGAGCAGCACAAGCATT ATCTGGATGAAATCATCGAACAAATCTCCGAGTTTTCAA AGCGCGTGATCCTCGCCGACGCCAACCTCGACAAAGTCC TGTCGGCCTACAATAAGCATAGAGATAAGCCGATCAGA GAACAGGCCGAGAACATTATCCACTTGTTACCCTGACT AACCTGGGAGCCCAGCCGCCTCAAGTACTTCGATACT ACTATCGATCGAAAAAGATACACGTCCACCAAGGAAGT TCTGGACGCGACCCTGATCCACCAAAGCATCACTGGACT CTACGAAACTAGGATCGATCTGTGCGAGCTGGGTGGCGA TTGATAGTCTAGCCATCACATTTAAAAGCATCTCAGCCT ACCATGAGAATAAGAGAAAAGAAAATGAAGATCAATAGC TTATTCATCTCTTTTTCTTTTTTCGTTGGTGTAAGCCAAC ACCCTGTCTAAAAACATAAATTTCTTTAATCATTTTGCC TCTTTTCTCTGTGCTTCAATTAATAAAAAATGGAAAGAA CCTCGAG	
Транскрипт Cas9, содержащий последователь ность Козак с	GGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCGT GTGTGTGTCGTTGCAGGCCTTATTCGGATCCGCCACCAT GCCTAAGAAAAAGCGGAAGGTGCGACGGGATAAGAAGT ACTCAATCGGGCTGGATATCGGAACTAATTCGTTGGGTT GGGCAGTGATCACGGATGAATACAAAGTGCCGTCCAAG	49

<p>ОРС Cas9 с использованием кодонов обычно высокой экспрессией у людей</p>	<p>AAGTTCAAGGTCCTGGGGAACACCGATAGACACAGCAT CAAGAAAAATCTCATCGGAGCCCTGCTGTTGACTCCGG CGAAACCGCAGAAGCGACCCGGCTCAAACGTACCGCGA GGCGACGCTACACCCGGCGGAAGAATCGCATCTGCTATC TGCAAGAGATCTTTTCGAACGAAATGGCAAAGGTCGAC GACAGCTTCTCCACCGCCTGGAAGAATCTTCCTGGTG GAGGAGGACAAGAAGCATGAACGGCATCCTATCTTTGG AAACATCGTCGACGAAGTGGCGTACCACGAAAAGTACC CGACCATCTACCATCTGCGGAAGAAGTTGGTTGACTCAA CTGACAAGGCCGACCTCAGATTGATCTACTTGGCCCTCG CCCATATGATCAAATTCCGCGGACACTTCCTGATCGAAG GCGATCTGAACCCTGATAACTCCGACGTGGATAAGCTTT TCATTCAACTGGTGCAGACCTACAACCAACTGTTCGAAG AAAACCCAATCAATGCTAGCGGCGTCGATGCCAAGGCC ATCCTGTCCGCCCGGCTGTCGAAGTCGCGGCGCCTCGAA AACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGAGAAAAAGAACGG ACTTTTCGGCAACTTGATCGCTCTCTACTGGGACTCACT CCCAATTTCAAGTCCAATTTTGACCTGGCCGAGGACGCG AAGCTGCAACTCTCAAAGGACACCTACGACGACGACTT GGACAATTTGCTGGCACAATTTGGCGATCAGTACGCGG ATCTGTTCTTGCCGCTAAGAACCTTTCGGACGCAATCTT GCTGTCCGATATCCTGCGCGTGAACACCGAAATAACCAA AGCGCCGCTTAGCGCCTCGATGATTAAGCGGTACGACGA GCATCACCAGGATCTCACGCTGCTCAAAGCGCTCGTGAG ACAGCAACTGCCTGAAAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGA CCAGTCCAAGAATGGGTACGCAGGGTACATCGATGGAG GCGCTAGCCAGGAAGAGTTCTATAAGTTCATCAAGCCAA TCCTGGAAAAGATGGACGGAACCGAAGAACTGCTGGTC AAGCTGAACAGGGAGGATCTGCTCCGAAAACAGAGAAC CTTTGACAACGGATCCATTCCCCACCAGATCCATCTGGG TGAGCTGCACGCCATCTTGCGGCGCCAGGAGGACTTTTA CCCATTCTCAAGGACAACCGGAAAAGATCGAGAAAA TTCTGACGTTCCGCATCCCGTATTACGTGGGCCCACTGG CGCGCGGCAATTCGCGCTTCGCGTGGATGACTAGAAAAT CAGAGGAAACCATCACTCCTTGAATTTGAGGAAGTTG</p>
--	--

<p> TGGATAAGGGAGCTTCGGCACAAAGCTTCATCGAACGA ATGACCAACTTCGACAAGAATCTCCCAAACGAGAAGGT GCTTCCTAAGCACAGCCTCCTTTACGAATACTTCACTGTC TACAACGAACTGACTAAAGTGAAATACGTTACTGAAGG AATGAGGAAGCCGGCCTTCTGTCCGGAGAACAGAAGA AAGCAATTGTCGATCTGCTGTTCAAGACCAACCGCAAGG TGACCGTCAAGCAGCTTAAAGAGGACTACTTCAAGAAG ATCGAGTGTTCGACTCAGTGGAATCAGCGGGGTGGA GGACAGATTCAACGCTTCGCTGGGAACCTATCATGATCT CCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTTGACAACG AGGAGAACGAGGACATCCTGGAAGATATCGTCCTGACC TTGACCCTTTTCGAGGATCGCGAGATGATCGAGGAGAGG CTTAAGACCTACGCTCATCTCTTCGACGATAAGGTCATG AAACAACCTCAAGCGCCGCCGGTACACTGGTTGGGGCCG CCTCTCCCGCAAGCTGATCAACGGTATTCGCGATAAACA GAGCGGTAAACTATCCTGGATTCCTCAAATCGGATGG CTTCGTAATCGTAACTTCATGCAATTGATCCACGACGA CAGCCTGACCTTTAAGGAGGACATCCAAAAGCACAAG TGTCCGGACAGGGAGACTCACTCCATGAACACATCGCG AATCTGGCCGGTTCGCCGGCGATTAAGAAGGGAATTCTG CAAACGTGAAGGTGGTCGACGAGCTGGTGAAGGTCAT GGGACGGCACAAACCGGAGAATATCGTGATTGAAATGG CCCAGAAAACCAGACTACCCAGAAGGGCCAGAAAAAC TCCCGCGAAAGGATGAAGCGGATCGAAGAAGGAATCAA GGAGCTGGGCAGCCAGATCCTGAAAGAGCACCCGGTGG AAAACACGCAGCTGCAGAACGAGAAGCTCTACCTGTAC TATTTGAAAATGGACGGGACATGTACGTGGACCAAGA GCTGGACATCAATCGGTTGTCTGATTACGACGTGGACCA CATCGTTCCACAGTCCTTTCTGAAGGATGACTCGATCGA TAACAAGGTGTTGACTCGCAGCGACAAGAACAGAGGGA AGTCAGATAATGTGCCATCGGAGGAGGTCGTGAAGAAG ATGAAGAATTACTGGCGGCAGCTCCTGAATGCGAAGCT GATTACCCAGAGAAAGTTTGACAATCTACTAAAGCCGA GCGCGGGGACTCTCAGAGCTGGATAAGGCTGGATTTCAT CAAACGGCAGCTGGTCGAGACTCGGCAGATTACCAAGC </p>

<p> ACGTGGCGCAGATCTTGACTCCCGCATGAACACTAAAT ACGACGAGAACGATAAGCTCATCCGGGAAGTGAAGGTG ATTACCCTGAAAAGCAAACCTGTGTCTGGACTTTCGGAAG GACTTTCAGTTTTACAAAGTGAGAGAAATCAACAACACTAC CATCACGCGCATGACGCATACCTCAACGCTGTGGTTCGGT ACCGCCCTGATCAAAAAGTACCCTAAACTTGAATCGGAG TTTGTGTACGGAGACTACAAGTCTACGACGTGAGGAA GATGATAGCCAAGTCCGAACAGGAAATCGGGAAAGCAA CTGCGAAATACTTCTTTTACTCAAACATCATGAACTTTTT CAAGACTGAAATTACGCTGGCCAATGGAGAAATCAGGA AGAGGCCACTGATCGAAACTAACGGAGAAACGGGGCGAA ATCGTGTGGGACAAGGGCAGGGACTTCGCAACTGTTTCGC AAAGTGCTCTCTATGCCGCAAGTCAATATTGTGAAGAAA ACCGAAGTGCAAACCGGCGGATTTTCAAAGGAATCGAT CCTCCCAAAGAGAAATAGCGACAAGCTCATTGCACGCA AGAAAGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGAGGATTTCGAT TCGCCGACTGTTCGATACTCCGTCCTCGTGGTGGCCAAG GTGGAGAAGGGAAAGAGCAAAAAGCTCAAATCCGTCAA AGAGCTGCTGGGGATTACCATCATGGAACGATCCTCGTT CGAGAAGAACCCGATTGATTTCCCTCGAGGCGAAGGGTT ACAAGGAGGTGAAGAAGGATCTGATCATCAAACCTCCCC AAGTACTCACTGTTTCGAACTGGAAAATGGTTCGGAAGCG CATGCTGGCTTCGGCCGGAGAACTCCAAAAAGGAAATG AGCTGGCCTTGCTAGCAAAGTACGTCAACTTCCTCTATC TTGCTTCGCACTACGAAAAACTCAAAGGGTCACCGGAA GATAACGAACAGAAGCAGCTTTTCGTGGAGCAGCACAA GCATTATCTGGATGAAATCATCGAACAAATCTCCGAGTT TTCAAAGCGGTGATCCTCGCCGACGCCAACCTCGACAA AGTCCTGTTCGGCCTACAATAAGCATAGAGATAAGCCGAT CAGAGAACAGGCCGAGAACATTATCCACTTGTTACCCCT GACTAACCTGGGAGCCCCAGCCGCCTCAAGTACTTCGA TACTACTATCGATCGAAAAGATACACGTCCACCAAGGA AGTTCTGGACGCGACCTGATCCACCAAAGCATCACTGG ACTCTACGAAACTAGGATCGATCTGTTCGAGCTGGGTGG CGATTGATAGTCTAGCCATCACATTTAAAAGCATCTCAG </p>
--

	<p>CCTACCATGAGAATAAGAGAAAGAAAATGAAGATCAAT AGCTTATTCATCTCTTTTCTTTTTTCGTTGGTGTAAAGCC AACACCCTGTCTAAAAAACATAAATTTCTTTAATCATTTT GCCTCTTTTCTCTGTGCTTCAATTAATAAAAAATGGAAA GAACCTCGAG</p>	
<p>ОРС Cas9 с удаленными точками сплайсинга; содержание U 12,75%</p>	<p>ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAAC AAACAGCGTCGGATGGGCAGTCATCACAGACGAATACA AGGTCCCGAGCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAAACACA GACAGACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACT GCTGTTTCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGAC TGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAA GAACAGAATCTGCTACCTGCAGGAAATCTTCAGCAACG AAATGGCAAAGGTCGACGACAGCTTCTCCACeggCTGG AAGAAAGCTTCTGGTTCGAAGAAGACAAGAAGCACGAA AGACACCCGATCTTCGGAAACATCGTCGACGAAGTCGC ATACCACGAAAAGTACCCGACAATCTACCACCTGAGAA AGAAGCTGGTTCGACAGCACAGACAAGGCAGACCTGAGA CTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCAAGTTCAGA GGACACTTCTGATCGAAGGAGACCTGAACCCGGACAA CAGCGACGTCGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTCCAGAC ATACAACCAGCTGTTTCGAAGAAAACCCGATCAACGCAA GCGGAGTCGACGCAAAGGCAATCCTGAGCGCAAGACTG AGCAAGAGCAGAAGACTGGAAAACCTGATCGCACAGCT GCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACTGTTTCGGAAACCTGA TCGCACTGAGCCTGGGACTGACACCGAACTTCAAGAGC AACTTCGACCTGGCAGAAGACGCAAAGCTGCAGCTGAG CAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGG CACAGATCGGAGACCAGTACGCAGACCTGTTCTGGCA GCAAAGAACCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACAT CCTGAGAGTCAACACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGA GCGCAAGCATGATCAAGAGATACGACGAACACCACCAG GACCTGACACTGCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGCT GCCGAAAAGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCA AGAACGGATACGCAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGC CAGGAAGAATTCTACAAGTTCATCAAGCCGATCCTGGAA</p>	<p>50</p>

<p>AAGATGGACGGAACAGAAGAACTGCTGGTCAAGCTGAA CAGAGAAGACCTGCTGAGAAAGCAGAGAACATTCGACA ACGGAAGCATCCCCACCAGATCCACCTGGGAGAACTG CACGCAATCCTGAGAAGACAGGAAGACTTCTACCCGTT CTGAAGGACAACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGAC ATTCAGAATCCCGTACTACGTCCGACCGCTGGCAAGAGG AAACAGCAGATTTCGCATGGATGACAAGAAAGAGCGAAG AAACAATCACACCGTGGAAGTTCGAAGAAGTCGTGAC AAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGAATGAC AAACTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAAAGGTCCTGC CGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTCTACA ACGAACTGACAAAGGTCAAGTACGTACAGAAAGGAATG AGAAAGCCGGCATTCTGAGCGGAGAACAGAAGAAGGC AATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTCA CAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATC GAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGA CAGATTCAACGCAAGCCTGGGAACATACCACGACCTGCT GAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAAG AAAACGAAGACATCCTGGAAGACATCGTCCTGACACTG ACACTGTTCGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACT GAAGACATACGCACACCTGTTTCGACGACAAGGTCATGA AGCAGCTGAAGAGAAGAAGATACACAGGATGGGGAAG ACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGAATCAGAGACAAGC AGAGCGGAAAGACAATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGAC GGATTCGCAAACAGAACTTCATGCAGCTGATCCACGAC GACAGCCTGACATTCAAGGAAGACATCCAGAAGGCACA GGTCAGCGGACAGGGAGACAGCCTGCACGAACACATCG CAAACCTGGCAGGAAGCCCGCAATCAAGAAGGGAATC CTGCAGACAGTCAAGGTCGTCGACGAACTGGTCAAGGT CATGGGAAGACACAAGCCGAAAACATCGTCATCGAAA TGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAA GAACAGCAGAGAAAGAATGAAGAGAATCGAAGAAGGA ATCAAGGAACTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCC GGTCGAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACC TGTAACCTGCAaAACGGAAGAGACATGTACGTCGACC</p>

AGGAACTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTC GACCACATCGTCCCGCAGAGCTTCTGAAGGACGACAG CATCGACAACAAGGTCCTGACAAGAAGCGACAAGAACA GAGGAAAGAGCGACAACGTCCCGAGCGAAGAAGTCGTC AAGAAGATGAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGC AAAGCTGATCACACAGAGAAAGTTCGACAACCTGACAA AGGCAGAGAGAGGAGGACTGAGCGAACTGGACAAGGC AGGATTCATCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAGACAGA TCACAAAGCACGTGCGACAGATCCTGGACAGCAGAATG AACACAAAGTACGACGAAAACGACAAGCTGATCAGAGA AGTCAAGGTCATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGCG ACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTCAGAGAA ATCAACAACCTACCACCACGCACACGACGCATACCTGAA CGCAGTCGTGGAACAGCACTGATCAAGAAGTACCCGA AGCTGGAAAGCGAATTCGTCTACGGAGACTACAAGGTC TACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAGAGCGAACAGGA AATCGGAAAGGCAACAGCAAAGTACTTCTTCTACAGCA ACATCATGAACTTCTTCAAGACAGAAATCACACTGGCAA ACGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAAAC GGAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAGGGAAGAG ACTTCGCAACAGTCAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGCAG GTCAACATCGTCAAGAAGACAGAAGTCCAGACAGGAGG ATTCAGCAAGGAAAGCATCCTGCCGAAGAGAAACAGCG ACAAGCTGATCGCAAGAAAGAAGGACTGGGACCCGAAG AAGTACGGAGGATTCGACAGCCCGACAGTCGCATACAG CGTCCTGGTCGTCGCAAAGGTCGAAAAGGGAAAGAGCA AGAAGCTGAAGAGCGTCAAGGAACTGCTGGGAATCACA ATCATGGAAGAAGCAGCTTCGAAAAGAACCCGATCGA CTCCTGGAAGCAAAGGGATACAAGGAAGTCAAGAAGG ACCTGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCTGTTTGAAC TGGAAAACCGAAGAAAGAGAATGCTGGCAAGCGCAGG AGAACTGCAGAAGGGAAACGAACTGGCACTGCCGAGCA AGTACGTCAACTTCTGTACCTGGCAAGCCACTACGAAA AGCTGAAGGGAAAGCCCGAAGACAACGAACAGAAGCA GCTGTTTCGTGCAACAGCACAAAGCACTACCTGGACGAAAT
--

	<p>CATCGAACAGATCAGCGAATTCAGCAAGAGAGTCATCC TGGCAGACGCAAACCTGGACAAGGTCCTGAGCGCATA AACAAAGCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAG AAAACATCATCCACCTGTTCACTGACAAAACCTGGGAG CACCGGCAGCATTCAAGTACTTCGACACAACAATCGACA GAAAGAGATACACAAGCACAAGGAAGTCCTGGACGCA ACACTGATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAAC AAGAATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAG GAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGTCTAG</p>	
<p>Транскрипт Cas9 с 5'-НТО HSD, OPC, соответствую щая SEQ ID NO: 50, последователь ность Козак и 3'-НТО ALB</p>	<p>GGGTCCCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCGT GTGTGTGTGCTTGCAGGCCTTATTCGGATCCGCCACCAT GGACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAA ACAGCGTCGGATGGGCAGTCATCACAGACGAATACAAG GTCCCAGCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAAACACAGA CAGACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGC TGTTGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACTG AAGAGAACAGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAAGA ACAGAATCTGCTACCTGCAGGAAATCTTCAGCAACGAA ATGGCAAAGGTCGACGACAGCTTCTCCACcggCTGGAA GAAAGCTTCTGGTTCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAG ACACCCGATCTTCGGAAACATCGTCGACGAAGTCGCATA CCACGAAAAGTACCCGACAATCTACCACCTGAGAAAGA AGCTGGTCGACAGCACAGACAAGGCAGACCTGAGACTG ATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCAAGTTCAGAGGA CACTTCTGATCGAAGGAGACCTGAACCCGGACAACAG CGACGTCGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTCCAGACATA CAACCAGCTGTTTCGAAGAAAACCCGATCAACGCAAGCG GAGTCGACGCAAAGGCAATCCTGAGCGCAAGACTGAGC AAGAGCAGAAGACTGGAAAACCTGATCGCACAGCTGCC GGGAGAAAAGAAGAACGGACTGTTTCGGAAACCTGATCG CACTGAGCCTGGGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAAC TTCGACCTGGCAGAAGACGCAAAGCTGCAGCTGAGCAA GGACACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCAC AGATCGGAGACCAGTACGCAGACCTGTTCTGGCAGCA AAGAACCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCT</p>	<p>51</p>

<p> GAGAGTCAACACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCG CAAGCATGATCAAGAGATACGACGAACACCACCAGGAC CTGACACTGCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCC GGAAAAGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGA ACGGATACGCAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAG GAAGAATTCTACAAGTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAA GATGGACGGAACAGAAGAACTGCTGGTCAAGCTGAACA GAGAAGACCTGCTGAGAAAGCAGAGAACATTTCGACAAC GGAAGCATCCCGCACCAGATCCACCTGGGAGAACTGCA CGCAATCCTGAGAAGACAGGAAGACTTCTACCCGTTCT GAAGGACAACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGACAT TCAGAATCCCGTACTACGTCGGACCGCTGGCAAGAGGA AACAGCAGATTTCGCATGGATGACAAGAAAGAGCGAAGA ACAATCACACCGTGGAACTTCGAAGAAGTCGTGCGACA AGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGAATGACA AACTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAAAGGTCTGCC GAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTCTACAA CGAACTGACAAAGGTCAAGTACGTCACAGAAGGAATGA GAAAGCCGGCATTCTGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCA ATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTCAC AGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATCG AATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGAC AGATTCAACGCAAGCCTGGGAACATACCACGACCTGCT GAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCTGGACAACGAAG AAAACGAAGACATCCTGGAAGACATCGTCCTGACACTG ACACTGTTTCAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACT GAAGACATACGCACACCTGTTTCGACGACAAGGTCATGA AGCAGCTGAAGAGAAGAAGATACACAGGATGGGGAAG ACTGAGCAGAAAAGCTGATCAACGGAATCAGAGACAAGC AGAGCGGAAAGACAATCCTGGACTTCTGAAGAGCGAC GGATTCGCAAACAGAACTTCATGCAGCTGATCCACGAC GACAGCCTGACATTCAAGGAAGACATCCAGAAGGCACA GGTCAGCGGACAGGGAGACAGCCTGCACGAACACATCG CAAACCTGGCAGGAAGCCCGGCAATCAAGAAGGGAATC CTGCAGACAGTCAAGGTCGTCGACGAACTGGTCAAGGT </p>

<p> CATGGGAAGACACAAGCCGGAAAACATCGTCATCGAAA TGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAA GAACAGCAGAGAAAGAATGAAGAGAAATCGAAGAAGGA ATCAAGGAACTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCC GGTCGAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACC TGTACTACCTGCAaAACGGAAGAGACATGTACGTCGACC AGGAACTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTC GACCACATCGTCCCGCAGAGCTTCTGAAGGACGACAG CATCGACAACAAGGTCCTGACAAGAAGCGACAAGAACA GAGGAAAGAGCGACAACGTCCCGAGCGAAGAAGTCGTC AAGAAGATGAAGA ACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGC AAAGCTGATCACACAGAGAAAGTTCGACAACCTGACAA AGGCAGAGAGAGGAGGACTGAGCGAACTGGACAAGGC AGGATTCATCAAGAGACAGCTGGTCGAAAACAAGACAGA TCACAAAGCACGTGCGACAGATCCTGGACAGCAGAATG AACACAAAGTACGACGAAAACGACAAGCTGATCAGAGA AGTCAAGGTCATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGCG ACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTCAGAGAA ATCAACA ACTACCACCACGCACACGACGCATACCTGAA CGCAGTCGTCGGAACAGCACTGATCAAGAAGTACCCGA AGCTGGAAAGCGAATTCGTCTACGGAGACTACAAGGTC TACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAGAGCGAACAGGA AATCGGAAAGGCAACAGCAAAGTACTTCTTCTACAGCA ACATCATGAACTTCTTCAAGACAGAAATCACACTGGCAA ACGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAAAC GGAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAGGGAAGAG ACTTCGCAACAGTCAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGCAG GTCAACATCGTCAAGAAGACAGAAGTCCAGACAGGAGG ATTCAGCAAGGAAAGCATCCTGCCGAAGAGAAAACAGCG ACAAGCTGATCGCAAGAAAGAAGGACTGGGACCCGAAG AAGTACGGAGGATTTCGACAGCCCGACAGTCGCATACAG CGTCCTGGTCGTCGCAAAGGTCGAAAAGGGAAAGAGCA AGAAGCTGAAGAGCGTCAAGGAACTGCTGGGAATCACA ATCATGGAAAGAAAGCAGCTTCGAAAAGAACCCGATCGA CTTCTGGAAGCAAAGGGATACAAGGAAGTCAAGAAGG </p>
--

	<p>ACCTGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCTGTTCTGAAC TGGAAAACGGAAGAAAGAGAATGCTGGCAAGCGCAGG AGAACTGCAGAAGGGAAACGAACTGGCACTGCCGAGCA AGTACGTCAACTTCTGTACCTGGCAAGCCACTACGAAA AGCTGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCA GCTGTTTCGTCTGAACAGCACAAGCACTACCTGGACGAAAT CATCGAACAGATCAGCGAATTCAGCAAGAGAGTCATCC TGGCAGACGCAAACCTGGACAAGGTCCTGAGCGCATA AACAAAGCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAG AAAACATCATCCACCTGTTCACTGACAAACCTGGGAG CACCGGCAGCATTCAAGTACTTCGACACAACAATCGACA GAAAGAGATACACAAGCACAAGGAAGTCCTGGACGCA AACTGATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAAC AAGAATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAG GAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGTCTAGCTAGCCATC ACATTTAAAAGCATCTCAGCCTACCATGAGAATAAGAG AAAGAAAATGAAGATCAATAGCTTATTCATCTCTTTTC TTTTTCGTTGGTGTAAGCCAACACCCTGTCTAAAAAAC ATAAATTTCTTAAATCATTTTGCCTCTTTTCTCTGTGCTTC AATTAATAAAAAATGGAAAGAACCTCGAG</p>	
<p>ОРС Cas9 с кодонами с минимальным содержанием уридина, часто используемым и у людей в целом; содержание U 12,75%</p>	<p>ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCAC CAACAGCGTGGGCTGGGCCGTGATCACCGACGAGTACA AGGTGCCCAGCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACC GACAGACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGCGCCCT GCTGTTTCGACAGCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCAGAC TGAAGAGAACCGCCAGAAGAAGATACACCAGAAGAAA GAACAGAATCTGCTACCTGCAGGAGATCTTCAGCAACG AGATGGCCAAGGTGGACGACAGCTTCTTCCACAGACTG GAGGAGAGCTTCTGTTGGAGGAGGACAAGAAGCACGA GAGACACCCCATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGG CCTACCACGAGAAGTACCCACCATCTACCACCTGAGAA AGAAGCTGGTGGACAGCACCGACAAGGCCGACCTGAGA CTGATCTACCTGGCCCTGGCCACATGATCAAGTTCAGA GGCCACTTCTGATCGAGGGCGACCTGAACCCCGACAAC AGCGACGTGGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTGCAGACC</p>	<p>52</p>

<p> TACAACCAGCTGTTTCGAGGAGAACCCCATCAACGCCAG CGGCGTGGACGCCAAGGCCATCCTGAGCGCCAGACTGA GCAAGAGCAGAAGACTGGAGAACCTGATCGCCCAGCTG CCCGGCGAGAAGAAGAACGGCCTGTTTCGGCAACCTGAT CGCCCTGAGCCTGGGCTGACCCCAACTTCAAGAGCAA CTTCGACCTGGCCGAGGACGCCAAGCTGCAGCTGAGCA AGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCC CAGATCGGCGACCAGTACGCCGACCTGTTCTGGCCGCC AAGAACCTGAGCGACGCCATCCTGCTGAGCGACATCCTG AGAGTGAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCTGAGCGC CAGCATGATCAAGAGATACGACGAGCACCACCAGGACC TGACCCTGCTGAAGGCCCTGGTGAGACAGCAGCTGCCCC AGAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAAC GGCTACGCCGGCTACATCGACGGCGGCCAGCCAGGA GGAGTTCTACAAGTTCATCAAGCCCATCCTGGAGAAGAT GGACGGCACCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACAGAG AGGACCTGCTGAGAAAGCAGAGAACCTTCGACAACGGC AGCATCCCCACCAGATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCC ATCCTGAGAAGACAGGAGGACTTCTACCCCTTCCTGAAG GACAACAGAGAGAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCAG AATCCCCTACTACGTGGGCCCCCTGGCCAGAGGCAACAG CAGATTGCTGCTGGATGACCAGAAAGAGCGAGGAGACCA TCACCCCTGGAACCTTCGAGGAGGTGGTGGACAAGGGC GCCAGCGCCCAGAGCTTCATCGAGAGAATGACCAACTTC GACAAGAACCTGCCAACGAGAAGGTGCTGCCAAGCA CAGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTACAACGAGCT GACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCATGAGAAAGC CCGCCTTCCTGAGCGGCGAGCAGAAGAAGGCCATCGTG GACCTGCTGTTCAAGACCAACAGAAAGGTGACCGTGAA GCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAGTGCT TCGACAGCGTGGAGATCAGCGGCGTGGAGGACAGATTC AACGCCAGCCTGGGCACCTACCACGACCTGCTGAAGATC ATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAGGAGAACGA GGACATCCTGGAGGACATCGTGCTGACCCTGACCCTGTT CGAGGACAGAGAGATGATCGAGGAGAGACTGAAGACCT </p>

<p> ACGCCCACCTGTTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTG AAGAGAAGAAGATACACCGGCTGGGGCAGACTGAGCAG AAAGCTGATCAACGGCATCAGAGACAAGCAGAGCGGCA AGACCATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGACGGCTTCGCCA ACAGAAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTG ACCTTCAAGGAGGACATCCAGAAGGCCAGGTGAGCGG CCAGGGCGACAGCCTGCACGAGCACATCGCCAACCTGG CCGGCAGCCCCGCCATCAAGAAGGGCATCCTGCAGACC GTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTGATGGGCAG ACACAAGCCGAGAACATCGTGATCGAGATGGCCAGAG AGAACCAGACCACCCAGAAGGGCCAGAAGAACAGCAG AGAGAGAATGAAGAGAATCGAGGAGGGCATCAAGGAG CTGGGCAGCCAGATCCTGAAGGAGCACCCCGTGGAGAA CACCCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCT GCAGAACGGCAGAGACATGTACGTGGACCAGGAGCTGG ACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTGGACCACATC GTGCCCCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACAA CAAGGTGCTGACCAGAAGCGACAAGAACAGAGGCAAGA GCGACAACGTGCCACGCGAGGAGGTGGTGAAGAAGATG AAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCCAAGCTGAT CACCCAGAGAAAGTTCGACAACCTGACCAAGGCCGAGA GAGGGCGCCTGAGCGAGCTGGACAAGGCCGGCTTCATC AAGAGACAGCTGGTGGAGACCAGACAGATCACCAAGCA CGTGGCCCAGATCCTGGACAGCAGAATGAACACCAAGT ACGACGAGAACGACAAGCTGATCAGAGAGGTGAAGGTG ATCACCTGAAGAGCAAGCTGGTGGAGCGACTTCAGAAA GGACTTCCAGTTCTACAAGGTGAGAGAGATCAACAAC ACCACCACGCCCACGACGCCTACCTGAACGCCGTGGTGG GCACCGCCCTGATCAAGAAGTACCCCAAGCTGGAGAGC GAGTTCGTGTACGGCGACTACAAGGTGTACGACGTGAG AAAGATGATCGCCAAGAGCGAGCAGGAGATCGGCAAGG CCACCGCCAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACT TCTTCAAGACCGAGATCACCTGGCCAACGGCGAGATCA GAAAGAGACCCCTGATCGAGACCAACGGCGAGACCGGC GAGATCGTGTGGGACAAGGGCAGAGACTTCGCCACCGT </p>

	<p>GAGAAAGGTGCTGAGCATGCCCCAGGTGAACATCGTGA AGAAGACCGAGGTGCAGACCGGCGGCTTCAGCAAGGAG AGCATCCTGCCAAGAGAAACAGCGACAAGCTGATCGC CAGAAAGAAGGACTGGGACCCCAAGAAGTACGGCGGCT TCGACAGCCCCACCGTGGCCTACAGCGTGCTGGTGGTGG CCAAGGTGGAGAAGGGCAAGAGCAAGAAGCTGAAGAG CGTGAAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGAGAA GCAGCTTCGAGAAGAACCCCATCGACTTCCTGGAGGCCA AGGGCTACAAGGAGGTGAAGAAGGACCTGATCATCAAG CTGCCAAGTACAGCCTGTTTCGAGCTGGAGAACGGCAG AAAGAGAATGCTGGCCAGCGCCGGCGAGCTGCAGAAGG GCAACGAGCTGGCCCTGCCAGCAAGTACGTGAACTTCC TGTACCTGGCCAGCCACTACGAGAAGCTGAAGGGCAGC CCCGAGGACAACGAGCAGAAGCAGCTGTTTCGTGGAGCA GCACAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCA GCGAGTTCAGCAAGAGAGTGATCCTGGCCGACGCCAAC CTGGACAAGGTGCTGAGCGCCTACAACAAGCACAGAGA CAAGCCCATCAGAGAGCAGGCCGAGAACATCATCCACC TGTTACCCTGACCAACCTGGGCGCCCCCGCCGCCTTCA AGTACTTCGACACCACCATCGACAGAAAGAGATACACC AGCACCAAGGAGGTGCTGGACGCCACCCTGATCCACCA GAGCATCACCGCCTGTACGAGACCAGAATCGACCTGA GCCAGCTGGGCGGCGACGGCGGCGGCAGCCCCAAGAAG AAGAGAAAGGTGTGA</p>	
<p>Транскрипт Cas9 с 5'-НТО HSD, OPC, соответствую щая SEQ ID NO: 52, последователь ность Козак и 3'-НТО ALB</p>	<p>GGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCGT GTGTGTGTCGTTGCAGGCCTTATTTCGGATCCGCCACCAT GGACAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCA ACAGCGTGGGCTGGGCCGTGATCACCGACGAGTACAAG GTGCCCAGCAAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGA CAGACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGCGCCCTGC TGTTTCGACAGCGGCGAGACCGCCGAGGCCACCAACTG AAGAGAACCAGCAGAGAAGAAGATACACCAGAAGAAAGA ACAGAATCTGCTACCTGCAGGAGATCTTCAGCAACGAG ATGGCCAAGGTGGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGA GGAGAGCTTCTGTTGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGA</p>	53

<p> GACACCCCATCTTCGGCAACATCGTGACGAGGTGGCCT ACCACGAGAAGTACCCACCATCTACCACCTGAGAAAG AAGCTGGTGGACAGCACCGACAAGGCCGACCTGAGACT GATCTACCTGGCCCTGGCCACATGATCAAGTTCAGAGG CCACTTCCTGATCGAGGGCGACCTGAACCCCGACAACAG CGACGTGGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTGCAGACCTA CAACCAGCTGTTTCGAGGAGAACCCCATCAACGCCAGCG GCGTGGACGCCAAGGCCATCCTGAGCGCCAGACTGAGC AAGAGCAGAAGACTGGAGAACCTGATCGCCCAGCTGCC CGGCGAGAAGAAGAACGGCCTGTTTCGGCAACCTGATCG CCCTGAGCCTGGGCCTGACCCCAACTTCAAGAGCAACT TCGACCTGGCCGAGGACGCCAAGCTGCAGCTGAGCAAG GACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCCCA GATCGGCGACCAGTACGCCGACCTGTTCTTCGGCCGCCAA GAACCTGAGCGACGCCATCCTGCTGAGCGACATCCTGAG AGTGAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCTGAGCGCCA GCATGATCAAGAGATACGACGAGCACCACCAGGACCTG ACCCTGCTGAAGGCCCTGGTGAGACAGCAGCTGCCCCGA GAAGTACAAGGAGATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACG GCTACGCCGGCTACATCGACGGCGGCCAGCCAGGAG GAGTTCTACAAGTTCATCAAGCCATCCTGGAGAAGATG GACGGCACCGAGGAGCTGCTGGTGAAGCTGAACAGAGA GGACCTGCTGAGAAAGCAGAGAACCTTCGACAACGGCA GCATCCCCCACCAGATCCACCTGGGCGAGCTGCACGCCA TCCTGAGAAGACAGGAGGACTTCTACCCCTTCCTGAAGG ACAACAGAGAGAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCAGA ATCCCCTACTACGTGGGCCCCCTGGCCAGAGGCAACAGC AGATTCGCCTGGATGACCAGAAAGAGCGAGGAGACCAT CACCCCTGGAACCTTCGAGGAGGTGGTGGACAAGGGCG CCAGCGCCCAGAGCTTCATCGAGAGAATGACCAACTTCG ACAAGAACCTGCCAACGAGAAGGTGCTGCCAACGAC AGCCTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTACAACGAGCTG ACCAAGGTGAAGTACGTGACCGAGGGCATGAGAAAGCC CGCCTTCCTGAGCGGCGAGCAGAAGAAGGCCATCGTGG ACCTGCTGTTCAAGACCAACAGAAAGGTGACCGTGAAG </p>

<p> CAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAGTGCTT CGACAGCGTGGAGATCAGCGGCGTGGAGGACAGATTCA ACGCCAGCCTGGGCACCTACCACGACCTGCTGAAGATCA TCAAGGACAAGGACTTCTTGACAACGAGGAGAACGAG GACATCCTGGAGGACATCGTGCTGACCCTGACCCTGTTC GAGGACAGAGAGATGATCGAGGAGAGACTGAAGACCTA CGCCACCTGTTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGA AGAGAAGAAGATACACCGGCTGGGGCAGACTGAGCAGA AAGCTGATCAACGGCATCAGAGACAAGCAGAGCGGCAA GACCATCCTGGACTTCTGAAGAGCGACGGCTTCGCCAA CAGAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCTGAC CTCAAGGAGGACATCCAGAAGGCCAGGTGAGCGGCC AGGGCGACAGCCTGCACGAGCACATCGCCAACCTGGCC GGCAGCCCCGCCATCAAGAAGGGCATCCTGCAGACCGT GAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGGTGATGGGCAGAC ACAAGCCCGAGAACATCGTGATCGAGATGGCCAGAGAG AACCAGACCACCCAGAAGGGCCAGAAGAACAGCAGAG AGAGAATGAAGAGAATCGAGGAGGGCATCAAGGAGCTG GGCAGCCAGATCCTGAAGGAGCACCCCGTGGAGAACAC CCAGCTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCA GAACGGCAGAGACATGTACGTGGACCAGGAGCTGGACA TCAACAGACTGAGCGACTACGACGTGGACCACATCGTG CCCCAGAGCTTCTGAAGGACGACAGCATCGACAACAA GGTGCTGACCAGAAGCGACAAGAACAGAGGCAAGAGCG ACAACGTGCCAGCGAGGAGGTGGTGAAGAAGATGAAG AACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATCAC CCAGAGAAAGTTCGACAACCTGACCAAGGCCGAGAGAG GCGGCCTGAGCGAGCTGGACAAGGCCGGCTTCATCAAG AGACAGCTGGTGGAGACCAGACAGATCACCAAGCACGT GGCCCAGATCCTGGACAGCAGAATGAACACCAAGTACG ACGAGAACGACAAGCTGATCAGAGAGGTGAAGGTGATC ACCCTGAAGAGCAAGCTGGTGAGCGACTTCAGAAAGGA CTCCAGTTCTACAAGGTGAGAGAGATCAACAATAACCA CCACGCCCACGACGCCTACCTGAACGCCGTGGTGGGCAC CGCCCTGATCAAGAAGTACCCCAAGCTGGAGAGCGAGT </p>

TCGTGTACGGCGACTACAAGGTGTACGACGTGAGAAAG ATGATCGCCAAGAGCGAGCAGGAGATCGGCAAGGCCAC CGCCAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTCTT CAAGACCGAGATCACCTGGCCAACGGCGAGATCAGAA AGAGACCCCTGATCGAGACCAACGGCGAGACCGGCGAG ATCGTGTGGGACAAGGGCAGAGACTTCGCCACCGTGAG AAAGGTGCTGAGCATGCCCCAGGTGAACATCGTGAAGA AGACCGAGGTGCAGACCGGCGGCTTCAGCAAGGAGAGC ATCCTGCCCAAGAGAAACAGCGACAAGCTGATCGCCAG AAAGAAGGACTGGGACCCCAAGAAGTACGGCGGCTTCG ACAGCCCCACCGTGGCCTACAGCGTGTGGTGGTGGCCA AGGTGGAGAAGGGCAAGAGCAAGAAGCTGAAGAGCGT GAAGGAGCTGCTGGGCATCACCATCATGGAGAGAAGCA GCTTCGAGAAGAACCCCATCGACTTCCTGGAGGCCAAG GGCTACAAGGAGGTGAAGAAGGACCTGATCATCAAGCT GCCCAAGTACAGCCTGTTTCGAGCTGGAGAACGGCAGAA AGAGAATGCTGGCCAGCGCCGGCGAGCTGCAGAAGGGC AACGAGCTGGCCCTGCCAGCAAGTACGTGAACTTCCTG TACCTGGCCAGCCACTACGAGAAGCTGAAGGGCAGCCC CGAGGACAACGAGCAGAAGCAGCTGTTTCGTGGAGCAGC ACAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCAGC GAGTTCAGCAAGAGAGTGATCCTGGCCGACGCCAACCT GGACAAGGTGCTGAGCGCCTACAACAAGCACAGAGACA AGCCCATCAGAGAGCAGGCCGAGAACATCATCCACCTG TTCACCCTGACCAACCTGGGCGCCCCCGCCGCTTCAAG TACTTCGACACCACCATCGACAGAAAGAGATACACCAG CACCAAGGAGGTGCTGGACGCCACCCTGATCCACCAGA GCATCACCGGCCTGTACGAGACCAGAATCGACCTGAGC CAGCTGGGCGGCGACGGCGGCGGCAGCCCCAAGAAGAA GAGAAAGGTGTGACTAGCCATCACATTTAAAAGCATCTC AGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAGAAAATGAAGATCA ATAGCTTATTCATCTCTTTTCTTTTTCGTTGGTGTAAG CCAACACCCTGTCTAAAAAACATAAATTTCTTTAATCAT TTTGCCTCTTTTCTCTGTGCTTCAATTAATAAAAAATGGA AAGAACCTCGAG

<p>ОРС Cas9 с кодонами с минимальным содержанием уридина, редко используемым и у людей в целом; содержание U 12,75%</p>	<p>ATGGACAAAAAATACAGCATAGGGCTAGACATAGGGGAC GAACAGCGTAGGGTGGGCGGTAATAACGGACGAATACA AAGTACCGAGCAAAAAATTCAAAGTACTAGGGAACACG GACCGACACAGCATAAAAAAACCTAATAGGGGCGCT ACTATTCGACAGCGGGGAAACGGCGGAAGCGACGCGAC TAAAACGAACGGCGCGACGACGATAACGCGACGAAAA AACCGAATATGCTACCTACAAGAAATATTCAGCAACGA AATGGCGAAAGTAGACGACAGCTTCTTCCACCGACTAG AAGAAAGCTTCCTAGTAGAAGAAGACAAAAACACGAA CGACACCCGATATTCGGGAACATAGTAGACGAAGTAGC GTACCACGAAAAATACCCGACGATATACCACCTACGAA AAAAACTAGTAGACAGCACGGACAAAGCGGACCTACGA СТААТАТАССТАГСГСТАГСГСАСАТГАТААААТТССГА GGGCACTTCCTAATAGAAGGGGACCTAAACCCGGACAA CAGCGACGTAGACAAACTATTCATACAACCTAGTACAAA CGTACAACCAACTATTCGAAGAAAACCCGATAAACGCG AGCGGGGTAGACGCGAAAGCGATACTAAGCGCGCGACT AAGCAAAAGCCGACGACTAGAAAACCTAATAGCGCAAC TACCGGGGAAAAAAAACGGGCTATTCGGGAACCTA ATAGCGCTAAGCCTAGGGCTAACGCCGAACCTTCAAAAG СААСТТСГАССТАГСГСААГАССГСАААСТАСААСТАА GCAAAGACACGTACGACGACGACCTAGACAACCTACTA GCGCAAATAGGGGACCAATACGCGGACCTATTCCTAGC GGCGAAAAACCTAAGCGACGCGATACTACTAAGCGACA TACTACGAGTAAACACGGAATAACGAAAGCGCCGCTA AGCGCGAGCATGATAAACGATAACGACGAACACCACCA AGACCTAACGCTACTAAAAGCGCTAGTACGACAACAAC TACCGGAAAAATACAAAGAAATATTCTTCGACCAAAGC AAAAAACGGGTACGCGGGGTACATAGACGGGGGGGCGAG CCAAGAAGAATTCTACAAATTCATAAAACCGATACTAG AAAAAATGGACGGGACGGAAGAACTACTAGTAAACTA AACCGAGAAGACCTACTACGAAAACAACGAACGTTCGA CAACGGGAGCATACCGCACCAATACACCTAGGGGAAC TACACGCGATACTACGACGACAAGAAGACTTCTACCCGT TCCTAAAAGACAACCGAGAAAAAATAGAAAAATACTA</p>	<p>54</p>
--	--	-----------

ACGTTCCGAATACCGTACTACGTAGGGCCGCTAGCGCGA
GGGAACAGCCGATTCGCGTGGATGACGCGAAAAAGCGA
AGAAACGATAACGCCGTGGAACCTCGAAGAAGTAGTAG
ACAAAGGGGCGAGCGCGCAAAGCTTCATAGAACGAATG
ACGAACTTCGACAAAAACCTACCGAACGAAAAAGTACT
ACCGAAACACAGCCTACTATACGAATACTTCACGGTATA
CAACGAACTAACGAAAGTAAAATACGTAACGGAAGGGA
TGCGAAAAACCGCGTTCCTAAGCGGGGAACAAAAA
GCGATAGTAGACCTACTATTCAAACGAACCGAAAAGT
AACGGTAAAACACTAAAAGAAGACTACTTCAAAAAA
TAGAATGCTTCGACAGCGTAGAAATAAGCGGGGTAGAA
GACCGATTCAACGCGAGCCTAGGGACGTACCACGACCT
ACTAAAAATAATAAAAGACAAAGACTTCCTAGACAACG
AAGAAAACGAAGACATACTAGAAGACATAGTACTAACG
CTAACGCTATTGGAAGACCGAGAAATGATAGAAGAACG
ACTAAAAACGTACGCGCACCTATTCGACGACAAAGTAA
TGAAACAATAAAACGACGACGATACACGGGGTGGGGG
CGACTAAGCCGAAAATAATAAACGGGATACGAGACAA
ACAAAGCGGGAAAACGATACTAGACTTCCTAAAAGCG
ACGGGTTCGCGAACCGAACTTCATGCAACTAATACACG
ACGACAGCCTAACGTTCAAAGAAGACATACAAAAGCG
CAAGTAAGCGGGCAAGGGGACAGCCTACACGAACACAT
AGCGAACCTAGCGGGGAGCCCGCGATAAAAAAAGGGA
TACTACAAACGGTAAAAGTAGTAGACGAACTAGTAAAA
GTAATGGGGCGACACAAACCGAAAAACATAGTAATAGA
AATGGCGCGAGAAAACCAAACGACGAAAAAGGGCAA
AAAAACAGCCGAGAACGAATGAAACGAATAGAAGAAG
GGATAAAAGAACTAGGGAGCCAAATACTAAAAGAACAC
CCGGTAGAAAACACGCAACTACAAAACGAAAACTATA
CCTATACTACCTACAAAACGGGCGAGACATGTACGTAG
ACCAAGAACTAGACATAAACCGACTAAGCGACTACGAC
GTAGACCACATAGTACCGCAAAGCTTCCTAAAAGACGA
CAGCATAGACAACAAAGTACTAACGCGAAGCGACAAAA
ACCGAGGGAAAAGCGACAACGTACCGAGCGAAGAAGTA
GTAAAAAATGAAAACTACTGGCGACAATACTAAA

<p> CGCGAAACTAATAACGCAACGAAAATTCGACAACCTAA CGAAAGCGGAACGAGGGGGGCTAAGCGAACTAGACAA AGCGGGGTTTCATAAACGACAAGTAGTAGAAACGCGAC AAATAACGAAACACGTAGCGCAAATACTAGACAGCCGA ATGAACACGAAATACGACGAAAACGACAACTAATACG AGAAGTAAAAGTAATAACGCTAAAAAGCAAAGTAGTAA GCGACTTCCGAAAAGACTTCCAATTCTACAAAGTACGAG AAATAAACAACTACCACCACGCGCACGACGCGTACCTA AACGCGGTAGTAGGGACGGCGCTAATAAAAAAATACCC GAAACTAGAAAGCGAATTCGTATACGGGGACTACAAAG TATACGACGTACGAAAAATGATAGCGAAAAGCGAACAA GAAATAGGGAAAGCGACGGCGAAATACTTCTTCTACAG CAACATAATGAACTTCTTCAAACGGAAATAACGCTAGC GAACGGGGAAATACGAAAACGACCGCTAATAGAAACGA ACGGGGAAACGGGGGAAATAGTATGGGACAAAGGGCG AGACTTCGCGACGGTACGAAAAGTACTAAGCATGCCGC AAGTAAACATAGTAAAAAAACGGAAGTACAAACGGGG GGGTTTCAGCAAAGAAAGCATACTACCGAAACGAAACAG CGACAACTAATAGCGCGAAAAAAGACTGGGACCCGA AAAAATACGGGGGGTTCGACAGCCCGACGGTAGCGTAC AGCGTACTAGTAGTAGCGAAAAGTAGAAAAAGGGAAAAG CAAAAACTAAAAAGCGTAAAAGAACTACTAGGGATAA CGATAATGGAACGAAGCAGCTTCGAAAAAAACCCGATA GACTTCCTAGAAGCGAAAGGGTACAAAGAAGTAAAAAA AGACCTAATAATAAACTACCGAAATACAGCCTATTCGA ACTAGAAAACGGGCGAAAACGAATGCTAGCGAGCGCGG GGGAACTACAAAAGGGAACGAACTAGCGCTACCGAGC AAATACGTAACTTCCTATACCTAGCGAGCCACTACGAA AACTAAAAGGGAGCCCGGAAGACAACGAACAAAAAC AACTATTCGTAGAACAACACAAACTACCTAGACGAA ATAATAGAACAATAAGCGAATTCAGCAAACGAGTAAT ACTAGCGGACGCGAACCTAGACAAAGTACTAAGCGCGT ACAACAAACACCGAGACAAACCGATACGAGAACAAGCG GAAAACATAATACACCTATTCACGCTAACGAACCTAGG GGCGCCGGCGGCGTTCAAATACTTCGACACGACGATAG </p>

	ACCGAAAACGATACACGAGCACGAAAGAAGTACTAGAC GCGACGCTAATACACCAAAGCATAACGGGGCTATACGA AACGCGAATAGACCTAAGCCAAGGGGGGGACGGGG GGGGGAGCCCGAAAAAAAACGAAAAGTATGA	
Транскрипт Cas9 с 5'-НТО HSD, OPC, соответствую щая SEQ ID NO: 54, последователь ность Козак и 3'-ПТО ALB	GGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTTCGT GTGTGTGTCGTTGCAGGCCTTATTTCGGATCCGCCACCAT GGACAAAAAATACAGCATAGGGCTAGACATAGGGACGA ACAGCGTAGGGTGGGCGGTAATAACGGACGAATACAAA GTACCGAGCAAAAAATTCAAAGTACTAGGGAACACGGA CCGACACAGCATAAAAAAACCTAATAGGGGCGCTAC TATTCGACAGCGGGGAAACGGCGGAAGCGACGCGACTA AAACGAACGGCGCGACGACGATACACGCGACGAAAAAA CCGAATATGCTACCTACAAGAAATATTCAGCAACGAAAT GGCGAAAAGTAGACGACAGCTTCTCCACCGACTAGAAG AAAGCTTCCTAGTAGAAGAAGACAAAAAACACGAACGA CACCCGATATTCGGGAACATAGTAGACGAAGTAGCGTA CCACGAAAAATACCCGACGATATACCACCTACGAAAAA AACTAGTAGACAGCACGGACAAAAGCGGACCTACGACTA ATATACCTAGCGCTAGCGCACATGATAAAATTCCGAGGG CACTTCCTAATAGAAGGGGACCTAAACCCGGACAACAG CGACGTAGACAAACTATTCATACAACCTAGTACAAACGTA CAACCAACTATTCGAAGAAAACCCGATAAACGCGAGCG GGGTAGACGCGAAAGCGATACTAAGCGCGCGACTAAGC AAAAGCCGACGACTAGAAAACCTAATAGCGCAACTACC GGGGGAAAAAAAACGGGCTATTCGGGAACCTAATAG CGCTAAGCCTAGGGCTAACGCCGAACCTTCAAAGCAAC TTCGACCTAGCGGAAGACGCGAAACTACAACCTAAGCAA AGACACGTACGACGACGACCTAGACAACCTACTAGCGC AAATAGGGGACCAATACGCGGACCTATTCCTAGCGGCG AAAAACCTAAGCGACGCGATACTACTAAGCGACATACT ACGAGTAAACACGGAAATAACGAAAAGCGCCGCTAAGCG CGAGCATGATAAACGATACGACGAACACCACCAAGAC CTAACGCTACTAAAAGCGCTAGTACGACAACAACCTACC GGAAAAATACAAAGAAATATTCTTCGACCAAAGCAAAA ACGGGTACGCGGGGTACATAGACGGGGGGGCGAGCCAA	55

<p> GAAGAATTCTACAAATTCATAAAACCGATACTAGAAAA AATGGACGGGACGGAAGAACTACTAGTAAACTAAACC GAGAAGACCTACTACGAAAACAACGAACGTTTCGACAAC GGGAGCATAACCGCACCAAATACACCTAGGGGAACTACA CGCGATACTACGACGACAAGAAGACTTCTACCCGTTCT AAAAGACAACCGAGAAAAAATAGAAAAATACTAACGT TCCGAATACCGTACTACGTAGGGCCGCTAGCGCGAGGG AACAGCCGATTCGCGTGGATGACGCGAAAAAGCGAAGA AACGATAACGCCGTGGAACCTCGAAGAAGTAGTAGACA AAGGGGCGAGCGCGCAAAGCTTCATAGAACGAATGACG AACTTCGACAAAAACCTACCGAACGAAAAAGTACTACC GAAACACAGCCTACTATACGAATACTTCACGGTATACAA CGAACTAACGAAAGTAAAATACGTAACGGAAGGGATGC GAAAACCGGCGTTCCTAAGCGGGGAACAAAAAAGCG ATAGTAGACCTACTATTCAAACGAACCGAAAAGTAAC GGTAAACAACATAAAAGAAGACTACTTCAAAAAATAG AATGCTTCGACAGCGTAGAAATAAGCGGGGTAGAAGAC CGATTCAACGCGAGCCTAGGGACGTACCACGACCTACTA AAAATAATAAAAGACAAAGACTTCCTAGACAACGAAGA AAACGAAGACATACTAGAAGACATAGTACTAACGCTAA CGCTATTGAAAGACCGAGAAATGATAGAAGAACGACTA AAAACGTACGCGCACCTATTGACGACAAAGTAATGAA ACAACTAAAACGACGACGATACACGGGGTGGGGGCGAC TAAGCCGAAAACATAAAACGGGATACGAGACAAACAA AGCGGGAAAACGATACTAGACTTCCTAAAAAGCGACGG GTTGCGGAACCGAAACTTCATGCAACTAATACACGACGA CAGCCTAACGTTCAAAGAAGACATACAAAAAGCGCAAG TAAGCGGGCAAGGGGACAGCCTACACGAACACATAGCG AACCTAGCGGGGAGCCCGCGATAAAAAAGGGATACT ACAAACGGTAAAAGTAGTAGACGAACTAGTAAAAGTAA TGGGGCGACACAAACCGGAAAACATAGTAATAGAAATG GCGCGAGAAAACCAAACGACGCAAAAAGGGCAAAAAA ACAGCCGAGAACGAATGAAACGAATAGAAGAAGGGAT AAAAGAACTAGGGAGCCAAATACTAAAAGAACACCCGG TAGAAAACACGCAACTACAAAACGAAAACTATACCTA </p>

<p> TACTACCTACAAAACGGGCGAGACATGTACGTAGACCA AGA ACTAGACATAAACCGACTAAGCGACTACGACGTAG ACCACATAGTACCGCAAAGCTTCCTAAAAGACGACAGC ATAGACAACAAAGTACTAACGCGAAGCGACAAAAACCG AGGGAAAAGCGACAACGTACCGAGCGAAGAAGTAGTAA AAAAAATGAAAACTACTGGGCGACA ACTACTAAACGCG AAACTAATAACGCAACGAAAATTTCGACAACCTAACGAA AGCGGAACGAGGGGGGCTAAGCGAACTAGACAAAGCG GGGTTCATAAACGACA ACTAGTAGAAACGCGACAAAT AACGAAACACGTAGCGCAAATACTAGACAGCCGAATGA ACACGAAATACGACGAAAACGACA ACTAATACGAGAA GTA AAAGTAATAACGCTAAAAAGCAAACTAGTAAGCGA CTTCGAAAAGACTTCCAATTCTACAAAGTACGAGAAAT AAACA ACTACCACCACGCGCACGACGCGTACCTAAACG CGGTAGTAGGGACGGCGCTAATAAAAAAATACCCGAAA CTAGAAAGCGAATTCGTATACGGGGACTACAAAGTATA CGACGTACGAAAAATGATAGCGAAAAGCGAACAAGAAA TAGGGAAAGCGACGGCGAAATACTTCTTCTACAGCAAC ATAATGAACTTCTTCAAAACGGAAATAACGCTAGCGAA CGGGGAAATACGAAAACGACCGCTAATAGAAACGAACG GGGAAACGGGGGAAATAGTATGGGACAAAGGGCGAGA CTTCGCGACGGTACGAAAAGTACTAAGCATGCCGCAAG TAAACATAGTAAAAAAAACGGAAGTACAAACGGGGGGG TTCAGCAAAGAAAAGCATACTACCGAAACGAAACAGCGA CAA ACTAATAGCGCGAAAAAAGACTGGGACCCGAAAA AATACGGGGGGTTCGACAGCCCGACGGTAGCGTACAGC GTACTAGTAGTAGCGAAAGTAGAAAAAGGGAAAAGCAA AAA ACTAAAAAGCGTAAAAGA ACTACTAGGGATAACGA TAATGGAACGAAGCAGCTTCGAAAAAACC CGATAGAC TTCCTAGAAGCGAAAGGGTACAAAGAAGTAAAAAAGA CCTAATAATAAACTACCGAAATACAGCCTATTCGAACT AGAAAACGGGCGAAAACGAATGCTAGCGAGCGCGGGG GAACTACAAAAAGGGAACGAACTAGCGCTACCGAGCAA ATACGTAAACTTCCTATACCTAGCGAGCCACTACGAAAA ACTAAAAGGGAGCCCGGAAGACAACGAACAAAAACAA </p>

	<p>CTATTCGTAGAACAACAACAACACTACCTAGACGAAAT AATAGAACAATAAGCGAATTCAGCAAACGAGTAATAC TAGCGGACGCGAACCTAGACAAAGTACTAAGCGCGTAC AACAAACACCGAGACAAACCGATACGAGAACAAGCGGA AAACATAATACACCTATTCACGCTAACGAACCTAGGGGC GCCGGCGGGCTTCAAATACTTCGACACGACGATAGACC GAAAACGATACACGAGCACGAAAGAAGTACTAGACGCG ACGCTAATACACCAAAGCATAACGGGGCTATACGAAAC GCGAATAGACCTAAGCCAACCTAGGGGGGGACGGGGGG GGAGCCCGAAAAAAAACGAAAAGTATGACTAGCCATC ACATTTAAAAGCATCTCAGCCTACCATGAGAATAAGAG AAAGAAAATGAAGATCAATAGCTTATTCATCTCTTTTC TTTTTCGTTGGTGTAAGCCAACACCCTGTCTAAAAAAC ATAAATTTCTTAATCATTTTGCCTCTTTTCTCTGTGCTTC AATTAATAAAAAATGGAAAGAACCTCGAG</p>	
<p>Транскрипт Cas9 с AGG в качестве первых трех нуклеотидов для использовани я с CleanCap™, 5'-НТО HSD, ОРС, соответствую щая SEQ ID NO: 4, последователь ность Козак и 3'-НТО ALB</p>	<p>AGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCGT GTGTGTGTGCTTGCAGGCCTTATTCGGATCCGCCACCAT GGACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAA ACAGCGTCGGATGGGCAGTCATCACAGACGAATACAAG GTCCCGAGCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAAACACAGA CAGACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGC TGTTTCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACTG AAGAGAACAGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAAGA ACAGAATCTGCTACCTGCAGGAAATCTTCAGCAACGAA ATGGCAAAGGTCGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGA AGAAAGCTTCTGGTCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAA GACACCCGATCTTCGGAAACATCGTCGACGAAGTCGCAT ACCACGAAAAGTACCCGACAATCTACCACCTGAGAAAG AAGCTGGTCGACAGCACAGACAAGGCAGACCTGAGACT GATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCAAGTTCAGAGG ACAATTCCTGATCGAAGGAGACCTGAACCCGGACAACA GCGACGTCGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTCCAGACAT ACAACCAGCTGTTTCGAAGAAAACCCGATCAACGCAAGC GGAGTCGACGCAAAGGCAATCCTGAGCGCAAGACTGAG CAAGAGCAGAAGACTGGAAAACCTGATCGCACAGCTGC</p>	56

<p> CGGGAGAAAAGAAGAACGGACTGTTTCGGAAACCTGATC GCACTGAGCCTGGGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAA CTTCGACCTGGCAGAAGACGCAAAGCTGCAGCTGAGCA AGGACACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCA CAGATCGGAGACCAGTACGCAGACCTGTTCTGGCAGC AAAGAACCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCC TGAGAGTCAACACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGC GCAAGCATGATCAAGAGATACGACGAACACCACCAGGA CCTGACACTGCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCC GGAAAAGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGA ACGGATACGCAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAG GAAGAATTCTACAAGTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAA GATGGACGGAACAGAAGAAGCTGCTGGTCAAGCTGAACA GAGAAGACCTGCTGAGAAAGCAGAGAACATTCGACAAC GGAAGCATCCCGCACCAGATCCACCTGGGAGAACTGCA CGCAATCCTGAGAAGACAGGAAGACTTCTACCCGTTCT GAAGGACAACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGACAT TCAGAATCCCGTACTACGTCGGACCGCTGGCAAGAGGA AACAGCAGATTTCGCATGGATGACAAGAAAGAGCGAAGA ACAATCACACCGTGGAACCTCGAAGAAGTCGTGCGACA AGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAAGAAATGACA AACTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAAAGGTCTGCC GAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTACAGTCTACAA CGAACTGACAAAGGTCAAGTACGTACAGAAAGGAATGA GAAAGCCGGCATTCTGAGCGGAGAACAGAAAGGGA ATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTCAC AGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATCG AATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGAC AGATTCAACGCAAGCCTGGGAACATACCACGACCTGCT GAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCTGGACAACGAAG AAAACGAAGACATCCTGGAAGACATCGTCCTGACACTG ACACTGTTTCAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACT GAAGACATACGCACACCTGTTTCGACGACAAGGTCATGA AGCAGCTGAAGAGAAGAAGATACACAGGATGGGGAAG ACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGAATCAGAGACAAGC </p>

AGAGCGGAAAGACAATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGAC GGATTCGCAAACAGAACTTCATGCAGCTGATCCACGAC GACAGCCTGACATTCAAGGAAGACATCCAGAAGGCACA GGTCAGCGGACAGGGAGACAGCCTGCACGAACACATCG CAAACCTGGCAGGAAGCCCGCAATCAAGAAGGGAATC CTGCAGACAGTCAAGGTCGTCGACGAACTGGTCAAGGT CATGGGAAGACACAAGCCGAAAAACATCGTCATCGAAA TGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAA GAACAGCAGAGAAAGAATGAAGAGAATCGAAGAAGGA ATCAAGGAACTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCC GGTCGAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACC TGTACTIONCTGCAGAACGGAAGAGACATGTACGTCGAC CAGGAACTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGT CGACCACATCGTCCCGCAGAGCTTCCTGAAGGACGACA GCATCGACAACAAGGTCCTGACAAGAAGCGACAAGAAC AGAGGAAAGAGCGACAACGTCCCGAGCGAAGAAGTCGT CAAGAAGATGAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACG CAAAGCTGATCACACAGAGAAAGTTCGACAACCTGACA AAGGCAGAGAGAGGAGGACTGAGCGAACTGGACAAGG CAGGATTCATCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAGACAG ATCACAAAGCACGTCGCACAGATCCTGGACAGCAGAAT GAACACAAAAGTACGACGAAAACGACAAGCTGATCAGAG AAGTCAAGGTCATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGC GACTTCAGAAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTCAGAGA AATCAACAACCTACCACCACGCACACGACGCATACCTGA ACGCAGTCGTCGGAACAGCACTGATCAAGAAGTACCCG AAGCTGGAAAGCGAATTCGTCTACGGAGACTACAAGGT CTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAGAGCGAACAGG AAATCGGAAAGGCAACAGCAAAGTACTTCTTCTACAGC AACATCATGAACTTCTTCAAGACAGAAATCACACTGGCA AACGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAAA CGGAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAGGGAAGA GACTTCGCAACAGTCAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGCA GGTCAACATCGTCAAGAAGACAGAAGTCCAGACAGGAG GATTCAGCAAGGAAAGCATCCTGCCGAAGAGAAAACAGC

	<p>GACAAGCTGATCGCAAGAAAGAAGGACTGGGACCCGAA GAAGTACGGAGGATTCGACAGCCCCGACAGTCGCATACA GCGTCCTGGTCGTCGCAAAGGTCGAAAAGGGAAAAGAGC AAGAAGCTGAAGAGCGTCAAGGAACTGCTGGGAATCAC AATCATGGAAAAGAAGCAGCTTCGAAAAGAACCCGATCG ACTTCCTGGAAGCAAAGGGATACAAGGAAGTCAAGAAG GACCTGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCTGTTTCGAA CTGGAAAACGGAAGAAAGAGAATGCTGGCAAGCGCAGG AGAACTGCAGAAGGGAAACGAACTGGCACTGCCGAGCA AGTACGTCAACTTCCTGTACCTGGCAAGCCACTACGAAA AGCTGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCA GCTGTTTCGTCGAACAGCACAAGCACTACCTGGACGAAAT CATCGAACAGATCAGCGAATTCAGCAAGAGAGTCATCC TGGCAGACGCAAACCTGGACAAGGTCCTGAGCGCATA ACAAGCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAG AAAACATCATCCACCTGTTCACTGACAAACCTGGGAG CACCGGCAGCATTCAAGTACTTCGACACAACAATCGACA GAAAGAGATACACAAGCACAAAGGAAGTCCTGGACGCA ACACTGATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAAC AAGAATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAG GAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGTCTAGCTAGCCATC ACATTTAAAAGCATCTCAGCCTACCATGAGAATAAGAG AAAGAAAATGAAGATCAATAGCTTATTCATCTCTTTTC TTTTTCGTTGGTGTAAGCCAACACCCTGTCTAAAAAAC ATAAATTTCTTTAATCATTTTGCCTCTTTCTCTGTGCTTC AATTAATAAAAAATGGAAAGAACCTCGAG</p>	
<p>Транскрипт Cas9 с 5'-НТО от CMV, ОРС, соответствую щая SEQ ID NO: 4, последователь ность Козак и 3'-НТО ALB</p>	<p>GGGCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGAC CTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGCGG CCGGGAACGGTGCATTGGAACGCGGATTCCTCCGTGCCA AGAGTGACTCACCGTCCTTGACACGGCCACCATGGACAA GAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAAACAGCG TCGGATGGGCAGTCATCACAGACGAATACAAGGTCCC AGCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAAACACAGACAGACA CAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTTCG ACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACTGAAGAG</p>	57

AACAGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAAGAACAGA ATCTGCTACCTGCAGGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCA AAGGTCGACGACAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAAAG CTTCCTGGTCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACC CGATCTTCGGAAACATCGTCGACGAAGTCGCATACCACG AAAAGTACCCGACAATCTACCACCTGAGAAAGAAGCTG GTCGACAGCACAGACAAGGCAGACCTGAGACTGATCTA CCTGGCACTGGCACACATGATCAAGTTCAGAGGACACTT CCTGATCGAAGGAGACCTGAACCCGGACAACAGCGACG TCGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTCCAGACATAACAAC AGCTGTTTCGAAGAAAACCCGATCAACGCAAGCGGAGTC GACGCAAAGGCAATCCTGAGCGCAAGACTGAGCAAGAG CAGAAGACTGGAAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAG AAAAGAAGAACGGACTGTTTCGGAAAACCTGATCGCACTG AGCCTGGGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTTCGA CCTGGCAGAAGACGCAAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACA CATACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCACAGATC GGAGACCAGTACGCAGACCTGTTCTGGCAGCAAAGAA CCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGT CAACACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCA TGATCAAGAGATACGACGAACACCACCAGGACCTGACA CTGCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGAAAA GTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGAT ACGCAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAA TTCTACAAGTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGAC GGAACAGAAGAAGCTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGA CCTGCTGAGAAAGCAGAGAACATTCGACAACGGAAGCA TCCCGCACAGATCCACCTGGGAGAAGTGCACGCAATCC TGAGAAGACAGGAAGACTTCTACCCGTTCTGAAGGAC AACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGACATTCAGAAT CCCGTACTACGTCGGACCGCTGGCAAGAGGAAAACAGCA GATTCGCATGGATGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAATC ACACCGTGGAAGTTCGAAGAAGTCGTCGACAAGGGAGC AAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGAATGACAAACTTCG ACAAGAACCTGCCGAACGAAAAGGTCCTGCCGAAGCAC

AGCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTCTACAACGAACTG ACAAAGGTCAAGTACGTACAGAAAGGAATGAGAAAGCC GGCATTCTGAGCGGAGAACAGAAAGGCAATCGTCC ACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTCACAGTCAAG CAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATCGAATGCTT CGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGATTCA ACGCAAGCCTGGGAACATACCACGACCTGCTGAAGATC ATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAAGAAAACGA AGACATCCTGGAAGACATCGTCCTGACACTGACACTGTT CGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACAT ACGCACACCTGTTCGACGACAAGGTCATGAAGCAGCTG AAGAGAAGAAGATACACAGGATGGGGAAGACTGAGCA GAAAGCTGATCAACGGAATCAGAGACAAGCAGAGCGGA AAGACAATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGACGGATTTCG AAACAGAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCC TGACATTCAAGGAAGACATCCAGAAGGCACAGGTCAGC GGACAGGGAGACAGCCTGCACGAACACATCGCAAACCT GGCAGGAAGCCCGCAATCAAGAAGGGAATCCTGCAGA CAGTCAAGGTCTGTCGACGAACTGGTCAAGGTCATGGGA AGACACAAGCCGAAAACATCGTCATCGAAATGGCAAG AGAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGC AGAGAAAAGAAATGAAGAGAATCGAAGAAGGAATCAAG AACTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTTCGAA AACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGTACTA CCTGCAGAACGGAAGAGACATGTACGTCGACCAGGAAC TGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGACCAC ATCGTCCCGCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGAC AACAAGGTCCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAA AGAGCGACAACGTCCCGAGCGAAGAAGTCGTCAAGAAG ATGAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAAGCT GATCACACAGAGAAAGTTCGACAACCTGACAAAAGGCAG AGAGAGGAGGACTGAGCGAACTGGACAAGGCAGGATTC ATCAAGAGACAGCTGGTTCGAAACAAGACAGATCACAAA GCACGTCGCACAGATCCTGGACAGCAGAATGAACACAA AGTACGACGAAAACGACAAGCTGATCAGAGAAGTCAAG
--

<p> GTCATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGCGACTTCAG AAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTCAGAGAAATCAACA ACTACCACCACGCACACGACGCATACCTGAACGCAGTC GTCGGAACAGCACTGATCAAGAAGTACCCGAAGCTGGA AAGCGAATTCGTCTACGGAGACTACAAGGTCTACGACGT CAGAAAGATGATCGCAAAGAGCGAACAGGAAATCGGAA AGGCAACAGCAAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGA ACTTCTTCAAGACAGAAATCACACTGGCAAACGGAGAA ATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAAACGGAGAAAC AGGAGAAATCGTCTGGGACAAGGGAAGAGACTTCGCAA CAGTCAGAAAGGTCTGAGCATGCCGCAGGTCAACATC GTCAAGAAGACAGAAGTCCAGACAGGAGGATTCAGCAA GGAAAGCATCCTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCTGA TCGCAAGAAAGAAGGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGA GGATTCGACAGCCCGACAGTCGCATACAGCGTCTGGTC GTCGCAAAGGTTCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTGA AGAGCGTCAAGGAACTGCTGGGAATCACAATCATGGAA AGAAGCAGCTTCGAAAAGAACCCGATCGACTTCTGGA AGCAAAGGGATACAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCA TCAAGCTGCCGAAGTACAGCCTGTTCGAACTGGAAAAC GGAAGAAAGAGAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAAGTCA GAAGGGAAACGAACTGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCA ACTTCTGTACCTGGCAAGCCACTACGAAAAGCTGAAGG GAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCAGCTGTTCTGTC GAACAGCACAAAGCACTACCTGGACGAAATCATCGAACA GATCAGCGAATTCAGCAAGAGAGTCATCCTGGCAGACG CAAACCTGGACAAGGTCCTGAGCGCATACAACAAGCAC AGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGAAAACATCAT CCACCTGTTCACTGACAAACCTGGGAGCACCGGCAGC ATTCAAGTACTTCGACACAACAATCGACAGAAAGAGAT ACACAAGCACAAAGGAAGTCTGGACGCAACACTGATC CACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAACAAGAATCGA CCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGA AGAAGAAGAGAAAGGTCTAGCTAGCCATCACATTTAAA AGCATCTCAGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAGAAAAT </p>
--

	<p>GAAGATCAATAGCTTATTCATCTCTTTTTCTTTTTTCGTTG GTGTAAAGCCAACACCCCTGTCTAAAAAACATAAATTTCT TTAATCATTTTGCCTCTTTTCTCTGTGCTTCAATTAATAA AAAATGGAAAGAACCTCGAG</p>	
<p>Транскрипт Cas9 с 5'-НТО от НВВ, ОРС, соответствую щая SEQ ID NO: 4, последователь ность Козак и 3'-НТО НВВ</p>	<p>GGGacatttgcttctgacacaactgtgttactagcaacctcaacagacaccggatctgcc accATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGA ACAAACAGCGTCCGATGGGCAGTCATCACAGACGAATA CAAGGTCCCAGCAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAAACA CAGACAGACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCA CTGCTGTTTCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAG ACTGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGA AAGAACAGAATCTGCTACCTGCAGGAAATCTTCAGCAA CGAAATGGCAAAGGTCGACGACAGCTTCTTCCACAGACT GGAAGAAAGCTTCCTGGTTCGAAGAAGACAAGAAGCACG AAAGACACCCGATCTTCGGAAACATCGTCGACGAAGTC GCATACCACGAAAAGTACCCGACAATCTACCACCTGAG AAAGAAGCTGGTCGACAGCACAGACAAGGCAGACCTGA GACTGATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCAAGTTCA GAGGACACTTCCTGATCGAAGGAGACCTGAACCCGGAC AACAGCGACGTCGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTCCAG ACATACAACCAGCTGTTTCGAAGAAAACCCGATCAACGC AAGCGGAGTCGACGCAAAGGCAATCCTGAGCGCAAGAC TGAGCAAGAGCAGAAGACTGGAAAACCTGATCGCACAG CTGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACTGTTTCGGAAACCT GATCGCACTGAGCCTGGGACTGACACCGAACTTCAAGA GCAACTTCGACCTGGCAGAAGACGCAAAGCTGCAGCTG AGCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCT GGCACAGATCGGAGACCAGTACGCAGACCTGTTCTCTGG CAGCAAAGAACCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGAC ATCCTGAGAGTCAACACAGAAATCACAAAGGCACCGCT GAGCGCAAGCATGATCAAGAGATACGACGAACACCACC AGGACCTGACACTGCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAG CTGCCGAAAAGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAG CAAGAACGGATACGCAGGATACATCGACGGAGGAGCAA GCCAGGAAGAATTCTACAAGTTCATCAAGCCGATCCTGG</p>	<p>58</p>

AAAAGATGGACGGAACAGAAGAACTGCTGGTCAAGCTG AACAGAGAAGACCTGCTGAGAAAGCAGAGAACATTCGA CAACGGAAGCATCCCGCACCAGATCCACCTGGGAGAAC TGCACGCAATCCTGAGAAGACAGGAAGACTTCTACCCGT TCCTGAAGGACAACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTG ACATTCAGAATCCCGTACTACGTCGGACCGCTGGCAAGA GGAAACAGCAGATTTCGCATGGATGACAAGAAAGAGCGA AGAAACAATCACACCGTGGAACTTCGAAGAAGTCGTCG ACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGAATG ACAAACTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAAAGTCCCT GCCGAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTCTA CAACGAACTGACAAAGGTCAAGTACGTACAGAAGGAA TGAGAAAGCCGGCATTTCCTGAGCGGAGAACAGAAGAAG GCAATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGT CACAGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGA TCGAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAA GACAGATTCAACGCAAGCCTGGGAACATAACCACGACCT GCTGAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAACG AAGAAAACGAAGACATCCTGGAAGACATCGTCCTGACA CTGACACTGTTCGAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAG ACTGAAGACATACGCACACCTGTTTCGACGACAAGGTCAT GAAGCAGCTGAAGAGAAGAAGATACACAGGATGGGGA AGACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGAATCAGAGACAA GCAGAGCGGAAAGACAATCCTGGACTTCCTGAAGAGCG ACGGATTCGCAAACAGAACTTCATGCAGCTGATCCACG ACGACAGCCTGACATTCAAGGAAGACATCCAGAAGGCA CAGGTCAGCGGACAGGGAGACAGCCTGCACGAACACAT CGCAAACCTGGCAGGAAGCCCGCAATCAAGAAGGGAA TCCTGCAGACAGTCAAGGTCGTCGACGAACTGGTCAAG GTCATGGGAAGACACAAGCCGAAAACATCGTCATCGA AATGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAG AAGAACAGCAGAGAAAGAATGAAGAGAATCGAAGAAG GAATCAAGGAACTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACAC CCGGTCGAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTA CCTGTACTACCTGCAGAACGGAAGAGACATGTACGTCG
--

<p> ACCAGGAACTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGAC GTCGACCACATCGTCCCGCAGAGCTTCCTGAAGGACGAC AGCATCGACAACAAGGTCCTGACAAGAAGCGACAAGAA CAGAGGAAAAGAGCGACAACGTCCCGAGCGAAGAAGTCG TCAAGAAGATGAAGA ACTACTGGAGACAGCTGCTGAAC GCAAAGCTGATCACACAGAGAAAAGTTCGACAACCTGAC AAAGGCAGAGAGAGGAGGACTGAGCGAACTGGACAAG GCAGGATTCATCAAGAGACAGCTGGTCGAAAACAAGACA GATCACAAAGCACGTCGCACAGATCCTGGACAGCAGAA TGAACACAAAAGTACGACGAAAACGACAAGCTGATCAGA GAAGTCAAGGTCATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAG CGACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTCAGAGA AATCAACA ACTACCACCACGCACACGACGCATACCTGA ACGCAGTCGTCGGAACAGCACTGATCAAGAAGTACCCG AAGCTGGAAAGCGAATTCGTCTACGGAGACTACAAGGT CTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAGAGCGAACAGG AAATCGGAAAGGCAACAGCAAAGTACTTCTTCTACAGC AACATCATGAACTTCTTCAAGACAGAAATCACACTGGCA AACGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAAA CGGAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAGGGAAGA GACTTCGCAACAGTCAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGCA GGTCAACATCGTCAAGAAGACAGAAGTCCAGACAGGAG GATTCAGCAAGGAAAGCATCCTGCCGAAGAGAAACAGC GACAAGCTGATCGCAAGAAAGAAGGACTGGGACCCGAA GAAGTACGGAGGATTCGACAGCCCGACAGTCGCATACA GCGTCCTGGTCGTCGCAAAGGTCGAAAAGGGAAAAGAGC AAGAAGCTGAAGAGCGTCAAGGAACTGCTGGGAATCAC AATCATGGAAAGAAGCAGCTTCGAAAAGAACCCGATCG ACTTCCTGGAAGCAAAGGGATACAAGGAAGTCAAGAAG GACCTGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCTGTTCGAA CTGGAAAACGGAAAGAAAGAGAATGCTGGCAAGCGCAGG AGAACTGCAGAAGGGAAACGAACTGGCACTGCCGAGCA AGTACGTCAACTTCTGTACCTGGCAAGCCACTACGAAA AGCTGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAAGCA GCTGTTTCGTGCAACAGCACAAAGCACTACCTGGACGAAAT </p>

	<p>CATCGAACAGATCAGCGAATTCAGCAAGAGAGTCATCC TGGCAGACGCAAACCTGGACAAGGTCCTGAGCGCATA ACAAGCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAG AAAACATCATCCACCTGTTCACTGACAAAACCTGGGAG CACCGGCAGCATTCAAGTACTTCGACACAACAATCGACA GAAAGAGATACACAAGCACAAAGGAAGTCCTGGACGCA ACACTGATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAAC AAGAATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAG GAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGTCTAGctagcctcgtttct tgctgtccaatttctattaaggttcctttgtccctaagtccaactactaaactggggatattatg aaggccttgagcatctggattctgcctaataaaaaacatttatttcattgcctcgag</p>	
<p>Транскрипт Cas9 с 5'-НТО от XBG, ОРС, соответствую щая SEQ ID NO: 4, последователь ность Козак и 3'-НТО XBG</p>	<p>GGGaaagtcagaataaacgctcaactttggccgatctgccacCATGGACAAGA AGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAAACAGCGTC GGATGGGCAGTCATCACAGACGAATACAAGGTCCCAG CAAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAAACACAGACAGACACA GCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTTCGAC AGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACTGAAGAGAA CAGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAAGAACAGAAT CTGCTACCTGCAGGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAA AGGTCGACGACAGCTTCTCCACAGACTGGAAGAAAGC TTCCTGGTTCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCC GATCTTCGGAAACATCGTTCGACGAAGTCGCATACCACGA AAAGTACCCGACAATCTACCACCTGAGAAAGAAGCTGG TCGACAGCACAGACAAGGCAGACCTGAGACTGATCTAC CTGGCACTGGCACACATGATCAAGTTCAGAGGACACTTC CTGATCGAAGGAGACCTGAACCCGGACAACAGCGACGT CGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTCCAGACATACAACCA GCTGTTTCGAAGAAAACCCGATCAACGCAAGCGGAGTCG ACGCAAAGGCAATCCTGAGCGCAAGACTGAGCAAGAGC AGAAGACTGGAAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGA AAAGAAGAACGGACTGTTTCGGAAACCTGATCGCACTGA GCCTGGGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTTCGACC TGGCAGAAGACGCAAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACA TACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCACAGATCGG AGACCAGTACGCAGACCTGTTCTGGCAGCAAAGAACC</p>	<p>59</p>

<p> TGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCA ACACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATG ATCAAGAGATACGACGAACACCACCAGGACCTGACACT GCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGAAAAGT ACAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGATAC GCAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAATT CTACAAGTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACG GAACAGAAGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGAC CTGCTGAGAAAAGCAGAGAACATTCGACAACGGAAGCAT CCCGCACCGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCT GAGAAGACAGGAAGACTTCTACCCGTTCTGAAGGACA ACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGACATTCAGAATC CCGTACTACGTCCGACCGCTGGCAAGAGGAAACAGCAG ATTCGCATGGATGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAATCA CACCGTGGAACCTCGAAGAAGTCGTCGACAAGGGAGCA AGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGAATGACAAACTTCGA CAAGAACCTGCCGAACGAAAAGGTCCTGCCGAAGCACA GCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTCTACAACGAACTGA CAAAGGTCAAGTACGTACAGAAAGGAATGAGAAAGCCG GCATTCCTGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAATCGTCGA CCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTCACAGTCAAGC AGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATCGAATGCTTC GACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGATTCAA CGCAAGCCTGGGAACATACCACGACCTGCTGAAGATCA TCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAAGAAAACGAA GACATCCTGGAAGACATCGTCCTGACACTGACACTGTTT GAAGACAGAGAAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATA CGCACACCTGTTTCGACGACAAGGTCATGAAGCAGCTGA AGAGAAGAAGATACACAGGATGGGGAAGACTGAGCAG AAAGCTGATCAACGGAATCAGAGACAAGCAGAGCGGAA AGACAATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGACGGATTCGCA AACAGAAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCT GACATTCAAGGAAGACATCCAGAAGGCACAGGTCAGCG GACAGGGAGACAGCCTGCACGAACACATCGCAAACCTG GCAGGAAGCCCGCAATCAAGAAGGGAATCCTGCAGAC </p>

AGTCAAGGTCGTCGACGAACTGGTCAAGGTCATGGGAA GACACAAGCCGAAAACATCGTCATCGAAATGGCAAGA GAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCA GAGAAAGAATGAAGAGAATCGAAGAAGGAATCAAGGA ACTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCGAAA ACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGTACTAC CTGCAGAACGGAAGAGACATGTACGTCGACCAGGAACT GGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGACCACA TCGTCCCGCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACA ACAAGGTCCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAA GAGCGACAACGTCCCGAGCGAAGAAGTCGTCAAGAAGA TGAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAAGCTG ATCACACAGAGAAAGTTCGACAACCTGACAAAGGCAGA GAGAGGAGGACTGAGCGAACTGGACAAGGCAGGATTCA TCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAGACAGATCACAAAG CACGTGCGACAGATCCTGGACAGCAGAATGAACACAAA GTACGACGAAAACGACAAGCTGATCAGAGAAGTCAAGG TCATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGCGACTTCAGA AAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTCAGAGAAATCAACAA CTACCACCACGCACACGACGCATACCTGAACGCAGTCGT CGGAACAGCACTGATCAAGAAGTACCCGAAGCTGGAAA GCGAATTCGTCTACGGAGACTACAAGGTCTACGACGTCA GAAAGATGATCGCAAAGAGCGAACAGGAAATCGGAAA GGCAACAGCAAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAA CTTCTTCAAGACAGAAATCACACTGGCAAACGGAGAAA TCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAAACGGAGAAACA GGAGAAATCGTCTGGGACAAGGGAAAGAGACTTCGCAAC AGTCAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGCAGGTCAACATCG TCAAGAAGACAGAAGTCCAGACAGGAGGATTCAGCAAG GAAAGCATCCTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCTGAT CGCAAGAAAGAAGGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGA GGATTCGACAGCCCGACAGTCGCATACAGCGTCCTGGTC GTCGCAAAGGTCGAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTGA AGAGCGTCAAGGAACTGCTGGGAATCACAATCATGGAA AGAAGCAGCTTCGAAAAGAACCCGATCGACTTCTGGA
--

	AGCAAAGGGATACAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCA TCAAGCTGCCGAAGTACAGCCTGTTTGAAGTGGAAAAC GGAAGAAAGAGAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAACTGCA GAAGGGAAACGAAGTGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCA ACTTCCTGTACCTGGCAAGCCACTACGAAAAGCTGAAGG GAAGCCCCGAAGACAACGAACAGAAGCAGCTGTTTCGTC GAACAGCACAAAGCACTACCTGGACGAAATCATCGAAC GATCAGCGAATTCAGCAAGAGAGTCATCCTGGCAGACG CAAACCTGGACAAGTCTGAGCGCATAACAACAGCAC AGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGAAAACATCAT CCACCTGTTACACTGACAAACCTGGGAGCACCAGGACG ATTCAAGTACTTCGACACAACAATCGACAGAAAGAGAT ACACAAGCACAAAGGAAGTCTGGACGCAACACTGATC CACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAACAAGAATCGA CCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGA AGAAGAAGAGAAAGGTCTAGctagcaccagcctcaagaacaccgaat ggagtcttaagctacataataccaacttacactttacaaaatgttgccccaaaatgtagecat tcgtatctgctcctaataaaaagaagtttcttcacattctctcgag	
Транскрипт Cas9 с AGG в качестве первых трех нуклеотидов для использовани я с CleanCap™, 5'-НТО от ХВГ, ОРС, соответствую щая SEQ ID NO: 4, последователь ность Козак и 3'-НТО ХВГ	AGGaagctcagaataaacgctcaacttggccggatctgccacCATGGACAAGA AGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAAACAGCGTC GGATGGGCAGTCATCACAGACGAATACAAGGTCCCGAG CAAGAAGTTCAAGTCTGGGAAACACAGACAGACACA GCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGCTGTTTCGAC AGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACTGAAGAGAA CAGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAAGAACAGAAT CTGCTACCTGCAGGAAATCTTCAGCAACGAAATGGCAA AGGTCGACGACAGCTTCTCCACAGACTGGAAGAAAGC TTCCTGGTCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCC GATCTTCGGAACATCGTTCGACGAAGTCGCATACCACGA AAAGTACCCGACAATCTACCACCTGAGAAAGAAGCTGG TCGACAGCACAGACAAGGCAGACCTGAGACTGATCTAC CTGGCACTGGCACACATGATCAAGTTCAGAGGACACTTC CTGATCGAAGGAGACCTGAACCCGGACAACAGCGACGT CGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTCCAGACATACAACCA GCTGTTTCGAAGAAAACCCGATCAACGCAAGCGGAGTCG	60

ACGCAAAGGCAATCCTGAGCGCAAGACTGAGCAAGAGC
 AGAAGACTGGAAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGA
 AAAGAAGAACGGACTGTTCGGAAAACCTGATCGCACTGA
 GCCTGGGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAACTTCGACC
 TGGCAGAAGACGCAAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACA
 TACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCACAGATCGG
 AGACCAGTACGCAGACCTGTTCCCTGGCAGCAAAGAACC
 TGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCA
 ACACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCAAGCATG
 ATCAAGAGATACGACGAACACCACCAGGACCTGACACT
 GCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCCGGAAAAGT
 ACAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGATAC
 GCAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAATT
 CTACAAGTTCATCAAGCCGATCCTGGAAAAGATGGACG
 GAACAGAAGAAGCTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAGAC
 CTGCTGAGAAAAGCAGAGAACATTCGACAACGGAAGCAT
 CCCGCACCAGATCCACCTGGGAGAACTGCACGCAATCCT
 GAGAAGACAGGAAGACTTCTACCCGTTCTGAAGGACA
 ACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGACATTCAGAATC
 CCGTACTACGTCCGACCGCTGGCAAGAGGAAAACAGCAG
 ATTCGCATGGATGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAATCA
 CACCGTGAACTTCGAAGAAGTCGTCGACAAGGGAGCA
 AGCGCACAGAGCTTCATCGAAAGAATGACAAACTTCGA
 CAAGAACCTGCCGAACGAAAAGGTCCTGCCGAAGCACA
 GCCTGCTGTACGAATACTTCACAGTCTACAACGAACTGA
 CAAAGGTCAAGTACGTCACAGAAGGAATGAGAAAGCCG
 GCATTCCTGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAATCGTCGA
 CCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTCACAGTCAAGC
 AGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATCGAATGCTTC
 GACAGCGTCGAAATCAGCGGAGTCGAAGACAGATTCAA
 CGCAAGCCTGGGAACATACCACGACCTGCTGAAGATCA
 TCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAAGAAAACGAA
 GACATCCTGGAAGACATCGTCCTGACACTGACACTGTTC
 GAAGACAGAGAAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATA
 CGCACACCTGTTTCGACGACAAGGTCATGAAGCAGCTGA

AGAGAAGAAGATACACAGGATGGGGAAGACTGAGCAG
 AAAGCTGATCAACGGAATCAGAGACAAGCAGAGCGGAA
 AGACAATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGACGGATTCGCA
 AACAGAACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACAGCCT
 GACATTCAAGGAAGACATCCAGAAGGCACAGGTCAGCG
 GACAGGGAGACAGCCTGCACGAACACATCGCAAACCTG
 GCAGGAAGCCCGCAATCAAGAAGGGAATCCTGCAGAC
 AGTCAAGGTCGTGACGAAGTGGTCAAGGTCATGGGAA
 GACACAAGCCGAAAACATCGTCATCGAAATGGCAAGA
 GAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCA
 GAGAAAGAATGAAGAGAATCGAAGAAGGAATCAAGGA
 ACTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTCGAAA
 ACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACCTGTACTAC
 CTGCAGAACGGAAGAGACATGTACGTCGACCAGGAACT
 GGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGTCGACCACA
 TCGTCCCGCAGAGCTTCCTGAAGGACGACAGCATCGACA
 ACAAGGTCCTGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAA
 GAGCGACAACGTCCCGAGCGAAGAAGTCGTCGAAGAAGA
 TGAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACGCAAAGCTG
 ATCACACAGAGAAAGTTCGACAACCTGACAAAGGCAGA
 GAGAGGAGGACTGAGCGAACTGGACAAGGCAGGATTCA
 TCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAGACAGATCACAAG
 CACGTCGCACAGATCCTGGACAGCAGAATGAACACAAA
 GTACGACGAAAACGACAAGCTGATCAGAGAAGTCAAGG
 TCATCACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGCGACTTCAGA
 AAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTCAGAGAAATCAACAA
 CTACCACCACGCACACGACGCATACCTGAACGCAGTCGT
 CGGAACAGCACTGATCAAGAAGTACCCGAAGCTGGAAA
 GCGAATTCGTCTACGGAGACTACAAGGTCTACGACGTCA
 GAAAGATGATCGCAAAGAGCGAACAGGAAATCGGAAA
 GGCAACAGCAAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAA
 CTTCTTCAAGACAGAAATCACACTGGCAAACGGAGAAA
 TCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAAACGGAGAAACA
 GGAGAAATCGTCTGGGACAAGGGAAAGAGACTTCGCAAC
 AGTCAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGACGGTCAACATCG

	<p>TCAAGAAGACAGAAGTCCAGACAGGAGGATTCAGCAAG GAAAGCATCCTGCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCTGAT CGCAAGAAAGAAGGACTGGGACCCGAAGAAGTACGGA GGATTCGACAGCCCGACAGTCGCATACAGCGTCTGGTC GTCGCAAAGGTCGAAAAGGGAAAAGAGCAAGAAGCTGA AGAGCGTCAAGGAACTGCTGGGAATCACAATCATGGAA AGAAGCAGCTTCGAAAAGAACCCGATCGACTTCCTGGA AGCAAAGGGATACAAGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCA TCAAGCTGCCGAAGTACAGCCTGTTGAACTGGAAAAC GGAAGAAAGAGAATGCTGGCAAGCGCAGGAGAAGCTGCA GAAGGGAAACGAACTGGCACTGCCGAGCAAGTACGTCA ACTTCCTGTACCTGGCAAGCCACTACGAAAAGCTGAAGG GAAGCCCGAAGACAACGAACAGAAGCAGCTGTTTCGTC GAACAGCACAAAGCACTACCTGGACGAAATCATCGAACA GATCAGCGAATTCAGCAAGAGAGTCATCCTGGCAGACG CAAACCTGGACAAGTCTGAGCGCATACAACAAGCAC AGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAGAAAACATCAT CCACCTGTTCACTGACAAACCTGGGAGCACCGGCAGC ATCAAGTACTTCGACACAACAATCGACAGAAAGAGAT ACACAAGCACAAAGGAAGTCCTGGACGCAACACTGATC CACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAACAAGAATCGA CCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGA AGAAGAAGAGAAAGGTCTAGctagcaccagcctcaagaacaccgaat ggagtcttaagctacataataccaacttacacttacaaaaatgtgtccccaaaatgtagecat tcgtatctgctcctaataaaaaagaagttcttcacattctctcgag</p>	
<p>Транскрипт Cas9 с AGG в качестве первых трех нуклеотидов для использовани я с CleanCap™, 5'-НТО от</p>	<p>AGGTCCCGCAGTCGGCGTCCAGCGGCTCTGCTTGTTCGT GTGTGTGTCGTTGCAGGCCTTATTCGGATCCGCCACCAT GGACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAACAA ACAGCGTCGGATGGGCAGTCATCACAGACGAATACAAG GTCCCGAGCAAGAAGTTCAAGTCTGGGAAACACAGA CAGACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCGGAGCACTGC TGTTTCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACTG AAGAGAACAGCAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAAGA ACAGAATCTGCTACCTGCAGGAAATCTTCAGCAACGAA ATGGCAAAGGTCGACGACAGCTTCTCCACAGACTGGA</p>	61

HSD, OPC, соответствую щая SEQ ID NO: 4, последователь ность Козак и 3'-НТО ALB	AGAAAGCTTCCTGGTCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAA GACACCCGATCTTCGGAACATCGTCGACGAAGTCGCAT ACCACGAAAAGTACCCGACAATCTACCACCTGAGAAAAG AAGCTGGTCGACAGCACAGACAAGGCAGACCTGAGACT GATCTACCTGGCACTGGCACACATGATCAAGTTCAGAGG ACACTTCCTGATCGAAGGAGACCTGAACCCGGACAACA GCGACGTCGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTCCAGACAT ACAACCAGCTGTTTCGAAGAAAACCCGATCAACGCAAGC GGAGTCGACGCAAAGGCAATCCTGAGCGCAAGACTGAG CAAGAGCAGAAGACTGGAAAACCTGATCGCACAGCTGC CGGGAGAAAAGAAGAACGGACTGTTTCGGAAACCTGATC GCACTGAGCCTGGGACTGACACCGAACTTCAAGAGCAA CTTCGACCTGGCAGAAGACGCAAAGCTGCAGCTGAGCA AGGACACATACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCA CAGATCGGAGACCAGTACGCAGACCTGTTCTTGGCAGC AAAGAACCTGAGCGACGCAATCCTGCTGAGCGACATCC TGAGAGTCAACACAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGC GCAAGCATGATCAAGAGATACGACGAACACCACCAGGA CCTGACACTGCTGAAGGCACTGGTCAGACAGCAGCTGCC GGAAAAGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGA ACGGATACGCAGGATACATCGACGGAGGAGCAAGCCAG GAAGAATTCTACAAGTTCATCAAGCCGATCCTGGAAA GATGGACGGAACAGAAGAACTGCTGGTCAAGCTGAACA GAGAAGACCTGCTGAGAAAAGCAGAGAACATTCGACAAC GGAAGCATCCCGCACCAGATCCACCTGGGAGAACTGCA CGCAATCCTGAGAAGACAGGAAGACTTCTACCCGTTCT GAAGGACAACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGACAT TCAGAATCCCGTACTACGTCGGACCGCTGGCAAGAGGA AACAGCAGATTTCGCATGGATGACAAGAAAGAGCGAAGA ACAATCACACCGTGGAACCTCGAAGAAGTCGTGACA AGGGAGCAAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAAAGATGACA AACTTCGACAAGAACCTGCCGAACGAAAAGGTCTGCC GAAGCACAGCCTGCTGTACGAATACTTACAGTCTACAA CGAACTGACAAAAGGTCAAGTACGTACAGAAAGGAATGA GAAAGCCGGCATTCTGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCA
--	--

<p> ATCGTCGACCTGCTGTTCAAGACAAACAGAAAGGTCAC AGTCAAGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAGATCG AATGCTTCGACAGCGTTCGAAAATCAGCGGAGTCAAGAC AGATTCAACGCAAGCCTGGGAACATAACCACGACCTGCT GAAGATCATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAACGAAG AAAACGAAGACATCCTGGAAGACATCGTCCTGACTG ACACTGTTTCAAGACAGAGAAATGATCGAAGAAAGACT GAAGACATACGCACACCTGTTTCGACGACAAGGTCATGA AGCAGCTGAAGAGAAGAAGATACACAGGATGGGGAAG ACTGAGCAGAAAGCTGATCAACGGAATCAGAGACAAGC AGAGCGGAAAGACAATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGAC GGATTCGCAAACAGAACTTCATGCAGCTGATCCACGAC GACAGCCTGACATTCAAGGAAGACATCCAGAAGGCACA GGTCAGCGGACAGGGAGACAGCCTGCACGAACACATCG CAAACCTGGCAGGAAGCCCGCAATCAAGAAGGGAATC CTGCAGACAGTCAAGGTCGTCGACGAACTGGTCAAGGT CATGGGAAGACACAAGCCGAAAACATCGTCATCGAAA TGGCAAGAGAAAACCAGACAACACAGAAGGGACAGAA GAACAGCAGAGAAAGAATGAAGAGAATCGAAGAAGGA ATCAAGGAACTGGGAAGCCAGATCCTGAAGGAACACCC GGTCGAAAACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGTACC TGTACTIONTGCAGAACGGAAGAGACATGTACGTCGAC CAGGAACTGGACATCAACAGACTGAGCGACTACGACGT CGACCACATCGTCCCGCAGAGCTTCCTGAAGGACGACA GCATCGACAACAAGGTCCTGACAAGAAGCGACAAGAAC AGAGGAAAGAGCGACAACGTCCCGAGCGAAGAAGTCGT CAAGAAGATGAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACG CAAAGCTGATCACACAGAGAAAGTTCGACAACCTGACA AAGGCAGAGAGAGGAGGACTGAGCGAACTGGACAAGG CAGGATTCATCAAGAGACAGCTGGTCGAAACAAGACAG ATCACAAAGCACGTCGCACAGATCCTGGACAGCAGAAT GAACACAAAGTACGACGAAAACGACAAGCTGATCAGAG AAGTCAAGGTCATCACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGC GACTTCAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTCAGAGA AATCAACAACCTACCACCACGCACACGACGCATACCTGA </p>

ACGCAGTCGTCGGAACAGCACTGATCAAGAAGTACCCG AAGCTGGAAAGCGAATTCGTCTACGGAGACTACAAGGT CTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAAAGAGCGAACAGG AAATCGGAAAGGCAACAGCAAAGTACTTCTTCTACAGC AACATCATGAACTTCTTCAAGACAGAAATCACACTGGCA AACGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGATCGAAACAAA CGGAGAAACAGGAGAAATCGTCTGGGACAAGGGAAGA GACTTCGCAACAGTCAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGCA GGTCAACATCGTCAAGAAGACAGAAGTCCAGACAGGAG GATTCAGCAAGGAAAGCATCCTGCCGAAGAGAAAACAGC GACAAGCTGATCGCAAGAAAGAAGGACTGGGACCCGAA GAAGTACGGAGGATTCGACAGCCCGACAGTCGCATACA GCGTCCTGGTCGTCGCAAAGGTCGAAAAGGGAAAGAGC AAGAAGCTGAAGAGCGTCAAGGAACTGCTGGGAATCAC AATCATGGAAAGAAGCAGCTTCGAAAAGAACCCGATCG ACTTCCTGGAAGCAAAGGGATACAAGGAAGTCAAGAAG GACCTGATCATCAAGCTGCCGAAGTACAGCCTGTTCGAA CTGGAAAACGGAAGAAAGAGAATGCTGGCAAGCGCAGG AGAACTGCAGAAGGGAAACGAACTGGCACTGCCGAGCA AGTACGTCAACTTCCTGTACCTGGCAAGCCACTACGAAA AGCTGAAGGGAAGCCCGAAGACAACGAACAGAAGCA GCTGTTTCGTCGAACAGCACAAGCACTACCTGGACGAAAT CATCGAACAGATCAGCGAATTCAGCAAGAGAGTCATCC TGGCAGACGCAAACCTGGACAAGGTCCTGAGCGCATA ACAAGCACAGAGACAAGCCGATCAGAGAACAGGCAG AAAACATCATCCACCTGTTCACTGACAAACCTGGGAG CACCGGCAGCATTCAAGTACTTCGACACAACAATCGACA GAAAGAGATACACAAGCACAAGGAAGTCCTGGACGCA ACACTGATCCACCAGAGCATCACAGGACTGTACGAAAC AAGAATCGACCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAG GAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAAGGTCTAGCTAGCCATC ACATTTAAAAGCATCTCAGCCTACCATGAGAATAAGAG AAAGAAAATGAAGATCAATAGCTTATTCATCTCTTTTC TTTTTCGTTGGTGTAAGCCAACACCCTGTCTAAAAAAC ATAAATTTCTTAATCATTTTGCCTCTTTTCTCTGTGCTTC
--

	AATTAATAAAAAATGGAAAGAACCTCGAG	
30/30/39 последовательность поли-А	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCGAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACCGAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	62
последовательность поли-А 100	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	63
Гидовая РНК G209	mC*mC*mA*GUCCAGCGAGGCAAAGGGUUUUAGAGCUA GAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA CUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCmU*mU*mU*U	64
ОРС, кодирующая Cas9 Neisseria meningitidis	ATGGCAGCATTCAAGCCGAACCTCGATCAACTACATCCTG GGACTGGACATCGGAATCGCATCGGTCGGATGGGCAAT GGTCGAAATCGACGAAGAAGAAAACCCGATCAGACTGA TCGACCTGGGAGTCAGAGTCTTCGAAAGAGCAGAAGTC CCGAAGACAGGAGACTCGCTGGCAATGGCAAGAAGACT GGCAAGATCGGTCAGAAGACTGACAAGAAGAAGAGCAC ACAGACTGCTGAGAACAAAGAAAGACTGCTGAAGAGAGAA GGAGTCCTGCAGGCAGCAAACCTTCGACGAAAACGGACT GATCAAGTCGCTGCCGAACACACCCGTGGCAGCTGAGAG CAGCAGCACTGGACAGAAAGCTGACACCGCTGGAATGG TCGGCAGTCCTGCTGCACCTGATCAAGCACAGAGGATAC CTGTTCGAGAGAAAGAACGAAGGAGAAACAGCAGACA AGGAACTGGGAGCACTGCTGAAGGGAGTCGCAGGAAAC GCACACGCACTGCAGACAGGAGACTTCAGAACACCGGC AGAAGTGGCACTGAACAAGTTCGAAAAGGAATCGGGAC ACATCAGAAACCAGAGATCGGACTACTCGCACACATTCT CGAGAAAAGGACCTGCAGGCAGAACTGATCCTGCTGTTC GAAAAGCAGAAGGAATTCGGAAACCCGCACGTCTCGGG AGGACTGAAGGAAGGAATCGAAACACTGCTGATGACAC AGAGACCGCACTGTCGGGAGACGCAGTCCAGAAGATG CTGGGACACTGCACATTCGAACCGGCAGAACCGAAGGC AGCAAAGAACACATACACAGCAGAAAGATTCATCTGGC TGACAAAGCTGAACAACCTGAGAATCCTGGAACAGGGA TCGGAAAAGACCGCTGACAGACACAGAAAGAGCAACT GATGGACGAACCGTACAGAAAGTGAAGCTGACATACG	65

<p> CACAGGCAAGAAAGCTGCTGGGACTGGAAGACACAGCA TTCTTCAAGGGACTGAGATACGGAAAGGACAACGCAGA AGCATCGACACTGATGGAAATGAAGGCATACCACGCAA TCTCGAGAGCACTGGAAAAGGAAGGACTGAAGGACAAG AAGTCGCCGCTGAACCTGTCGCCGGAAGTGCAGGACGA AATCGGAACAGCATTCTCGCTGTTCAAGACAGACGAAG ACATCACAGGAAGACTGAAGGACAGAATCCAGCCGGAA ATCCTGGAAGCACTGCTGAAGCACATCTCGTTCGACAAG TTCGTCCAGATCTCGCTGAAGGCACTGAGAAGAATCGTC CCGCTGATGGAACAGGGAAAGAGATACGACGAAGCATG CGCAGAAATCTACGGAGACCACTACGGAAAGAAGAACA CAGAAGAAAAGATCTACCTGCCGCCGATCCCGGCAGAC GAAATCAGAAACCCGGTCTCCTGAGAGCACTGTCGCA GGCAAGAAAGGTCATCAACGGAGTCGTCAGAAGATACG GATCGCCGGCAAGAATCCACATCGAAACAGCAAGAGAA GTCGGAAAGTCGTTCAAGGACAGAAAGGAAATCGAAAA GAGACAGGAAGAAAACAGAAAGGACAGAGAAAAGGCA GCAGCAAAGTTCAGAGAATACTTCCCGAACTTCGTCCGA GAACCGAAGTCGAAGGACATCCTGAAGCTGAGACTGTA CGAACAGCAGCACGGAAAGTGCCTGTACTCGGGAAAGG AAATCAACCTGGGAAGACTGAACGAAAAGGATACGTC GAAATCGACCACGCACTGCCGTTCTCGAGAACATGGGA CGACTCGTTCAACAACAAGGTCCTGGTCTGGGATCGGA AAACCAGAAACAAGGGAAACCAGACACCGTACGAATACT TCAACGGAAAGGACAACCTCGAGAGAATGGCAGGAATTC AAGGCAAGAGTCGAAACATCGAGATTCCCGAGATCGAA GAAGCAGAGAATCCTGCTGCAGAAGTTCGACGAAGACG GATTCAAGGAAAGAAACCTGAACGACACAAGATACGTC AACAGATTCCTGTGCCAGTTCGTTCGACAGACAGAATGAGA CTGACAGGAAAGGGAAAGAAGAGAGTCTTCGCATCGAA CGGACAGATCACAACCTGCTGAGAGGATTCTGGGGAC TGAGAAAGGTCAGAGCAGAAAACGACAGACACCACGCA CTGGACGCAGTCGTTCGTCATGCTCGACAGTCGCAATG CAGCAGAAGATCACAAGATTCGTTCAGATACAAGGAAAT GAACGCATTTCGACGGAAAGACAATCGACAAGGAAACAG </p>

	<p>GAGAAGTCCTGCACCAGAAGACACACTTCCCGCAGCCG TGGGAATTCTTCGCACAGGAAGTCATGATCAGAGTCTTC GGAAAGCCGGACGGAAAGCCGGAATTCGAAGAAGCAG ACACACTGGAAAAGCTGAGAACACTGCTGGCAGAAAAG CTGTCGTCGAGACCGGAAGCAGTCCACGAATACGTCAC ACCGCTGTTCGTCTCGAGAGCACCGAACAGAAAGATGTC GGGACAGGGACACATGGAAACAGTCAAGTCGGCAAAGA GACTGGACGAAGGAGTCTCGGTCCTGAGAGTCCCCTG ACACAGCTGAAGCTGAAGGACCTGGAAAAGATGGTCAA CAGAGAAAAGAGAACCGAAGCTGTACGAAGCACTGAAGG CAAGACTGGAAGCACACAAGGACGACCCGGCAAAGGCA TTCGCAGAACCGTTCTACAAGTACGACAAGGCAGGAAA CAGAACACAGCAGGTCAAGGCAGTCAGAGTCGAACAGG TCCAGAAGACAGGAGTCTGGGTCAGAAACCACAACGGA ATCGCAGACAACGCAACAATGGTCAGAGTAGACGTCTT CGAAAAGGGAGACAAGTACTACCTGGTCCCCTGATCTACTC GTGGCAGGTTCGCAAAGGGAATCCTGCCGGACAGAGCAG TCGTCCAGGGAAAGGACGAAGAAGACTGGCAGCTGATC GACGACTCGTTCAACTTCAAGTTCTCGCTGCACCCGAAC GACCTGGTCGAAGTCATCACAAGAAGGCAAGAATGTT CGGATACTTCGCATCGTGCCACAGAGGAACAGGAAACA TCAACATCAGAATCCACGACCTGGACCACAAGATCGGA AAGAACGGAATCCTGGAAGGAATCGGAGTCAAGACAGC ACTGTCTGTTCCAGAAGTACCAGATCGACGAACTGGGAA AGGAAATCAGACCGTGCAGACTGAAGAAGAGACCGCCG GTCAGATCCGGAAAGAGAACAGCAGACGGATCGGAATT CGAATCGCCGAAGAAGAAGAGAAAGGTCGAATGA</p>	
<p>ОПС, кодирующая Cas9 Neisseria meningitidis (без старт- или стоп-кодонов; подходит для включения в</p>	<p>GCAGCATTCAAGCCGAACCTCGATCAACTACATCCTGGGA CTGGACATCGGAATCGCATCGGTCGGATGGGCAATGGTC GAAATCGACGAAGAAGAAAACCCGATCAGACTGATCGA CCTGGGAGTCAGAGTCTTCGAAAGAGCAGAAGTCCCGA AGACAGGAGACTCGCTGGCAATGGCAAGAAGACTGGCA AGATCGGTCAGAAGACTGACAAGAAGAAGAGCACACAG ACTGCTGAGAACAAGAAGACTGCTGAAGAGAGAAGGAG TCCTGCAGGCAGCAAACCTCGACGAAAACGGACTGATC</p>	<p>66</p>

<p>последовательность, кодирующую слитый белок)</p>	<p>AAGTCGCTGCCGAACACACCCGTGGCAGCTGAGAGCAGC AGCACTGGACAGAAAGCTGACACCCGCTGGAATGGTTCGG CAGTCCTGCTGCACCTGATCAAGCACAGAGGATACCTGT CGCAGAGAAAGAACGAAGGAGAAACAGCAGACAAGGA ACTGGGAGCACTGCTGAAGGGAGTCGCAGGAAACGCAC ACGCACTGCAGACAGGAGACTTCAGAACACCCGGCAGAA CTGGCACTGAACAAGTTCGAAAAGGAATCGGGACACAT CAGAAACCAGAGATCGGACTACTCGCACACATTCTCGA GAAAGGACCTGCAGGCAGAACTGATCCTGCTGTTTCGAA AAGCAGAAAGGAATTCGGAAACCCGCACGTCTCGGGAGG ACTGAAGGAAGGAATCGAAACACTGCTGATGACACAGA GACCGGCACTGTCGGGAGACGCAGTCCAGAAGATGCTG GGCACTGCACATTTCGAACCGGCAGAACCGAAGGCAGC AAAGAACACATACACAGCAGAAAGATTTCATCTGGCTGA CAAAGCTGAACAACCTGAGAATCCTGGAACAGGGATCG GAAAGACCGCTGACAGACACAGAAAGAGCAAACTGAT GGACGAACCGTACAGAAAGTCGAAGCTGACATACGCAC AGGCAAGAAAGCTGCTGGGACTGGAAGACACAGCATTCT TTCAAGGGACTGAGATACGGAAAGGACAACGCAGAAGC ATCGCACTGATGGAAATGAAGGCATACCACGCAATCT CGAGAGCACTGGAAAAGGAAGGACTGAAGGACAAGAA GTCGCCGCTGAACCTGTCGCCGGAAGTGCAGGACGAAA TCGGAACAGCATTCTCGCTGTTCAAGACAGACGAAGAC ATCACAGGAAGACTGAAGGACAGAATCCAGCCGGAAT CCTGGAAGCACTGCTGAAGCACATCTCGTTCGACAAGTT CGTCCAGATCTCGCTGAAGGCACTGAGAAGAATCGTCCC GCTGATGGAACAGGGAAAGAGATACGACGAAGCATGCG CAGAAATCTACGGAGACCACTACGGAAAGAAGAACA GAAGAAAAGATCTACCTGCCGCCGATCCCGGCAGACGA AATCAGAAACCCGGTCGTCCTGAGAGCACTGTCGCAGG CAAGAAAGGTCATCAACGGAGTCGTCAGAAGATACGGA TCGCCGGCAAGAATCCACATCGAAACAGCAAGAGAAGT CGGAAAGTCGTTCAAGGACAGAAAGGAAATCGAAAAGA GACAGGAAGAAAACAGAAAGGACAGAGAAAAGGCAGC AGCAAAGTTCAGAGAATACTCCCGAACTTCGTCGGAGA</p>
--	--

ACCGAAGTCGAAGGACATCCTGAAGCTGAGACTGTACG AACAGCAGCACGGAAAGTGCCTGTACTCGGGAAAGGAA ATCAACCTGGGAAGACTGAACGAAAAGGGATACGTCGA AATCGACCACGCACTGCCGTTCTCGAGAACATGGGACG ACTCGTTCAACAACAAGGTCTGGTCTGGGATCGGAAA ACCAGAACAAGGGAAACCAGACACCGTACGAATACTTC AACGGAAAGGACAACCTCGAGAGAATGGCAGGAATTC GGCAAGAGTCGAAACATCGAGATTCCCGAGATCGAAGA AGCAGAGAATCCTGCTGCAGAAGTTCGACGAAGACGGA TTCAAGGAAAGAAACCTGAACGACACAAGATACGTCAA CAGATTCCTGTGCCAGTTCGTGCGCAGACAGAATGAGACT GACAGGAAAAGGGAAAGAAGAGAGTCTTCGCATCGAACG GACAGATCACAACCTGCTGAGAGGATTCTGGGGACTG AGAAAGGTCAGAGCAGAAAACGACAGACACCACGCACT GGACGCAGTCGTGTCGCATGCTCGACAGTCGCAATGCA GCAGAAGATCACAAGATTCGTGATACAAGGAAATGA ACGCATTCGACGGAAAGACAATCGACAAGGAAACAGGA GAAGTCCTGCACCAGAAGACACACTTCCCGCAGCCGTG GGAATTCTTCGCACAGGAAAGTCATGATCAGAGTCTTCGG AAAGCCGGACGGAAAGCCGGAATTCGAAGAAGCAGACA CACTGGAAAAGCTGAGAACACTGCTGGCAGAAAAGCTG TCGTCGAGACCGGAAGCAGTCCACGAATACGTACACC GCTGTTCTGTCGAGAGCACCGAACAGAAAGATGTCCG GACAGGGACACATGGAAACAGTCAAGTCGGCAAAGAGA CTGGACGAAGGAGTCTCGGTCCTGAGAGTCCCGCTGACA CAGCTGAAGCTGAAGGACCTGGAAAAGATGGTCAACAG AGAAAGAGAACCGAAGCTGTACGAAGCACTGAAGGCAA GACTGGAAGCACACAAGGACGACCCGGCAAAGGCATTC GCAGAACCGTTCTACAAGTACGACAAGGCAGGAAACAG AACACAGCAGGTCAAGGCAGTCAGAGTCGAACAGGTCC AGAAGACAGGAGTCTGGGTGAGAAACCACAACGGAATC GCAGACAACGCAACAATGGTCAGAGTAGACGTCTTCGA AAAGGGAGACAAGTACTACCTGGTCCCGATCTACTCGTG GCAGGTGCGAAAGGGAATCCTGCCGGACAGAGCAGTCG TCCAGGGAAAGGACGAAGAAGACTGGCAGCTGATCGAC
--

	<p>GACTCGTTCAACTTCAAGTTCTCGCTGCACCCGAACGAC CTGGTCTGAAGTCATCACAAAGAAGGCAAGAATGTTTCGG ATACTTCGCATCGTGCCACAGAGGAACAGGAAACATCA ACATCAGAATCCACGACCTGGACCACAAGATCGGAAAG AACGGAATCCTGGAAGGAATCGGAGTCAAGACAGCACT GTCGTTCCAGAAGTACCAGATCGACGAACTGGGAAAGG AAATCAGACCGTGCAGACTGAAGAAGAGACCGCCGGTC AGATCCGGAAAGAGAACAGCAGACGGATCGGAATTCGA ATCGCCGAAGAAGAAGAGAAAGGTTCGAA</p>	
<p>Транскрипт, содержащий SEQ ID NO: 65 (кодирующую Cas9 Neisseria meningitidis)</p>	<p>GGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTTAAACTTAAGCTTGG ATCCGCCACCATGGCAGCATTCAAGCCGAACCTCGATCAA CTACATCCTGGGACTGGACATCGGAATCGCATCGGTCGG ATGGGCAATGGTTCGAAATCGACGAAGAAGAAAACCCGA TCAGACTGATCGACCTGGGAGTCAGAGTCTTCGAAAGA GCAGAAGTCCCGAAGACAGGAGACTCGCTGGCAATGGC AAGAAGACTGGCAAGATCGGTCAGAAGACTGACAAGAA GAAGAGCACACAGACTGCTGAGAACAAGAAGACTGCTG AAGAGAGAAGGAGTCCTGCAGGCAGCAAACCTTCGACGA AAACGGACTGATCAAGTCGCTGCCGAACACACCGTGGC AGCTGAGAGCAGCAGCACTGGACAGAAAGCTGACACCG CTGGAATGGTCGGCAGTCCCTGCTGCACCTGATCAAGCAC AGAGGATACCTGTTCGAGAGAAAGAACGAAGGAGAAAC AGCAGACAAGGAACTGGGAGCACTGCTGAAGGGAGTCG CAGGAAACGCACACGCACTGCAGACAGGAGACTTCAGA ACACCCGGCAGAAGTGGCACTGAACAAGTTTCGAAAAGGA ATCGGGACACATCAGAAACCAGAGATCGGACTACTTCGC ACACATTCTCGAGAAAGGACCTGCAGGCAGAACTGATC CTGCTGTTTCGAAAAGCAGAAGGAATTCGGAACCCGCA CGTCTCGGGAGGACTGAAGGAAGGAATCGAAACACTGC TGATGACACAGAGACCGGCACTGTCGGGAGACGCAGTC CAGAAGATGCTGGGACACTGCACATTCGAACCCGGCAGA ACCGAAGGCAGCAAAGAACACATACACAGCAGAAAGAT TCATCTGGCTGACAAAGCTGAACAACCTGAGAATCCTGG AACAGGGATCGGAAAGACCGCTGACAGACACAGAAAGA GCAAACTGATGGACGAACCGTACAGAAAGTTCGAAGCT</p>	<p>67</p>

<p> GACATACGCACAGGCAAGAAAGCTGCTGGGACTGGAAG ACACAGCATTCTTCAAGGGACTGAGATACGGAAAGGAC AACGCAGAAGCATCGACACTGATGGAAATGAAGGCATA CCACGCAATCTCGAGAGCACTGGAAAAGGAAGGACTGA AGGACAAGAAGTCGCCGCTGAACCTGTGCCGGAATG CAGGACGAAATCGGAACAGCATTCTCGCTGTTCAAGAC AGACGAAGACATCACAGGAAGACTGAAGGACAGAATCC AGCCGGAATCCTGGAAGCACTGCTGAAGCACATCTCGT TCGACAAGTTCGTCCAGATCTCGCTGAAGGCACTGAGAA GAATCGTCCCGCTGATGGAACAGGGAAAGAGATACGAC GAAGCATGCGCAGAAATCTACGGAGACCACTACGGAAA GAAGAACACAGAAGAAAAGATCTACCTGCCCGGATCC CGGCAGACGAAATCAGAAACCCGGTCGTCTGAGAGCA CTGTGCGCAGGCAAGAAAGGTCATCAACGGAGTCGTGAG AAGATACGGATCGCCGCAAGAATCCACATCGAAACAG CAAGAGAAGTCGGAAAGTCGTTCAAGGACAGAAAGGAA ATCGAAAAGAGACAGGAAGAAAACAGAAAGGACAGAG AAAAGGCAGCAGCAAAGTTCAGAGAATACTTCCCGAAC TTCGTCCGGAACCGAAGTCGAAGGACATCCTGAAGCT GAGACTGTACGAACAGCAGCACGGAAAGTGCCTGTACT CGGGAAAGGAAATCAACCTGGGAAGACTGAACGAAAAG GGATACGTGAAATCGACCACGCACTGCCGTTCTCGAGA ACATGGGACGACTCGTTCAACAACAAGGTCCTGGTCCTG GGATCGGAAAACAGAAACAAGGGAAACAGACACCGTA CGAATACTTCAACGGAAAGGACAACCTCGAGAGAATGGC AGGAATTCAAGGCAAGAGTCGAAACATCGAGATTCCCG AGATCGAAGAAGCAGAGAATCCTGCTGCAGAAGTTCGA CGAAGACGGATTCAAGGAAAGAAACCTGAACGACACAA GATACGTCAACAGATTCTGTGCCAGTTCGTGCGCAGACA GAATGAGACTGACAGGAAAGGGAAAGAAGAGAGTCTTC GCATCGAACGGACAGATCACAAACCTGCTGAGAGGATT CTGGGGACTGAGAAAGGTCAGAGCAGAAAACGACAGAC ACCACGCACTGGACGCAGTCGTGTCGTCATGCTCGACAG TCGCAATGCAGCAGAAGATCACAAAGATTCGTGAGATAC AAGGAAATGAACGCATTTCGACGGAAAGACAATCGACAA </p>

GGAAACAGGAGAAGTCCTGCACCAGAAGACACACTTCC CGCAGCCGTGGGAATTCTTCGCACAGGAAGTCATGATCA GAGTCTTCGGAAAGCCGGACGGAAAGCCGGAATTCGAA GAAGCAGACACACTGGAAAAGCTGAGAACACTGCTGGC AGAAAAGCTGTCGTCGAGACCGGAAGCAGTCCACGAAT ACGTCACACCGCTGTTTCGTCTCGAGAGCACCGAACAGAA AGATGTCCGGACAGGGACACATGGAAACAGTCAAGTCCG GCAAAGAGACTGGACGAAGGAGTCTCGGTCTGAGAGT CCCGCTGACACAGCTGAAGCTGAAGGACCTGGAAAAGA TGGTCAACAGAGAAAGAGAACCGAAGCTGTACGAAGCA CTGAAGGCAAGACTGGAAGCACACAAGGACGACCCGGC AAAGGCATTTCGAGAACC GTTCTACAAGTACGACAAGG CAGGAAACAGAACACAGCAGGTCAAGGCAGTCAGAGTC GAACAGGTCCAGAAGACAGGAGTCTGGGTCCAGAAACCA CAACGGAATCGCAGACAACGCAACAATGGTCAGAGTAG ACGTCTTCGAAAAGGGAGACAAGTACTACCTGGTCCCG ATCTACTCGTGGCAGGTTCGAAAAGGGAATCCTGCCGGAC AGAGCAGTCGTCCAGGGAAAGGACGAAGAAGACTGGCA GCTGATCGACGACTCGTTCAACTTCAAGTTCTCGCTGCA CCCGAACGACCTGGTTCGAAGTCATCACAAAGAAGGCAA GAATGTTCCGATACTTCGCATCGTGCCACAGAGGAACAG GAAACATCAACATCAGAATCCACGACCTGGACCACAAG ATCGGAAAGAACGGAATCCTGGAAGGAATCGGAGTCAA GACAGCACTGTCGTTCCAGAAGTACCAGATCGACGAACT GGGAAAGGAAATCAGACCGTGCAGACTGAAGAAGAGAC CGCCGGTCAGATCCGGAAAGAGAACAGCAGACGGATCG GAATTCGAATCGCCGAAAGAAGAAGAGAAAGGTCGAATG ATAGCTAGCTCGAGTCTAGAGGGCCCGTTTAAACCCGCT GATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTG TTGTTTGGCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGG TGCCACTCCCCTGTCCTTTCCTAATAAAAATGAGGAAAT TGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGG GGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGG GAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTC TATGG
--

<p>Аминокислотная последовательность Cas9 Neisseria meningitidis</p>	<p>MAAFKPNSINYILGLDIGIASVWAMVEIDEEENPIRLIDLG VRVFERAEVPKTGDSLAMARRLARSVRRRLTRRRRAHRLRLT RRLKREGVLQAANFDENGLIKSLPNTPWQLRAAALDRKL TPLEWSAVLLHLIKHRGYLSQRKNEGETADKELGALLKGV AGNAHALQTGDFRTPAELALNKFEKESGHIRNQRSDYSHT FSRKDLQAEILLFEKQKEFGNPHVSGGLKEGIETLLMTQR PALSGDAVQKMLGHCTFEPAEPKAAKNTYTAERFIWLTKL NNLRILEQGSERPLDTERATLMDEPYRKSCLTYAQARKLL GLEDTAFFKGLRYGKDNAEASTLMEMKAYHAISRALEKE GLKDKKSPLNLSPELQDEIGTAFSLFKTDEDITGRLKDRIQP EILEALLKHISFDKQVQISLQALRRIVPLMEQGKRYDEACAE IYGDHYGKKNTEEKIYLPPIPADEIRNPVLRALSQARKVIN GVVRRYGGSPARIHIETAREVGKSFKDRKEIEKRQEENRKDR EKAAAKFREYFPNFVGEPEKSKDILKRLRYEQHGKCLYSG KEINLGRLENEKGYVEIDHALPFSRTWDDSFNNKVLVLGSE NQNKGNQTPYEYFNGKDNSREWQEFKARVETSFRPFRSKK QRILLQKFDGDFKERNLNDTRYVNRFLCQFVADRMRLTG KGKKRVFASNGQITNLLRGFWGLRKYVRAENDRHHALDAV VVACSTVAMQQKITRFVRYKEMNAFDGKTIDKETGEVLH QKTHFPQPWEFFAQEVMIRVFGKPDGKPEFEEADTLEKLRT LLAEKLSRPEAVHEYVTPLFVSRAPNRKMSGQGHMETVK SAKRLDEGVSVLRVPLTQLKLDLEKMNREREPPLYEAL KARLEAHKDDPAKAFAPFYKYDKAGNRTQQVKAVRVEQ VQKTGVVVRNHNHGIADNATMVRVDVFEKGDKYYLVPIYS WQVAKGILPDRAVVQKDEEDWQLIDDSFNFKFSLHPNDL VEVITKKARMFYGFASCHRGTGNINIRIHDLCHKIGKNGILE GIGVKTALSFKYQIDELGKEIRPCRLKKRPPVRSKGRTAD GSEFESPKKKRKE</p>	<p>68</p>
<p>Гидовая РНК G390</p>	<p>mG*mC*mC*GAGUCUGGAGAGCUGCAGUUUAGAmGmC mUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*m U*mU*mU</p>	<p>69</p>
<p>Гидовая РНК G502</p>	<p>mA*mC*mA*CAAAUACCAGUCCAGCGUUUUAGAmGmC mUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCU</p>	<p>70</p>

	AGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*m U*mU*mU	
Гидовая РНК G509	mA*mA*mA*GUUCUAGAUGCCGUCCGGUUUUAGAmGmC mUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*m U*mU*mU	71
Гидовая РНК G534	mA*mC*mG*CAAAUAUCAGUCCAGCGUUUUAGAmGmC mUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*m U*mU*mU	72

* = связь PS; 'm' = 2'-O-Ме нуклеотид.

Последовательности праймеров для NGS G000282 мыши.

Прямой праймер:

CACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGTTTTGTTCCAGAGTCTATCACCG

Обратный праймер:

GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTACACGAATAAGAGCAAATGGGAAC

Последовательности праймеров для NGS G000390 крысы

Прямой праймер:

CACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTGCATTTTCATGAGACCGAAAACA

Обратный праймер:

GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGCTACAGTAGAGCTGTACATAAAACTT

Последовательность GFP:

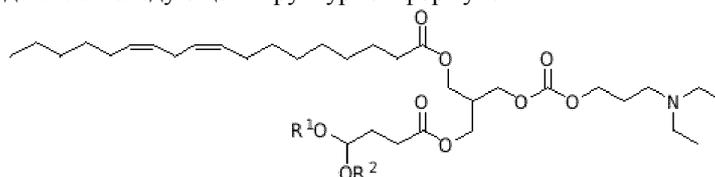
TCGCGCGTTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGA
GACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCG
CGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGGGGCTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAG
ATTGTAAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAG
AAAATACCGCATCAGGCGCCATTCGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGC
GATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCA
AGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAACGAC
GGCCAGTGAATTCTAATACGACTCACTATAGGGTCCCGAGTCGGCGTCCAGCGGCT
CTGCTTGTTCGTGTGTGTCGTTGCAGGCCTTATTCGGATCCATGGTGAGCAAGGG
CGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAA
ACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAG
CTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCCTGCCCTGGCCACCCTC
GTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAG

CAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATC
TTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGA
CACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACA
TCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCC
GACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACCTCAAGATCCGCCACAACATCGAGG
ACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGGCAGCGG
CCCGTGTCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGA
CCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCCGCCCGCGGA
TCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAATAGGAATTATGCAGTCTAGCCATCA
CATTTAAAAGCATCTCAGCCTACCATGAGAATAAGAGAAAAGAAAATGAAGATCAAT
AGCTTATTCATCTCTTTTCTTTTTCTGTTGGTGTAAAGCCAACACCCTGTCTAAAAA
CATAAATTTCTTTAATCATTGCTCTTTTCTCTGTGCTTCAATTAATAAAAAATGG
AAAGAACCTCGAGAA
AA
AAAAAATCTAGACTTAAGCTTGATGAGCTCTAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCT
GTTTCCTGTGTAAATTGTTATCCGCTCACAAATCCACACAACATACGAGCCGGAAG
CATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTT
GCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAAT
CGGCCAACGCGCGGGGAGAGGGGTTTTCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCT
CACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAA
GGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAG
CAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCTTGTGCGTTTTTC
CATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTG
GCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATAACAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCG
TGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTC
GGGAAGCGTGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGT
CGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGC
CTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGTAAGACACGACTTATCGCCACT
GGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAG
AGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCT
GCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCA
AACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTGTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCA
GAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGT
GGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTC
ACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATAGAG
TAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATC
TGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATAC
GGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCA
CCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAG
TGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAG

AGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCAT
 CGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTCCCAACGATCA
 AGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTT
 CCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCA
 CTGCATAATTCTCTTACTGTTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGT
 ACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGG
 CGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTTG
 GAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTT
 CGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTACTTTACCAGCGT
 TTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCG
 ACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATC
 AGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAA
 TAGGGTTCCGCGCACATTTCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTA
 TTATCATGACATTAACCTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCG

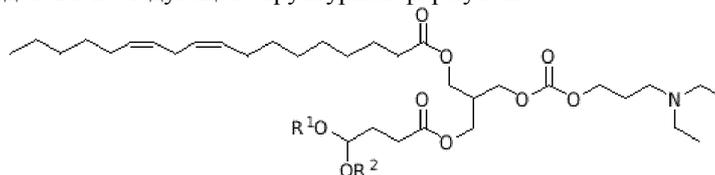
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция липидных наночастиц, содержащая:
 РНК-компонент, где РНК-компонент содержит (i) мРНК, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, и (ii) нуклеиновую кислоту гРНК; и
 липидный компонент, причем липидный компонент содержит:
 50-60 мол.% аминлипида;
 8-10 мол.% нейтрального липида; и
 2,5-4 мол.% ПЭГ-липида,
 при этом остаток липидного компонента представляет собой вспомогательный липид,
 аминлипид представлен следующей структурной формулой:



где R^1 и R^2 , каждый независимо, представляет собой C_4 - C_{12} алкил, и при этом соотношение N/P композиции LNP составляет 6.

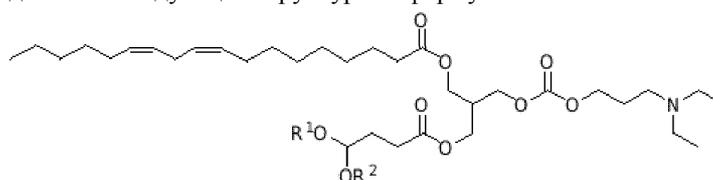
2. Фармацевтическая композиция LNP, содержащая:
 РНК-компонент, где РНК-компонент содержит (i) мРНК, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, и (ii) нуклеиновую кислоту гРНК; и липидный компонент, при этом липидный компонент содержит:
 50-60 мол.% аминлипида;
 27-39,5 мол.% вспомогательного липида;
 8-10 мол.% нейтрального липида; и
 2,5-4 мол.% ПЭГ-липида,
 аминлипид представлен следующей структурной формулой:



где R^1 и R^2 , каждый независимо, представляет собой C_4 - C_{12} алкил, и причем соотношение N/P композиции LNP составляет 5-7.

3. Композиция по п.6, причем липидный компонент содержит:
 50-60 мол.% аминлипида;
 5-10 мол.% нейтрального липида; и
 2,5-4 мол.% ПЭГ-липида.
 4. Фармацевтическая композиция LNP, содержащая:
 РНК-компонент, где РНК-компонент содержит (i) мРНК, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, и (ii) нуклеиновую кислоту гРНК; и липидный компонент, причем липидный компонент содержит:
 40-60 мол.% аминлипида;

5-15 мол.% нейтрального липида; и
2,5-4 мол.% ПЭГ-липид,
при этом остаток липидного компонента представляет собой вспомогательный липид,
аминолипид представлен следующей структурной формулой:



где R^1 и R^2 , каждый независимо, представляет собой C_4 - C_{12} алкил, и при этом соотношение N/P композиции LNP составляет 6.

5. Фармацевтическая композиция LNP, содержащая:

РНК-компонент, где РНК-компонент содержит (i) мРНК, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, и (ii) нуклеиновую кислоту гРНК; и

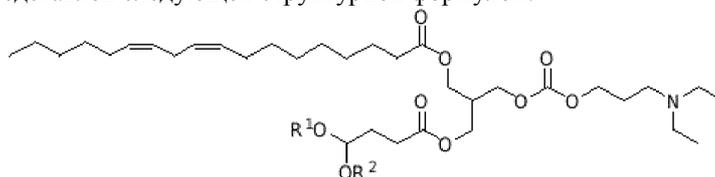
липидный компонент, причем липидный компонент содержит:

50-60 мол.% аминолипида;

5-15 мол.% нейтрального липида; и

1,5-10 мол.% ПЭГ-липид,

при этом остаток липидного компонента представляет собой вспомогательный липид,
аминолипид представлен следующей структурной формулой:



где R^1 и R^2 , каждый независимо, представляет собой C_4 - C_{12} алкил, и при этом соотношение N/P композиции LNP составляет 6.

6. Фармацевтическая композиция LNP, содержащая:

РНК-компонент, где РНК-компонент содержит (i) мРНК, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, и (ii) нуклеиновую кислоту гРНК; и

липидный компонент, причем липидный компонент содержит:

40-60 мол.% аминолипида;

менее 10 мол.% нейтрального липида; и

1,5-10 мол.% ПЭГ-липид,

при этом остаток липидного компонента представляет собой вспомогательный липид,
аминолипид представлен следующей структурной формулой:



где R^1 и R^2 , каждый независимо, представляет собой C_4 - C_{12} алкил, и при этом соотношение N/P композиции LNP составляет 5-7.

7. Композиция по п.6, причем липидный компонент содержит:

менее чем 1 мол.% нейтрального липида.

8. Фармацевтическая композиция LNP, содержащая:

РНК-компонент, где РНК-компонент содержит (i) мРНК, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, и (ii) нуклеиновую кислоту гРНК; и

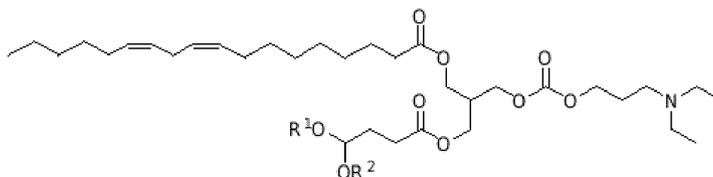
липидный компонент, причем липидный компонент содержит:

50-60 мол.% аминолипида;

8-10 мол.% нейтрального липида; и

2,5-4 мол.% ПЭГ-липид,

при этом остаток липидного компонента представляет собой вспомогательный липид,
аминолипид представлен следующей структурной формулой:



где R^1 и R^2 , каждый независимо, представляет собой C_4 - C_{12} алкил, и при этом соотношение N/P композиции LNP составляет 5-7.

9. Композиция по любому из предшествующих пунктов, в которой РНК-направляемый ДНК-связывающий агент представляет собой Cas-нуклеазу.

10. Композиция по любому из предшествующих пунктов, в которой РНК-компонент содержит мРНК Cas-нуклеазы класса 2, такой как мРНК нуклеазы Cas9.

11. Композиция по п.9 или 10, в которой мРНК представляет собой модифицированную мРНК.

12. Композиция по любому из предшествующих пунктов, в которой мРНК содержит открытую рамку считывания, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, при этом открытая рамка считывания имеет содержание уридина в диапазоне от минимального содержания уридина до 150% от минимального содержания уридина или

открытую рамку считывания, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, при этом открытая рамка считывания имеет содержание уридинового динуклеотида в диапазоне от минимального содержания уридинового динуклеотида до 150% от минимального содержания уридинового динуклеотида.

13. Композиция по любому из предшествующих пунктов, в которой мРНК содержит последовательность с по меньшей мере 90% идентичностью с любой из SEQ ID NO: 1, 4, 7, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 17, 18, 20, 21, 23, 24, 26, 27, 29, 30, 50, 52, 54, 65 или 66 и, при этом, мРНК содержит открытую рамку считывания, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

14. Композиция по любому из предшествующих пунктов, в которой нуклеиновая кислота гРНК представляет собой гРНК.

15. Композиция по любому из предшествующих пунктов, в которой РНК-компонент содержит мРНК нуклеазы Cas класса 2 и гРНК.

16. Композиция по п.14 или 15, в которой нуклеиновая кислота гРНК представляет собой или кодирует двойную гидовую РНК (дгРНК) или огРНК.

17. Композиция по любому из пп.14-16, в которой гРНК содержит модификацию, такую как модификация, выбранная из 2'-О-метил (2'-О-Ме)-модифицированного нуклеотида, фосфоротиоатной (PS) связи между нуклеотидами; и 2'-фтор (2'-F)-модифицированного нуклеотида.

18. Композиция по п.17, в которой гРНК содержит модификацию на одном или более из первых пяти нуклеотидов на 5'-конце или гРНК содержит модификацию на одном или более из последних пяти нуклеотидов на 3'-конце.

19. Композиция по п.17 или 18, в которой гРНК содержит PS связи между первыми четырьмя нуклеотидами или гРНК содержит PS связи между последними четырьмя нуклеотидами.

20. Композиция по любому из пп.17-19, дополнительно содержащая 2'-О-Ме-модифицированные нуклеотиды в первых трех нуклеотидах на 5'-конце или 2'-О-Ме-модифицированные нуклеотиды в последних трех нуклеотидах на 3'-конце.

21. Композиция по любому из пп.14-20, в которой гРНК и мРНК Cas-нуклеазы класса 2 присутствуют в массовом соотношении от 10:1 до 1:10, от 5:1 до 1:5, от 3:1 до 1:1 или от 2:1 до 1:1.

22. Композиция по любому из пп.14-20, в которой гРНК и мРНК Cas-нуклеазы класса 2 присутствуют в массовом соотношении 2:1 или в массовом соотношении 1:1.

23. Композиция по любому из предшествующих пунктов, дополнительно содержащая по меньшей мере одну матричную нуклеиновую кислоту.

24. Композиция по любому из предшествующих пунктов, в которой липидный компонент содержит 3 мол.% ПЭГ-липида.

25. Композиция по любому из предшествующих пунктов, в которой липидный компонент содержит 50 или 55 мол.% аминוליпида.

26. Композиция по любому из предшествующих пунктов, в которой липидный компонент содержит 47-53, 48-53 или 53-57 мол.% аминוליпида.

27. Композиция по любому из предшествующих пунктов, в которой соотношение N/P равно 6 ± 1 .

28. Композиция по любому из предшествующих пунктов, в которой соотношение N/P равно $6 \pm 0,5$.

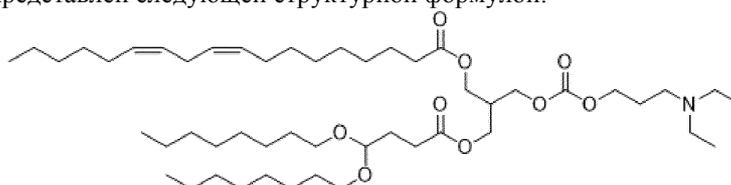
29. Композиция по любому из предшествующих пунктов, в которой каждый из R^1 и R^2 независимо представляет собой C_5 - C_{12} алкил.

30. Композиция по любому из пп.1-28, где R^1 и R^2 , каждый независимо, представляет собой C_5 - C_{10} алкил.

31. Композиция по любому из пп.1-28, где ацеталевый аналог выбран из C4, C5, C6, C7, C9, C10,

C11 и C12 аналога.

32. Композиция по любому из пп.1-28, в которой аминоклипид представляет собой Липид А, где Липид А представлен следующей структурной формулой:



33. Композиция по любому из предшествующих пунктов, где вспомогательный липид выбран из холестерина, 5-гептадецилрезорцина и гемисукцината холестерина.

34. Композиция по любому из предшествующих пунктов, в которой вспомогательный липид представляет собой холестерин.

35. Композиция по любому из предшествующих пунктов, где нейтральный липид выбран из дипальмитоилфосфатидилхолина (DPPC), дистеароилфосфатидилхолина (DSPC), диолеилфосфатидилхолина (DOPC), димиристоилфосфатидилхолина (DMPC), 1-пальмитоил-2-линолеоил-sn-глицеро-3-фосфохолина (PLPC), 1,2-диарахидоил-sn-глицеро-3-фосфатидилхолина (DAPC), фосфатидилэтаноламина (PE), яичного фосфатидилхолина (EPH), дилауроилфосфатидилхолина (DLPC), 1-миристоил-2-пальмитоилфосфатидилхолина (MPPC), 1-пальмитоил-2-миристоилфосфатидилхолина (PMPC), 1-пальмитоил-2-стеароилфосфатидилхолина (SPPC), 1,2-дибегеноил-sn-глицеро-3-фосфохолина (DBPC), 1-стеароил-2-пальмитоилфосфатидилхолина (SPPC), 1,2-дизйкозеноил-sn-глицеро-3-фосфохолина (DEPC), пальмитоилолеоилфосфатидилхолина (POPC), лизофосфатидилхолина, диолеилфосфатидилэтаноламина (DOPE), дилинолеоилфосфатидилхолина, дистеароилфосфатидилэтаноламина (DSPE), димиристоилфосфатидилэтаноламина (DMPE), дипальмитоилфосфатидилэтаноламина (DPPE), пальмитоилолеоилфосфатидилэтаноламина (POPE), лизофосфатидилэтаноламина и их комбинации.

36. Композиция по любому из предшествующих пунктов, в которой нейтральный липид представляет собой DSPC или DPPC.

37. Композиция по любому из предшествующих пунктов, где нейтральный липид представляет собой DSPC.

38. Композиция по любому одному из пп.1-36, где нейтральный липид представляет собой DPPC.

39. Композиция по любому одному из пп.1-35, где нейтральный липид представляет собой димиристоилфосфатидилэтаноламин (DMPE).

40. Композиция по любому из предшествующих пунктов, в которой ПЭГ-липид содержит димиристоилглицерин (DMG) и/или ПЭГ-липид содержит ПЭГ-2к.

41. Композиция по любому из предшествующих пунктов, в которой ПЭГ-липид представляет собой ПЭГ-DMG.

42. Композиция по п.41, в которой ПЭГ-DMG представляет собой ПЭГ2к-DMG.

43. Композиция по п.40, в которой ПЭГ-липид представляет собой ПЭГ2к-DMG.

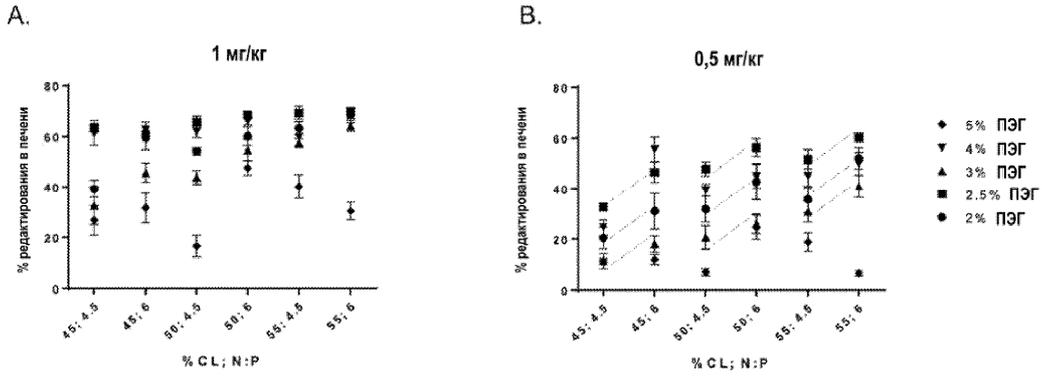
44. Композиция по любому одному из пп.1-39, где ПЭГ-липид выбран из ПЭГ-дилауроилглицерина, ПЭГ-димиристоилглицерина (ПЭГ-DMG), ПЭГ-дипальмитоилглицерина, ПЭГ-дистеароилглицерина (ПЭГ-ДСФЭ), ПЭГ-дилаурилглицерина, ПЭГ-димиристилгликамида, ПЭГ-дипальмитоилгликамида, ПЭГ-дистеароилгликамида, ПЭГ-холестерина (1-[8'-(холест-5-ен-3[бета]-окси)карбоксамидо-3',6'-диоксаоктанил]карбамоил-[омега]-метил-поли(этиленгликоль)эфира), ПЭГ-ДМБ (3,4-дитетрадекоксилбензил-[омега]-метил-поли(этиленгликоль)эфира), 1,2-димиристоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[метокси(полиэтиленгликоль)-2000] (ПЭГ2к-DMG), 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[метокси(полиэтиленгликоль)-2000] (ПЭГ2к-ДСФЭ), 1,2-дистеароил-sn-глицерин метоксиполиэтиленгликоля (ПЭГ2к-ДСГ), полиэтиленгликоль-2000-диметакрилата (ПЭГ2к-DMA) и 1,2-дистеарилоксипропил-3-амин-N-[метокси(полиэтиленгликоль)-2000] (ПЭГ2к-ДСА).

45. Способ редактирования генов или получения генетически сконструированной клетки, включающий приведение в контакт клетки с композицией LNP по любому из предшествующих пунктов.

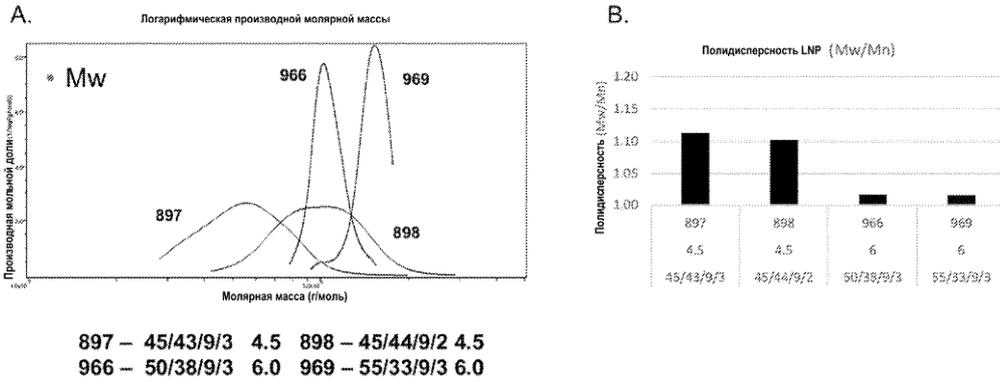
46. Способ по п.45, в котором композицию LNP вводят по меньшей мере два раза, таким образом, как 2-5 раз.

47. Способ по п.46, в котором редактирование улучшается при повторном введении.

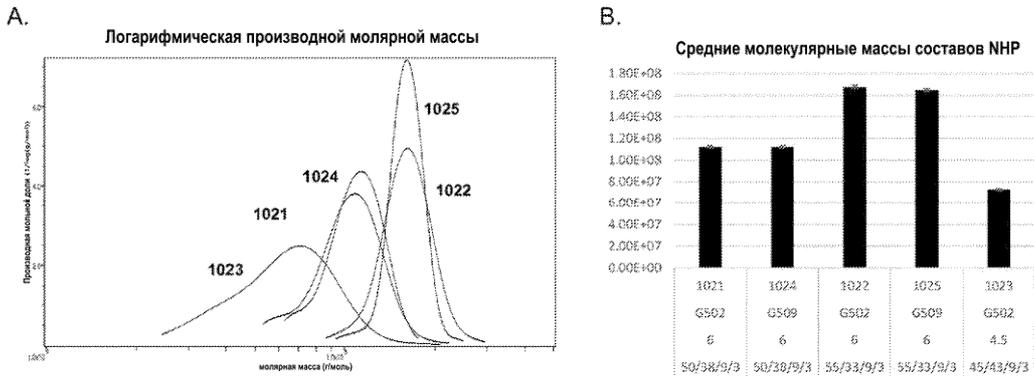
48. Способ по любому из пп.45-47, дополнительно включающий введение по меньшей мере одной матричной нуклеиновой кислоты в клетку.



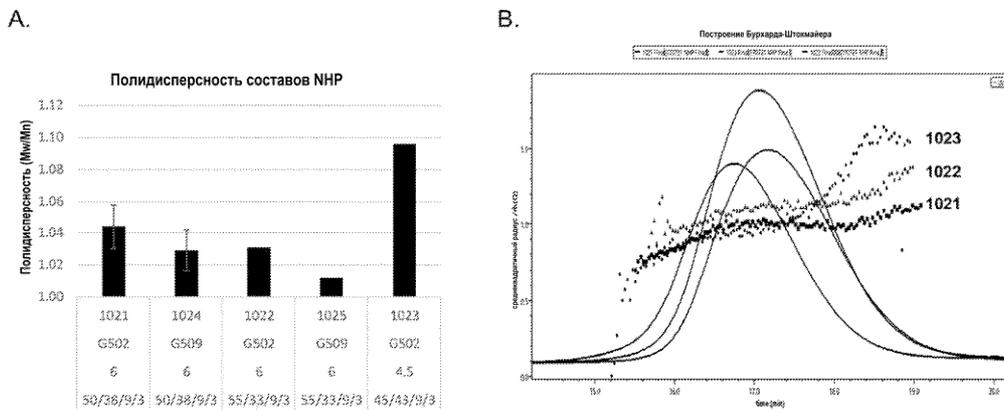
Фиг. 1



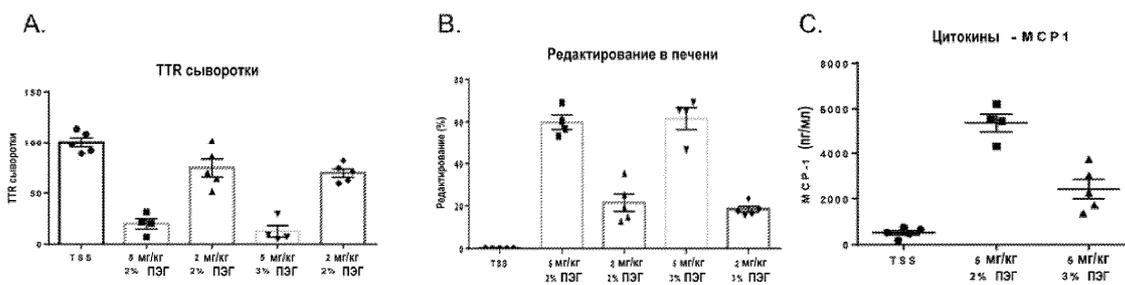
Фиг. 2



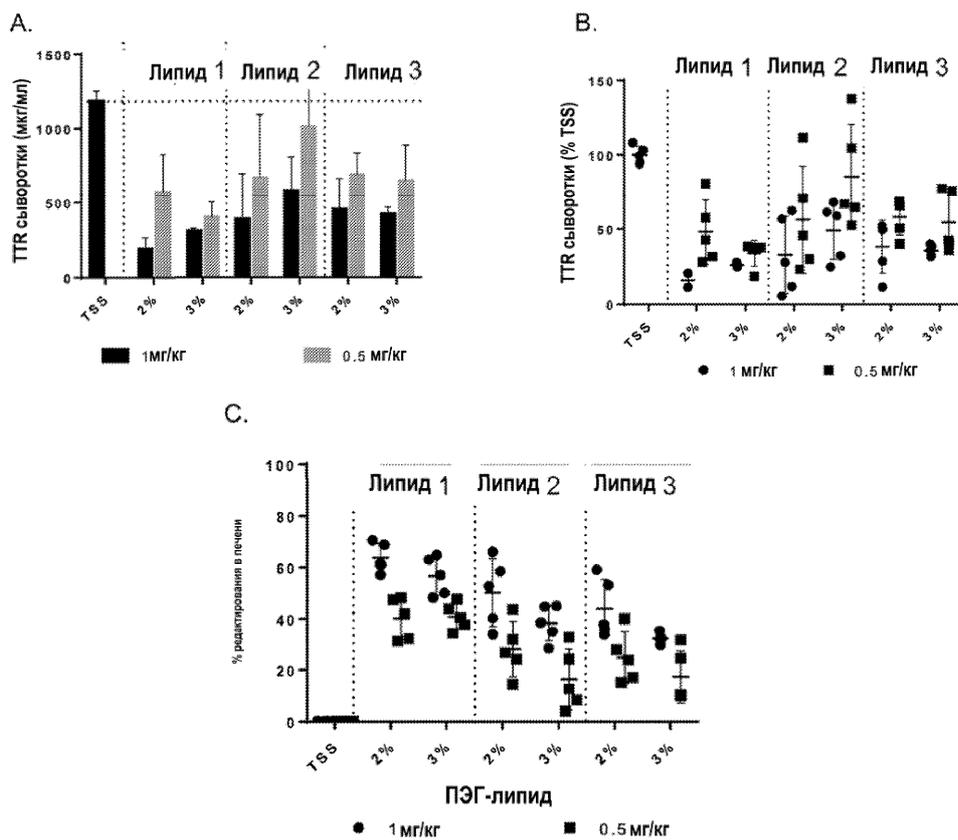
Фиг. 3



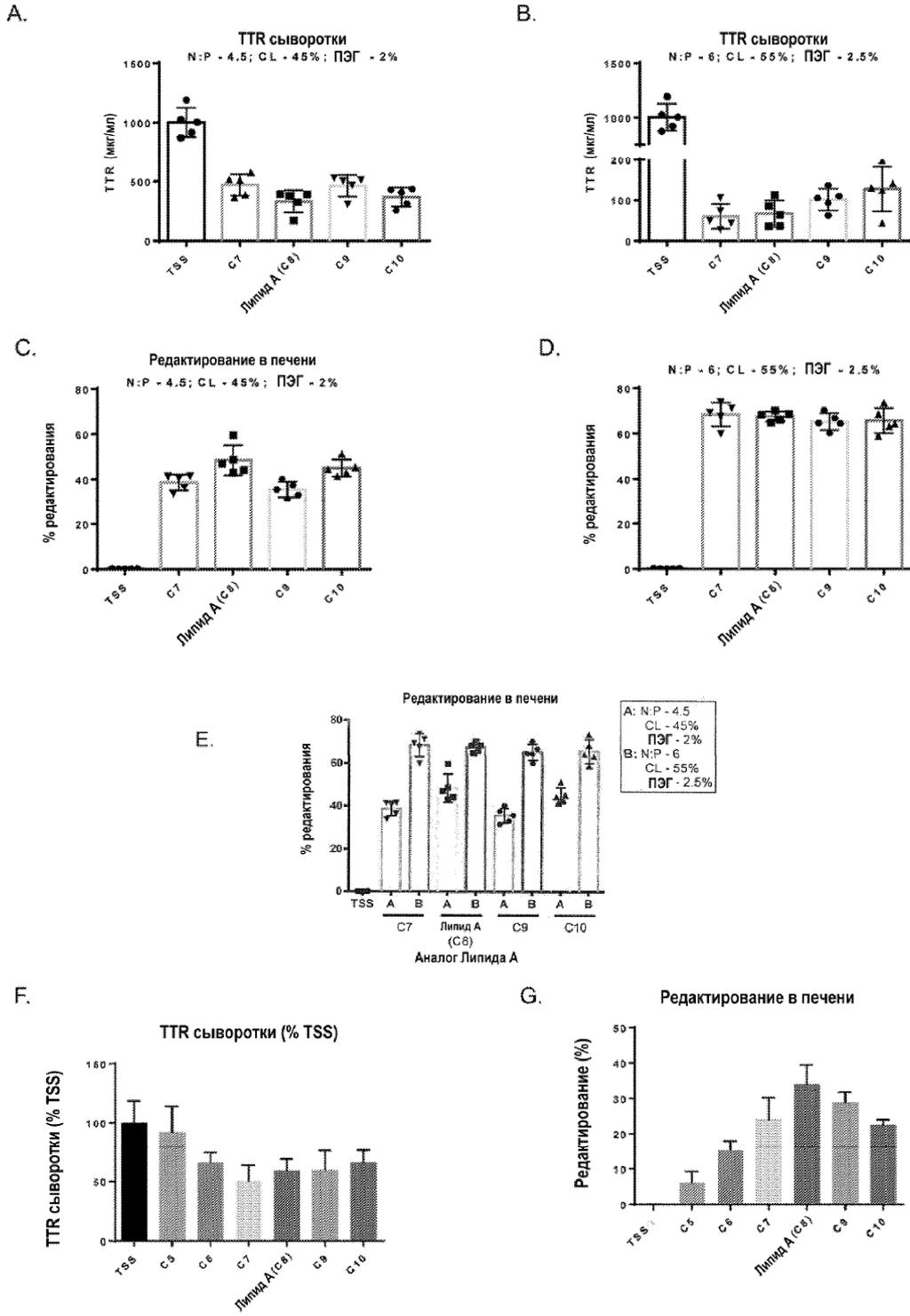
Фиг. 4



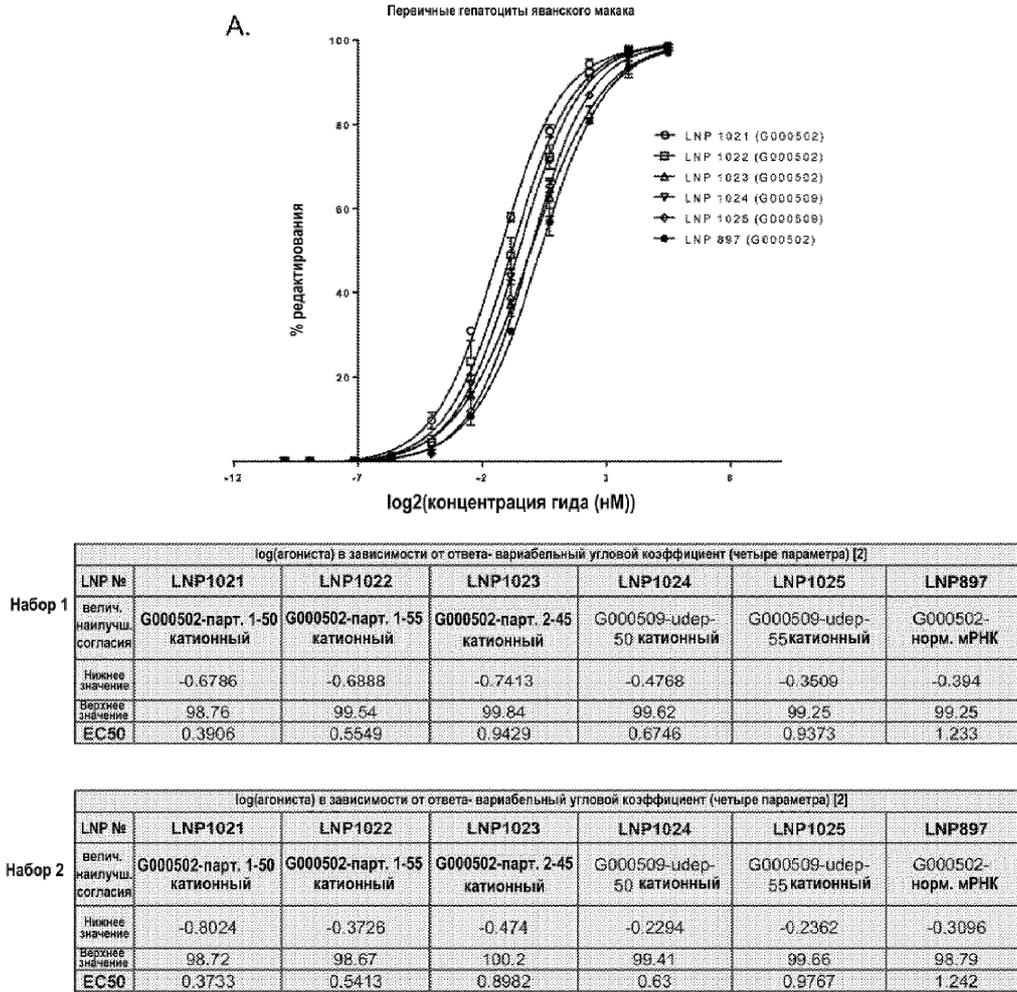
Фиг. 5



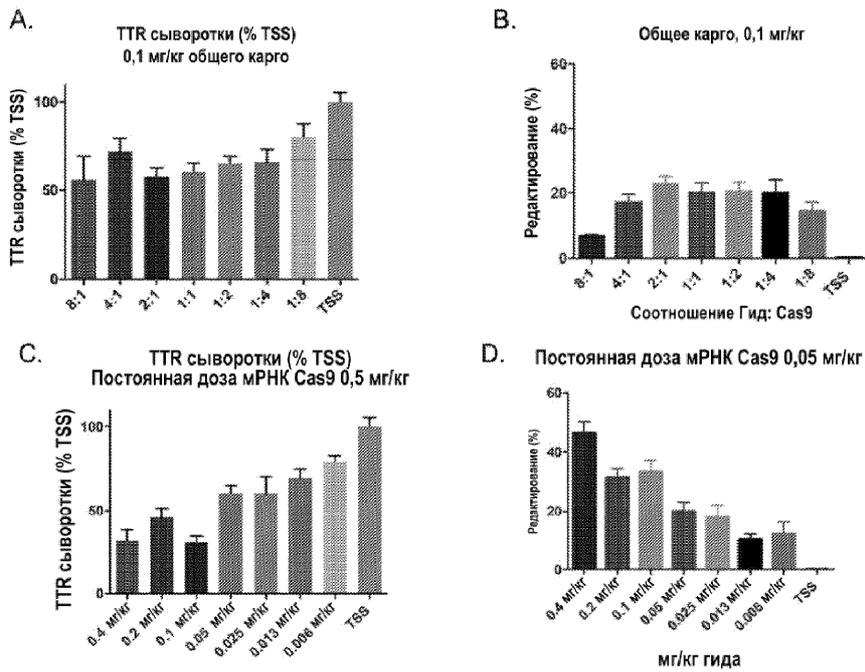
Фиг. 6



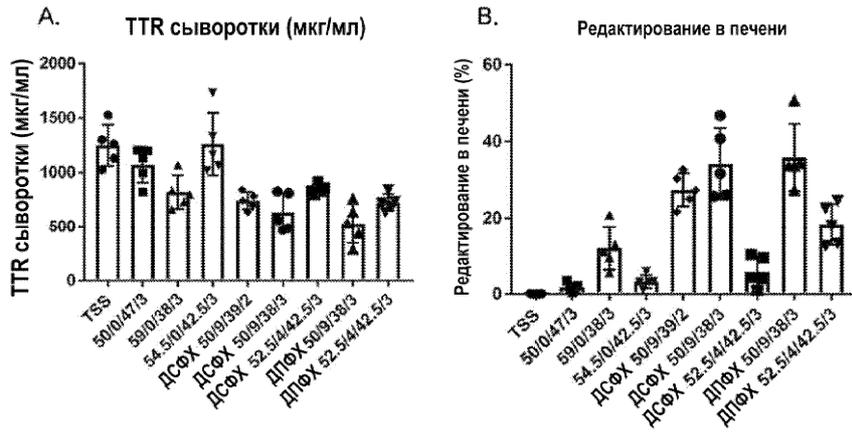
Фиг. 7



Фиг. 8B



Фиг. 9



Фиг. 10

