

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **047832**

(13) **B1**

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

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2024.09.18**

**(21)** Номер заявки  
**202191555**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2019.12.05**

**(51)** Int. Cl. **C12N 15/113** (2010.01)  
**A61K 47/69** (2017.01)  
**C12N 15/864** (2006.01)  
**C12N 15/90** (2006.01)

---

**(54) СИСТЕМЫ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОВ ДЛЯ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНА  
ТРАНСМЕМБРАННОГО РЕГУЛЯТОРА МУКОВИСЦИДОЗА (CFTR)**

---

**(31)** **62/775,637**

**(32)** **2018.12.05**

**(33)** **US**

**(43)** **2021.09.03**

**(86)** **PCT/US2019/064718**

**(87)** **WO 2020/118073 2020.06.11**

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**ВЕРТЕКС ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ  
ИНКОРПОРЕЙТЕД (US)**

**(72)** Изобретатель:  
**Вейнберг Марко, Д'Астольфо Диего  
(US)**

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

**(56)** EP-A2-3129485  
HARRISON PATRICK T ET AL: "Gene editing & stem cells", JOURNAL OF CYSTIC FIBROSIS, ELSEVIER, NL, vol. 17, no. 1, 9 December 2017 (2017-12-09), pages 10-16, XP085330708, ISSN: 1569-1993, DOI: 10.1016/J.JCF.2017.11.018 figure 2 the whole document

CHRISTIEN BEDNARSKI ET AL: "Targeted Integration of a Super-Exon into the CFTR Locus Leads to Functional Correction of a Cystic Fibrosis Cell Line Model", PLOS ONE, vol. 11, no. 8, 15 August 2016 (2016-08-15), page e0161072, XP055676189, DOI: 10.1371/journal.pone.0161072 the whole document

GERALD SCHWANK ET AL: "Functional Repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in Intestinal Stem Cell Organoids of Cystic Fibrosis Patients", CELL STEM CELL, vol. 13, no. 6, 5 December 2013 (2013-12-05), pages 653-658, XP055102691, ISSN: 1934-5909, DOI: 10.1016/j.stem.2013.11.002 the whole document

**(57)** В данном изобретении описаны высокоэффективные системы редактирования генов, содержащие нуклеазу, направляющую РНК и/или донорную матрицу, и их применение для редактирования гена трансмембранного регулятора муковисцидоза (CFTR) *in vitro* или *in vivo*.

**B1**

**047832**

**047832**

**B1**

### Перекрестные ссылки на родственные заявки

Данная заявка испрашивает приоритет по дате подачи, в соответствии с § 119(e) 35 U.S.C., предварительной заявки США № 62/775637, с названием "GENE-EDITING SYSTEMS FOR EDITING A CYSTIC FIBROSIS TRANSMEMBRANE REGULATOR (CFTR) GENE", поданной 5 декабря 2018 г., полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки.

### Уровень техники

Муковисцидоз (МВ) является наиболее распространенным аутосомно-рецессивным заболеванием в европеоидной популяции. Он вызывает серьезные повреждения легких, поджелудочной железы, печени, кишечника, носовых пазух и других органов тела. Различные известные мутации в гене МВ трансмембранного регулятора проводимости (CFTR) вызывают МВ. Хотя технологические достижения увеличили продолжительность жизни пациентов с МВ, эффективного лекарственного средства от этого заболевания до сих пор не существует. Поэтому разработка новых методов лечения МВ представляет большой интерес.

### Краткое описание сущности изобретения

Данное изобретение основано, по меньшей мере частично, на разработке эффективных систем редактирования генов для исправления мутаций в гене регулятора трансмембранной проводимости МВ (CFTR). В некоторых вариантах осуществления система редактирования генов основывается на определении эффективных положений редактирования в интроне 10 гена CFTR (, например, раскрытых в данном документе) для эффективной вставки нуклеиновой кислоты, кодирующей экзона с 11 по 27 гена CFTR, что приведет к коррекции 99% наиболее часто встречающихся резистентных аллелей CFTR.

Таким образом, в некоторых аспектах данное изобретение относится к системам редактирования генов для модификации гена трансмембранного регулятора муковисцидоза (CFTR). Такая система редактирования генов может содержать: (a) первый полинуклеотид, который содержит первую нуклеотидную последовательность, кодирующую экзона 11-27 гена CFTR; (b) второй полинуклеотид, содержащий вторую нуклеотидную последовательность, кодирующую РНК-направляемую ДНК-эндонуклеазу, или РНК-направляемую ДНК-эндонуклеазу; и (c) третий полинуклеотид, который содержит третью нуклеотидную последовательность, кодирующую направляющую РНК (нРНК), причем нРНК направляет расщепление РНК-направляемой ДНК-эндонуклеазы на целевой сайт, который является положением 1220, 2068, 3821, 4262, 5041, 5052, 5278, 5343, 5538 или 6150 интрона 10 в гене CFTR. В некоторых вариантах осуществления первый нуклеотид первого полинуклеотида (a) не содержит последовательностей интронов.

В некоторых вариантах осуществления первый полинуклеотид (a) может дополнительно содержать 5' гомологичное плечо выше первой нуклеотидной последовательности и/или 3' гомологичное плечо ниже первой нуклеотидной последовательности. 5' гомологичное плечо может включать последовательность нуклеиновой кислоты, которая гомологична области выше сайта-мишени. В качестве альтернативы или дополнительно 3' гомологичное плечо может включать последовательность нуклеиновой кислоты, которая гомологична области ниже сайта-мишени. В некоторых вариантах осуществления 5' гомологичное плечо и 3' гомологичное плечо включают нуклеотидные последовательности, выбранные из группы, состоящей из:

- (i) SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18, соответственно;
- (ii) SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 20, соответственно;
- (iii) SEQ ID NO: 21 и SEQ ID NO: 22, соответственно;
- (iv) SEQ ID NO: 23 и SEQ ID NO: 24, соответственно;
- (v) SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 345, соответственно;
- (vi) SEQ ID NO: 346 и SEQ ID NO: 347, соответственно;
- (vii) SEQ ID NO: 348 и SEQ ID NO: 349, соответственно;
- (viii) SEQ ID NO: 350 и SEQ ID NO: 351, соответственно;
- (ix) SEQ ID NO: 352 и SEQ ID NO: 353, соответственно; и
- (x) SEQ ID NO: 354 и SEQ ID NO: 355, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления первая нуклеотидная последовательность в (a) может дополнительно содержать первый фрагмент, расположенный выше первой нуклеотидной последовательности и ниже 5' гомологичного плеча, и при этом первый фрагмент содержит акцепторный сайт сплайсинга. Например, первый фрагмент может состоять из нуклеотидной последовательности

TATACACTTCTGCTTAGGATGATAATTGGAGGCAAGTGAATCCTGAGCGTGATTTGA TAATGACСТААТААТГАТGGGTTTTATTCCAG (SEQ ID NO: 1), где 3' конец AG представляет собой акцепторный сайт сплайсинга.

В некоторых вариантах осуществления вторая нуклеотидная последовательность, кодирующая РНК-направляемую ДНК-эндонуклеазу в (b), может дополнительно содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую сигнал ядерной локализации (NLS), который слит в рамке с РНК-направляемой ДНК-эндонуклеазой. В некоторых вариантах осуществления NLS представляет собой NLS SV40. В некоторых вариантах осуществления, РНК-направляемая ДНК-эндонуклеаза может быть эндонуклеазой Cas9, например, ферментом Cas9 Staphylococcus aureus (saCas9).

В некоторых вариантах осуществления третья нуклеотидная последовательность в (c), которая ко-

дирует нРНК, может включать одну из следующих нуклеотидных последовательностей:

- (i) ACCCAGCCTGACACCAAATTTA (SEQ ID NO: 2);
- (ii) TACTAAAAGGCAGCCTCCTAGA (SEQ ID NO: 3);
- (iii) ATTTGGCTACCTTGGTTGGATGA (SEQ ID NO: 4);
- (iv) GACAGCTGGCTATCCAGGATTC (SEQ ID NO: 5);
- (v) ACTTGCAGGAGGTGAGGGATTA (SEQ ID NO: 6);
- (vi) ATTAGGGAATGCAGACTCTGGG (SEQ ID NO: 7);
- (vii) TGGGTGAGATTAGAGGCCACTG (SEQ ID NO: 8);
- (viii) TGCTTCCTCCCTTGCTCCCTA (SEQ ID NO: 9);
- (iv) TGGCATATGAGAAAAGTCACAG (SEQ ID NO: 10) и
- (x) CCTTATTCTTTTGATATACTCC (SEQ ID NO: 11).

Следует понимать, что поскольку третья нуклеотидная последовательность, кодирующая нРНК, может быть как последовательностью ДНК, так и последовательностью РНК, любой из тимин (Т) в последовательностях может быть заменен на урацил (U). В некоторых вариантах осуществления третья нуклеотидная последовательность в (с) может дополнительно содержать каркасную последовательность, которая в некоторых примерах может включать нуклеотидную последовательность

GUUUUAGUACUCUGGAAACAGAAUCUACUAAAACAAGGCAAAAUGCCGUG-UUUUACUCGUAACUUGUUGGCGAGAUUUU (SEQ ID NO: 12).

В некоторых вариантах осуществления (а), (b) и (с) могут располагаться в одном и том же векторе. В некоторых вариантах осуществления (а), (b) и/или (с) могут располагаться в разных векторах. Например, (а) и (с) могут быть расположены в первом векторе, а (b) может быть расположена во втором векторе, который отличается от первого вектора. В качестве альтернативы, (а) может быть расположена в первом векторе, а (b) и (с) могут быть расположены во втором векторе, который отличается от первого вектора. В некоторых вариантах осуществления вектор(ы) представляет собой вирусный вектор(ы), например, аденоассоциированный вирусный (AAV) вектор(ы).

Также в объем данного изобретения входят вирусные частицы или наборы вирусных частиц, которые в совокупности составляют любую из систем редактирования генов, раскрытых в данном документе. В некоторых вариантах осуществления вирусная частица или набор вирусных частиц представляет собой частицу(ы) AAV.

В других аспектах, данное изобретение относится к способам редактирования гена CFTR, включающим приведение в контакт клетки с (i) любой из систем редактирования генов, раскрытых в данном документе, или (ii) вирусной частицей или набором вирусных частиц, которые в совокупности составляют систему редактирования генов. В некоторых вариантах осуществления клетка может содержать мутацию в одном или более экзонах 11-27 гена CFTR. Примеры мутаций включают, без ограничения, F508del, I507del, G542X, S549N, G551D, R553X, D1152H, N1303K, W1282X, 2789+5G>A или 3849+10kbC>T.

В некоторых вариантах осуществления этап приведения в контакт выполняют путем введения системы редактирования генов или вирусной частицы (частиц) нуждающемуся в этом субъекту. В некоторых вариантах осуществления систему редактирования генов или вирусную частицу(ы) вводят в дыхательные пути субъекта. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой пациента-человека, страдающего муковисцидозом. В некоторых примерах пациент-человек является ребенком.

В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой стволовую клетку, например, клетку iPSC или бронхиолоальвеолярную стволовую клетку.

В некоторых примерах любой из описанных в данном документе способов может дополнительно включать введение клетки с отредактированным геном CFTR нуждающемуся в этом субъекту. В некоторых примерах клетку с отредактированным геном CFTR вводят в дыхательные пути субъекта (например, пациента с муковисцидозом). В некоторых примерах пациент-человек может быть ребенком.

В других аспектах данное изобретение относится к нуклеиновым кислотам, которые могут быть вирусными векторами, такими как векторы AAV. Нуклеиновая кислота может содержать: (а) первую нуклеотидную последовательность, кодирующую экзоны с 11 по 27 гена CFTR; (b) 5' гомологичное плечо выше первой нуклеотидной последовательности, где 5' гомологичное плечо включает последовательность нуклеиновой кислоты, которая гомологична области выше целевого положения в интроне 10 гена CFTR; и (с) 3' гомологичное плечо ниже первой нуклеотидной последовательности, где 3' гомологичное плечо включает последовательность нуклеиновой кислоты, которая гомологична области ниже целевого положения в интроне 10 гена CFTR; при этом целевое положение выбирают из группы, состоящей из положений 1220, 2068, 3821, 4262, 5041, 5052, 5278, 5343, 5538, или 6150 интрона 10 в гене CFTR. В некоторых вариантах осуществления последовательность первого нуклеотида (а) не содержит последовательностей интронов.

В других вариантах осуществления нуклеиновая кислота может содержать: (а) первую нуклеотидную последовательность, кодирующую РНК-направляемую ДНК-эндонуклеазу, и (b) вторую нуклеотидную последовательность, кодирующую направляющую РНК (нРНК), где нРНК направляет расщепление РНК-направляемой ДНК-эндонуклеазы в целевое положение гена CFTR, при этом целевое положение

выбирают из группы, состоящей из положений 1220, 2068, 3821, 4262, 5041, 5052, 5278, 5343, 5538 или 6150 интрона 10 в гене CFTR; при этом каждая из первой нуклеотидной последовательности и второй нуклеотидной последовательности функционально связаны с промотором.

В некоторых вариантах осуществления первая нуклеотидная последовательность в (а) дополнительно содержит первый фрагмент, связанный с 5' концом нуклеотидной последовательности, кодирующей экзона с 11 по 27 гена CFTR, при этом первый фрагмент содержит акцепторный сайт сплайсинга (например, раскрытый в данном документе).

В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота может дополнительно содержать вторую нуклеотидную последовательность, кодирующую направляющую РНК (нРНК), причем нРНК направляет расщепление РНК-направляемой ДНК-эндонуклеазы в любое из целевых положений, раскрытых в данном документе. Иллюстративные нРНК также предложены в данном изобретении. См. стр. 14 ниже.

В других аспектах в данном изобретении предложены генетически отредактированным клетки легких или их предшественники. Генетически отредактированная клетка легкого или ее клетка-предшественник может содержать генетически отредактированный эндогенный ген CFTR, в которой экзогенная нуклеиновая кислота вставлена в интрон 10 эндогенного гена CFTR, при этом экзогенная нуклеиновая кислота содержит первую нуклеотидную последовательность, кодирующую экзона с 11 по 27 гена CFTR. В некоторых вариантах осуществления последовательность первого нуклеотида не содержит последовательностей интронов. В некоторых вариантах осуществления экзогенная нуклеиновая кислота дополнительно содержит вторую нуклеотидную последовательность, связанную с 5' концом первой нуклеотидной последовательности, причем вторая нуклеотидная последовательность содержит акцепторный сайт сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления вторая нуклеотидная последовательность включает SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления отредактированная клетка легкого или ее предшественник является клеткой человека. В некоторых вариантах осуществления клетка-предшественник представляет собой клетку iPSC или бронхоальвеолярную стволовую клетку.

Также в объем данного изобретения входит применение любой из описанных в данном документе систем редактирования генов, их компонентов или любой из описанных в данном документе генно-инженерных клеток для лечения МВ, а также их применение для производства лекарственного средства для предполагаемого лечения.

Подробности одного или более вариантов осуществления изобретения изложены в описании ниже. Другие признаки или преимущества настоящего изобретения будут очевидны из подробного описания нескольких вариантов осуществления, а также из приложенной формулы изобретения.

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

Фиг. 1 представляет собой схему, изображающую стратегии редактирования гена CFTR. На фиг. 1А изображена стратегия редактирования генов, основанная на двойной доставке CRISPR-Cas9 и суперэкзонов 11-27 CFTR с помощью AAV. Первый (1) вектор AAV экспрессирует saCAS9 и одну молекулу нРНК (енРНК) для индуцирования специфического двухцепочечного разреза ДНК в интроне 10 гена CFTR, а второй (2) вектор AAV служит донорной матрицей HDR. На фиг. 1В изображена стратегия редактирования генов, основанная на однократной доставке донорной матрицы HDR и енРНК с помощью AAV. LHA: левое гомологическое плечо; RHA: правое гомологическое плечо.

Фиг. 2 представляет собой диаграмму, показывающую сайты-кандидаты на вырезание, выявленные в результате скрининга 120 инделей нРНК saCas9 в электропорационных прогениторных клетках легких (LPC). Положительным и отрицательным контролем были клетки, электропорированные мРНК saCAS9 вместе с VEGFA нРНК или без нРНК, соответственно (черные и белые ромбы). Частота инделей (левая ось y) представлена сплошными точками, а выживаемость клеток (правая ось y) - полыми квадратами. Положения нуклеотидов представлены на оси x, при этом первый нуклеотид интрона 10 hsCFTR обозначен как 1, и так далее. SEQ ID NO приведены в табл. 1.

Фиг. 3 представляет собой график, показывающий валидацию 10 сайтов-мишеней кандидатных енРНК в интроне 10 гена CFTR (обозначены в соответствии с фиг. 2).

Фиг. 4 представляет собой график, показывающий паттерны инделей для 10 сайтов-мишеней енРНК-кандидатов (обозначены в соответствии с фиг. 2). На графиках тепловой карты представлены профили инделей от -25 до +25 нуклеотидов (ось y) от сайта разреза CRISPR-CAS9 каждого из 10 сайтов-мишеней кандидатных енРНК. Значения белого и черного были установлены как 0% и 100%, соответственно.

Фиг. 5 представляет собой диаграмму, показывающая общий обзор анализа внецелевых сайтов-мишеней 10 кандидатных енРНК. Обобщенный внецелевой анализ 10 кандидатных нРНК с использованием технологий GUIDE-Sequencing и Hybrid capture. Звездочкой выделены нРНК с потенциальным и/или значительным внецелевым редактированием.

Фиг. 6 представляет собой схему, изображающую иллюстративный экспериментальный процесс, используемый для определения функциональной коррекции в LPC после CRISPR-CAS9 опосредованной вставки AAV суперэкзона CFTR. LPC: клетки-предшественники легких; НВЕ: эпителиальная клетка бронхов человека; HDR: гомологически-зависимая рекомбинация.

Фиг. 7 представляет собой диаграмму, показывающую измерения скорости HDR суперэкзона CFTR для 10 целевых сайтов енРНК-кандидатов в LPC. График, показывающий скорость гомологически-зависимой рекомбинации (HDR) суперэкзона 11-27 CFTR и выживаемость клеток. LPC были электропорированы с saCAS9 и соответствующей енРНК (CRISPR/Cas9) или без нее. Клетки помещали на среду, содержащую соответствующий донор AAV суперэкзона CFTR в указанных концентрациях. Выживаемость клеток показана в процентах, при этом контрольные электропорации были произвольно приняты за 100%. График показывает среднее значение и SD для каждого экспериментального условия (n=4).

Фиг. 8 представляет собой график, демонстрирующий функциональную коррекцию CFTR после опосредованной CRISPR-CAS9 вставки донора суперэкзона 11-27 CFTR в 7 местах в НВЕ. График, показывающий показатели функциональной коррекции CFTR и HDR 7 выбранных сайтов нРНК CFTR в НВЕ. LPC dF508/dF508 были электропорированы с мРНК saCAS9 и соответствующей енРНК (CRISPR/Cas9) или без нее. Клетки помещали на среду с соответствующим донором AAV суперэкзона CFTR. Положительным контролем функции CFTR служили клетки, обработанные тройной комбинацией малых молекул корректоров и потенциаторов CFTR (659-TC). График показывает среднее значение и SD для каждого экспериментального условия (n=3).

### Подробное описание

Редактирование генов (включая геномное редактирование) - это вид генной инженерии, при котором нуклеотид(ы)/нуклеиновая кислота(ы) вставляются, удаляются и/или заменяются в последовательности ДНК, например, в геноме клетки-мишени. Нацеленное редактирование генов позволяет осуществлять вставку, удаление и/или замену в заранее выбранных местах в геноме клетки-мишени (например, в целевом гене или целевой последовательности ДНК). Когда последовательность эндогенного гена редактируется, например, путем делеции, вставки или замены нуклеотида(ов)/нуклеиновой кислоты (кислот), эндогенный ген, содержащий затронутую последовательность, может быть нокаутирован или выключен вследствие изменения последовательности. Поэтому для нарушения экспрессии эндогенных генов можно использовать нацеленное редактирование. Альтернативно или дополнительно, желаемая нуклеиновая кислота может быть вставлена в целевой сайт в последовательности ДНК (например, в эндогенный ген), что известно как нацеленная интеграция. "Нацеленная интеграция" относится к процессу, включающему вставку одной или более экзогенных последовательностей с удалением или без удаления эндогенной последовательности в месте вставки. Нацеленная интеграция может быть результатом направленного редактирования генов при наличии донорной матрицы, содержащего экзогенную последовательность.

Данное изобретение основано, по меньшей мере частично, на разработке эффективных систем редактирования генов для исправления мутации (мутаций) в гене трансмембранного регулятора проводимости МВ (CFTR), например, мутации в областях, кодируемых одним из экзонов 11-27, и вызывают МВ. Как описано в данном документе, выживаемость клеток, частота инделов и паттерны инделов были определены в 120 ранее не охарактеризованных целевых положениях в интроне 10 гена CFTR, и на основе полученных результатов был определен ряд эффективных положений редактирования. Соответственно, системы редактирования генов, описанные в данном документе, основаны на идентификации положений мишеней-кандидатов (например, раскрытых в данном документе) которые способствуют эффективному введению (в соответствии с выживаемостью клеток, частотой инделов и характером инделов) нуклеиновой кислоты, кодирующей экзон с 11 по 27 гена CFTR, что приведет к коррекции 99% наиболее часто встречающихся резистентных аллелей CFTR.

Соответственно, в данном документе представлены системы генного редактирования для эффективной модификации генов CFTR и их применение для исправления мутаций в гене CFTR, что позволяет лечить МВ. Компоненты систем редактирования генов и генетически модифицированные клетки, полученные в результате применения систем редактирования генов, также входят в объем данного изобретения.

#### I. Системы редактирования генов для генетической модификации гена CFTR.

В некоторых аспектах данное изобретение относится к системам редактирования генов для модификации гена трансмембранного регулятора муковисцидоза (CFTR). "Система редактирования генов" означает комбинацию компонентов для генетического редактирования целевого гена (например, CFTR), или один или более агентов для получения таких компонентов. Например, система редактирования генов может содержать: (а) нуклеазу или агент (например, нуклеиновую кислоту, кодирующую нуклеазу) для ее получения; (b) направляющую РНК (нРНК) или агент для ее получения (например, вектор, способный экспрессировать нРНК); и/или (с) донорную матрицу или агент для его получения (например, вектор, способный продуцировать донорную матрицу).

Системы редактирования генов, описанные в данном документе, могут демонстрировать одно или более преимуществ при модификации гена CFTR. Например, это позволит достичь высокого процента редактирования генов, например, скорости гомологически-направленной репарации (например, по меньшей мере 5%, по меньшей мере 6%, по меньшей мере 7%, по меньшей мере 8%, по меньшей мере 9%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 11%, по меньшей мере 12%, по меньшей мере 13%, по меньшей мере 14%, по меньшей мере 15%, по меньшей мере 16%, по меньшей мере 17%, по меньшей мере 18%, по меньшей мере 19%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 21%, по меньшей мере 22%,

по меньшей мере 23%, по меньшей мере 24%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35% или по меньшей мере 40% при оценке методами, известными в данной области техники (например, методами, описанными в данном документе)). Кроме того, клетки, отредактированные системой редактирования генов, раскрытой в данном документе, будут иметь высокий уровень выживаемости, (например, 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 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%) по сравнению с неотредактированным контролем. Альтернативно или дополнительно, клетки, отредактированные системой редактирования генов, будут демонстрировать повышенную активность CFTR (например, на по меньшей мере 30%, 50%, 100%, 2-кратно, 5-кратно или 10-кратно) по сравнению с неотредактированным контролем.

В одном иллюстративном варианте осуществления система редактирования генов, описанная в данном документе, может содержать: (а) первый полинуклеотид, который включает нуклеотидную последовательность, кодирующую донорную матрицу; (b) второй полинуклеотид, который включает нуклеотидную последовательность, кодирующую РНК-направляемую ДНК-эндонуклеазу; и (с) третий полинуклеотид, который включает нуклеотидную последовательность, кодирующую нРНК. В другом иллюстративном варианте осуществления система редактирования генов может содержать: (а) первый полинуклеотид, который включает нуклеотидную последовательность, кодирующую донорную матрицу; (b) полипептид, включающий РНК-направляемую ДНК-эндонуклеазу; и (с) третий полинуклеотид, который включает нуклеотидную последовательность, кодирующую нРНК.

#### А. Нуклеаза.

Нацеленное редактирование генов может быть достигнуто как с помощью нуклеазно-независимого подхода, так и с помощью нуклеазно-зависимого подхода. При нуклеазно-независимом подходе нацеленного редактирования гомологичная рекомбинация направляется гомологичными последовательностями, фланкирующими экзогенный полинуклеотид, который должен быть внедрен в эндогенную последовательность с помощью ферментного механизма клетки-хозяина. Экзогенный полинуклеотид может вносить делеции, вставки или замену нуклеотидов в эндогенную последовательность.

Альтернативно, нуклеазно-зависимый подход может обеспечить нацеленное редактирование путем введения двухцепочечных разрывов (DSB) в определенных местах с помощью специфических для последовательности нуклеаз (например, эндонуклеаз). Такое нуклеазно-зависимое нацеленное редактирование также использует механизмы репарации ДНК, например, негомологичное соединение концов (NHEJ), которое происходит в ответ на DSB. Репарация ДНК с помощью NHEJ часто приводит к случайным вставкам или делециям (индексу) небольшого числа эндогенных нуклеотидов. В отличие от репарации, опосредованной NHEJ, репарация может также происходить путем гомологически направленной репарации (HDR). При наличии донорной матрицы, содержащей экзогенный генетический материал, фланкированный парой гомологичных плеч, экзогенный генетический материал может быть введен в геном с помощью HDR, что приводит к направленной интеграции экзогенного генетического материала.

Нуклеаза системы редактирования генов может быть представлена в форме полипептида (т.е. в ферментативной форме). Альтернативно, система редактирования генов может содержать агент для продуцирования нуклеазы. Например, система редактирования генов может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность нуклеазы, и дополнительную нуклеотидную последовательность, которая облегчает экспрессию/продуцирование нуклеазы в виде полипептида.

Доступные нуклеазы, способные вводить специфические и направленные DSB, включают, но не ограничиваются этим, нуклеазы с цинковым пальцем (ZFN), эффлекторные нуклеазы, подобные активатору транскрипции (TALEN) и РНК-направляемые эндонуклеазы (например, CRISPR-Cas9 или CRISPR/Cas9; короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами, ассоциированные нуклеазы 9). Дополнительные примеры нацеленных нуклеаз, пригодных для применения по данному документу, включают, без ограничения, Vxb1, phiC31, R4, phiBT1 и Wp/SPBc/TP901-1, как по отдельности, так и в комбинации. Другие неограничивающие примеры нацеливающих нуклеаз включают природные и рекомбинантные нуклеазы, например, CRISPR/Cas9, эндонуклеазы рестрикции, мегануклеазы, самонаводящиеся эндонуклеазы и тому подобное.

#### (i) Нуклеазы с цинковым пальцем (ZFN).

ZFN представляют собой нацеливающие нуклеазы, состоящие из нуклеазы, слитой с доменом связывания ДНК с цинковым пальцем (ZFB), который представляет собой полипептидный домен, связывающий ДНК специфическим для последовательности образом через один или более цинковых пальцев. Цинковый палец представляет собой домен из около 30 аминокислот в пределах связывающего домена цинкового пальца, структура которого стабилизирована за счет координации иона цинка. Примеры цинковых пальцев включают, без ограничения, цинковые пальцы C2H2, цинковые пальцы C3H и цинковые пальцы C4. Спроектированный домен цинкового пальца - это домен, не встречающийся в природе, дизайн/композиция которого является результатом главным образом рациональных критериев, например, применения правил подстановки и компьютеризированных алгоритмов обработки информации в базе данных, хранящей информацию о существующих дизайнах ZFP и данных связывания. См., например,

патенты США № 6140081; 6453242 и 6534261; см. также WO 98/53058; WO 98/53059; WO 98/53060; WO 02/016536 и WO 03/016496. Отобранный домен цинкового пальца - это домен, не встречающийся в природе, получение которого происходит в основном в результате эмпирического процесса, такого как фазовый дисплей, ловушка взаимодействия или гибридный отбор. ZFN более подробно описаны в патенте США № 7888121 и патенте США № 7972854. Наиболее известным примером ZFN является слияние нуклеазы FokI с ДНК-связывающим доменом с цинковым пальцем.

(ii) Нуклеазы TALEN.

TALEN - это нацеленная нуклеаза, содержащая нуклеазу, слитую с ДНК-связывающим доменом эффектора TAL. "Домен связывания ДНК активатора транскрипции" "домен связывания ДНК эффектора TAL" или "домен связывания ДНК эффектора TALE" - это полипептидный домен эффекторных белков TAL, который отвечает за связывание эффекторного белка TAL с ДНК. Эффекторные белки TAL секретируются патогенами растений из рода *Xanthomonas* во время инфекции. Эти белки проникают в ядро растительной клетки, связывают эффектор-специфические последовательности ДНК через свой ДНК-связывающий домен и активируют транскрипцию генов в этих последовательностях через свои транскрипционные домены. Специфичность ДНК-связывающего домена эффекторного TAL зависит от переменного для эффектора числа несовершенных 34 аминокислотных повторов, которые включают полиморфизмы в отдельных позициях повторов, называемых переменными диоснованиями повторов (RVD). Более подробно TALEN описаны в патентной заявке США № 2011/0145940. Наиболее известным примером TALEN в данной области техники является слитый полипептид нуклеазы FokI с ДНК-связывающим доменом эффектора TAL.

(iii) РНК-направляемые эндонуклеазы.

РНК-направляемые эндонуклеазы - это ферменты, которые используют сопряжение оснований РНК:ДНК для нацеливания и расщепления полинуклеотида. РНК-направляемая эндонуклеаза может расщеплять одноцепочечные полинуклеиновые кислоты или по меньшей мере одну цепь двухцепочечного полинуклеотида. Система редактирования генов может содержать одну РНК-направляемую эндонуклеазу. Альтернативно, система редактирования генов может включать по меньшей мере две (например, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или более десяти) РНК-направляемых эндонуклеаз.

Система CRISPR-Cas9 представляет собой естественный защитный механизм прокариот, который был перепрофилирован в РНК-направляемую ДНК-нацеленную платформу, используемую для редактирования генов. Она использует ДНК-нуклеазу Cas9 и две некодирующие РНК - crРНК (сrРНК) и транс-активирующую РНК (tracrРНК) - для направленного расщепления ДНК. crРНК обеспечивает распознавание последовательности и специфичность комплекса CRISPR-Cas9 посредством спаривания оснований по Уотсону-Крику, как правило, с 20-нуклеотидной (нт) последовательностью в целевой ДНК. Изменение последовательности 5' 20 нт в crРНК позволяет нацеливать комплекс CRISPR-Cas9 на специфический локус. Комплекс CRISPR-Cas9 связывается только с последовательностями ДНК, которые содержат последовательность, совпадающую с первыми 20 нт crРНК, только если за целевой последовательностью следует специфический короткий мотив ДНК (с последовательностью NGG), называемый протоспейсерным смежным мотивом (PAM). TracrРНК гибридизуется с 3' концом crРНК, образуя РНК-дуплексную структуру, которая связывается эндонуклеазой Cas9 с образованием каталитически активного комплекса CRISPR-Cas9, которые затем могут расщеплять целевую ДНК.

Как только комплекс CRISPR-Cas9 связывается с ДНК в целевом сайте, два независимых нуклеазных домена фермента Cas9 каждый расщепляют одну из цепочек ДНК выше PAM-сайта, оставляя двухцепочечный разрыв (DSB), где обе цепочки ДНК заканчиваются парой оснований (тупой конец).

Система редактирования генов может содержать эндонуклеазу CRISPR (например, CRISPR-ассоциированный белок 9 или нуклеазу Cas9). В некоторых вариантах осуществления эндонуклеаза получена от *Streptococcus aureus* (например, saCas9), хотя могут быть использованы и другие гомологи CRISPR. Следует понимать, что Cas9 может быть заменена другой РНК-направляемой эндонуклеазой, известной в данной области техники, например, Cpf1. Наконец, следует понимать, что может быть использована РНК-направляемая эндонуклеаза дикого типа или могут быть использованы модифицированные варианты (например, эволюционировавшие варианты Cas9, ортологи Cas9, химерные/смешанные белки Cas9 или другие функциональные варианты Cas9). Например, в некоторых вариантах осуществления эндонуклеаза, управляемая РНК, модифицирована таким образом, что включает сигнал ядерной локализации (NLS; англ. nuclear localization signal), такой как NLS SV40 или NLS NucleoPlasmine. Примеры других сигналов ядерной локализации известны специалистам в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления NLS включает NLS SV40 и NLS NucleoPlasmine.

В. Направляющая РНК.

В данном изобретении предложена геномно-направленная нуклеиновая кислота или агент для ее получения (например, полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую нРНК), который может направлять активность связанного полипептида (например, РНК-направленной эндонуклеазы) на конкретную целевую последовательность в целевой нуклеиновой кислоте. Нуклеиновая кислота, нацеленная на геном, может представлять собой РНК. РНК, нацеленная на геном, в данном

документе называется "направляющая РНК" или "нРНК". В некоторых вариантах осуществления системы редактирования генов содержат одну нРНК. В других вариантах осуществления система редактирования генов содержит по меньшей мере две нРНК (например, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или более десяти нРНК).

нРНК системы редактирования генов может быть предоставлена в синтезированной форме. Например, направляющая РНК может быть синтезирована химическим путем, как показано ниже и описано в данной области техники. Хотя химические синтетические процедуры постоянно расширяются, очистка таких РНК с помощью таких процедур, как высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ, которая позволяет избежать использования гелей, таких как ПААГ), становится все более сложной, поскольку длина полинуклеотидов значительно превышает сотню или около того нуклеотидов. Один из подходов, используемых для создания РНК большей длины, заключается в получении двух или более молекул, которые соединяются вместе. Более длинные РНК легче образуются ферментативным путем. Во время или после химического синтеза и/или ферментативного получения РНК могут быть введены различные виды модификаций РНК, например, модификации, которые повышают стабильность, снижают вероятность или степень врожденного иммунного ответа, и/или улучшают другие свойства, как описано в данной области техники.

Альтернативно, система редактирования генов может содержать агент для продуцирования нРНК. Например, система редактирования генов может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую нуклеотидную последовательность нРНК, и дополнительную нуклеотидную последовательность, которая облегчает экспрессию/продуцирование нРНК.

нРНК может представлять собой двухмолекулярную направляющую РНК. Двухмолекулярная нРНК состоит из двух цепей РНК. Первая цепочка может содержать в направлении от 5' к 3' необязательную последовательность удлинения спейсера, последовательность спейсера и последовательность каркаса - минимальную последовательность повтора CRISPR. Вторая цепочка содержит минимальную последовательность *tracr*РНК (комплементарную минимальной последовательности повтора CRISPR), последовательность 3' *tracr*РНК и необязательную последовательность расширения *tracr* РНК.

Альтернативно, нРНК может быть одномолекулярной направляющей РНК, содержащей спейсерную последовательность и последовательность каркаса. Одномолекулярная направляющая РНК может также содержать необязательное расширение спейсера.

#### (i) Спейсер нРНК.

Как понятно специалисту в данной области техники, каждая нРНК предназначена для включения спейсерной последовательности, комплементарной ее геномной последовательности-мишени. См. Jinek et al., *Science*, 337, 816-821 (2012) и Deltcheva et al., *Nature*, 471, 602-607 (2011). Спейсерная последовательность - это последовательность (например, последовательность из 20 нуклеотидов), которая определяет целевую последовательность (например, целевую последовательность ДНК, такую как геномная целевая последовательность) интересующей целевой нуклеиновой кислоты. нРНК может содержать спейсерную последовательность переменной длины с 17-30 нуклеотидами на 5' конце последовательности нРНК. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность имеет длину от 15 до 30 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность имеет длину 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления спейсерная последовательность имеет длину 20 нуклеотидов.

"Целевая последовательность" примыкает к последовательности РАРМ и является последовательностью, модифицированной РНК-направляемой нуклеазой (например, Cas9). "Целевая нуклеиновая кислота" представляет собой двухцепочечную молекулу: Одна цепочка содержит целевую последовательность и называется "РАРМ цепочка", а другая комплементарная цепочка называется "не-РАРМ цепочка". Специалисты в данной области техники понимают, что спейсерная последовательность нРНК гибридизуется с обратным комплементом целевой последовательности, которая находится в не-РАРМ цепочке интересующей целевой нуклеиновой кислоты. Таким образом, спейсерная последовательность нРНК является РНК-эквивалентом последовательности-мишени. Например, если целевая последовательность представляет собой 5' AGAGCAACAGTGCTGTGGCC-3' (SEQ ID NO: 13), тогда спейсерная последовательность нРНК представляет собой 5' AGAGCAACAGUGCUGGGCC-3' (SEQ ID NO: 14). Спейсер нРНК взаимодействует с интересующей целевой нуклеиновой кислотой специфическим для последовательности образом посредством гибридизации (т.е. сопряжения оснований). Таким образом, нуклеотидная последовательность спейсера варьируется в зависимости от последовательности интересующей целевой нуклеиновой кислоты.

Спейсерная последовательность предназначена для гибридизации с участком целевой нуклеиновой кислоты, который расположен 5' от РАРМ фермента Cas9, используемого в системе. Спейсер может полностью совпадать с целевой последовательностью или иметь несовпадения. Каждый фермент Cas9 имеет определенную последовательность РАРМ, которую он распознает в ДНК-мишени. Например, Cas9 S. *ruogenes* распознает в целевой нуклеиновой кислоте РАРМ, содержащий последовательность 5'-NRG-3', где R включает А или G, где N представляет собой любой нуклеотид, и N находится непосредственно в 3' последовательности целевой нуклеиновой кислоты, на которую нацелена спейсерная последовательность.

В некоторых вариантах осуществления последовательность целевой нуклеиновой кислоты содержит 20 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления последовательность целевой нуклеиновой кислоты содержит менее 20 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления последовательность целевой нуклеиновой кислоты содержит более 20 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления целевая нуклеиновая кислота содержит по меньшей мере: 5, 10, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30 или более нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления целевая нуклеиновая кислота содержит не более: 5, 10, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30 или более нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления последовательность целевой нуклеиновой кислоты включает 20 оснований непосредственно 5' от первого нуклеотида PAM. Например, в последовательности, содержащая 5'-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNRG-3', целевая нуклеиновая кислота включает последовательность, соответствующую Ns, где N - любой нуклеотид, а подчеркнутая последовательность NRG является последовательностью PAM *S. aureus*.

В некоторых вариантах осуществления нРНК для применения в системе генного редактирования, раскрытой в данном документе, может направлять расщепление РНК-направляемой эндонуклеазы в целевой сайт в положении 1220, 2068, 3821, 4262, 5041, 5052, 5278, 5343, 5538 или 6150 интрона 10 гена CFTR, где обозначенный номер соответствует нуклеотидному положению в интроне 10 гена *hsCFTR* (т.е. первый нуклеотид интрона имеет значение 1, второй - 2 и т.д.).

Иллюстративные нРНК могут содержать одну из следующих спейсерных последовательностей:

- (i) ACCCAGCCTGACACCAAATTTA (SEQ ID NO: 2);
- (ii) TACTAAAAGGCAGCCTCCTAGA (SEQ ID NO: 3);
- (iii) ATTGCTACCTTGGTTGGATGA (SEQ ID NO: 4);
- (iv) GACAGCTGGCTATCCAGGATTC (SEQ ID NO: 5);
- (v) ACTTGCAGGAGGTGAGGGATTA (SEQ ID NO: 6);
- (vi) ATTAGGGAATGCAGACTCTGGG (SEQ ID NO: 7);
- (vii) TGGGTGAGATTAGAGGCCACTG (SEQ ID NO: 8);
- (viii) TGCTTCCTCCCTTGTCTCCCTA (SEQ ID NO: 9);
- (iv) TGGCATATGAGAAAAGTCACAG (SEQ ID NO: 10) и
- (x) CCTTATTCTTTGATATACTCC (SEQ ID NO: 11).

(ii) каркас нРНК.

В некоторых вариантах осуществления нРНК дополнительно содержит каркасную последовательность. Каркасная последовательность может содержать последовательность минимальной последовательности повтора CRISPR, одномолекулярный направляющий линкер, минимальную последовательность *tracrP*РНК, последовательность 3' *tracrP*РНК и/или необязательную последовательность расширения *tracrP*РНК. В некоторых вариантах осуществления каркасная последовательность включает нуклеотидную последовательность GUUUUAGUACUCUGGAAACAGAAUCUACUAAAACAAGGCAAAAUGCCGUGUUUAUCUCGUCAACUUGUUGGCGAGAUUUU (SEQ ID NO: 12). Каркасная последовательность может быть соединена с 5' и/или 3' концом спейсерной последовательности. В некоторых вариантах осуществления каркасная последовательность соединена с 3' концом спейсерной последовательности. В других вариантах осуществления каркасная последовательность соединена с 5' концом спейсерной последовательности.

(iii) Иллюстративные последовательности нРНК.

нРНК для применения в системе редактирования генов, раскрытой в данном документе, может содержать, состоять по существу из (например, содержать до 20 дополнительных нуклеотидов на 5' конце и/или 3' конце следующих последовательностей) или состоять из одной из следующих нуклеотидных последовательностей:

(i)

accagcctgacaccaaatttaGUUUUAGUACUCUGGAAACAGAAUCUACUAAAACAA  
GGCAAAAUGCCGUGUUUAUCUCGUCAACUUGUUGGCGAGAUUUU (SEQ ID  
NO: 26);

(ii)

tactaaaaggcagcctcctagaGUUUUAGUACUCUGGAAACAGAAUCUACUAAAACAA  
GGCAAAAUGCCGUGUUUAUCUCGUCAACUUGUUGGCGAGAUUUU (SEQ ID  
NO: 27);

(iii)

attggctaccttggttgatgaGUUUUAGUACUCUGGAAACAGAAUCUACUAAAACAAG  
GCAAAAUGCCGUGUUUAUCUCGUCAACUUGUUGGCGAGAUUUU (SEQ ID  
NO: 28);

(iv)

gacagctggctatccaggattcGUUUUAGUACUCUGGAAACAGAAUCUACUAAAACAA  
GGCAAAAUGCCGUGUUUAUCUCGUCAACUUGUUGGCGAGAUUUU (SEQ ID  
NO: 29);

(v)

acttgaggaggtgagggattaGUUUUAGUACUCUGGAAACAGAAUCUACUAAAACAA  
GGCAAAAUGCCGUGUUUAUCUCGUCAACUUGUUGGCGAGAUUUU (SEQ ID  
NO: 30);

(vi)

attaggaatgcagactctgggGUUUUAGUACUCUGGAAACAGAAUCUACUAAAACAA  
GGCAAAAUGCCGUGUUUAUCUCGUCAACUUGUUGGCGAGAUUUU (SEQ ID  
NO: 31);

(vii)

tgggtgagattagaggccactgGUUUUAGUACUCUGGAAACAGAAUCUACUAAAACA  
AGGCAAAAUGCCGUGUUUAUCUCGUCAACUUGUUGGCGAGAUUUU (SEQ ID  
NO: 32);

(viii)

tgcttctccctgtctcctaGUUUUAGUACUCUGGAAACAGAAUCUACUAAAACAAG  
GCAAAAUGCCGUGUUUAUCUCGUCAACUUGUUGGCGAGAUUUU (SEQ ID  
NO: 33);

(iv)

tggcatatgagaaaagtacagGUUUUAGUACUCUGGAAACAGAAUCUACUAAAACAA  
GGCAAAAUGCCGUGUUUAUCUCGUCAACUUGUUGGCGAGAUUUU (SEQ ID  
NO: 34) и

(x)

ccctattctttgatatactccGUUUUAGUACUCUGGAAACAGAAUCUACUAAAACAAGG  
CAAAAUGCCGUGUUUAUCUCGUCAACUUGUUGGCGAGAUUUU (SEQ ID NO:  
35).

Подразумевается, что поскольку описанные выше последовательности нРНК являются последовательностями РНК. Любой Т (тимин) в последовательностях, относящихся к нРНК, будет означать U (или урацил) в контексте молекул РНК. Последовательности, содержащие Т (тимин), в данном документе охватывают как молекулы ДНК, так и молекулы РНК (где Т относится к U).

Более того, одномолекулярная нРНК может не содержать урацилов на 3' конце последовательности нРНК. В состав нРНК может входить один или более урацилов на 3' конце последовательности нРНК. Например, нРНК может содержать 1 урацил (U) на 3' конце последовательности нРНК. нРНК может содержать 2 урацила (UU) на 3' конце последовательности нРНК. нРНК может содержать 3 урацила (UUU) на 3' конце последовательности нРНК. нРНК может содержать 4 урацила (UUUU) на 3' конце последовательности нРНК. нРНК может содержать 5 урацила (UUUUU) на 3' конце последовательности нРНК. нРНК может содержать 6 урацилов (UUUUUU) на 3' конце последовательности нРНК. нРНК может со-

держат 7 урацилов (UUUUUUU) на 3' конце последовательности нРНК. нРНК может содержать 8 урацилов (UUUUUUUU) на 3' конце последовательности нРНК.

Также следует понимать, что нуклеотиды описанных выше нРНК могут содержать модифицированные нуклеиновые кислоты в любом положении нуклеотида. Соответственно, нРНК может быть немодифицированной или модифицированной. Например, модифицированные нРНК могут содержать один или более 2'-О-метилфосфориоатных нуклеотидов. Примеры дополнительных модифицированных нуклеиновых кислот известны специалистам в данной области техники.

(iv) Рибонуклеопротеиновые комплексы.

В некоторых случаях система редактирования генов, раскрытая в данном документе, может включать рибонуклеопротеиновый комплекс (РНП), в котором нРНК и нуклеаза (например, как описано выше) образуют комплекс. В контексте данного документа, термин "рибонуклеопротеин" или "РНП" относится к белку, который структурно связан с нуклеиновой кислотой (ДНК или РНК). Например, в некоторых вариантах осуществления РНК-направляемая эндонуклеаза Cas9 и нРНК системы редактирования генов находятся в форме РНП.

С. донорная матрица.

Донорную матрицу включает последовательность нуклеиновой кислоты, которая должна быть вставлена в целевой сайт в последовательности ДНК (например, в эндогенный ген). Соответственно, в некоторых вариантах осуществления донорную матрицу системы генного редактирования может включать мини-ген CFTR, содержащий экзоны с 11 по 27 гена CFTR. донорную матрицу может дополнительно включать нуклеотидную последовательность акцепторного сайта сплайсинга и/или одно или более гомологичных плечей.

Донорную матрицу системы редактирования генов может быть предоставлен в синтезированной форме. Альтернативно, система редактирования генов может содержать агент (например, нуклеиновую кислоту, такую как вектор) для получения донорной матрицы. Например, система редактирования генов может содержать нуклеиновую кислоту (например, вектор) для получения донорной матрицы.

(i) Мини-ген CFTR, содержащий экзоны 11-27 CFTR.

Донорную матрицу может включать мини-ген CFTR, кодирующий экзоны с 11 по 27 гена CFTR (например, hsCFTR). Мини-ген CFTR может содержать один или более интронов с 11 по 26, как в гене CFTR дикого типа. Например, мини-ген CFTR может включать нуклеотидную последовательность интрона, расположенную 3' к экзону 11 гена CFTR, и/или нуклеотидную последовательность интрона между одним или более экзонами 11 и 12, экзонами 12 и 13, экзонами 13 и 14, экзонами 14 и 15, экзонами 15 и 16, экзонами 16 и 17, экзонами 17 и 18, экзонами 18 и 19, экзонами 19 и 20, экзонами 20 и 21, экзонами 21 и 22, экзонами 22 и 23, экзонами 23 и 24, экзонами 24 и 25, экзонами 25 и 26, и экзонами 26 и 27. В некоторых случаях в мини-гене CFTR отсутствует по меньшей мере один из интронов 11-26.

Если мини-ген CFTR содержит нуклеотидную последовательность интрона между экзоном 11 и экзоном 27, такая последовательность интрона может быть нативным интроном CFTR. Например, интрон 3' к экзону 11 CFTR может быть интроном 10 CFTR дикого типа. Аналогичным образом 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, и/или 26 интрон CFTR дикого типа (или любая их комбинация) может располагаться между одним или более экзонами 11 и 12, экзонами 12 и 13, экзонами 13 и 14, экзонами 14 и 15, экзонами 15 и 16, экзонами 16 и 17, экзонами 17 и 18, экзонами 18 и 19, экзонами 19 и 20, экзонами 20 и 21, экзонами 21 и 22, экзонами 22 и 23, экзонами 23 и 24, экзонами 24 и 25, экзонами 25 и 26, и/или экзонами 26 и 27 (или любой их комбинацией).

Альтернативно, мини-ген CFTR может содержать синтетический интрон (т.е. не эндогенный для гена CFTR) между экзонами 11-27. В некоторых вариантах осуществления первая нуклеотидная последовательность содержит синтетический интрон между экзонами 11 и 12, экзонами 12 и 13, экзонами 13 и 14, экзонами 14 и 15, экзонами 15 и 16, экзонами 16 и 17, экзонами 17 и 18, 18 и 19, 19 и 20, 20 и 21, 21 и 22, 22 и 23, 23 и 24, 24 и 25, 25 и 26, и/или 26 и 27 (или любой их комбинацией). В некоторых вариантах осуществления синтетический интрон включает модифицированную нуклеотидную последовательность интрона CFTR (т.е. нативный интрон CFTR, который был модифицирован путем добавления или удаления одного или более нуклеотидов).

В некоторых вариантах осуществления мини-ген CFTR может быть свободен от любой последовательности интрона (например, между экзонами 11-27). В некоторых случаях мини-ген CFTR кодирует фрагмент CFTR человека дикого типа, который кодируется экзонами 11-27 гена CFTR человека дикого типа. Например, мини-ген CFTR может включать нуклеотидную последовательность, кодирующую следующий фрагмент CFTR (SEQ ID NO: 36):

```
MVIMGELEPSEGKIKHSGRISFCSQFSWIMPGTIKENIFGVSYDEYRYSVIKACQ
LEEDISKFAEKDNIVLGEGGITLSGGQARISLARA VYKDADLYLLDSPFGYLDVLTKEI
FESCVCKLMANKTRILVTSKMEHLKADKILILHEGSSYFYGTFSSELQNLQPDFSSKLMG
CDSFDQFSAERRNSILTETLHRFSLEGDAPVSWTETKKQSFKQTGEFGEKRKNSILNPINS
```

IRKFSIVQKTPLQMNGIEEDSDEPLERRLSLVPDSEQGEAILPRISVISTGPTLQARRRQSV  
 LNLMTHSVNVQGNHRKTTASTRKVSLAPQANLTELDIYSRRLSQETGLEISEEINEEDLK  
 ECFDDMESIPAVTTWNTYLRYITVHKSLIFVLIWCLVIFLAEVAASLVVLWLLGNTPLQ  
 DKGNSTHSRNNYSYAVIITSTSSYYVFYIYVGVADTLLAMGFFRGLPLVHTLITVSKILHH  
 KMLHSVQLQPMSTLNTLKAGGILNRFKDIADLLPLTIFDFIQLLLIVIGAIAVVAVLQ  
 PYIFVATVPVIVAFIMLRAYFLQTSQQLKQLESEGRSPIFTHLVTSLKGLWTLRAFGRQPY  
 FETLFHKALNLHTANWFLYLSTLRWFQMRIEMIFVIFIAVTFISILTTGEGEGRVGIILTL  
 AMNIMSTLQWAVNSSIDVDSLMSVSRVFKFIDMPTEGKPTKSTKPYKNGQLSKVMIE  
 NSHVKKDDIWPSGGQMTVKDLTAKYTEGGNAILENISFSISPGQRVGLLGRGTGSGKSTLL  
 SAFLRLNTEGEIQIDGVSWDSITLQQWRKAFGVIPQKVFIFSGTFRKNLDPYEQWSDQEI  
 WKVADEVGLRSVIEQFPGKLDVFLVDGGCVLSHGKQLMCLARSVLSKAKILLLDEPS  
 AHLDPVYQIIRRTLKQAFADCTVILCEHRIEAMLECQQFLVIEENKVRQYDSIQKLLNE  
 RSLFRQAISPSDRVKLFPHRNSSKCKSKPQIAALKEETEEVQDTRL

В одном примере мини-ген CFTR включает нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 37, которая кодирует вышеуказанный фрагмент CFTR (SEQ ID NO: 36).

Альтернативно, мини-ген CFTR может включать нуклеотидную последовательность, которая имеет 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 процентов идентичности с SEQ ID NO: 37, и кодирует функциональный фрагмент CFTR (например, SEQ ID NO: 36).

(ii) Акцепторный сайт сплайсинга.

донорную матрицу может дополнительно содержать нуклеотидный фрагмент, расположенный 5' от мини-гена CFTR, для обеспечения акцепторного сайта сплайсинга, так что 5' конец мини-гена CFTR может быть точно соединен с экзоном 9 выше посредством РНК-сплайсинга после вставки в интрон 10 гена CFTR. В некоторых примерах нуклеотидный фрагмент, несущий акцепторный сайт сплайсинга, может быть 3' концевым фрагментом интрона 10 нативного гена CFTR. В некоторых вариантах осуществления акцепторный сайт сплайсинга может быть нативным акцепторным сайтом сплайсинга интрона 10 нативного гена CFTR. В других вариантах осуществления акцепторный сайт сплайсинга может быть синтетическим (т.е. ненативным) акцепторным сайтом сплайсинга. Примеры нуклеотидных последовательностей, включающих синтетические акцепторные сайты сплайсинга, известны специалистам в данной области техники. Любой из нуклеотидных фрагментов, несущих акцепторный сайт сплайсинга, может иметь длину 50-200 нуклеотидов (например, 80-150 или 100-150 нуклеотидов).

Например, в некоторых вариантах осуществления первый фрагмент, кодирующий синтетический акцепторный сайт сплайсинга, включает от 5' до 3': TATACACTTCTGCTTAGGATGATAATTGGAGGCAAGTGAATCCTGAGCGTGATTTGATAATGACCTAATAATGATGGGTTTTATTTC AG (SEQ ID NO: 1), где 3' концевой AG является акцепторным сайтом сплайсинга.

(iii) Гомологичные плечи.

донорную матрицу может дополнительно содержать одно или более гомологичных плеч, фланкирующих мини-ген CFTR, чтобы обеспечить эффективную гомологически зависимую рекомбинацию (HDR) в интересующем геномном месте (например, интроне 10 CFTR). Длина гомологичного плеча может варьировать. Например, гомологичное плечо может иметь длину, равную по меньшей мере 50, по меньшей мере 100, по меньшей мере 150, по меньшей мере 200, по меньшей мере 250, по меньшей мере 300, по меньшей мере 350, по меньшей мере 400, по меньшей мере 450, по меньшей мере 500, по меньшей мере 550, по меньшей мере 600, по меньшей мере 650, по меньшей мере 700, по меньшей мере 750, по меньшей мере 800, по меньшей мере 850, по меньшей мере 900, по меньшей мере 950 или по меньшей мере 1000 нуклеотидов. Аналогичным образом, гомологичное плечо может иметь длину 50-100, 50-200, 50-300, 50-400, 50-500, 50-600, 50-700, 50-800, 50-900, 50-1000, 100-200, 100-300, 100-400, 100-500, 100-600, 100-700, 100-800, 100-900, 100-1000, 200-300, 200-400, 200-500, 200-600, 200-700, 200-800, 200-900, 200-1000, 300-400, 300-500, 300-600, 300-700, 300-800, 300-900, 300-1000, 400-500, 400-600, 400-700, 400-800, 400-900, 400-1000, 500-600, 500-700, 500-800, 500-900, 500-1000, 600-700, 600-800, 600-900, 600-1000, 700-800, 700-900, 700-1000, 800-900, 800-1000 или 900-1000 нуклеотидов. В частности, длина гомологичного плеча может составлять 500 нуклеотидов.

Например, в некоторых вариантах осуществления донорную матрицу содержит 5' гомологичное плечо (т.е. расположенное выше первой нуклеотидной последовательности) и 3' гомологичное плечо (т.е. расположенное ниже первой нуклеотидной последовательности), причем 5' гомологичное плечо включает последовательность нуклеиновой кислоты, которая гомологична области выше интересующего геномного участка, и при этом 3' гомологичное плечо включает последовательность нуклеиновой кислоты, которая гомологична области ниже интересующего геномного участка. В некоторых вариантах осуществления 5' гомологичное плечо и 3' гомологичное плечо включают нуклеотидные последовательности,

выбранные из группы, состоящей из:

- (i) SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18, соответственно;
- (ii) SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 20, соответственно;
- (iii) SEQ ID NO: 21 и SEQ ID NO: 22, соответственно;
- (iv) SEQ ID NO: 23 и SEQ ID NO: 24, соответственно;
- (v) SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 345, соответственно;
- (vi) SEQ ID NO: 346 и SEQ ID NO: 347, соответственно;
- (vii) SEQ ID NO: 348 и SEQ ID NO: 349, соответственно;
- (viii) SEQ ID NO: 350 и SEQ ID NO: 351, соответственно;
- (ix) SEQ ID NO: 352 и SEQ ID NO: 353, соответственно; и
- (x) SEQ ID NO: 354 и SEQ ID NO: 355, соответственно.

В других вариантах осуществления донорную матрицу может содержать 5' гомологичное плечо и не иметь 3' гомологичного плеча. В других вариантах осуществления донорную матрицу может содержать 3' гомологичное плечо и не иметь 5' гомологичного плеча. 5' или 3' гомологичное плечо может включать нуклеотидную последовательность любого из SEQ ID NO: 17-25 и SEQ ID NO: 345-355, соответственно.

Альтернативно, в донорной матрице могут отсутствовать гомологичные плечи. Например, в некоторых случаях донорную матрицу может быть интегрирован путем NHEJ-зависимого концевое присоединения после расщепления в целевом сайте.

В некоторых случаях донорную матрицу может содержать, от 5' конца к 3' концу, 5' гомологичное плечо, нуклеотидный фрагмент, содержащий акцепторный сайт сплайсинга, мини-ген CFTR и 3' концевое гомологичное плечо. Эти компоненты могут быть связаны напрямую. Альтернативно, они могут быть связаны через нуклеотидный линкер.

донорную матрицу может представлять собой ДНК или РНК, одноцепочечную и/или двухцепочечную, и может быть введен в клетку в линейной или кольцевой форме. При введении в линейной форме концы донорной последовательности могут быть защищены (например, от экзонуклеолитической деградации) методами, известными специалистам в данной области техники. Например, один или более дезоксирибонуклеотидных остатков добавляются к 3' концу линейной молекулы и/или самокомплементарные олигонуклеотиды лигируются к одному или обоим концам. См., например, Chang et al., (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:4959-4963; Nehls et al., (1996) Science 272:886-889. Дополнительные способы защиты экзогенных полинуклеотидов от деградации включают в себя, но не ограничиваются этим, добавление концевых аминогрупп и применение модифицированных межнуклеотидных связей, таких как, например, тиофосфаты, фосфорамидаты и остатки О-метилрибозы или дезоксирибозы.

донорную матрицу можно вносить в клетку в виде части векторной молекулы, имеющей дополнительные последовательности, такие как, например, точки начала репликации, промоторы и гены, кодирующие резистентность к антибиотикам. Кроме того, донорную матрицу может быть введен в виде голой нуклеиновой кислоты, нуклеиновой кислоты, объединенной с агентом, таким как липосома или поллоксамер, или может быть доставлен вирусами (например, аденовирусом, AAV, герпесвирусом, ретровирусом, лентивирусом и лентивирусом с неактивной интегразой (IDLV)).

донорную матрицу, в некоторых вариантах осуществления, вставляется так, чтобы его экспрессия управлялась эндогенным промотором, например, промотором, который управляет экспрессией эндогенного гена, в который вставляется донорную матрицу.

Кроме того, экзогенные последовательности могут также включать транскрипционные или трансляционные регуляторные последовательности, например, промоторы, энхансеры, инсуляторы, внутренние сайты входа в рибосому, последовательности, кодирующие 2A пептиды и/или сигналы полиаденилирования.

D. Система редактирования генов на основе вирусных векторов/вирусных частиц.

В некоторых вариантах осуществления система редактирования генов, раскрытая в данном документе, может содержать полинуклеиновые кислоты (например, векторы, такие как вирусные векторы) или вирусные частицы, включающие их. Полинуклеиновая кислота(ы) продуцирует компоненты (например, нуклеазу, нРНК и донорную матрицу) для редактирования гена CFTR, как описано в данном документе.

В некоторых примерах система редактирования генов содержит одну полинуклеиновую кислоту, способную продуцировать все компоненты системы редактирования генов, включая нуклеазу, нРНК и донорную матрицу. В других примерах система редактирования генов включает две полинуклеиновые кислоты, одна из которых кодирует нуклеазу и нРНК, а другая включает донорную матрицу. Альтернативно, система редактирования генов содержит две полинуклеиновые кислоты, одна из которых кодирует нуклеазу, а другая включает донорную матрицу и кодирует нРНК. В другом примере система редактирования генов включает три полинуклеиновые кислоты, первая из которых кодирует нуклеазу, вторая кодирует нРНК, а третья включает донорную матрицу.

Нуклеиновая кислота (или по меньшей мере одна нуклеиновая кислота из набора нуклеиновых кислот) может быть вектором, например, вирусным вектором, таким как ретровирусный вектор, аденови-

русный вектор, аденоассоциированный вирусный (AAV) вектор и вектор вируса простого герпеса (HSV).

В некоторых примерах система редактирования генов может содержать одну или более вирусных частиц, несущих генетические материалы для производства компонентов системы редактирования генов, как раскрыто в данном документе. Вирусная частица (например, частица AAV) может содержать один или более компонентов (или агентов для получения одного или более компонентов) системы редактирования генов (например, как описано в данном документе). Вирусная частица (или вирион) состоит из нуклеиновой кислоты, которая кодирует вирусный геном, и внешней оболочки из белка (т.е. капсида). В некоторых случаях вирусная частица дополнительно содержит оболочку из липидов, которая окружает белковую оболочку.

В некоторых примерах вирусная частица содержит полинуклеиновую кислоту, способную продуцировать все компоненты системы редактирования генов, включая нуклеазу, нРНК и донорную матрицу. В других примерах вирусная частица содержит полинуклеиновую кислоту, способную продуцировать один или более компонентов системы редактирования генов. Например, вирусная частица может содержать полинуклеиновую кислоту, способную продуцировать нуклеазу и нРНК. Альтернативно, вирусная частица может содержать полинуклеиновую кислоту, способную продуцировать донорную матрицу и кодировать нРНК. В другом примере вирусная частица может содержать полинуклеиновую кислоту, способную продуцировать только одну из нуклеаз, нРНК или донорную матрицу.

Вирусные частицы, описанные в данном документе, могут быть получены из любой вирусной частицы, известной в данной области техники, включая, но не ограничиваясь этим, ретровирусную частицу, аденовирусную частицу, аденоассоциированную вирусную частицу (AAV) или частицу вируса простого герпеса (HSV). В некоторых вариантах осуществления вирусная частица представляет собой частицу AAV.

В некоторых вариантах осуществления набор вирусных частиц содержит более одной системы редактирования генов. В некоторых вариантах осуществления каждая вирусная частица в наборе вирусных частиц представляет собой частицу AAV. В других вариантах осуществления набор вирусных частиц содержит более одного типа вирусных частиц (например, ретровирусную частицу, аденовирусную частицу, аденоассоциированную вирусную частицу (AAV) или частицу вируса простого герпеса (HSV)).

Е. Дополнительные иллюстративные системы редактирования генов.

Кроме того, система редактирования генов, раскрытая в данном документе, может содержать нуклеазу (например, фермент Cas9), раскрытый в данном документе. Такая система редактирования генов может дополнительно содержать нРНК и донорную матрицу. Нуклеаза и нРНК, необязательно в сочетании с донорной матрицей, могут образовывать РНП для доставки. Кроме того, система редактирования генов может дополнительно содержать нРНК и полинуклеиновую кислоту (например, вектор, описанный в данном документе) для получения донорной матрицы. Нуклеаза и нРНК могут образовывать комплекс РНП. Альтернативно, система редактирования генов может дополнительно содержать одну или более полинуклеиновых кислот для получения нРНК и донорной матрицы.

Альтернативно, система редактирования генов, раскрытая в данном документе, может содержать агент для продуцирования нуклеазы, например, вектор экспрессии, такой как вирусный вектор, раскрытый в данном документе, способный экспрессировать нуклеазу. Такая система редактирования генов может дополнительно содержать нРНК и/или донорную матрицу, или агенты для их получения.

Любой другой формат системы редактирования генов, содержащий компоненты, раскрытые в данном документе, для модификации гена CFTR или агенты, производящие такие агенты, входят в объем данного изобретения.

II. Способы редактирования гена трансмембранного регулятора муковисцидоза (CFTR).

В некоторых аспектах, данное изобретение относится к способам редактирования гена трансмембранного регулятора муковисцидоза (CFTR) с использованием любой из систем редактирования генов, раскрытых в данном документе. Редактируемый объект может исправить мутацию в гене CFTR. Одна или более копий (т.е. аллелей) гена (например, CFTR) могут содержать мутацию. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе способы редактирования генов могут быть использованы для коррекции по меньшей мере одной копии (т.е. аллеля) гена CFTR. В некоторых вариантах осуществления редактируются две копии (т.е. аллели) гена CFTR.

Описано более 2000 мутаций в CFTR, которые вызывают целый ряд молекулярных и функциональных фенотипов. См., например, Veit G. et al., *Mol. Biol. Cell.* 2016 Feb 1; 27(3): 424-33. Примеры включают, без ограничения, M1V, A46D, E56K, P67L, R74W, G85E, E92K, P99L, D110H, D110E, R117C, R117H, R170G, G178R, E193K, P205S, L206W, V232D, R334W, R334W, I336K, T338I, S341P, R347P, R347H, R352Q, L467P, S492F, ΔI507, ΔF508, V520F, G542X, S549R, S549N, G551S, G551N, G551D, A455E, S549N, R553X, A559T, R560T, R560S, R560K, A561E, Y569D, D579G, D614G, R668C, L927P, S945L, S977F, L997F, F1052V, H1054D, K1060T, L1065P, R1066C, R1066M, R1066H, A1067T, R1070Q, R1070W, F1074L, H1085R, M1101K, D1270N, D1152H, L1077P, S1235R, G1244E, S1251N, S1255P, W1282X, N1303K, G1349D, Q1411X, 2789+5G>A и 3849+10kbC>T. В некоторых вариантах осуществления описанные в данном документе способы могут быть использованы для исправления одной или более мутаций, перечисленных выше или известных из уровня техники.

Способ редактирования гена CFTR может включать приведение в контакт клетки с: системой редактирования генов, описанной в данном документе; вирусной частицы или набора вирусных частиц, содержащих систему редактирования генов, описанную в данном документе; и/или нуклеиновой кислотой или набором нуклеиновых кислот, содержащих систему редактирования генов, описанную в данном документе. Эти способы могут быть выполнены, например, на одной или более клетках, у живого субъекта (например, *in vivo*). Альтернативно или дополнительно, эти способы могут быть выполнены на одной или более клетках, существующих в культуре (например, *in vitro*). В некоторых случаях отредактированную в культуре клетку затем вводят субъекту (в данном документе это называется "терапия на основе клеток").

#### А. Способы доставки.

Приведение в контакт клетки (или субъекта) с системой редактирования генов, вирусной частицей или набором вирусных частиц, и/или нуклеиновой кислотой или набором нуклеиновых кислот может осуществляться с помощью различных методов доставки. Например, нуклеазы и/или донорные матрицы могут быть доставлены с помощью векторной системы, включая, без ограничения, плазмидные векторы, ДНК-минициклы, ретровирусные векторы, лентивирусные векторы, аденовирусные векторы, поксвирусные векторы; герпесвирусные векторы и аденоассоциированные вирусные векторы, а также их комбинации.

Для введения в клетки нуклеиновых кислот, кодирующих нуклеазы и донорные матрицы, можно использовать обычные методы переноса генов, основанные на вирусных и невирусных инфекциях. Системы доставки невирусных векторов включают ДНК-плазмиды, ДНК-минициклы, голую нуклеиновую кислоту и нуклеиновую кислоту, объединенную с носителями для доставки, таким как липосома или поллоксамер. Вирусные векторные системы доставки включают ДНК- и РНК-вирусы, которые после доставки в клетку имеют либо эписомальный, либо интегрированный геном.

Методы невирусной доставки нуклеиновых кислот включают, без ограничения, электропорацию, липофекцию, микроинъекцию, биолистику, виросомы, липосомы, иммунолипосомы, конъюгаты поликатион или липид:нуклеиновая кислота, голую ДНК, голую РНК, кэппированную РНК, искусственные вирионы и усиленное агентом поглощение ДНК. Для доставки нуклеиновых кислот можно также использовать сонопорирование с помощью, например, системы Sonitron 2000 (Rich-Mar).

Методы доставки белков (например, РНК-направляемых эндонуклеаз) включают, без ограничения, использование проникающих в клетки пептидов и наноносителей.

#### (i) Доставка с помощью аденоассоциированных вирусов.

Донорная нуклеиновая кислота, кодирующая экзоны с 11 по 27 гена CFTR, может быть доставлена в клетку с помощью аденоассоциированного вируса (AAV). AAVs - это небольшие вирусы, которые интегрируются в геном хозяина специфически, и поэтому могут доставлять трансген, например, экзоны с 11 по 27 гена CFTR. Инvertированные концевые повторы (ITR) присутствуют на флангах генома AAV и/или интересующего трансгена и служат в качестве точек начала репликации. Также в геноме AAV присутствуют белки гер и сар, которые при транскрипции образуют капсиды, инкапсулирующие геном AAV для доставки в клетки-мишени. Поверхностные рецепторы на этих капсидах определяют серотип AAV, который определяет, какие органы-мишени капсиды будут связывать в первую очередь и, следовательно, какие клетки AAV будут заражать наиболее эффективно. В настоящее время известно двенадцать серотипов AAV человека. В некоторых вариантах осуществления AAV представляет собой AAV серотипа 6 (AAV6).

Аденоассоциированные вирусы являются одними из наиболее часто используемых вирусов для генной терапии по нескольким причинам. Во-первых, AAV не вызывают иммунного ответа при введении млекопитающим, включая человека. Во-вторых, AAV эффективно доставляются в клетки-мишени, особенно если уделить внимание выбору подходящего серотипа AAV. Наконец, AAV обладают способностью заражать как делящиеся, так и неделящиеся клетки, поскольку геном может сохраняться в клетке-хозяине без интеграции. Этот признак делает их идеальным кандидатом для генной терапии.

#### (ii) Гомологически-направленное восстановление (HDR).

Донорная нуклеиновая кислота, кодирующая экзоны с 11 по 27 гена CFTR, может быть вставлена в целевой геномный участок редактируемой клетки методом гомологически направленной репарации (HDR). Обе цепочки ДНК в целевом геномном участке разрезаются ферментом CRISPR Cas9. Затем происходит HDR для восстановления двухцепочечного разрыва (DSB) и вставки донорной ДНК. Для того чтобы это произошло правильно, донорная последовательность конструируют с фланкирующими остатками, которые комплементарны последовательности, окружающей сайт DSB в гене-мишени (далее "гомологичные плечи"). Эти гомологичные плечи служат матрицей для репарации DSB и позволяют HDR быть по сути безошибочным механизмом. Процент направленной гомологической репарации (HDR) зависит от расстояния между мутацией и местом разреза, поэтому выбор перекрывающихся или близких целевых сайтов очень важен. Матрицы могут содержать дополнительные последовательности, фланкирующие гомологичные участки, или могут содержать последовательность, отличающуюся от геномной последовательности, что позволяет редактировать последовательность.

#### (iii) Негомологичное соединение концов (NHEJ).

Путь NHEJ также может приводить к образованию вставок, содержащих экзоны 11-27, с очень низкой частотой. Такая репарация должна корректировать экспрессию CFTR, когда вставка находится в ориентации смысловой цепи.

#### В. Клеточная терапия.

Описанные в данном документе способы могут быть выполнены на одной или более клетках, существующих в культуре (например, *in vitro*). Соответственно, в некоторых аспектах данное изобретение относится к генетически редактируемым клеткам, содержащим отредактированный ген трансмембранного регулятора муковисцидоза (CFTR), в котором экзогенная нуклеиновая кислота вставлена в интрон 10 эндогенного гена CFTR. Экзогенная последовательность может включать один или более компонентов донорной матрицы, описанных выше (например, нуклеотидную последовательность, кодирующую экзон с 11 по 27 CFTR, нуклеотидную последовательность, кодирующую акцепторный сайт сплайсинга, и/или нуклеотидную последовательность, кодирующую одно или более гомологичных плеч).

##### (i) Клетки с отредактированным геном CFTR.

Генетически отредактированные клетки могут быть получены с помощью любого из способов, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления один или более генных правок в популяции отредактированных клеток приводят к фенотипу, связанному с изменением функциональности CFTR.

В некоторых вариантах осуществления генетически отредактированные клетки по данному изобретению демонстрируют повышенную активность CFTR (например, на по меньшей мере 30%, 50%, 100%, 2-кратно, 5-кратно или 10-кратно) по сравнению с неотредактированным контролем. Например, уровень активности CFTR может быть увеличен на по меньшей мере 30%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 100%, по меньшей мере 200%, по меньшей мере 500%, по меньшей мере 1000% по сравнению с контрольными необработанными клетками. В некоторых вариантах осуществления уровень активности CFTR может быть увеличен на 30%-50%, 30%-100%, 30%-200%, 30%-500%, 30%-1000%, 50%-100%, 50%-200%, 50%-500%, 50%-1000%, 100%-200%, 100%-500%, 100%-1000%, 200%-500%, 200%-1000% или 500%-1000% по сравнению с контрольными Т-клетками.

##### (ii) Способы введения.

В некоторых случаях генетически отредактированная клетка может быть введена субъекту. Этап введения может включать размещение (например, трансплантацию) генетически модифицированных клеток в организме субъекта с помощью способа или пути, который приводит к по меньшей мере частичной локализации введенных клеток в желаемом месте, так что возникает желаемый эффект (эффекты) и где по меньшей мере часть имплантированных клеток или компонентов клеток остается жизнеспособной. Период жизнеспособности клеток после введения субъекту может составлять от нескольких часов, например, двадцати четырех часов, до нескольких суток, до нескольких лет или даже до срока жизни субъекта, т.е. долгосрочное приживание. В некоторых вариантах осуществления введение осуществляют в дыхательные пути субъекта.

Способы введения включают инъекции, инфузии, инстилляции или прием внутрь. Инъекция включает, без ограничений, внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, внутрижелудочковую, внутрикапсульную, внутриорбитальную, внутрисердечную, внутрикожную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсульную, субарахноидальную, интраспинальную, интрацереброспинальную, интрастернальную инъекцию и инфузию. В некоторых вариантах осуществления способ введения является внутривенным.

В некоторых вариантах осуществления генно-инженерные клетки вводятся системно, что означает введение популяции клеток не непосредственно в целевой участок, ткань или орган, а в систему кровообращения субъекта, где они подвергаются метаболизму и другим подобным процессам.

Для применения в различных аспектах, описанных в данном документе, эффективное количество генно-инженерных клеток включает по меньшей мере  $10^2$  клеток, по меньшей мере  $5 \times 10^2$  клеток, по меньшей мере  $10^3$  клеток, по меньшей мере  $5 \times 10^3$  клеток, по меньшей мере  $10^4$  клеток, по меньшей мере  $5 \times 10^4$  клеток, по меньшей мере  $10^5$  клеток, по меньшей мере  $2 \times 10^5$  клеток, по меньшей мере  $3 \times 10^5$  клеток, по меньшей мере  $4 \times 10^5$  клеток, по меньшей мере  $5 \times 10^5$  клеток, по меньшей мере  $6 \times 10^5$  клеток, по меньшей мере  $7 \times 10^5$  клеток, по меньшей мере  $8 \times 10^5$  клеток, по меньшей мере  $9 \times 10^5$  клеток, по меньшей мере  $1 \times 10^6$  клеток, по меньшей мере  $2 \times 10^6$  клеток, по меньшей мере  $3 \times 10^6$  клеток, по меньшей мере  $4 \times 10^6$  клеток, по меньшей мере  $5 \times 10^6$  клеток, по меньшей мере  $6 \times 10^6$  клеток, по меньшей мере  $7 \times 10^6$  клеток, по меньшей мере  $8 \times 10^6$  клеток, по меньшей мере  $9 \times 10^6$  клеток, или кратное им. В некоторых примерах, описанных в данном документе, клетки размножают в культуре перед введением нуждающемуся в этом субъекту.

#### С. Эффективное количество.

В некоторых аспектах, данное изобретение относится к способам введения эффективного количества системы редактирования генов, описанной в данном документе, вирусной частицы или набора вирусных частиц, содержащего систему редактирования генов, описанную в данном документе, нуклеиновой кислоты или набора нуклеиновых кислот, содержащего систему редактирования генов, описанную в

данном документе, или композиции отредактированных клеток, описанной в данном документе, нуждающемуся в этом субъекту.

Субъект может быть любым субъектом, для которого желательны диагностика, лечение или терапия. В некоторых вариантах реализации субъект представляет собой млекопитающее, в некоторых вариантах реализации субъект представляет собой человека. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой пациента-человека, страдающего муковисцидозом. В некоторых вариантах осуществления пациент-человек является ребенком.

Эффективное количество относится к количеству системы редактирования генов, вирусной частицы или набора вирусных частиц, содержащих систему редактирования генов, нуклеиновую кислоту или набор нуклеиновых кислот, содержащий систему редактирования генов, или популяции генно-инженерных клеток, необходимых для предотвращения или облегчения по меньшей мере одного или более признаков или симптомов медицинского состояния (например, МВ), и относится к достаточному количеству композиции для обеспечения желаемого эффекта (например, для лечения субъекта, страдающего МВ). Эффективное количество также включает количество, достаточное для предотвращения или задержки развития симптома заболевания, изменения течения симптома заболевания (например, но не ограничиваясь этим, замедления прогрессирования симптома заболевания) или обращения развития симптома заболевания. Подразумевается, что для любого конкретного случая соответствующее эффективное количество может быть определено специалистом в данной области техники с помощью обычного эксперимента.

Эффективность лечения с использованием композиции для лечения медицинского состояния, может быть определена квалифицированным врачом. Лечение считается "эффективным лечением", если какой-либо один или все признаки или симптомы, в качестве одного из примеров, уровни функциональной цели изменяются благоприятным образом (например, увеличиваются на по меньшей мере 10%), или улучшаются или ослабляются другие клинически признанные симптомы или маркеры заболевания (например, МВ). Эффективность также может измеряться отсутствием ухудшения состояния пациента, оцениваемого по госпитализации или необходимости медицинского вмешательства (например, прогрессирование заболевания остановлено или, по меньшей мере, замедлено). Методы измерения этих показателей известны специалистам в данной области техники и/или описаны в данном документе. Лечение включает любое лечение заболевания у субъекта и включает: (1) подавление болезни, например, остановку или замедление прогрессирования симптомов; или (2) облегчение болезни, например, вызов регресса симптомов; и (3) предотвращение или снижение вероятности развития симптомов.

### III. Наборы для терапевтического применения.

В данном изобретении также предложены наборы для применения описанных в данном документе композиций. Например, в данном изобретении предложены наборы, содержащие систему редактирования генов, описанную в данном документе; вирусную частицу или набор вирусных частиц, содержащих систему редактирования генов, описанную в данном документе; нуклеиновую кислоту или набор нуклеиновых кислот, содержащих систему редактирования генов, описанную в данном документе; и/или популяцию генетически измененных клеток, описанную в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления набор может дополнительно содержать инструкции по применению любого из описанных в данном документе способов. Включенные инструкции могут содержать описание: (i) по доставке системы редактирования генов, описанной в данном документе; вирусной частицы или набора вирусных частиц, содержащих систему редактирования генов, описанную в данном документе, и/или нуклеиновой кислоты или набора нуклеиновых кислот, содержащих систему редактирования генов, описанную в данном документе; и/или (ii) по введению популяции генетически измененных клеток, описанной в данном документе.

Набор может дополнительно содержать описание выбора субъекта, подходящего для лечения, на основе определения того, нуждается ли субъект в лечении. Инструкции, могут включать информацию о дозировке, схеме применения препарата и способе введения для предполагаемого лечения. Контейнеры могут быть стандартными дозами, упаковками со множеством доз (например, многодозовыми упаковками) или частичными дозами. Инструкции, поставляемые в наборах по изобретению, обычно представляют собой письменные инструкции на этикетке или листке-вкладыше. Этикетка или листок-вкладыш указывают, что фармацевтические композиции применяются для лечения, задержки начала и/или облегчения заболевания или расстройства у субъекта.

Предлагаемые в данном документе наборы находятся в подходящей упаковке. Подходящая упаковка включает флаконы, бутылки, банки, гибкую упаковку и т.п., но не ограничивается этим. Также предусмотрены упаковки для применения в комбинации с конкретным устройством, таким как ингалятор, устройство для назального введения или устройство для инфузии. Набор может иметь стерильный порт доступа (например, контейнер может представлять собой пакет с раствором для внутривенного введения или флакон, имеющий пробку, которую можно проткнуть иглой для подкожных инъекций). Контейнер может также иметь порт для стерильного доступа.

Наборы необязательно могут содержать дополнительные компоненты, такие как буферы и интерпретирующую информацию. Обычно набор включает контейнер и этикетку или листок-вкладыш(и) на

контейнере или связанные с ним. В некоторых вариантах осуществления в изобретении предложены изделия, содержащие содержимое наборов, описанных выше.

#### IV. Общие методики.

В практическом применении данного изобретения будут использоваться, если не указано иное, обычные методы молекулярной биологии (включая рекомбинантные методы), микробиологии, клеточной биологии, биохимии и иммунологии, которые находятся в пределах компетенции специалистов в данной области. Такие методы полностью описаны в литературе, например в *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, second edition (Sambrook, et al., 1989) Cold Spring Harbor Press; *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait, ed. 1984); *Methods in Molecular Biology*, Humana Press; *Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J. E. Cellis, ed., 1989) Academic Press; *Animal Cell Culture* (R. I. Freshney, ed. 1987); *Introduction to Cell and Tissue Culture* (J. P. Mather and P. E. Roberts, 1998) Plenum Press; *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* (A. Doyle, J. B. Griffiths, and D. G. Newell, eds. 1993-8) J. Wiley and Sons; *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.); *Handbook of Experimental Immunology* (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds.): *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J. M. Miller and M. P. Calos, eds., 1987); *Current Protocols in Molecular Biology* (F. M. Ausubel, et al. eds. 1987); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis, et al., eds. 1994); *Current Protocols in Immunology* (J. E. Coligan et al., eds., 1991); *Short Protocols in Molecular Biology* (Wiley and Sons, 1999); *Immunobiology* (C.A. Janeway and P. Travers, 1997); *Antibodies* (P. Finch, 1997); *Antibodies: a practice approach* (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); *Monoclonal antibodies: a practical approach* (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); *Using antibodies: a laboratory manual* (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); *The Antibodies* (M. Zanetti and J. D. Capra, eds. Harwood Academic Publishers, 1995); *DNA Cloning: A practical Approach*, Volumes I and II (D.N. Glover ed. 1985); *Nucleic Acid Hybridization* (B.D. Hames & S.J. Higgins eds.(1985"; *Transcription and Translation* (B.D. Hames & S.J. Higgins, eds. (1984"; *Animal Cell Culture* (R.I. Freshney, ed. (1986"; *Immobilized Cells and Enzymes* (IRL Press, (1986"; and B. Perbal, *A practical Guide To Molecular Cloning* (1984); F.M. Ausubel et al. (eds.).

Без дальнейшего уточнения считается, что специалист в данной области техники может, основываясь на приведенном выше описании, использовать данное изобретение в его самом полном объеме. Таким образом, следующие ниже конкретные варианты осуществления следует воспринимать как просто иллюстративные, а не как ограничивающие остальную часть изобретения каким-либо образом. Все публикации, цитируемые в данном документе, включены посредством ссылки для целей или объекта изобретения, упомянутых в данном документе.

#### Примеры

Пример 1. Системы редактирования генов для генетической модификации гена CFTR. Способы.

Клетки и культура: Клетки-предшественники легких (КПЛ) были получены из легких доноров людей с диагнозом муковисцидоз. Идентификационные номера доноров КПЛ 14071 и 14335 содержат генотип CFTR dF508/dF508 и dF508/G542X, соответственно. КПЛ были получены и размножены с использованием среды роста бронхиальных эпителиальных клеток BEGM™ (Lonza), дополненной фирменными реагентами Vertex.

Бронхиальные эпителиальные клетки человека (БЭКЧ) были получены путем направленной дифференцировки КПЛ с использованием формата культуры Air Liquid Interface (ALI). 80000 клеток КПЛ были посеяны в каждую лунку на апикальной стороне планшета ALI-96. КПЛ питали с апикальной и базолатеральной стороны каждый день в течение 5 суток, используя среду для роста бронхиальных эпителиальных клеток BEGM™ (Lonza), дополненную фирменными реагентами Vertex. На 6-е сутки апикальная среда была удалена, чтобы способствовать развитию воздушно-жидкостной среды раздела. Базолатеральная среда была заменена на фирменную среду HBE компании Vertex для дифференцировки. Клетки питали каждые двое суток, заменяя среду дифференцировки HBE на базолатеральной стороне. Полная дифференцировка HBE была достигнута через 5 недель дифференцировки HBE.

Реагенты для редактирования генов CRISPR-Cas9: Синтетические нРНК были приобретены у компании Synthego. нРНК были очищены с помощью ВЭЖХ (высокоэффективной жидкостной хроматографии) и содержали химически модифицированные нуклеотиды (2'-О-метил 3'-фосфоротиоат) в трех концевых положениях на 5' и 3' концах. нРНК содержали спейсерную последовательность длиной 22 нуклеотида для специфической мишени интрона 10 гена CFTR (см. табл. 1) и спейсерную последовательность длиной 80 нуклеотидов, позволяющую связываться с белком saCas9.

мРНК saCas9 была разработана компанией CRISPR Therapeutics и синтезирована компанией TriLink Biotechnologies. мРНК saCas9 экспрессирует *Staphylococcus aureus* Cas9 (код записи Uniprot J7RUA5) с сигналами ядерной локализации SV40 и NucleoPlasmine. мРНК saCas9 также содержит структуру CAP1 и полиаденилированный сигнал для достижения оптимального уровня экспрессии в клетках млекопитающих. мРНК saCAS9 была очищена с помощью ВЭЖХ.

Интрон 10 hsCFTR (SEQ ID NO: 38).

GTAGTTCTTTTGTTCCTTCACTATTAAGAACTTAATTTGGTGTCCATGTCTCTTT  
TTTTTTCTAGTTTGTAGTGCTGGAAGGTATTTTTGGAGAAATCTTACATGAGCATT  
GGAGAATGTATGGGTGTAGTGTCTTGTATAATAGAAATTGTTCCACTGATAATTTAC  
TCTAGTTTTTTATTTCCCTCATATTATTTTCAGTGGCTTTTTCTCCACATCTTTATATTT  
TGCACCACATTCAACACTGTATCTTGCACATGGCGAGCATTCAATAACTTTATTGAA  
TAAACAAATCATCCATTTTATCCATTCTTAACCAGAACAGACATTTTTTCAGAGCTG  
GTCCAGGAAAATCATGACTTACATTTTGCCTTAGTAACCACATAAAACAAAAGGTCTC  
CATTTTTGTAAACATTACAATTTTCAGAATAGATTTAGATTTGCTTATGATATATTAT  
AAGGAAAAATTATTTAGTGGGATAGTTTTTTGAGGAAATACATAGGAATGTTAATTT  
ATTCAGTGGTCATCCTCTTCTCCATATCCCACCCTAAGAACAACCTAACCTGGCATAT  
TTGGAGATACATCTGAAAAAATAGTAGATTAGAAAAGAAAAACAGCAAAAAGGACC  
AAAACCTTTATTGTCAGGAGAAGACTTTGTAGTGATCTTCAAGAATATAACCCATTGT  
GTAGATAATGGTAAAAACTTGCTCTCTTTAACTATTGAGGAAATAAATTTAAAGAC  
ATGAAAGAATCAAATTAGAGATGAGAAAGAGCTTTCTAGTATTAGAATGGGCTAAA  
GGGCAATAGGTATTTGCTTCAGAAGTCTATAAAATGGTTCCTTGTTCCTTTGATTG  
TCATTTTAGCTGTGGTACTTTGTAGAAATGTGAGAAAAAGTTTAGTGGTCTCTTGAA  
GCTTTTCAAATACTTTCTAGAATTATACCGAATAATCTAAGACAAACAGAAAAAG  
AAAAGAGAGGAAAGGAAAGAAAGAAAGAAAGTAAAGGAAAGAAAGGAAAGTAAAGGAAAGG  
AAGGAAGGAAAGAAGGAAGGAAGTAAGAGGGAAGCAGTGCTGCTGTAGGTAA  
AAATGTTAATGAAAATAGAAATTAAGAAAGACTCCTGAAAGGCAATTATTTATCAA  
TATCTAAGATGAGGAGAACCATATTTTGAAGAATTGAATATGAGACTTGGGAAACA  
AAATGCCACAAAAAATTTCCACTCAATAAATTTGGTGTGAGGCTGGGTGCAGTGGCT  
CACACTTGTAATCCTAGCACTTTTGGAGGCAGAGGCAGGTGAATTGCTTGAGTCCAG  
GAGTTTGAGACCAGCGTGGGCAACATGGCAAACCCACCTCTACAAAAACACAAA  
CAAAAGAAAATAGCTGGGTGTGGTGGTGTGTGCCTGTAGTCCCAGCTACTTGGGAG  
GCTGAGGTGGGAGGATCACCTGAGCCTGAGAAGTGGAGGCTGCAGTGAGCCATGAT  
TGCACCCTGTACCCTAGCCTAGGTGATAGGCTCAAAAAAAAAAAAAAATTGGTGTT  
TGCAATGCTAATAATAACAATTTGGTTGTTTCTCTCTCCAGTTGTTTTCTACATACGA  
AACAGCTTTTAAACAAAATAGCTGGAATTGTGCATTTTTTTCTTACAAAAACATTTT

CTTCTTAAAATGTTATTATTTTTCTTTTATATCTTGTATATTACTAGCAGTGTC  
ACTATTA AAAAATTATACTATAGGAGGGGCTGATACTAAATAAGTTAGCAATGGTCT  
AAACAAGGATGTTTATTTATGAAAAGGTAGTAATTGTGTTTCATAGAATTTTTAAAA  
TTAATTCTGCGTATGTCTTCAAGATCAATTCTATGATAGATGTGCAAAAATAGCTTT  
GGAATTACAAATTCCAAGACTTACTGGCAATTA AATTTTCAGGCAGTTTTATTAAAAT  
TGATGAGCAGATAATTACTGGCTGACAGTGCAGTTATAGCTTATGAAAAGCAGCTAT  
GAAGGCAGAGTTAGAGGAAGGCAGTGGTCCCTTGGGAATATTTAAACACTTCTGAG  
AAACGGAGTTTACTAACTCAATCTAGGAGGCTGCCTTTTAGTAGTATTAGGAATGGA  
ACACTTTATAGTTTTTTTTGGACAAAAGATCTAGCTAAAATATAAGATTGAATAATT  
GAAAATATTAACATTTTTAAGTTAAATCTTACCCACTCAATACAATTTGGTAATTTGT  
ATCAGAAGCTTAAAAGATAACCTAATAGTTCTTCTACTTCTATACTTACCCAAATA  
TGTTTGCAGAGATCTTATGTAAAGCTCTTCATTATAACACTGCTTTCAGGAGCCAAA  
AATTGGGTGGGGGAGCCCCATAAATGTTGAATAATAGGGGTTTGATTAGATAAATTT  
TGGTGTAGTTCTATAATGGCGTGTTATTCAGCCAATAAAAAGGTTTGTTAAAGAATGA  
CTGTGACGGATGTATATGATATACTCTAAGTGAATAAAGAGTTACAAAATGTTATG  
TACAAGTTACAAAATGTATGTACATTATGATCCATTTTTTCATAAAAATCATATGTATGT  
ATATATGTGTGCTGGAAGGATAAATTTATCAAGTTGTTATCTCTGAAATTTTTGGGT  
ATATTTTATATTTCTAGATTTTCTGTTACTTTGTTACTTTACTGATAAAGTAATAACGT  
TGTTGACTTTTGTCACTCTCCCCTATTAATAATCATCTAGGCTGCAAAAGGATCATGT  
CTTCTTTATTTTTATATTCCAAGGACTGTCAACAAGTGCCTAGCACTTGACAGGTATA  
TTATAGAAATTTAACTGAATATCTTTAGGAAATAGATTTTTGTTTGTAGTTGTTCTAG  
TCTACATTAATGTCTTGGCCTTATGAAACTTCCTTGAATTATTTTAGTGAAGCAATA  
TTAGTATAGAATTTTGCATCACTGGATGCCCTTGACTGAAAGCTGGCTTATGGCATC  
TCACCAGTGTGTGGGGAGTTTCAGTCCTTCTGTTGTCTGCATCACAGCTGAAGCAGT  
GCTGTTGCTGACAATTCCTGACACCACCTTGCTCTATTATTGATCATTGCCCTACTA  
TGGTACTGAGTTTTAGCTTATTCTTGTAATAACTGGGACTCATATGTATAGAATAAG  
CTATTAGCTCACGTTTTTGGCTTGTCTTTTATACAGAATACATGTCTGCAAATAGTTTT  
ATCAATATTTTGAATTTTGGGAGATATGAAGTTAAAACATCATTGAATATATATA  
TATACACACACACATATATATATGACACTATACATGATTTATTTTATTTAATTTTTAA  
AATTTTATTCTTTTTAGAGATTAGGCTTACTCTGTCAACCAGGCTGAACTTCAGTGG  
TGTGATCATAGCTCACTGTAACCTTGAACCTCGGGCTCAATTGACCTTCCGCTTCA  
GCCTCCCAAAGTGCTGGGTTTATAGGCATGAGCCACTGTGTCTGGTCCAATATGCAT  
ATATATATTTTTAACCTGGATTATCAGAGCTATATTGTGTTTAGGTTTATAAAGCTGT  
ACTATGTGAAAATATCACTTCTAGGTTAATTTTGTACAAAGGAATTTTATATAGAA  
ATGAGGTAATTCAGATTTTTTCCCATGTAATAAGAATTGTA AAAATTTACTGAAACAA  
ACATCAAAAAGATATCTGTTACATGACCTTCCTTTCTTTTGAATATATTTCAAGGTGAT  
ATTATTTATTA AAAATTTAAAATGAAAATTA AAAATATATAAAAAGTTGAAAATTATT  
CCTTTCTTACTGTCTCTCATCTGTCCATTTTCCATTCTCCTGCATTCCCTCATCCAAC  
CAAGGTAGCCAATCCAGGTAACTTTTTTTTAGTATCTTCCCAGAGATGTTTCTCTCTAT  
ATATATAATCAATATACATTTTTTATTATCCCCACCTCTTTTTTATGTAACAATAT

GCAGAGTTTTGCTTCTTGCTTTTCCCCTACTATCTTGGACAACCTTCCATATTCAAAGCA  
CAGAGGACTTGCACATATGTTTCAGACTGCTGAATATTTCTGTCTCTCCCCTGCCATTC  
ATATGTTGAAATCCTAATTCCCAAGGTGATGGTATTGCAGGGTGGGGCCTTTGGGAG  
GTGATTAGTCCATGAGGGTGAAGTCTTTAGTAAATGAGATTAGTGTCTTTATAAAAAG  
AAACCTTAGAGAGACCCTCACACCTTAGAGAGACCCTCACCCCTTTCTGCCATGTGA  
GAACACAGCAGGAAGACAGCTGGCTATCCAGGATTGAGGAGTCTCTTAGCAGACCC  
AAATCTGCTGGCACCTTGATCTTGGACTCCCAGCCTCCAGAACTGTGAGAAATAAA  
TTCCTGTTGTTTATAAGCCACACAGTTCATGGTATTTTGTATAGCAGCCTGAACAAG  
GACACACACACACACACACACATGCACACACATTTAAATAGATGCATAGTATTC  
TATCATATGGATGGATATTCTATGATATAATGAATCACTATTGATTGACATTTGGGTT  
GTTTCCAATATTTTGTAAACACAAAGAACAACACTACAAATAACTTTATATACATAT  
CATTTAGCACATCTGCAATTGTATCAGTAGGCTTCCTATAAGTGGTCAAGCATTTGT  
GTACTTGTGATTTTGGTAGATGTTGTCAAATGTCCTTCCCTGAAATTTGTACCAATTC  
GTACTCATGCCATACACTCTAAATAGAGTGTGATTTCCCACAGCATTACTAACAG  
ATGATATTATCTAATTTAAAAAGTTTCTCATCTTATAGGGAAAATAGTATGTCAATG  
TATTCTTAACTTGCATTTCTTTTATTATAAGTAGTGTAAAATATCATTTCAACTTATA  
CACAGGAGGAATTTCTCTCTATATAAAGTGATCCTAGAATCATAATGAAAAATATCA  
CCAACCTCATTAGGAAAATGTACAAAGGATTGAATAGATATCTCATCAAAAATAAAA  
ATATAAGTGGCCTTTAAACATTGAAAGGTAACATTTGAACAAAGACTTGCAGGAGG  
TGAGGGATTAGGGAATGCAGACTCTGGGAAGAGTCTTCCAAGTAGCAGGTGAAGCA  
AGTGCAAAGCTTTCAGATGGGACTGACTATACTGTCTGGTTTGAAGAACAGTAAG  
GAGGTCACTGAGGCTGGCATAGAGTAAGACAGGGAGGGTAGAATACTGTCAGAGA  
AGTAATCGGCGGTGGAGGTAGGGGGTAAACCATAAAGTGCTCGTAAAGACTAAGGC  
TTATTTCTCTGGGTGAGATTAGAGGCCACTGGAGAGTTTTAAACAGAAGTAACAGG  
GCCACTTTGGCTAATGTTTTTAGGCTATTCTGTAGGGAGACAAGGGAGGAAGCAAG  
GAGATGAGTTAGGAGTCTATTGTGCCAGTTCAGGCAAGTGATGATGGTGGCTTGATC  
CAGGTAGTAGTGGAAAGTAGTATAGTAGGAAGTGATCAGATTCAGGACATGCTTTGA  
AGGAAGATCCAATAGGATTAATGGATAAGTTGAACAATGGCATATGAGAAAAGTCA  
CAGAGGAGTCAAAGATGATTCCAAGCTTTCTGGACTGAGTAACTGGAAGGATAAAT  
GTGCCGTTTACTAGAAAAGATAATGGGAGAAACAGGTTTTGGATGGAGCTTGTTTTG  
GGAATATTAAGTTTGAATGCCTATTTGACATCCAAATAGAGATGTTAGTTGGATGT  
ACAAGTCTAGTTTCAAGGAAGAGGGGCTGGTAGTGTGAAGATGGGGCTGGATAAG  
ATTCTAAAGGAAAGAGGGTTGATAAGAAGAGAAAGGGGTGTAGGGGTTAGCCTAA  
GGGCATTCTAAGTATTAGAGGTTAAGGAGGTGGGTGAAGAAAACCCAATAAAATAA  
AAGTCTGAGAAGACAAAGCTAGTGAATGAATGTGGTATCCCGGAACCCAACCTGATG  
TCAAGCAGAAGGGTGTATCAACTAGGTCAAATGCTCATTCAAGTAAGATGAA  
ACTGTTATAATTAACCGGTGTCTTCTGAAATACGGAGATAACTCGTGACTTAATGAA  
AGCAATAGTAGAGAAGGTCAAACCTTGACCAGAATGAAATTAGAAAAGATAAGAGG  
AAAGAAAAGACCAAATACAGACAACCATTGATGCCTTATTCTTTGATATACTCCTG  
GAGTCCACTTGCTAATACAATTGACCCTTAAACAATACAGGCTTGAAGTGCATGGGT

CCACTTATTTGTGAATTTTTTTTCAGTTAATACATTGGAAAATTTTTGGGGTTTTTTG  
ACAATTTGAAAAAACTCACAACTGTCTAGCCTAGAAATACCGAGAAAATTAAGAA  
AAAGTAAGATATGCCATGAATGCATAAAATATATGTAGACACTAGCCTATTTTATCA  
TTTGCTACTATAAAATATACACAATCTATTATAAAAAAGTTAAAATTTATCAAACTT  
AACACACACTAACACCTACCCTACCTGGCACCATTACAGTAAAGAGAAATGTAAA  
TAAACATAAAAAATGTAGTATTAACCATAATGGCATAAAACTAATTGTAGTACATAT  
GGTACTACTGTAATAATTTGGAAGCCACTTCCTGTTGCTATTACGGTAAGCTCAAGC  
ATTGTGGATAGCCATTTAAAACACCACGTGATGCTAATCATCTCCGTGTGAGCAGTT  
CTCTCTCCAGTAAATTGCATATTGCAGTAAAAAGTGATCTCTAGTGGTTCTCGCATA  
TTTTTCATCATGTTTGTAGTGAATGCCATAAACCTTGAATAACATCAAGCAATCCATA  
CAAAGTGCCACTAGTGATGCACGGAAAAGTTGTAACAGTACAAGAAAAAAGTTGAG  
TTGCTTGGTATTTACCATATATTGAGGTCTGCAGCTACAGTTGCCTGCAATTTTCGAGA  
TAAATGAACCCAGTATAAAGACTGTTGTAACAAAAGAAAAGAAAATGTGAAACCAT  
CAGTGCAGCTATGCCAGCAGGTGTGAAGTCTTGCACTTTTTGCAAAAATACAAAATAT  
GAAATATGTGTTAATTGACTGTTTATGTTATCTGTAAGGTTTCCACTCAACAATAGG  
CTATTAGTAGTTAAGTTTTTGTGGAGTCAAAAATTATACGTGGATTTTTGACTATACA  
GTGGGTTGGCACCCCTAACCTTCATGTTGATAAAGGGTCAATGGTATATTATTTAAT  
TTTTTTGTATTTATATTCATAAATAAGATTAATCTATATTTCCAAGTAATCTCTATA  
AGATTTTGTTATTAATATTACTATTATTTTTGAGACAGAGTCTTACTGTCACCAGGCT  
GGAGCACAGTGGTGGGATCTCGGCTCACTGCAACCTCTGCCTCCCGGGCTCAAGCAA  
TTCTCCTGCCTCACCTCCCAAGTAGCTGGGACTACAGGCACGCACAACCACACTCA  
GCTAATTTTTGTATTTTTAGTAGAGACGGGGTTTACCATGTTGGCCAGGATGGTATT  
GATCTCTTGACCTCATGATCTGCCTGCCTCGGCCTCCCAAAGTGTTGGGATTACAGG  
CATGAGCCACTGTGCACAGCCATTAATATTATTGTTACCCAATAAAAAAATTTGGA  
AACTTGTCTTCTTTTCCCTGATTCTGTTTAAATAGCACTGGAGTTACCTGTTTTGAA  
TTTTTTTTCCAAGCGGTCCCTTATGAGTTTTCTCTATGTTTTATTGTTTCATTTCTTTT  
TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGAGACGGAGTCTCGCTCTGTGCGCCAGGCTGGAGTGCA  
GTGGCGGGATCTCGGCTCACTGCAAGCTCCGCCTCCCGGGTTCAGCCATTCTCCTG  
CCTCAGCCTCCCAAGTAGCTGGGACTACAGGCGCCCGCCACTACGCCCAGGCTAATTT  
TTTGTATTTTTAGTAGAGACGGGGTTTACCAGTTTTAGCCGGGATGGTCTCGATCTCC  
TGACCTCGTGATCCGCCCCGCCTCGGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAGGCGTGAGC  
CACCGCGCCCGGCTGTTTCATTTCTTATATCGTATTTTTGCAACTCCTTTATTGATA  
CTTTTCTCCTGATTAGGTTTCTACTAAAACCAAACAAGCTTTCCATGAATTAGCTTT  
TAGATTTACTTATTAGTTTAACTGTTCTGTTGTATTGTAACCTATTAATTTATAATTTT  
ATCTTTATTAATTATTCTATTTTTCTTCGCTTTTTTGTGTTTTTCTAGTTTTTGTAGTTA  
GATGTTTGACGCTTTTTTAAAAAGCTGTGCATTTTCTCTGGGTAATACTTTAGCTGT  
ATATTATGTATTCTGATATATAGTGTTCATTACATTGTTTTCTAGAAAATCTGTAG  
CTTTGATTTATATTTGTTTCTCTTTGACCTAAGATATCCTAAGGGAAAATTTAACAT  
TTCCAGAAAGAAAACAAATTTTCTTTGTTTTCCAAGAATGTTGTTCAAATTATTCT  
ACTGCTTGGAAATTTTATCATTTTTGTGTATCCAGTAAATAGTCAATATTTGTAATTG

CTCTCTGACCACATAAAAAGAATATATTCGTGTAGTTTCTATTAATAGATTAGAGTTC  
AATTCAGATATTAATGTACATCATTATTCATGATATTTAGGTCTTCTACATCTTCAC  
TTATCTTTTTTCTACTTGCTTTGCCATTAACAGATAAAAGTTGAATTAAGGCTTCTAC  
TACATACATTTCTCCCTGTTATTCCCTATAGGTTCTGTAATTTTTGCTTCAAGAATATT  
GCTTTTTAAATTTAATATATAGATACTTATAATTACACTCTAGCATTATAAAGAGCCT  
TTTCTTTTTCAATTGAATGTATTTGGGCTGCATATGTCTAACATGAAAATTATAGTCC  
TTTTTTGTTTCTTTGTTTGTATTTACAGTTTTAAGTTCCATTTTCAACCTTTATGCACT  
CTTTGCTTTAGGTGTGTCTCTTTTAGTTAGCATAAAGTTAGGTTTGTCTTTAATTTAC  
CTGAAGTCTTTTCCCTCTTAATAGATGGGTTAAGCCAACCTGAAAAATAAACTGACTT  
ATATACTTTTATTTCAAGTATGTCCCTCCACAAATATTTTTTGAATAGATTAGCTTATA  
TACTTTGGAATTTGTTAAAAAAGATTTTTATAAAAAATAATTGTGGTGAAATGTAC  
ATAACATAAAATTTATCATTGTGACCATTTTTAAGGGCATAGCTCTGTGGCATAAAG  
TATACTCACATAGTTGTGCAACTATCACCTCCTTTGATTTTTTTTTACTAATTTTGTA  
AATTTGTTTCATCTGAGCTGTCTTATATGTTTTGTTTTATGTTTTTCTTTCTTTATTA  
TGAAGTCACTGTATTGTCTGTAGGCTATATGTATCTGTGAGTGTGTGTATATGTGT  
GTATTATGGTTTTTAAAAAGTCTATATTTGTTTTCCAGTGGCTATACTTAATACTAA  
TAACTTTATGTAAATTTTTTCACTTATGTGACTCTAGTTCACTAATATGAGCTCTGA  
TAAAATCAGTGCTTTTTCGAGGTTAGGAGATCAAGACCATCCTGGCTAACACAGTGA  
AACTCCGCTCTACTAAAAATACAAAAATTAGCCAGACGTGATGGCGGGTGCCCG  
TAGTCCCAGCTACTCGGGAGGCTGAGGCAGGAGAATGGCGTGAACCCAGGAGGCAG  
AACTTGCAGTGAGCCGAGATCGCGCCACTGCACTCTAGCCTGGGTGACAGAGTGAG  
ACTCTGTCTCTAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATCAGTGCTTT  
TTCTTCTCTGCTACCTCCTTTCTTCTACTCAGTTTTAGTCAGTAGTATTATCTTTTT  
TCAGATTTATCTTTGTATTGTTAAATCTGCTTATGCTTCTATTACTTTATTTATTAGCT  
TTAAATGATACCTTTTGACTTTTCAGTTTTTCTTAATAAAGCAATCAGCAAATTTCTT  
TACTCTCACACTTATACCCATTTCTTTGTTTGTATTTGGTTTTTACTTCTAACT  
TTTCTTATTGTCAGGACATATAACATATTTAACTTTGTTTTTCAACTCGAATCTGCG  
CATTAGTTTTAATTTTTGTTTACAGTTATATAAATCTTTGTTCACTGATAGTCCTTTTG  
TACTATCATCTCTTAAATGACTTTTACTCCAAGAAAGGCTCATGGGAACAATATTA  
CCTGAATATGTCTCTATTACTTAATCTGTACCTAATAATATGAAGGTAATCTACTTTG  
TAGGATTTCTGTGAAGATTAATAAATTAATATAGTTAAAGCACATAGAACAGCACT  
CGACACAGAGTGAGCACTTTGGCAACTGTTAGCTGTACTAACCTTTCCCATTCTTCTT  
CCAAACCTATTCCAACCTATCTGAATCATGTGCCCTTCTCTGTGAACCTCTATCATAA  
TACTTGTCACTGTATTGTAATTGTCTCTTTTACTTTCCCTTGTATCTTTTGTGCATA  
GCAGAGTACCTGAAACAGGAAGTATTTTAAATATTTGAATCAAATGAGTTAATAG  
AATCTTTACAAATAAGAATATACACTTCTGCTTAGGATGATAATTGGAGGCAAGTGA  
ATCCTGAGCGTGATTTGATAATGACCTAATAATGATGGGTTTTATTTCCAG

Индел-скрининг нРНК с соответствующими инделами и коэффициентами выживаемости клеток

ID	спейсерные	Процент	СЗ	Процент	СЗ	SEQ
нРНК	последовательности нРНК	INDEL (%)	(%)	выживаемости клеток (%)	(%)	ID NO:
Без нРНК	Н/О - Отрицательный контроль	2,0	1,3	100,0	0,4	
VEGFA	CCAUCCCCUCUUUA GCCAGAGC	89,6	0,6	93,7	1,8	39
278	UGGCGAGCAUUCAA UAACUUUA	0,8	0,8	98,4	1,4	40
306	GUUCUGGUUAAGAA UGGAUAAA	2,4	1,7	96,7	1,2	41
315	AAAAUGUCUGUUCU GGUUAAGA	5,2	3,6	95,5	0,9	42
320	UGAAAAAAUGUCUG UUCUGGUU	4,3	0,6	89,0	3,0	43
505	AUAGUUUUUGAGG AAAUACAU	4,8	1,9	88,5	2,5	44
550	CCAGGUUAAGUUGU UCUUAGGG	1,8	0,3	96,5	2,5	45
555	AUAUGCCAGGUUAA GUUGUUCU	1,9	0,7	94,4	2,2	46
664	AGAAGACUUUGUAG UGAUCUUC	3,3	0,6	93,8	1,7	47
781	AUGAGAAAGAGCUU UCUAGUAU	2,7	0,6	93,6	3,1	48
1119	UAUUGAUAAAUAU UGCCUUUC	3,0	0,3	96,1	3,3	49
1159	AGAUGAGGAGAACC AUAUUUUG	3,5	1,0	94,4	1,6	50
1220**	ACCCAGCCUGACAC CAAAUUUA	33,4	4,7	92,6	2,1	51
1229	ACUCAAUAAAUUUG GUGUCAGG	7,0	0,9	90,8	3,1	52
1760	AUAAGUUAGCAAUG GUCUAAAC	4,4	1,9	86,0	3,8	53

1799	AAAAGGUAGUAAUU GUGUUUCA	2,9	1,2	87,5	1,9	54
1829	GAAUUGAUCUUGAA GACAUACG	3,5	0,3	97,9	1,3	55
1853*	AGCUAUUUUUGCAC AUCUAUCA	8,9	0,8	96,6	0,4	56
1869	GAUAGAUGUGCAAA AAUAGCUU	4,9	0,9	96,4	2,0	57
1893	AAAUUUAAUUGCCA GUAAGUCU	5,3	0,8	95,3	2,0	58
1989	UUAUGAAAAGCAGC UAUGAAGG	5,7	1,0	92,6	1,7	59
2017	UAGAGGAAGGCAGU GGUCCCUU	3,7	0,4	92,0	2,0	60
2068**	UACUAAAAGGCAGC CUCCUAGA	35,0	4,1	93,4	3,5	61
2088	GAGGCUGCCUUUUA GUAGUAUU	6,4	0,4	97,5	2,7	62
2144	AAGAUCUAGCUAAA AUAUAAGA	3,8	0,3	100,6	1,0	63
2197*	ACAAAUUACCAAU UGUAUUGA	36,3	4,9	93,2	1,7	64
2272	CAUAAGAUCUCUGC AAACAUAU	5,3	0,3	96,1	1,1	65
2327	CACUGCUUUCAGGA GCCAAAAA	3,2	0,3	97,9	2,2	66
2351	GGGUGGGGGAGCCC CAUAAAUG	5,9	1,0	95,9	3,0	67
2360*	AGCCCCAUAAAUGU UGAAUAAU	18,8	2,9	94,4	2,5	68
2431*	UCAGCCAAUAAAAG GUUUGUUA	31,6	2,9	94,4	1,4	69
2451	GGUUUGUAAAAGAA UGACUGUG	5,8	1,8	91,3	3,3	70

<b>2476*</b>	AUGAUAUACUCUUA AGUGAAUA	36,1	5,8	94,3	1,5	71
<b>2697*</b>	GCCUAGAUGAUUUAU UAAUAGGG	16,6	2,9	89,3	1,8	72
<b>2698</b>	GCCUAGAUGAUUUAU UAAUAGGG	7,2	0,2	88,1	1,3	73
<b>2717</b>	UUAUUAAUCAUCUA GGCUGCAA	3,8	0,2	90,1	3,6	74
<b>2756</b>	CUAGGCACUUGUUG ACAGUCCU	4,9	0,5	94,3	1,4	75
<b>2878*</b>	GUCUUGC GCUUAUG AAACUCC	12,5	2,0	94,1	3,0	76
<b>2908*</b>	UUUUAGUGAAGCAA UAUUAGUA	28,6	4,6	94,4	5,1	77
<b>2923</b>	AUUAGUAUAGAAUU UUGCAUCA	2,3	0,6	95,6	1,2	78
<b>2972*</b>	UAUGGCAUCUCACC AGUGUGUG	29,0	6,1	86,9	2,8	79
<b>3042*</b>	AUAAUAGAGACAAG GUGGUGUC	14,9	3,1	88,8	1,9	80
<b>3079*</b>	UGAUCAUUGCCUCA CUAUGGUA	24,0	6,0	87,4	1,1	81
<b>3106</b>	ACAUAUGAGUCCCA GUUAUUAC	5,7	1,0	92,0	2,4	82
<b>3122</b>	UAAUAACUGGGACU CAUAUGUA	4,5	0,6	90,8	4,4	83
<b>3125*</b>	GCUAAUAGCUAAUU CUAUACAU	38,5	2,9	91,9	3,1	84
<b>3614</b>	UUCUUUUACAUGG GAAAAAAU	2,0	0,7	95,0	2,1	85
<b>3630</b>	UUCAGAUUUUUUCC CAUGUAAU	3,1	1,2	95,1	2,8	86
<b>3687</b>	UGUUACAUGACCUU CCUUUCUU	1,5	0,8	91,6	4,2	87

<b>3821**</b>	AUUGGCUACCUUGG UUGGAUGA	54,8	3,6	80,1	4,1	88
<b>3829*</b>	UUACCUUGGAUUGGC UACCUUGG	7,6	0,6	95,2	3,2	89
<b>3922</b>	UUGUUACAUA AAAA GAGAGGUG	1,8	0,1	97,3	0,9	90
<b>4000</b>	AUAUGUGCAAGUCC UCUGUGCU	2,8	0,6	97,2	1,9	91
<b>4025</b>	ACUUGCACAUAUGU UCAGACUG	7,3	0,6	95,3	3,7	92
<b>4195*</b>	GGUGAGGGUCUCUC UAAGGUGU	23,8	3,3	96,1	4,5	93
<b>4215*</b>	UUCUCACAUGGCAG AAAGGGGU	34,6	2,4	86,1	2,1	94
<b>4254</b>	AGCAGGAAGACAGC UGGCUAUC	5,9	0,9	94,4	4,5	95
<b>4262**</b>	GACAGCUGGCUAUC CAGGAUUC	82,4	1,9	90,8	5,1	96
<b>4264</b>	UCUGCUAAGAGACU CCUGAAUC	1,6	0,6	101,0	2,7	97
<b>4271*</b>	AUUUGGGUCUGCUA AGAGACUC	42,0	1,4	97,0	2,7	98
<b>4463</b>	CAUAGAAUAUCCAU CCAUAUGA	6,6	0,8	102,2	2,7	99
<b>4470</b>	UGCAUAGUAUUCUA UCAUAUGG	4,1	0,2	101,6	1,4	100
<b>4482</b>	UGGAUGGAUAUUCU AUGAUUA	3,0	0,6	99,4	1,6	101
<b>4692*</b>	AUUUAGAGUGUAUG GCAUGAGU	28,2	3,6	92,6	3,4	102
<b>4698*</b>	CACUCUAUUUAGAG UGUAUGGC	30,1	3,3	94,4	3,4	103
<b>4706*</b>	UACUCAUGCCAUC ACUCUAAA	29,9	1,7	91,5	2,4	104

4711*	GUGGGGAAAUCAGC ACUCUAUU	11,6	1,3	94,6	3,4	105
4861	AUCAUUUCAACUUA UACACAGG	3,8	1,1	93,2	3,7	106
4889*	UUCUCUCUAUAUAA AGUGAUCC	15,3	2,0	96,3	2,2	107
4947	CAUUAGGAAAUGU ACAAAGGA	2,3	0,4	101,0	4,1	108
5041**	ACUUGCAGGAGGUG AGGGAUUA	89,4	1,7	97,1	3,6	109
5052**	AUUAGGGAAUGCAG ACUCUGGG	45,9	1,9	88,6	1,7	110
5057*	CUGCUACUUGGAAG ACUCUCC	46,6	3,8	95,4	1,6	111
5169*	GGCUGGCAUAGAGU AAGACAGG	29,9	3,1	96,8	2,1	112
5211	GAAGUAAUCGGCGG UGGAGGUA	2,2	0,4	96,6	1,7	113
5278**	UGGGUGAGAUUAGA GGCCACUG	43,4	2,7	90,6	3,0	114
5343**	UGC UCCUCCCUUG UCUCCUA	52,2	5,4	92,4	2,5	115
5426*	ACUAUACUACUCC ACUACUAC	40,8	2,9	95,7	1,9	116
5491	UUCAACUUAUCCAU UAAUCCUA	7,2	1,2	94,4	2,5	117
5492*	GAAGGAAGAUCCAA UAGGAUUA	18,5	2,4	95,3	2,8	118
5538**	UGGCAUAUGAGAAA AGUCACAG	72,4	1,0	92,4	1,6	119
5628	AAGAUA AUGGAGA AACAGGUU	3,5	0,4	99,9	2,9	120
5683*	UACAUCCAACUAAC AUCUCUAU	18,6	2,1	94,4	1,9	121

5689	GACAUCCAAAUAGA GAUGUUAG	7,3	0,8	96,2	1,8	122
5744	GGCUGGUAGUGUGA AGAUGGGG	1,4	0,3	92,5	3,0	123
5766	UUCUUAUCAACCCU CUUCCUU	1,2	0,1	97,5	3,2	124
5793	AAGAGGGUUGAUAA GAAGAGAA	1,5	0,1	95,1	2,5	125
5801*	UGAUAAGAAGAGAA AGGGGUGU	13,8	2,6	102,9	5,1	126
5825	CACCUCCUUAACCU CUAAUACU	2,6	0,2	94,3	2,7	127
5837*	CUAAGUAAUAGAGG UUAAGGAG	19,8	2,6	92,0	0,5	128
5896*	UCUGAGAAGACAAA GCUAGUGA	25,9	1,1	99,9	3,6	129
5913	CUGCUUGACAUCAG UUGGGUUC	5,5	0,9	98,7	1,9	130
5921	ACACCCUUCUGCUU GACAUCAG	7,2	1,4	96,9	2,5	131
5928*	GAACCCAACUGAUG UCAAGCAG	18,1	2,8	91,4	2,0	132
6029*	CUACUUAUUGCUUUC AUUAAGUC	13,0	0,6	91,6	3,3	133
6061	AGUAGAGAAGGUCA AACUUGAC	1,3	0,5	94,8	3,6	134
6083	ACUUGACCAGAAUG AAAUUAGA	2,9	0,2	99,8	3,0	135
6138*	GUGGACUCCAGGAG UAUAUCAA	8,6	0,7	98,8	2,3	136
6150**	CCUUAUUCUUUUGA UAUACUCC	44,8	5,3	93,3	2,4	137
6151*	AUUGUAUUAGCAAG UGGACUCC	22,1	0,9	89,9	1,5	138

6286*	GUAUUUCUAGGCUA GACAGUUU	47,2	2,2	93,8	1,8	139
6460*	CUUUACUGUGAAUG GUGCCAGG	9,0	2,1	95,8	2,1	140
6603	UAUUACGGUAAGCU CAAGCAUU	1,9	0,4	97,3	1,5	141
7055*	CUUAACUACUAAUA GCCUAUUG	16,4	2,1	84,1	3,3	142
7152*	ACCCCUAACCUUCA UGUUGAUA	16,2	1,2	94,6	2,1	143
7625	AAUAGCACUGGAGU UACCUGUU	5,1	0,3	94,1	3,6	144
7652	UUUUUUUCCAAGC GGUCCCUU	6,1	0,6	95,2	3,7	145
8379	UGGAAAUGUUAAA UUUCCCU	0,9	0,2	99,3	4,1	146
8519	UACUUGCUCUCUGA CCACAUA	3,0	0,3	98,2	2,3	147
8541	CUAAUCUAUUAAUA GAAACUAC	5,3	0,6	92,6	4,3	148
8600	AGAUGUAGAAGACC UAAAUAUC	2,8	0,3	97,2	4,1	149
8784	AAGAAAAGGCUCUU UAUAAUGC	4,7	0,2	98,1	1,9	150
8922*	UAAAAGAGACACAC CUAAAGCA	27,6	2,5	90,0	3,8	151
9000	UGAAGUCUUUCCU CUUAAUAG	2,8	0,6	94,1	2,5	152
9468	AUAUUAGUGAACUA GAGUCACA	1,5	0,2	98,4	2,2	153
9478*	AUCAGAGCUCAUAU UAGUGAAC	28,8	4,6	93,7	1,4	154
10303	AGCACAUAGAACAG CACUCGAC	0,0	0,0	99,7	1,2	155
10308*	GUUGCCAAGUGCUC ACUCUGUG	21,7	5,3	84,9	2,7	156
10375*	CCUCCAAACCUAAU CCAACUAU	18,1	5,5	92,8	1,0	157
10377	AGGGGCACAUGAUU CAGAUAGU	1,0	0,7	95,6	1,9	158

Примечание: Процент инделов и выживаемости клеток представляют собой среднее значение 2 независимых экспериментов, в которых каждая енРНК использовалась в трех повторностях. Каждая енРНК

содержит уникальную спейсерную последовательность из 22 нуклеотидов, за которой следует общая каркасная последовательность из 80 нуклеотидов. Каркасная последовательность нРНК (5'-3'): GUUUUAGUACUCUGGAAACAGAAUCUACUAAAACAAGGCAAAAUGCCGUG-UUUUAUCUCGUCAACUUGUUGGCGAGAUUUU (SEQ ID NO: 12).

\* нРНК с количеством инделов, превышающим пороговое значение 7,5%, рассматривались как положительные. Пороговое значение определяли путем добавления 4 SD к среднему значению отрицательного контроля.

\*\* 10 нРНК-кандидатов были отобраны для дальнейшего анализа на основе расположения, процента инделов и выживаемости клеток.

Дизайн донорской конструкции CFTR Super-Exon AAV и трансдукция AAV донорской конструкции CFTR intron 10 AAV содержал: (i) левый и правый гомологические рукава длиной 500 нуклеотидов относительно сайта разрезания нРНК, (ii) сайт акцептора сплайсинга, (iii) кДНК гена CFTR дикого типа с экзона 11 по 27, и (iv) последовательность остановки и полиаденилирования. Донорские препараты AAV были изготовлены с использованием серотипа AAV6, очищенного и титрованного компанией Vector Biolabs. Титр AAV был представлен в виде вирусных геномов на мл. Трансдукцию AAV проводили путем добавления вектора AAV6 в клетки при указанных копиях генома вектора на клетку в течение 36 часов при температуре 37°C.

Электропорация: Электропорацию проводили с помощью системы Lonza 4D-Nucleofector™ System, соединенной с 96-луночной челночной системой.  $1,8 \times 10^5$  клеток LPC ресуспендировали в 20 мкл буфера P4 для электропорации Lonza (V4SP-4096). 20 мкл клеточной смеси объединили с 2 мкл смеси реагентов CRISPR-Cas9, содержащей 1 мкг мРНК saCAS9 и 1 мкг нРНК. 20 мкл смеси клеток и CRISPR-Cas9 было перенесено в одну лунку 96-луночного планшета для электропорации. Клетки были подвергнуты электропорации с помощью программы CM-138. Часть электропорированных клеток LPC переносили в лунку 384-луночного планшета или ALI-96-луночного планшета, содержащего культуральную среду LPC. Клетки инкубировали при 37°C в инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub>.

Выделение геномной ДНК: Геномную ДНК выделяли путем инкубации клеток в течение 30 мин при 37°C с 50 мкл и 15 мкл раствора для быстрого извлечения ДНК (Epicentre) на лунку 96-луночного и 384-луночного планшета, соответственно. Клеточный экстракт смешивали и переносили в 96-луночный ПЦР-планшет, затем инкубировали в течение 6 мин при 65°C и 2 мин при 98°C. Геномная ДНК сразу же использовалась в последующих экспериментах или хранилась при 4°C.

Измерение частоты инделей для скрининга нРНК интрона CFTR: Для амплификации фрагмента ДНК размером 12 Кб, соответствующего интрону 10 CFTR, использовали набор для ПЦР PrimeSTAR (R045B, TAKARA). ПЦР-реакции проводили в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, 2,5 мкл раствора геномной ДНК объединяли с 47,5 мкл мастер-микса PrimeSTAR, содержащего дНТФ, буфер 5xGXL, полимеразу GXL и соответствующие прямые и обратные праймеры интрона 10 CFTR (CFTR 12 Кб F3: GCTACCAGTGTGATGGAGTAG (SEQ ID NO: 160) и CFTR 12 Кб R3: AGCCAGGGA-TACAATATCTTCACAAA (SEQ ID NO: 161) при 250 нМ каждого). ПЦР-реакции проводили с использованием следующего протокола термоциклирования: 1) 94°C 30 с; 2), 94°C 10 с; 3), 68°C 10 мин; 4) повтор шагов 2-3 32 раза.

ПЦР-реакции для положительного контроля VEGFA проводили с использованием набора Phire Green Hot Start II PCR Master Mix (F126L, Thermo Scientific) в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, 1,5 мкл раствора геномной ДНК объединяли с 18,5 мкл мастер-микса Phire с соответствующей парой прямого и обратного праймеров VEGFA (VEGFA-F1: CCAGTCACTGACTAACCCCG (SEQ ID NO: 162) и VEGFA-R1: ACTCTGTCCAGAGACACGCG (SEQ ID NO: 163) по 625 нМ каждый). ПЦР-реакции проводили с использованием следующего протокола термоциклирования: 1) 98°C 30 с; 2) 98°C 5 с; 3) 60°C 5 с; 4) 72°C 10 с 5) повтор шагов 2-4 35 раз; 6), 72°C 4 мин.

Продукты ПЦР были ферментативно очищены, и продукты ПЦР интрона 10 CFTR были амплифицированы с использованием амплификации по роллинг-циклу в GENEWIZ. Образцы ДНК секвенировали по методу Сэнгера с использованием праймеров для секвенирования, которые связываются вблизи сайта расщепления тестируемой нРНК (табл. 2). Каждую хроматограмму секвенирования анализировали с помощью программного обеспечения TIDE в сравнении с эталонными последовательностями (tide.nki.nl). Эталонные последовательности были получены из контрольных образцов. Параметры прилива были установлены для покрытия спектра инделов в пределах  $\pm 30$  нуклеотидов от места разреза нРНК, а окно минерализации было установлено для покрытия максимально возможного окна с высококачественными следами. Общее количество инделов (инсерций и делеций) было получено непосредственно из графиков TIDE. Для построения графиков и расчета всей статистической информации использовалось программное обеспечение GraphPad Prism 7.

Праймеры для секвенирования для скрининга инделов CFTR нРНК и эталонного контроля VEGFA

ID нРНК	Название праймера	Последовательность	Протокол секвенирования	SEQ ID
				<b>NO:</b>
<b>VEGFA</b>	VEGFA-F1	CCAGTCACTGACTAACCCCG	Стандартное секвенирование	164
<b>278</b>	CFTR-F1	AACTTCTAATGGTGATGACA GCC	RCA+Стандартное секвенирование	165
<b>306</b>	CFTR-R1	GTCATGATTTTCCTGGACCAG C	RCA+Стандартное секвенирование	166
<b>315</b>	CFTR-R1	GTCATGATTTTCCTGGACCAG C	RCA+Стандартное секвенирование	167
<b>320</b>	CFTR-R1	GTCATGATTTTCCTGGACCAG C	RCA+Стандартное секвенирование	168
<b>505</b>	CFTR-R1	GTCATGATTTTCCTGGACCAG C	RCA+Стандартное секвенирование	169
<b>550</b>	CFTR-R1	GTCATGATTTTCCTGGACCAG C	RCA+Стандартное секвенирование	170
<b>555</b>	CFTR-R1	GTCATGATTTTCCTGGACCAG C	RCA+Стандартное секвенирование	171
<b>664</b>	CFTR-R2	GGGTACAGTGGTGCAATCAT GG	RCA+Стандартное секвенирование	172
<b>781</b>	CFTR-R2	GGGTACAGTGGTGCAATCAT GG	RCA+Стандартное секвенирование	173
<b>1119</b>	CFTR-R2	GGGTACAGTGGTGCAATCAT GG	RCA+Стандартное секвенирование	174
<b>1159</b>	CFTR-R2	GGGTACAGTGGTGCAATCAT GG	RCA+Стандартное секвенирование	175
<b>1220**</b>	CFTR-R2	GGGTACAGTGGTGCAATCAT GG	RCA+Стандартное секвенирование	176
<b>1229</b>	CFTR-R2	GGGTACAGTGGTGCAATCAT GG	RCA+Стандартное секвенирование	177
<b>1760</b>	CFTR-R3	AAAAGGCAGCCTCCTAGATT GA	RCA+Стандартное секвенирование	178
<b>1799</b>	CFTR-R3	AAAAGGCAGCCTCCTAGATT GA	RCA+Стандартное секвенирование	179
<b>1829</b>	CFTR-R3	AAAAGGCAGCCTCCTAGATT	RCA+Стандартное	180

		GA	секвенирование	
1853*	CFTR-R3	AAAAGGCAGCCTCCTAGATT GA	RCA+Стандартное секвенирование	181
1869	CFTR-R3	AAAAGGCAGCCTCCTAGATT GA	RCA+Стандартное секвенирование	182
1893	CFTR-R3	AAAAGGCAGCCTCCTAGATT GA	RCA+Стандартное секвенирование	183
1989	CFTR-F4	TGCGTATGTCTTCAAGATCA ATTCT	RCA+Стандартное секвенирование	184
2017	CFTR-F4	TGCGTATGTCTTCAAGATCA ATTCT	RCA+Стандартное секвенирование	185
2068**	CFTR-F4	TGCGTATGTCTTCAAGATCA ATTCT	RCA+Стандартное секвенирование	186
2088	CFTR-F4	TGCGTATGTCTTCAAGATCA ATTCT	RCA+Стандартное секвенирование	187
2144	CFTR-F4	TGCGTATGTCTTCAAGATCA ATTCT	RCA+Стандартное секвенирование	188
2197*	CFTR-F4	TGCGTATGTCTTCAAGATCA ATTCT	RCA+Стандартное секвенирование	189
2272	CFTR-F4	TGCGTATGTCTTCAAGATCA ATTCT	RCA+Стандартное секвенирование	190
2327	CFTR-F5	TTGGACAAAAGATCTAGCTA AAATATAAGATTGA	RCA+Стандартное секвенирование	191
2351	CFTR-F5	TTGGACAAAAGATCTAGCTA AAATATAAGATTGA	RCA+Стандартное секвенирование	192
2360*	CFTR-F5	TTGGACAAAAGATCTAGCTA AAATATAAGATTGA	RCA+Стандартное секвенирование	193
2431*	CFTR-F5	TTGGACAAAAGATCTAGCTA AAATATAAGATTGA	RCA+Стандартное секвенирование	194
2451	CFTR-F5	TTGGACAAAAGATCTAGCTA AAATATAAGATTGA	RCA+Стандартное секвенирование	195
2476*	CFTR-F5	TTGGACAAAAGATCTAGCTA AAATATAAGATTGA	RCA+Стандартное секвенирование	196
2697*	CFTR-R5	GGCATCCAGTGATGCAAAAT	RCA+Стандартное	197

		TCTATAC	секвенирование	
2698	CFTR-R5	GGCATCCAGTGATGCAAAAT TCTATAC	RCA+Стандартное секвенирование	198
2717	CFTR-R5	GGCATCCAGTGATGCAAAAT TCTATAC	RCA+Стандартное секвенирование	199
2756	CFTR-R5	GGCATCCAGTGATGCAAAAT TCTATAC	RCA+Стандартное секвенирование	200
2878*	CFTR-F6	AGTTGTTATCTCTGAAATTT GGGT	RCA+Стандартное секвенирование	201
2908*	CFTR-F6	AGTTGTTATCTCTGAAATTT GGGT	RCA+Стандартное секвенирование	202
2923	CFTR-F6	AGTTGTTATCTCTGAAATTT GGGT	RCA+Стандартное секвенирование	203
2972*	CFTR-F6	AGTTGTTATCTCTGAAATTT GGGT	RCA+Стандартное секвенирование	204
3042*	CFTR-R6	ACAATATAGCTCTGATAATC CAGGT	RCA+Стандартное секвенирование	205
3079*	CFTR-R6	ACAATATAGCTCTGATAATC CAGGT	RCA+Стандартное секвенирование	206
3106	CFTR-R6	ACAATATAGCTCTGATAATC CAGGT	RCA+Стандартное секвенирование	207
3122	CFTR-R6	ACAATATAGCTCTGATAATC CAGGT	RCA+Стандартное секвенирование	208
3125*	CFTR-R6	ACAATATAGCTCTGATAATC CAGGT	RCA+Стандартное секвенирование	209
3614	CFTR-R6B	CCCCACCCTGCAATACCA	RCA+Стандартное секвенирование	210
3630	CFTR-R6B	CCCCACCCTGCAATACCA	RCA+Стандартное секвенирование	211
3687	CFTR-R6B	CCCCACCCTGCAATACCA	RCA+Стандартное секвенирование	212
3821**	CFTR-R6B	CCCCACCCTGCAATACCA	RCA+Стандартное секвенирование	213
3829*	CFTR-R6B	CCCCACCCTGCAATACCA	RCA+Стандартное	214

			секвенирование	
3922	CFTR-F7	CCTGCATTCCCTCATCCA	RCA - Протокол для насыщенных GC	215
4000	CFTR-F7	CCTGCATTCCCTCATCCA	RCA - Протокол для насыщенных GC	216
4025	CFTR-F7	CCTGCATTCCCTCATCCA	RCA - Протокол для насыщенных GC	217
4195*	CFTR-F7	CCTGCATTCCCTCATCCA	RCA - Протокол для насыщенных GC	218
4215*	CFTR-F7	CCTGCATTCCCTCATCCA	RCA - Протокол для насыщенных GC	219
4254	CFTR-F7	CCTGCATTCCCTCATCCA	RCA - Протокол для насыщенных GC	220
4262**	CFTR-F7	CCTGCATTCCCTCATCCA	RCA - Протокол для насыщенных GC	221
4264	CFTR-F7	CCTGCATTCCCTCATCCA	RCA - Протокол для насыщенных GC	222
4271*	CFTR-F7	CCTGCATTCCCTCATCCA	RCA - Протокол для насыщенных GC	223
4463	CFTR-R7	GCTGTGGGGAAATCAGCA	RCA+Стандартное секвенирование	224
4470	CFTR-R7	GCTGTGGGGAAATCAGCA	RCA+Стандартное секвенирование	225
4482	CFTR-R7	GCTGTGGGGAAATCAGCA	RCA+Стандартное секвенирование	226
4692*	CFTR-F8	TGCACACACATTTAAATAGA TGCATAGT	RCA+Стандартное секвенирование	227
4698*	CFTR-F8	TGCACACACATTTAAATAGA TGCATAGT	RCA+Стандартное секвенирование	228
4706*	CFTR-F8	TGCACACACATTTAAATAGA TGCATAGT	RCA+Стандартное секвенирование	229
4711*	CFTR-F8	TGCACACACATTTAAATAGA TGCATAGT	RCA+Стандартное секвенирование	230
4861	CFTR-F8	TGCACACACATTTAAATAGA	RCA+Стандартное	231

		TGCATAGT	секвенирование	
4889*	CFTR-F8	TGCACACACATTTAAATAGA TGCATAGT	RCA+Стандартное секвенирование	232
4947	CFTR-R8	TTGCCTGAACTGGCACAAT	RCA+Стандартное секвенирование	233
5041**	CFTR-R8	TTGCCTGAACTGGCACAAT	RCA+Стандартное секвенирование	234
5052**	CFTR-R8	TTGCCTGAACTGGCACAAT	RCA+Стандартное секвенирование	235
5057*	CFTR-R8	TTGCCTGAACTGGCACAAT	RCA+Стандартное секвенирование	236
5169*	CFTR-F9	TTGCAGGAGGTGAGGGATT	RCA+Стандартное секвенирование	237
5211	CFTR-F9	TTGCAGGAGGTGAGGGATT	RCA+Стандартное секвенирование	238
5278**	CFTR-F9	TTGCAGGAGGTGAGGGATT	RCA+Стандартное секвенирование	239
5343**	CFTR-F9	TTGCAGGAGGTGAGGGATT	RCA+Стандартное секвенирование	240
5426*	CFTR-F9	TTGCAGGAGGTGAGGGATT	RCA+Стандартное секвенирование	241
5491	CFTR-F9	TTGCAGGAGGTGAGGGATT	RCA+Стандартное секвенирование	242
5492*	CFTR-F9	TTGCAGGAGGTGAGGGATT	RCA+Стандартное секвенирование	243
5538**	CFTR-R9	TCAGTTGGGTTCCGGGATA	RCA+Стандартное секвенирование	244
5628	CFTR-R9	TCAGTTGGGTTCCGGGATA	RCA+Стандартное секвенирование	245
5683*	CFTR-R9	TCAGTTGGGTTCCGGGATA	RCA+Стандартное секвенирование	246
5689	CFTR-R9	TCAGTTGGGTTCCGGGATA	RCA+Стандартное секвенирование	247
5744	CFTR-F10	GTCACAGAGGAGTCAAAGAT	RCA+Стандартное	248

		GATTCCAAG	секвенирование	
5766	CFTR-F10	GTCACAGAGGAGTCAAAGAT GATTCCAAG	RCA+Стандартное секвенирование	249
5793	CFTR-F10	GTCACAGAGGAGTCAAAGAT GATTCCAAG	RCA+Стандартное секвенирование	250
5801*	CFTR-F10	GTCACAGAGGAGTCAAAGAT GATTCCAAG	RCA+Стандартное секвенирование	251
5825	CFTR-F10	GTCACAGAGGAGTCAAAGAT GATTCCAAG	RCA+Стандартное секвенирование	252
5837*	CFTR-F10	GTCACAGAGGAGTCAAAGAT GATTCCAAG	RCA+Стандартное секвенирование	253
5896*	CFTR-F10	GTCACAGAGGAGTCAAAGAT GATTCCAAG	RCA+Стандартное секвенирование	254
5913	CFTR-F10	GTCACAGAGGAGTCAAAGAT GATTCCAAG	RCA+Стандартное секвенирование	255
5921	CFTR-F10	GTCACAGAGGAGTCAAAGAT GATTCCAAG	RCA+Стандартное секвенирование	256
5928*	CFTR-F10	GTCACAGAGGAGTCAAAGAT GATTCCAAG	RCA+Стандартное секвенирование	257
6029*	CFTR-R10	GGGTAGGTGTTAGTGTGTGT TAAGT	RCA+Стандартное секвенирование	258
6061	CFTR-R10	GGGTAGGTGTTAGTGTGTGT TAAGT	RCA+Стандартное секвенирование	259
6083	CFTR-R10	GGGTAGGTGTTAGTGTGTGT TAAGT	RCA+Стандартное секвенирование	260
6138*	CFTR-R10	GGGTAGGTGTTAGTGTGTGT TAAGT	RCA+Стандартное секвенирование	261
6150**	CFTR-R10	GGGTAGGTGTTAGTGTGTGT TAAGT	RCA+Стандартное секвенирование	262
6151*	CFTR-R10	GGGTAGGTGTTAGTGTGTGT TAAGT	RCA+Стандартное секвенирование	263
6286*	CFTR-R10	GGGTAGGTGTTAGTGTGTGT TAAGT	RCA+Стандартное секвенирование	264
6460*	CFTR-F11	TACAGGCTTGAACATGCATGG	RCA+Стандартное	265

			секвенирование	
6603	CFTR-F11	TACAGGCTTGAAC TGCATGG	RCA+Стандартное секвенирование	266
7055*	CFTR-F12	CCACTAGTGATGCACGGAAA	RCA+Стандартное секвенирование	267
7152*	CFTR-F12	CCACTAGTGATGCACGGAAA	RCA+Стандартное секвенирование	268
7625	CFTR-F20	CTCTGCCTCCCGGGCTCAAG	RCA+Стандартное секвенирование	269
7652	CFTR-F20	CTCTGCCTCCCGGGCTCAAG	RCA+Стандартное секвенирование	270
8379	CFTR-F13	AGCTGTGCATTTTCCTCTGG	RCA+Стандартное секвенирование	271
8519	CFTR-F13	AGCTGTGCATTTTCCTCTGG	RCA+Стандартное секвенирование	272
8541	CFTR-F13	AGCTGTGCATTTTCCTCTGG	RCA+Стандартное секвенирование	273
8600	CFTR-F13	AGCTGTGCATTTTCCTCTGG	RCA+Стандартное секвенирование	274
8784	CFTR-R13	TCTGTTAATGGCAAAGCAAG TAGAA	RCA+Стандартное секвенирование	275
8922*	CFTR-R13	TCTGTTAATGGCAAAGCAAG TAGAA	RCA+Стандартное секвенирование	276
9000	CFTR-R13	TCTGTTAATGGCAAAGCAAG TAGAA	RCA+Стандартное секвенирование	277
9468	CFTR-F14	GATGGGTTAAGCCAAC TGA AA	RCA+Стандартное секвенирование	278
9478*	CFTR-F14	GATGGGTTAAGCCAAC TGA AA	RCA+Стандартное секвенирование	279
10303	CFTR-R15	ATTCACTTGCCTCCAATTATC ATCCT	RCA+Стандартное секвенирование	280
10308*	CFTR-R15	ATTCACTTGCCTCCAATTATC ATCCT	RCA+Стандартное секвенирование	281
10375*	CFTR-R15	ATTCACTTGCCTCCAATTATC	RCA+Стандартное	282
		ATCCT	секвенирование	
10377	CFTR-R15	ATTCACTTGCCTCCAATTATC ATCCT	RCA+Стандартное секвенирование	283

Измерение коэффициента вставки суперэкзона CFTR с помощью капельной цифровой ПЦР (кцПЦР): HDR-опосредованная инсерция суперэкзона 10 CFTR была оценена с помощью кцПЦР (QX200, Bio-Rad Laboratories, Inc.). Для определения количества HDR-редактированных аллелей по отношению к общему количеству аллелей, присутствующих в образце, были проведены мультиплексные анализы кцПЦР. Количество аллелей GAPDH использовалось для определения общего числа аллелей, амплифицированных с помощью кцПЦР. Проводили кцПЦР (1x анализ: 900 нМ праймеров и 250 нМ

каждого зонда) с использованием 2 зондов для кцПЦР на анализ (IDT, Inc.). Один FAM-меченый зонд был специфичен для HDR-измененных аллелей с одним праймером, расположенным вне области соответствия матрицы суперэкзону CFTR для предотвращения амплификации донорной матрицы. Второй зонд, меченный HEX, и пара праймеров были специфичны для GAPDH. Анализы кцПЦР были собраны, а капли были сгенерированы с помощью Automated Droplet Generator (Bio-Rad). Анализы кцПЦР проводились с использованием супермикса кцПЦР для зондов (без дУТФ) с использованием следующего протокола термоциклирования: 1) 95°C 5 мин; 2), 94°C 30 с; 3), 58°C 1 мин; 4), 72°C 3 мин; 5) повтор шагов 2-4 39 раз; 6), 98°C 5 мин, со скоростью 2°C/с. Для количественной оценки использовали QuantaSoft (Bio-Rad). Доля положительных капель, соответствующих флуоресцентным каналам FAM и HEX, определяет количество HDR-редактированных и GAPDH аллелей, соответственно. Процент HDR-редактированных аллелей рассчитывали относительно аллелей GAPDH, которые представляют 100% амплифицированных аллелей в образце. Доверительные интервалы для каждой лунки были рассчитаны QuantaSoft на основе распределения Пуассона. Последовательности праймеров и зондов приведены в табл. 3 и табл. 4.

Таблица 3

Праймеры и зонды для анализа кцПЦР интрона 10 CFTR

нРН К	Сторо на	Прямой праймер	SEQ ID NO:	Обратный праймер	SEQ ID NO:	Зонд кцПЦР (FAM)	SEQ ID NO:
1220	3'	TACAGCGTA ССТTCAGСТC AC	284	ACCACTG ССТTCСТ СТААСТC	285	CATTGATGA GTTTGGACA AACCACAAC TAG	286
	5'	CACATGGCG AGCATTCAAT AAC	287	AGGCATG ATCCATG AGAАСТG	288	AAGAAATCC GTCCTGAGT GTTTGATCTT	289

						CC	
2068	3'	TACAGCGTA CCTTCAGCTC AC	290	GGAAGTT TCATAAG CGCAAGA C	291	CATTGATGA GTTTGGACA AACCACAAC TAG	292
	5'	AGAAAGACT CCTGAAAGG CA	293	AGGCATG ATCCATG AGAACTG	294	AAGAAATCC GTCCTGAGT GTTTGATCTT CC	295
3821	3'	TACAGCGTA CCTTCAGCTC AC	296	GAGTGTA TGGCATG AGTACGA AT	297	CATTGATGA GTTTGGACA AACCACAAC TAG	298
	5'	AATTCCTGAC ACCACCTTGT CTC	299	AGGCATG ATCCATG AGAACTG	300	AAGAAATCC GTCCTGAGT GTTTGATCTT CC	301
4262	3'	TACAGCGTA CCTTCAGCTC AC	302	ACCCTCC CTGTCTT ACTCTAT G	303	CATTGATGA GTTTGGACA AACCACAAC TAG	304
	5'	ATGCATATAT ATATTTTTAA CCTGGATTAT CAGAGC	305	AGGCATG ATCCATG AGAACTG	306	AAGAAATCC GTCCTGAGT GTTTGATCTT CC	307
5041 5052	3'	TACAGCGTA CCTTCAGCTC AC	308	CTTCACC CACCTCC TTAACC	309	CATTGATGA GTTTGGACA AACCACAAC TAG	310
	5'	GTGAGAACA CAGCAGGAA GAC	311	AGGCATG ATCCATG AGAACTG	312	AAGAAATCC GTCCTGAGT GTTTGATCTT CC	313
5278	3'	TACAGCGTA	314	AGGCATC	315	CATTGATGA	316

5343		CCTTCAGCTC AC		AATGGTT GTCTGTA TT		GTTTGGACA AACCACAAC TAG	
	5'	ACTTCCCAGC CTCCAGAACT	317	AGGCATG ATCCATG AGAACTG	318	AAGAAATCC GTCCTGAGT GTTTGATCTT CC	319
5538	3'	TACAGCGTA CCTTCAGCTC AC	320	GTAGGGT AGGTGTT AGTGTGT GTTAAG	321	CATTGATGA GTTTGGACA AACCACAAC TAG	322
	5'	GAGTGCTGA TTCCCCACA G	323	AGGCATG ATCCATG AGAACTG	324	AAGAAATCC GTCCTGAGT GTTTGATCTT CC	325
6150	3'	TACAGCGTA CCTTCAGCTC AC	326	AGCTGCA CTGATGG TTCA	327	CATTGATGA GTTTGGACA AACCACAAC TAG	328
	5'	TAGGGAGAC AAGGGAGGA AG	329	AGGCATG ATCCATG AGAACTG	330	AAGAAATCC GTCCTGAGT GTTTGATCTT CC	331

Таблица 4

Праймеры и зонды для GAPDH (референсный анализ для определения общего числа аллелей)

	Прямой праймер	SEQ ID NO:	Обратный праймер	SEQ ID NO:	Зонд кцПЦР (HEX)	SEQ ID NO:
<b>GAP DH</b>	TGGAAGACAGA ATGGAAGAAAT	332	GTCAGGTC CACCACTG A	333	CCCCCACCCTCAT AGGCGAGATCCC	334

Измерение процента выживаемости клеток LPC: Клетки инкубировали с 5 мкг/мл Hoechst 33342 (Life technologies: H3570) и 0,5 мкг/мл йодистого пропидия (PI; Life technologies: P3566) в культуральной среде в течение 1 часа при 37°C. Клетки были визуализированы для измерения позитивных событий Хоешта (живые и погибшие клетки) и позитивных событий PI (погибшие клетки) с помощью системы High-Content Imaging System (Molecular devices). Относительную выживаемость клеток рассчитывали следующим образом: [(событий Хоешт+ - событий PI+) образца]/[(событий Хоешт+ - событий PI+) контроля] \* 100. Контролем служили контрольно-трансфицированные клетки, и их выживаемость была установлена произвольно как 100%.

Измерение функции CFTR в НБЕ: Эксперименты с использованием камеры были проведены на поляризованных эпителиальных клетках дыхательных путей, экспрессирующих dF508del, для оценки функциональной эффективности ген-отредактированных клеток. Полученные из LPC НБЕ выращивали на вставках для клеточных культур Costar® Snapwell™ и устанавливали в камеру Уссинга (Physiologic Instruments, Inc., Сан-Диего, Калифорния). Трансэпителиальное сопротивление и ток короткого замыкания в присутствии базолатерального и апикального градиента хлоридов (Isc) измеряли с помощью системы вольтамперометрии (факультет биоинженерии, Университет Айовы, Айова). Вкратце, LPC-производные НБЕ исследовались в условиях записи вольтампером (Vhold=0 мВ) при 37°C. Базолатеральный раствор содержал (в мМ) 145 NaCl, 0,83 K2HPO4, 3,3 KH2PO4, 1,2 MgCl2, 1,2 CaCl2, 10 глюко-

зы, 10 HEPES (pH отрегулирован до 7,35 с помощью NaOH), а апикальный раствор содержал (в мМ) 145 глюконата Na, 1,2 MgCl<sub>2</sub>, 1,2 CaCl<sub>2</sub>, 10 глюкозы, 10 HEPES (pH скорректирован до 7,35 с помощью NaOH). Положительным контролем функции CFTR были клетки dF508del, обработанные коктейлем модуляторов CFTR (TC) на базолатеральной стороне в течение 18-24 ч до анализа. Отрицательным контролем служили клетки, обработанные ДМСО. Форсколин (10 мкМ) добавляли к апикальной стороне во время анализа для стимуляции CFTR-опосредованного транспорта хлоридов. Коктейль CFTR-ингибиторов (30 мкМ) впоследствии добавляли к апикальной стороне во время анализа для ингибирования CFTR-опосредованного транспорта хлоридов. Функция CFTR выражается в мкА/см<sup>2</sup> и рассчитывается по следующей формуле: Максимальный ток, индуцированный форсколином - Минимальный ток в присутствии коктейля ингибиторов CFTR.

Последовательности нуклеотидов образцовых пар енРНК и донорных матриц.

Целевой сайт 1220 интрона 10 CFTR.

енРНК:

accsagcctgacaccaaatGUUUUAGUACUCUGGAAACAGAAUCUACUAAAACAAGGCAA  
AAUGCCGUGUUUAUCUCGUCAACUUGUUGGCGAGUUUU (SEQ ID NO: 26), где строчные буквы  
соответствуют нуклеотидной последовательности, содержащей спейсер енРНК, а прописные буквы со-  
ответствуют нуклеотидной последовательности, включающей каркас енРНК.

Донорная матрица:

**CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCGGGCAAA  
GCCCGGGCGTGGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCG  
CGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTGCGGCCGCACGCGT  
ATTGAGGAAATAAATTTAAAGACATGAAAGAATCAAATTAGAGATGAGAAAGAGCT**

TTCTAGTATTAGAATGGGCTAAAGGGCAATAGGTATTTGCTTCAGAAGTCTATAAAA  
TGGTTCCTTGTTCCCATTTGATTGTCATTTTAGCTGTGGTACTTTGTAGAAATGTGAG  
AAAAAGTTTATGGTCTCTTGAAGCTTTTCAAAATACTTTCTAGAATTATACCGAAT  
AATCTAAGACAAACAGAAAAAGAAAGAGAGGAAGGAAGAAAGAAGGAAATGAGG  
AAGAAAGGAAGTAGGAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGGAAGTAAGAGGGA  
AGCAGTGCTGCTGCTGTAGGTAATAATGTTAATGAAAATAGAAATTAAGAAAGACT  
CCTGAAAGGCAATTATTTATCAATATCTAAGATGAGGAGAACCATATTTTGAAGAAT  
TGAATATGAGACTTGGGAAACAAAATGCCACAAAAAATTTCCACTCAATAATATACA  
CTTCTGCTTAGGATGATAATTGGAGGCAAGTGAATCCTGAGCGTGATTGATAATGACCTA  
ATAATGATGGGTTTTATTTCAG  
actctctgctgatggtcatcatggcgagctggaaccagtgagggaagatcaaac  
actcaggacggattcttttgcagtcagttctcatggatcatcctgggaccattaaggagaatatcattttggagtgctctacgatgaatacc  
ggfacagaagcgtgatcaaggcctgccagctggaggaagacattagcaagttccagaaaaagataacatcgtgctggggaggggcgg  
gattactctgagtgaggccagcgggccaatctcactggctcgcgagtgtaacaggacgctgatctgtatctgctggactctccctcgg  
gctacctggagctgctgaccgagaaaaaatcttcagagtgctgctgtaagctgatggtaacaaaacccggattctggtgatcaaaag  
atggaacacctgaagaagcagacaaaatctgattctgcatgagggctcaagctactttatgggacctcagcgaactgcagaatctgca  
gcccgattttctctaagctgatgggatgtgactctttgatcagttctctgccgaaaggcgaactccatcctgactgagacctgcacaga  
ttcagcctggaaggcagctccctgtagctggacagagactaagaacagctctttaagcagacagccgagttcgggaaaaagcga  
aaatagcatcctgaacccaatcaatagattcggaaagtctcaatcgtgcagaaaaactcccctgcagatgaacggcattgaggaagactccg  
atgagccactggaacgagcggctgagcctggtcccattccgagcagggagaagccatcctgcctaggatcagcgtcatttccactggcc  
caaccctgcaggctagaaggcggcagagtgctgaatctgatgacacactcagcaaccaggccagaataatccatcggaaagactaccg  
cctctacaagaaaagtgagctggtccacaggaacactgactgagctggacatctacagccggcggtgtcccaggagaccgggctg  
gaaatttctgaggaatcaatgaggaagatctgaaggaatccttttcagcagataggagatccccccgtgacaacttgaacacttac  
ctgctatattaccgtccacaagtctctgattttgtcctgatctgggtctgtgtcatctcctggctgaggtcgcagccagcctgggtctctg  
ggctgctgggaaacaccccactgcaggacaaggggaattctacacatagtagaacaatagctacccgtgatcattaccctcaagaatc  
atactatgtctctacatctatgtggcgtcgtgatacactgctggcaatggggttttcaggggactgcctctggtgcacacactgatcactg  
tctctaagattctgcaccataaatgctgcattctgctgctcaggtccaatgagtagccctgaacacactgaaggcaggggaatcctgaatc  
ggfttagcaagacatcgcattctgacgatctgctcctctgaccattttgatttccagctgctgctgatcgtgaltgagcaatcgtg  
tggtcggctgctgcagccttacatttctgctactgtgccagtcattgtggccttcatcatgctgctgcgcctatttctcagaccagccag  
cagctgaagcagctggagtctgaaggccggagtcfaatctttacacactgggtgacttccctgaaaggactgtggacctgagagcctcgg  
gcagcagcccactttgagacactgtccacaaggctctgaacctgcatactgcaaatggfctctgtatctgtctacctcgcgatggfctcag  
atgcggatcagatgatttctgctatctttcattgccctcacctcatcagcattctgaccacaggggaggagaaggcagagtgggcatc  
attctgactctggccatgaacatcatgagtagcctgagtgggctgtgaatagctccattgacgtggattcactgatgcctcagtcagccga  
gtgttaagttcatcgacatgcccacagaggggaagcctactaatactaccaagccctacaaaaacggacagctgagcaaatgatgatcat  
tgaataatcccatgtcaagaaagacgacatctggcctagcggcgggcagatgacctgaaggatctgaccgtaatacacagaaggag  
gcaacgcaattctgagaatattctctttctattagtcaggacagcagtgaggactgctgggacgaacagggtcaggaagagcactct  
gctgctccgattcctgaggctgctgaatactgagggagaaatccagattgacggcgtctcctgggattctatcacctgcagcagtgaggaa  
aggctttggagtcacctcagaaagtgtttttcagcggcacattcaggaagaacctggaccatacgaacagtggtccgatcaggaga  
tctggaagtcgcagacgaagtgggactgcgctctgtgattgaacagttctcctgggaagctggacttctcctggtgatggggatgcgt  
gctgagccagccataaacagctgatgtcctggcccggagtgctgtcaaaaggctaaaatcctgctgctggacgagccaagcggcca  
cctggaccctgacactaccagatcattagaaggacactgaagcaggaatttccgactgcaccgtgatcctgtgcgagcatcgattgaa

gctatgctggagtgccagcagttcctggtcatcgaggaaaacaaggtccggcagtatgactctattcagaaactgctgaatgagcggagctct  
 gtttagacaggccatctcaccagcgataggggtgaagctgtccctaccgcaactctagtaagttaaaccagccacagattgccgcac  
 tgaaggaagagactgaagaggaggtccaggatacaagactgtgactgactgagatacagcgtaccttcagctc**acagacatgataagat**  
**acattgatgagtttgacaacaaccacaactagaatgcagtgaaaaaatgctttatgtgaaatgtgatgctattgctttatgtta**  
**accattataagctgcaataaacaagttaacaacaacaattgcattcattttatgtttcaggttcagggggaggtgtgggaggttttt**  
ATTTGGTGTGTCAGGCTGGGTGCAGTGGCTCACACTTGTAATCCTAGCACTTTTGGAGG  
CAGAGGCAGGTGAATTGCTTGAGTCCAGGAGTTTGAGACCAGCGTGGGCAACATGG  
CAAACCCACCTCTACAAAAACACAAACAAAAGAAAATAGCTGGGTGTGGTGGTG  
TGTGCCTGTAGTCCCAGCTACTTGGGAGGCTGAGGTGGGAGGATCACCTGAGCCTG  
AGAAGTGGAGGCTGCAGTGAGCCATGATTGCACCACTGTACCCTAGCCTAGGTGAT  
AGGCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAATTGGTGTGTTGCAATGCTAATAATACAATTTGGTTGTT  
TCTCTCTCCAGTTGTTTTCTACATACGAAACAGCTTTTAAAAACAAAATAGCTGGAA  
TTGTGCATTTTTTTCTTACAAAAACATTTTCTTTCTTAAAATGTTATTATTTTTCTTTTA  
TATCTTGTATATTACTAGCAGTGTTCACTATTAATAAATTATAGGTAACCACGT  
GCGGACCGAGGCTGCAGCGTCGCTCCCTAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGC  
CACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCG  
CCCCAGCCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG  
CTGCCTGCAGG (SEQ ID NO: 335).

Прописные жирные буквы соответствуют последовательности, содержащей ITR AAV (SEQ ID NO: 15 для 5' концевой ITR и SEQ ID NO: 16 для 3' ITR); подчеркнутые заглавные буквы соответствуют нуклеотидной последовательности, содержащей 5' и 3' гомологичные рукава (SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18, соответственно); прописные курсивные буквы соответствуют нуклеотидной последовательности, содержащей акцептор сайта сплайсинга (SEQ ID NO: 1); строчные буквы (нежирный шрифт) соответствуют нуклеотидной последовательности, содержащей экзоны 11-27 CFTR (SEQ ID NO: 37); и строчные жирные буквы соответствуют нуклеотидной последовательности, содержащей элементы 3'UTR (SEQ ID NO: 159).

Целевой сайт 2068 интрона 10 CFTR.

енPHK:

tactaaaaggcagcctcctagaGUUUUAGUACUCUGGAAACAGAAUCUACUAAAACAAGGCAA  
 AAUGCCGUGUUUAUCUCGUAACUUGUUGCGAGAUUUU (SEQ ID NO: 27), где строчные буквы соответствуют нуклеотидной последовательности, содержащей спейсер енPHK, а прописные буквы соответствуют нуклеотидной последовательности, включающей каркас енPHK.

Донорная матрица:

**CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAA**  
**GCCCCGGGCGTGGGCGACCTTTGGTGCAGGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCG**  
**CGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTGCGGCCGCACGCGT**  
CAGCTTTTAAAAACAAAATAGCTGGAATTGTGCATTTTTTTCTTACAAAAACATTTTCTT  
TCTTAAAATGTTATTATTTTTCTTTTATATCTTGTATATTACTAGCAGTGTTCACT

ATTAAAAAATTATACTATAGGAGGGGCTGATACTAAATAAGTTAGCAATGGTCTAA  
ACAAGGATGTTTATTTATGAAAAGGTAGTAATTGTGTTTCATAGAATTTTTAAAATT  
AATTCTGCGTATGTCTTCAAGATCAATTCTATGATAGATGTGCAAAAATAGCTTTGG  
AATTACAAATTCCAAGACTTACTGGCAATTAATTTTCAGGCAGTTTTTATAAAATTG  
ATGAGCAGATAATTACTGGCTGACAGTGCAGTTATAGCTTATGAAAAGCAGCTATG  
AAGGCAGAGTTAGAGGAAGGCAGTGGTCCCTTGGGAATATTTAAACACTTCTGAGA  
AACGGAGTTTACTAACTCAATCTAGGAGGCTGCCTTTTAGTAGTTATACACTTCTGCTT  
AGGATGATAATTGGAGGCAAGTGAATCCTGAGCGTGATTTGATAATGACCTAATAATGATG  
GGTTTTATTCCAGacttctctgctgatggtcatcatggcgagctggaaccagtgaggggaagatcaaacactcaggacgga  
ttcttttgcagctcagttctcatggatcatcctgggaccattaaggagaatatcattttggagtgcctacgatgaataccggtagacaagcg  
tgatcaaggcctgccagctggaggaagacattagcaagctcgcagaaaaagataacatcgtcctgggggagggcggtactctgagtg  
gaggccagcggccagaatctcactgctcgcagtgtaacaggacgctgatctgtatctgctggactctccttcggctacctggacgt  
gctgaccgagaaaagaaactctcgagagttgctgtgaagctgatggtaacaaaaccggattctggtgacatcaagatggaacactg  
aagaaagcagacaaaactcctgattctgcatgagggctcaagactctttatgggacctcagcgaactgcagaatctgagcccgattttct  
ctaagctgatgggatgtgactcctttgatcagttctctgccaaaaggcgcaactccatcctgactgagacctgcacagattcagcctggag  
gagcagctcccgtgagctggagacagactaagaacagctcttttaagcagacagcgagttcggggaaaagcgaataatagcatcctg  
aacccaatcaatagatttcggaagtctcaatcgtgcagaaaactcccctgcagatgaacggcattgaggaagactccgatgaccactgg  
aacgacggctgagcctggtgcccgattccgagcagggagaagccatcctgctagatcagcgtcatttccactggcccaacctgcagg  
ctagaaggcgcagagtgctgtaactgatgacacactcagtaaccaggggccagaatatccatcggaaactaccgctctacaagaa  
aagtgagctggtccacaggcaaacctgactgagctggacatctacagccggcggtgtcccaggagaccgggctggaatttctgagg  
aatcaatgaggaagatctgaaggaatcttttcgacgataggagatccccccgtgacaactggaacacttacctgcctatattac  
cgtccaagaictctgattttgtctgatctggtgctggtcactctcctgaggtcgcagccagcctggtgctctggtgctgctggaa  
acccccactgcaggaaggggaattctacacatagtagaacaatagctacgccgtgatcattacctccacaagttcactatgcttcta  
catctatggtggcgtcgtgatacactgctgcaatggggttttcaggggactgctcctggtgcacacactgatcactgtctctaaattctg  
accataaatgctgattctgctgagctcctcaatgagctcctgaacactgaaaggcaggggaatcctgaaatcggtttagcaagac  
atgccattctgagcagatctgctcctctgaccattttgattcatccagctgctgctgatctgattggagcaatcgtggtgctgctgctg  
cagccttacatttctgctgactgtgccagtcattgtgacctcatcatgctgctgacctatttctgcagaccagccagcagctgaagcagc  
tggagtctgaagccggagtcacatcttacacactggtgactcctgaaaggactgtggaccctgagagccttcggcagcgagcccta  
ctttgagacactgttccacaaggctctgaacctgcaactgcaaatggtttctgtaictgtctacctgcatggtttcagatgaggatcgagat  
gatttctgctatctttcattgccctcatcagcattctgaccacaggggagggagaaggcagagtggtgcatcattctgactctggcc  
atgaacatcatgagtagcctgagtggtgctgtaatagctccattgacgtggattcactgatgcctcagtcagccgagtggttaagttcatg  
acatccccacagaggggaagcctactaaatctaccaagccctacaaaaacggacagctgagcaaaagtgatgattgaaatcccatgt  
caagaaagacgacatctggcctagcggcgagatgacctgaaggatctgaccgctaaatacacagaaggaggcaacgcaattctg  
gagaatatctctttctattagtcagagcagcagtggtgactgctggagcaaacagggctcaggaagagcactctgctgctccgattct  
gaggctgctgaatactgagggagaatccagattgacggcgtgctcctgggattctatcaccctgcagcagtgagaaaggcttttggagtc  
atccctcagaaagtgtttatcttcagcggcactcaggaagaacctggaccatacgaacagtggtccgatcaggagatctgaaagtgc  
agacgaagtgggactgctgctgattgaacagtttctgggaagctggactcgtcctggtgagtgaggatgctgctgagccacggc  
cataaacagctgatgtcctggccggagtgctgtcaaaaggctaaatcctgctgctggacgagccaagcggccacctggaccccgctg  
acctaccagatcattagaaggacactgaagcagcatttccgactgaccctgatcctgtgagcagcattgaaagctatgctggagtg  
ccagcagttcctgctcatcgaggaacaaggtccggcagtatgactctatcagaactgctgaatgagcggagctgttttagacagggcca

tctcaccagcgatagggtgaagctgtccctcaccgcaactctagtaagtgtaaatccaagccacagattgccgactgaaggaagagac  
 tgaagaggagggtccaggatacaagactgtgactgactgagatacagcgtaccttcagctcacagacatgataagatacattgatgagttt  
**ggaca**aaccacaactagaatcgactgaaaaaatgctttatttgtgaaatttggatgctattgctttatttgaaccattataagctg  
**caata**aacaagttaacaacaacaattgcattcattttatgtttcaggttcagggggaggtgtgggaggtttttATTAGGAAT  
GGAACACTTTATAGTTTTTTTTTGGACAAAAGATCTAGCTAAAATATAAGATTGAATA  
ATTGAAAATATTAACATTTTAAGTTAAATCTTACCCACTCAATACAATTTGGTAATTT  
GTATCAGAAGCTTAAAAGATAACCTAATAGTTCTTCTACTTCTATAAATTACCCAAA  
TATGTTTTGCAGAGATCTTATGTAAAGCTCTTCATTATAAACTGCTTTCAGGAGCCA  
AAAATTGGGTGGGGGAGCCCCATAAATGTTGAATAAATAGGGGTTTGATTAGATAAA  
TTTTGGTGTAGTTCTATAAATGGCGTGTTATTCAGCCAATAAAAAGGTTTGTTAAAGAA  
TGACTGTGACGGATGTATATGATATACTCTTAAGTGAATAAAGAGTTACAAAATGTT  
ATGTACAAGTTACAAAATGTATGTACATTATGATCCATTTTTTCATAAAATCATATGT  
ATGTATATATGTGTGTCTGGAAGGATAAATTTATCGGTAACCACGTGCGGACCGAGG  
CTGCAGCGTCGTCCTCCCTAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTC  
TGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCG  
GGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG  
 (SEQ ID NO: 336).

Прописные жирные буквы соответствуют последовательности, содержащей ITR AAV (SEQ ID NO: 15 для 5' концевой ITR и SEQ ID NO: 16 для 3' ITR); подчеркнутые заглавные буквы соответствуют нуклеотидной последовательности, содержащей 5' и 3' гомологичные рукава (SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 20, соответственно); прописные курсивные буквы соответствуют нуклеотидной последовательности, содержащей акцептор сайта сплайсинга (SEQ ID NO: 1); строчные буквы (нежирный шрифт) соответствуют нуклеотидной последовательности, содержащей экзоны 11-27 CFTR (SEQ ID NO: 37); и строчные жирные буквы соответствуют нуклеотидной последовательности, содержащей элементы 3'UTR (SEQ ID NO: 159).

Целевой сайт 3821 интрона 10 CFTR.

енPHK:

attggctaccttgggtgatgaGUUUUAGUACUCUGGAAACAGAAUCUACUAAAACAAGGCAAA  
 AUGCCGUGUUUAUCUCGUCAACUUGUUGGCGAGAUUUU (SEQ ID NO: 28), где строчные буквы соответствуют нуклеотидной последовательности, содержащей спейсер енPHK, а прописные буквы соответствуют нуклеотидной последовательности, включающей каркас енPHK.

Донорная матрица:

**CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAA**  
**GCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCG**  
**CGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTGCGGCCGCACGCGT**  
TTAGAGATTAGGTCTTACTCTGTCAACCCAGGCTGAACTTCAGTGGTGTGATCATAGC  
TCACTGTAACCTTGAACCTCCTGGGCTCAATTGACCTTCCGCTTCAGCCTCCCAAAGT  
GCTGGGTTTATAGGCATGAGCCACTGTGTCTGGTCCAATATGCATATATATTTTTTA

ACCTGGATTATCAGAGCTATATTGTGTTTAGGTTTATAAAGCTGTACTATGTGAAAA  
TATCACTTCTAGGTTTAATTTTGTACAAAGGAATTTTATATAGAAATGAGGTAATTC  
AGATTTTTTCCCATGTAATAAGAATTGTA AAAATTTACTGAAACAAACATCAAAAAGA  
TATCTGTTACATGACCTTCCTTTCTTTTGAATATATTTTCAGGTGATATTATTTATTA  
ATTTAAAAATGAAAATTA AAAATATATAAAAAGTTGAAAATTATTCCTTTCTTTACTG  
TCTCTCATCTGTCCATTTTCCATTCTCCTGCATTCCCTCATATACACTTCTGCTTAGGAT  
GATAATTGGAGGCAAGTGAATCCTGAGCGTGATTGATAATGACCTAATAATGATGGGTTT  
TATTTCCAGacttctctgctgatggtcatcatggcgagctggaaccagtgaggggaagatcaaacactcaggacggattcttttgg  
cagtcagttctcatgatcatgctgggaccattaaggagaatatttttggagtctctacgatgaataccgggtacagaagcgtgatcaag  
gcctgccagctggaggaagacattagcaagttcgcagaaaaagataacatcgtgctgggggagggcgggattactctgagtgaggcca  
cggggccagaatctcactggctcgcgagtgataagacgctgatctgtatctgctggactctccctcggctacctggagctgctgaccg  
agaagaatctcagagattgctgctgtaagctgatggtaacaaaaccggattctggtgacatcaaatggaacacctgaagaagc  
agacaaaatcctgattctgcatgagggctcaagctactttatgggacctcagcgaactgcagaatctgcagcccattttctctaagctga  
tgggatgtgactcctttgatcattctctgccaaaagcgcgaactccatctgactgagaccctgcacagattcagcctggaagggcagcct  
cccgtgagctggacagagactaagaacagctctttaaagcagacaggcgagttcgggaaaagcgaaaaaatagcatcctgaacccaatc  
aatagattcgggaagtctcaatcgtgcagaaaactcccctgcagatgaacggcattgaggaagactccgatgaccactggaacgacggc  
tgagcctgggtcccattccgagcagggagaagccatcctgcttaggatcagcgtcattccactggcccaacctgcaggctagaaggc  
gccagagtgctgtaactgatgacacactcagcaaccagggccagaatccatcgggaagactaccgctctacaagaaaatgagtgct  
ggctccacagggcaaacctgactgagctggacatctacagcccggcggctgtcccaggagaccggctggaattctgaggaaatcaatga  
ggaagatctgaaggaatgcttttgcagatatggagagtatcccggcgtgacaactggaaacttacctcgcgtatattaccgtccacaa  
gtctctgattttgtctgatctggtgctggtcatctcctggtgaggtcgcagccagcctggtgctctggtgctggtgaaacacccccac  
tgcaggacaaggggaattctacacatagtagaacaatagctacgccgtgatcattaccctcacaagttcactatgcttctacatctatgtg  
ggcgtcgtgatacactgctggcaatggggtttccagggactgcctctgggtgcacacactgatcactgtcttaagattctgcaccataaaa  
tctgactctgtgctgcaggtccaatgagfacctgaacacactgaagcgaggggaatcctgaatcggtttagcaagacatgcaccatt  
ctggacgatctgctgcctcagaccattttgattcatccagctgctgctgatcgtgattggagcaatcgtgtggtcgcctgctgcagcctta  
catttctgctactgtgccagtcattgtggcctcctcatgctgcgcgctatttctgcagaccagccagcagctgaagcagctggagtct  
gaagggcggagccaatctttacacacctggtgactccctgaaaggactgtggacctgagagccttcggcagggcagccactttgaga  
cactgtccacaaggctctgaacctgcatactgcaaatggtttctgtatctgtctaccctgcgatggttcagatgcggatcagatgatttctg  
gatcttttattccgtcactctcagcattctgaccacaggggagggagaagcgagtggtgatcattctgactctggccatgaacat  
catgagtaccctgcagtggtgctgaatgctccattgacgtggattcactgatgcgctcagtcagccagtggttaagttcatcagatgcc  
acagaggggaagcctactaaatctacaaagccctacaaaacggacagctgagcaaatgatgatcattgaaattccatgtcaagaaag  
acgacatctggcctagcggcggcagatgaccgtgaaggtgctgaccgtaatacacagaagggcaacgcaattctggagaatattct  
cctttctattagtcagagacgcgagtggtgactgctgggacgaacagggtcaggaagagcactctgctgtccgactcctgaggtgctg  
aatactgagggagaatccagattgacggcgtgctcctggattctaccctgcagcagtgagaaaggcttttgagtgatcctcagaa  
agtgtttatttcagggcacattcaggaagaacctggaccatacgaacagtggtccgatcaggagatctggaagtcgcagacgaagtg  
ggactgcgctctgtgattgaacagtttctgggaagctggactctgctggtggtgaggggatgctgctgagccacggccataaacagct  
gatgtcctggccccgagtgctgctgcaaggtctaaaatcctgctgctgacgagccaagcggccacctggaccctgacactaccagat  
cattagaaggacactgaagcaggtcatttccgactgcaccgtgatcctgtgcgagcatcgattgaagctatgctggagtgccagcagttcc  
tggatcagaggaacaaggtccggcagtgatgactctattcagaaactgctgaatgagcggagtgctgttagacagggccatctcaccagc  
gatagggtgaagctgttccctcaccgcaactctagtaagttaaatccaagccacagattgccgactgaaggaagagactgaagaggag

gtccaggatacaagactgtgactgactgagatacagcgtaccttcagctcacagacatgataagatacattgatgagttggacaacc  
 acaactagaatgcagtgaaaaaatgctttattttgtaaattgtgatgctattgctttattttgtaaccattataagetgcaataaaca  
 agttaacaacaacaattgcattcattttatgtttcaggttcaggggaggtgtggagggtttttTCCAACCAAGGTAGC  
CAATCCAGGTAACTTTTTTAGTATCTTCCCAGAGATGTTTCTCTCTATATATATAAT  
CAATATACATTTTTTATTATTCCCCACCTCTCTTTTTATGTAACAATATGCAGAGTTTT  
GCTTCTTGCTTTTCCCACCTATCTTGGACAACCTTCCATATTCAAAGCACAGAGGACTT  
GCACATATGTTTCAGACTGCTGAATATTTCTGTCTCTCCCCTGCCATTTCATATGTTGAA  
ATCCTAATTCCCAAGGTGATGGTATTGCAGGGTGGGGCCTTTGGGAGGTGATTAGTC  
CATGAGGGTGAAGTCTTTAGTAAATGAGATTAGTGTCTTTATAAAAGAAACCTTAGA  
GAGACCCTCACACCTTAGAGAGACCCTCACCCCTTTCTGCCATGTGAGAACACAGCA  
GGAAGACAGCTGGCTATCCAGGATTCAGGAGTCTCTTAGCAGACCCAAATCTGCTG  
GCACCTTGATCTTGGACTTCCCAGCGGTAACCACGTGCGGACCGAGGCTGCAGCGTC  
GTCCTCCCTAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTC  
GCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTGCGCCGACGCCCAGGCTTTGCC  
CGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG (SEQ ID NO:  
 337).

Прописные жирные буквы соответствуют последовательности, содержащей ITR AAV (SEQ ID NO: 15 для 5' концевой ITR и SEQ ID NO: 16 для 3' ITR); подчеркнутые заглавные буквы соответствуют нуклеотидной последовательности, содержащей 5' и 3' гомологичные рукава (SEQ ID NO: 21 и SEQ ID NO: 22, соответственно); прописные курсивные буквы соответствуют нуклеотидной последовательности, содержащей акцептор сайта сплайсинга (SEQ ID NO: 1); строчные буквы (нежирный шрифт) соответствуют нуклеотидной последовательности, содержащей экзона 11-27 CFTR (SEQ ID NO: 37); и строчные жирные буквы соответствуют нуклеотидной последовательности, содержащей элементы 3'UTR (SEQ ID NO: 159).

Целевой сайт 4262 интрона 10 CFTR.

енРНК:

gacagctggctatccaggattcGUUUUAGUACUCUGGAAACAGAAUCUACUAAAACAAGGCAA  
 AAUGCCGUGUUUAUCUCGUCAACUUGUUGGCGAGAUUUU (SEQ ID NO: 29), где строчные буквы соответствуют нуклеотидной последовательности, содержащей спейсер енРНК, а прописные буквы соответствуют нуклеотидной последовательности, включающей каркас енРНК.

Донорная матрица:

**CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAA**  
**GCCCGGGCGTCCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCG**  
**CGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTGCGGCCGCACGCGT**  
**TTATTCCTTTCTTTACTGTCTCTCATCTGTCCATTTTCCATTCCTGCAATCCCTCATC**  
**CAACCAAGGTAGCCAATCCAGGTAACCTTTTTTTAGTATCTTCCCAGAGATGTTTCTCT**  
**CTATATATATAATCAATATACATTTTTTATTATTCCCCACCTCTCTTTTTATGTAACAA**  
**TATGCAGAGTTTTGCTTCTTGCTTTTCCCACCTATCTTGGACAACCTTCCATATTCAA**

GCACAGAGGACTTGCACATATGTTTCAGACTGCTGAATATTTCTGTCTCTCCCCTGCC  
ATTCATATGTTGAAATCCTAATTCCTCAAGGTGATGGTATTGCAGGGTGGGGCCTTTG  
GGAGGTGATTAGTCCATGAGGGTGAAGTCTTTAGTAAATGAGATTAGTGTCTTTATA  
AAAGAAACCTTAGAGAGACCTCACACCTTAGAGAGACCTCACCCCTTTCTGCCAT  
GTGAGAACACAGCAGGAAGACAGCTGGCTATCCAGGATATACACTTCTGCTTAGGATG  
ATAATTGGAGGCAAGTGAATCCTGAGCGTGATTTGATAATGACCTAATAATGATGGGTTTTA  
TTCCAGacttctctgctgatggtcatcatggcgagctggaaccagtgaggggaagatcaaacactcaggacggatttcttttgc  
gtcagttctcatggatcatgctggaccattaaggagaatcatcttttggagtgctctacgatgaataccggtacagaagcgtgatcaaggc  
ctgccagctggaggaagacattagcaagttcgcagaaaaagataacatcgtgctgggggagggcgggattactctgagtgaggccagc  
ggccagaatctcactgctcgcgagtgtaacaggacgctgatctgtatctgctggactctcctctggctacctggacgtgctgaccgag  
aaagaatcttcgagagtgctgtgaagctgatggctaacaaaaccggattctggtgacatcaaagatggaacacctgaagaaagcag  
acaaaactctgattctgcatgagggctcaagctactttatgggacctcagcgaactgcagaatctgcagcccattttctctaagctgatg  
ggatgtgactcctttgatcagttctctccgaaaggcgcaactccatcctgactgagaccctgcacagattcagcctggaaggcgacgctcc  
cgtgagctggacagagactaagaaacagctctttaagcagacagggcgagttcgggaaaagcgaaaaatagcatcctgaaccaatca  
tagtattcggaagtctcaatcgtgcagaaaactcccctgcagatgaacggcattgaggaagactccgatgagccactggaacgacggctg  
agcctggtgccgattccgagcagggagaagccatcctgcttaggatcagcgtcatttccactggcccaaccctgcaggctagaaggcgc  
cagagtgtgctgaatctgatcacactcagcaaccaggccagaatatccatcggaagactaccgctctacaagaaaagtgagctggtg  
ctccacaggcaaacctgactgagctggacatctacagccggcggtgtccagggagaccgggctggaaattctgagaaatcaatgagg  
aagatctgaaggaatgcttttcgacgatagagagatcccccggtgacaactggaacacttacctgcgctatattaccgtccacaagtc  
tctgattttgtcctgatctggtgtctgctcctctggctgaggtgcagccagcctggtgctgctggtgctgctgggaaacaccccactgc  
aggacaaggggaattctacacatagtagaacaatagctacgcctgatcattacctccacaagttcatactatgtctctacatctatgtggg  
cgtcgtgatacactgctggcaatggggttttcagggactgctcctggtgcacacactgatcactgtcttaagattctgcaccataaaatg  
ctgacttctgtgctgaggtccaatgagttaccctgaacacactgaaggcagggggaatcctgaatcggtttagcaaaacatcgccattct  
ggacgatctgctccttgaccatttttgatttaccagctgctgctgatcgtgattggagcaatcgtggtgctgcccgtgctgcagccttaca  
tttctgctgactgtgcccagtcattgtggccttcatctgctgcgcccatttctgcagaccagccagcagctgaagcagctggagctgta  
aggccggagtccaatctttacacactggtgacttccctgaaaggactgtggaccctgagagccttggcaggcagccctactttgagaca  
ctgttccacaaggtctgaaactgcatactgcaaaatggtttctgtatctgtctaccctcgatggtttagatcgggatcgagatgatttctg  
atcttttctgcccgtcaccttcatcagcattctgaccacaggggagggagaaggcagagtgggcatcattctgactctggccatgaacatc  
atgagtaacctgagtggtgctgtaatagctcattgacgtggttactgatgctcagtcagccagtggttaagttcatcgacatgccc  
cagaggggaagcctactaaaatctaccaagccctacaaaaacggacagctgagcaaaagtgatgatcattgaaaatcccatgcaagaaaga  
cgacatctggcctagcggcgagatgacctgaaagatctgaccgtaataacagaaggaggcaacgaattctggagaatatctc  
ctttctattagtcaggacagcagtgaggactgctggacgaacaggtcaggaagagcactctgctgctccgattctgaggctgctga  
atactgagggagaaatcagattgacggcgtgctcctgggattctatcacctgcagcagtgagaaaggcttttggagtcacccctcagaaa  
gtgtttatttccagcggcattcaggaagaacctggaccatacgaacagtggtccgatcaggagatctgaaagtgcagacgaagtg  
gactgctgctgtgattgaacagttcctgggaagctggacttctgctggtgatggggatgctgctgagccacggccataaacagctg  
atgtccctggcccggagtgctgtcaaggctaaaatcctgctgctggacgagccaagcggccacctggaccccgtgacctaccagatc  
attagaaggacactgaagcagctttgcgactgcacctgatctgtgagcagcattgaagctatgctggagtgccagcagttcct  
ggtcatcgaggaaaacaaggtccggcagtatgactctattcagaaactgctgaatgagcggagctgttttagacagccatctcaccagc  
gatagggtgaagctgttccctaccgcaactctagtaagttaaatccagccacagattgccgactgaaggaagagactgaaaggag  
gtccaggatacaagactgtgactgactgagatacagcgtacctcagctc**acagacatgataagatacattgatgagttggacaacc**

**acaactagaatgcagtgaaaaaatgctttatttggaaatttggatgatctattgctttatttgaaccattataagctgcaataaaca  
agttaacaacaacaatgcattcattttatgtttcaggttcagggggaggtgtgggaggtttttTTCAGGAGTCTCTTAG  
CAGACCCAAATCTGCTGGCACCTTGATCTGGACTTCCCAGCCTCCAGAACTGTGAG  
AAATAAATTCCTGTTGTTTATAAGCCACACAGTTCATGGTATTTTGTATAGCAGCCT  
GAACAAGGACACACACACACACACACATGCACACACATTTAAATAGATGCAT  
AGTATTCTATCATATGGATGGATATTCTATGATATAATGAATCACTATTGATTGACA  
TTTGGGTTGTTTCCAATATTTTGTAAACACAAAGAACAACACTACAAATAACTTTAT  
ATACATATCATTTAGCACATCTGCAATTGTATCAGTAGGCTTCCCTATAAGTGGTCAA  
GCATTTGTGTACTIONTGTGATTTTGGTAGATGTTGTCAAATGTCCTTCCCTGAAATTTGT  
ACCAATTCGTACTIONTGCATGCCATACACTCTAAATAGAGTGCTGATTTCCCCACAGCATT  
ACTAACAGATGATATTATCTAATTTAAGGTAACACGTCGGACCGAGGCTGCAGC  
GTCGTCTCCCTAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCG  
CTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCCGACGCCCGGGCTTT  
GCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG (SEQ ID  
NO: 338).**

Прописные жирные буквы соответствуют последовательности, содержащей ITR AAV (SEQ ID NO: 15 для 5' концевой ITR и SEQ ID NO: 16 для 3' ITR); подчеркнутые заглавные буквы соответствуют нуклеотидной последовательности, содержащей 5' и 3' гомологичные рукава (SEQ ID NO: 23 и SEQ ID NO: 24, соответственно); прописные курсивные буквы соответствуют нуклеотидной последовательности, содержащей акцептор сайта сплайсинга (SEQ ID NO: 1); строчные буквы (нежирный шрифт) соответствуют нуклеотидной последовательности, содержащей экзоны 11-27 CFTR (SEQ ID NO: 37); и строчные жирные буквы соответствуют нуклеотидной последовательности, содержащей элементы 3'UTR (SEQ ID NO: 159).

Целевой сайт 5041 интрона 10 CFTR.

енРНК:

acttgaggaggtgaggattaGUUUUAGUACUCUGGAAACAGAAUCUACUAAAACAAGGCAA  
AAUGCCGUGUUUAUCUCGUCAACUUGUUGGCGAGAUUUU (SEQ ID NO: 30), где строчные буквы  
соответствуют нуклеотидной последовательности, содержащей спейсер енРНК, а прописные буквы со-  
ответствуют нуклеотидной последовательности, включающей каркас енРНК.

Донорная матрица:

**CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAA  
GCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCG  
CGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTGCGGCCGCACGCGT  
ACAAAGAACAACACTACAAATAACTTTATATACATATCATTTAGCACATCTGCAATT  
GTATCAGTAGGCTTCCCTATAAGTGGTCAAGCATTGTGTACTTGTGATTTTGGTAGAT  
GTTGTCAAATGTCCTTCCCTGAAATTTGTACCAATTCGTACTIONTGCATGCCATACACTCTA  
AATAGAGTGCTGATTTCCCCACAGCATTAACAGATGATATTATCTAATTTAAA  
AGTTTCTCATCTTATAGGGAAAATAGTATGTCAATGTATTCTTAACTGCATTTCTTT**

TATTATAAGTAGTGTA AAAATATCATTTC AACTTATACACAGGAGGAATTTCTCTCTA  
TATAAAGTGATCCTAGAAATCATAATGAAAAATATCACCAACTCATTAGGAAAATGT  
ACAAAAGGATTGAATAGATATCTCATCAAAAATAAAAATATAAGTGGCCTTTAAACA  
TTGAAAGGTAACATTTGAACAAAGACTTGCAGGAGGTGAGGGA *TATACACTTCTGCTT*  
*AGGATGATAATTGGAGGCAAGTGAATCCTGAGCGTGATTTGATAATGACCTAATAATGATG*  
*GGTTTTATTTCCAG* *G*acttctctgctgatggctcatctggcggagctggaaccagtgaggggaagatcaaacactcaggacgga  
ttcttttgcagtcagttctcatggatcatgctggaccattaaggagaatatcattttggagtgctctacgatgaataccggtacagaagcg  
tgatcaaggcctccagctggaggagacattagcaagttcgcaaaaaagataacatcgtctgggggagggcgggattactctgagtg  
gagggcagcgggccaatctcactggctcgcgagtgtaacaggacgctgatctgtatctgctggactcctctcggctactctggactg  
gctgaccgagaagaatctcagagttgctgtgtaagctgatggctaacaaaaccggattctggtgacatcaaatggaacacctg  
aagaagcagacaaaatctgattctgcatgaggctcaagctactttatggaccttcagcgaactgcagaatctgcagcccattttct  
ctaagctgatgggatgactcctttgatcagttctctgcccgaagggcgaactccatcctgactgagaccctgcacagattcagcctggaag  
gcgacgctcccgtgagctggacagagactaagaacagctctttaagcagacagggcagttcgggaaaagcgaaaaaatgcatcctg  
aaccaatcaatagtattcggagttctcaatcgtgcagaaaactccctgcagatgaacggcattgaggaagactccgatgagccactgg  
aacgacggctgagcctggtgcccgaattccgagcagggagaagccatcctgcttaggatcagcgtcatttccactgcccacccctgcag  
ctagaaggcggcagagtgctgtaactgatgacacactcagcaaccaggccagaatatccatcgggaagactaccgctctacaagaa  
aagtgagtgctgctccacaggaacactgactgagctggacatctacagccggcgtctccaggagaccgggctggaatttctgagg  
aaatcaatgaggaagatctgaaggaatccttttcgacgatatggagatccccgccgtgacaactggaacacttacctgcgctatattac  
cgtccacaagctctgattttgctctgatctggtgtctgctcctctggctgaggtcgcagccagcctggtgctctggtgctggtgaa  
acacccactgcagagcaaggggaattctacacatagtagaaacaatagctacgccgtgatattacctccacaagttcatactatgtcttcta  
catctatgtggcgtcgtgatacactgctggcaatggggttttcaggggactcctctggtgcacacactgatcactgtcttaagattctgc  
accataaaatgctgacttctgctgctcaggctccaatgagtaccctgaacacactgaaggcagggggaatcctgaatcggtttagcaaaagac  
atcgccattctggacgatctgctcctctgaccattttgattcatccagctgctgctgatcgtgattggagcaatcgctgtggtcgcctgctg  
cagccttacatttctgctactgctgagcagctattgtggccttcatcatgctgcgcctatttctgcagaccagccagcagctgaagcagc  
tggagctgaaggccggagtcgaatctttacacactggtgacttccctgaaaggactgaggaccctgagagccttccgagcagcccta  
ctttgagacactgttccacaaggctctgaacctgcatactgcaaatggtttctgtatctgtctaccctgcgatggtttcagatcggatcagat  
gatttctgacttttctcattgccctcaccttcatcagcattctgaccacaggggagggagaaggcagagtgggcatcattctgactctggcc  
atgaacatcatgagtaccctgagtggtgctgtaaatgctccattgacgtggattcactgatgcgctcagtcagccagtggtttaaagttcatcg  
acatgcccacagaggggaagcctactaaatctaccaagccctacaaaacggacagctgagcaaatgatgatcattgaaaattcccattg  
caagaagacgacatctggcctagcggcggcagatgacctgaaggatctgaccgctaatacacagaaggaggcaacgcaattctg  
gagaatatctctttctattagttccaggacagcagtggtgactcctgggacgaacagggtcaggaaagagcactctgctgctccgattcct  
gaggtgctgaatactgagggagaatccagattgacggcgtgctcctgggattctatcaccctgcagcagtgaggaaaaggcttttggagtc  
atcctcagaaagtgttttctcagcggcacattcaggaagaacctggaccatacgaacagtggtccgatcaggagatctggaagtcgc  
agcgaagtgggactgctgctgtgattgaacagttcctgggaagctgacttctcctggtgagtgaggatggggatgctgctgagccagggc  
cataaacagctgatgctcctgcccggagtgctgtcaaaaggtaaaatcctgctgctggacgagccaagcggccacccctggacccctg  
acctaccagatcattagaaggacactgaagcagcatttccgactgcaccgtgatcctgtgcgagcatcattgaagctatgctgagtg  
ccagcagttcctgctatcagggaaaacaaggtccggcagatgacttattcagaactgctgaatgagcggagctgttttagacagggca  
tctcaccagc gatagggtgaagctgttccctaccgcaactctagtaagtgaatccaagccacagattgccgactgaaggaagagac  
tgaagaggaggtccaggatacaagactgtgactgactgagatacagcgtacctcagctcacagacatgataagatacattgatgagttt  
**ggacaaccacaactagaatgcagtgaaaaaatgctttattgtgaaattgtgatgctattgctttattgtaaccattataagctg**

caataacaagttaacaacaacaattgcattcattttatgtttcaggttcagggggaggtgtgggaggtttttTTAGGGAAT  
GCAGACTCTGGGAAGAGTCTTCCAAGTAGCAGGTGAAGCAAGTGCAAAGCTTTCAG  
ATGGGACTGACTATACCTGTCTGGTTTTGAAGAACAGTAAGGAGGTCACTGAGGCTG  
GCATAGAGTAAGACAGGGAGGGTAGAATACTGTCAGAGAAGTAATCGGCCGTGGA  
GGTAGGGGGTAAACCATAAAGTGCTCGTAAAGACTAAGGCTTATTTCTCTGGGTGA  
GATTAGAGGCCACTGGAGAGTTTTAAACAGAAGTAACAGGGCCACTTTGGCTAATG  
TTTTTAGGCTATTCTGTAGGGAGACAAGGGAGGAAGCAAGGAGATGAGTTAGGAGT  
CTATTGTGCCAGTTCAGGCAAGTGATGATGGTGGCTTGATCCAGGTAGTAGTGGAAG  
TAGTATAGTAGGAAGTGATCAGATTCAGGACATGCTTTGAAGGAAGATCCAATAGG  
ATTAATGGATAAGTTGAACAATGGCATATGAGAAAAGTCACAGGGTAACCACGTGC  
GGACCGAGGCTGCAGCGTCGTCCTCCCTAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCA  
CTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCC  
CGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCT  
**GCCTGCAGG** (SEQ ID NO: 339).

Прописные жирные буквы соответствуют последовательности, содержащей ITR AAV (SEQ ID NO: 15 для 5' концевой ITR и SEQ ID NO: 16 для 3' ITR); подчеркнутые заглавные буквы соответствуют нуклеотидной последовательности, содержащей 5' и 3' гомологичные рукава (SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 345, соответственно); прописные курсивные буквы соответствуют нуклеотидной последовательности, содержащей акцептор сайта сплайсинга (SEQ ID NO: 1); строчные буквы (нежирный шрифт) соответствуют нуклеотидной последовательности, содержащей экзона 11-27 CFTR (SEQ ID NO: 37); и строчные жирные буквы соответствуют нуклеотидной последовательности, содержащей элементы 3'UTR (SEQ ID NO: 159).

Целевой сайт 5052 интрона 10 CFTR.

енPHK:

attaggaatgcagactctgggGUUUUAGUACUCUGGAAACAGAAUCUACUAAAACAAGGCAA  
AAUGCCGUGUUUAUCUCGUCAACUUGUUGGCGAGAUUUU (SEQ ID NO: 31), где строчные буквы соответствуют нуклеотидной последовательности, содержащей спейсер енPHK, а прописные буквы соответствуют нуклеотидной последовательности, включающей каркас енPHK.

Донорная матрица:

**CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAA**  
**GCCCCGGCGTCCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCG**  
**CGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTAGGGGTTCTGCGGCCGCACGCGT**  
AATAACTTTATATACATATCATTTAGCACATCTGCAATTGTATCAGTAGGCTTCTAT  
AAGTGGTCAAGCATTTGTGTACTTGTGATTTGGTAGATGTTGTCAAATGTCCTTCCC  
TGAAATTTGTACCAATTCGTAATCATGCCATACACTCTAAATAGAGTGCTGATTTCC  
CCACAGCATTACTAACAGATGATATATCTAATTTAAAAAGTTTCTCATCTTATAGG  
GAAAATAGTATGTCAATGTATTCTTAACTTGCATTTCTTTTATTATAAGTAGTGAAA  
ATATCATTTCAACTTATACACAGGAGGAATTTCTCTCTATATAAAGTGATCCTAGAA

TCATAATGAAAAATATCACCAACTCATTAGGAAAATGTACAAAGGATTGAATAGAT  
ATCTCATCAAAAATAAAAAATATAAGTGGCCTTTAAACATTGAAAGGTAACATTTGA  
ACAAAGACTTGCAGGAGGTGAGGGATTAGGGAATGCAGACTCTTATACACTTCTGCTT  
AGGATGATAATTGGAGGCAAGTGAATCCTGAGCGTGATTGATAATGACCTAATAATGATG  
GGTTTTATTTCCAGacttctctgctgatggcatcatggcgagctggaaccagtgaggggaagatcaaacactcaggacgga  
tttcttttgcagtcagttctcatggatcatgctggaccattaaggagaatcattttggagtgtctctacgatgaataccggtacagaagcg  
tgatcaaggcctgccagctggaggaagacattagcaagttcgcagaaaaagataacatcgtctgctggggagggcgggattactctgagt  
gagccagcgggccaatctcactggctcgcagtgtaacaggacgctgatctgtatctgctggactctccttcggctactctggacgt  
gctgaccgagaagaatcttcgagagttgctgtgtaagctgatggctaacaaaaccggattctgtgacatcaaatggaacacctg  
aagaaagcagacaaaatctgattctgcatgagggctcaagctacttttatgggacctcagcgaactgcagaatctgcagcccattttct  
ctaagctgatgggatgactcctttgatcagttctctgccgaaaggcgaactccatcctgactgagacctgcacagattcagcctggaag  
gagcagctcccgtgagctggacagagactaagaaacagctcttfaagcagacagcgagttcgggaaaagcgaaaaaatagatcctg  
aaccatcaatagatattcggagttctcaatcgtgcagaaaactccctgcagatgaacggcattgaggaagactccgatgagccactgg  
aacgacggctgagcctggtcccattccgagcagggagaagccatcctgctaggatcagcgtcatttccactggcccacacctgcagg  
ctagaaggcgcagagtgctgctaatctgatgacacactcagtaaccaggccagaatccatcggagactaccgctctacaagaa  
aagtgagtctggctccacaggaacactgactgagctggacatctacagccggcgtgtccaggagaccgggctgaaatttctgagg  
aaatcaatgaggaagatctgaaggaatcttttcgacgatagagagtatcccccgctgacaactggaacacttacctgctatattac  
cgtccacaagtctctgattttgtcctgatctggtgtctgcatcttctggctgaggtcgcagccagcctggtgctctgtgctgctgggaa  
acacccactgcagggacaaggggaattctacacatagtagaaacaatagctacgcccgtgatcattacctccacaagttcatactatgtctta  
catctatgtggcgctcgctgatacactgctggcaatggggttttcaggggactgcctctggtgcacacactgatcactgtcttaagattctgc  
accataaaatgctgactctgtctgctgagcctcaatgagtaacctgaacacactgaaggcagggggaatctgaaatctggtttagcaaaagac  
atcgcattctgagcagatctgctcctctgaccattttgattcatccagctgctgctgatcgtgattggagcaatcgtgtgctgctgctg  
cagccttactttctgctactgtgccaatctgtggccttcatctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctg  
tggagtctgaagccggagtcacatctttacacacctggtgacttccctgaaaggactgtggacctgagagccttggcagggcagcccta  
ctttgagacactgttccacaaggctctgaacctgcatactgcaaaatggtttctgtatctgtctaccctgcgatggtttcagatcggatcagat  
gattttctgctatctttcattgctccttcatcagcattctgaccacagggaggagaaaggcagagtgaggcatcattctgactctggcc  
atgaacatcatgagtaacctgagtggtgctgtaatagtctcattgacgtggattcactgatgctcagctcagcagtggttttaagttcatcg  
acatgcccacagaggggaagcctaactaaatctaccaagccctcaaaaaaggcagctgagcaaatgatgatcattgaaaattccatgt  
caagaaaagcagacatctggcctagcggcgggagatgaccgtgaaggatctgaccgtaatacagaaaggaggaacgcaattctg  
gagaatatctcttttctattagtcaggacagcgagtgaggactgctgggacgaacagggtcaggaagagcactctgctgctccgattct  
gaggctgctgaataactgagggagaatcagattgacggcgtgtcctgggattctatcaccctgcagcagtgagaaaggcttttgagct  
atccctcagaaagtgtttattttcagcggcaccattcaggaagaacctggaccatacgaacagtggtccgatcaggagatctgaaagtgc  
agacgaagtgggactgctgctgtgattgaacagtttctgggaagctggacttctcctggtgagtgagggatgctgctgagccacggc  
cataaacagctgatgtcctgcccggagtgctgtcctgaaaggctaaatctgctgctggacgagccaagcggccacctggacccctg  
acctaccagatcattagaaggacactgaagcagcatttggcactgacacctgatcctgctgagcagcatcgattgaagctatgctggagt  
ccagcagttcctgctcagggaaaacaaggtccggcagatgactctattcagaactgctgaaatgagcggagctgttttagacagggca  
tctccccagcgatagggtgaagctgttccctaccgcaactctagtaagttaaatcaagccacagattccgactgaaggaagagac  
tgaagaggaggtccaggatacaagactgtgactgactgagatacagcgtacctcagctcacagacatgataagatacattgatgagttt  
**ggacaaccacaactagaatgcagtgaaaaaatgctttatgtgaaattgtgatgctattgctttatttgaaccattataagctg**  
**caataacaagftaacaacaacattgattcattttatgtttcagggtcagggggaggtgtgggaggtttttGGGAAGAGT**

CTTCCAAGTAGCAGGTGAAGCAAGTGCAAAGCTTTCAGATGGGACTGACTATACCT  
GTCTGGTTTGAAGAACAGTAAGGAGGTCAGTACTGAGGCTGGCATAGAGTAAGACAGGG  
AGGGTAGAATACTGTCAGAGAAGTAATCGGCGGTGGAGGTAGGGGGTAAACCATA  
AAGTGCTCGTAAAGACTAAGGCTTATTTCTCTGGGTGAGATTAGAGGCCACTGGAG  
AGTTTTAAACAGAAGTAACAGGGGCCACTTTGGCTAATGTTTTTAGGCTATTCTGTAG  
GGAGACAAGGGAGGAAGCAAGGAGATGAGTTAGGAGTCTATTGTGCCAGTTCAGGC  
AAGTGATGATGGTGGCTTGATCCAGGTAGTAGTGGAAGTAGTATAGTAGGAAGTGA  
TCAGATTCAGGACATGCTTTGAAGGAAGATCCAATAGGATTAATGGATAAGTTGAA  
CAATGGCATATGAGAAAAGTCACAGAGGAGTCAAAGATGATTCGGTAACCACGTGC  
GGACCGAGGCTGCAGCGTCGTCCTCCCTAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCA  
CTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCC  
CGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCT  
GCCTGCAGG (SEQ ID NO: 340).

Прописные жирные буквы соответствуют последовательности, содержащей ITR AAV (SEQ ID NO: 15 для 5' концевой ITR и SEQ ID NO: 16 для 3' ITR); подчеркнутые заглавные буквы соответствуют нуклеотидной последовательности, содержащей 5' и 3' гомологичные рукава (SEQ ID NO: 346 и SEQ ID NO: 347, соответственно); прописные курсивные буквы соответствуют нуклеотидной последовательности, содержащей акцептор сайта сплайсинга (SEQ ID NO: 1); строчные буквы (нежирный шрифт) соответствуют нуклеотидной последовательности, содержащей экзона 11-27 CFTR (SEQ ID NO: 37); и строчные жирные буквы соответствуют нуклеотидной последовательности, содержащей элементы 3'UTR (SEQ ID NO: 159).

Целевой сайт 5278 интрона 10 CFTR.

енPHK:

*tgggtgagattagagccactgUUUUAGUACUCUGGAAACAGAAUCUACUAAAACAAGGCAA*  
*AAUGCCGUGUUUAUCUCGUCAACUUGUUGGCGAGAUUUU* (SEQ ID NO: 32), где строчные буквы соответствуют нуклеотидной последовательности, содержащей спейсер енPHK, а прописные буквы соответствуют нуклеотидной последовательности, включающей каркас енPHK.

Донорная матрица:

**CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAA**  
**GCCCGGGCGTCCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCG**  
**CGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTGCGGCCGCACGCGT**  
TAGGGAAAATAGTATGTCAATGTATTCTTAACTTGCATTTCTTTTATTATAAGTAGTG  
TAAAATATCATTTCAACTTATACACAGGAGGAATTTCTCTCTATATAAAGTGATCCT  
AGAATCATAATGAAAAATATCACCAACTCATTAGGAAAATGTACAAAGGATTGAAT  
AGATATCTCATCAAAAATAAAAATATAAGTGGCCTTTAAACATTGAAAGGTAACAT  
TTGAACAAAGACTTGCAGGAGGTGAGGGATTAGGGAATGCAGACTCTGGGAAGAGT  
CTTCCAAGTAGCAGGTGAAGCAAGTGCAAAGCTTTCAGATGGGACTGACTATACCT  
GTCTGGTTTGAAGAACAGTAAGGAGGTCAGTACTGAGGCTGGCATAGAGTAAGACAGGG

AGGGTAGAATACTGTCAGAGAAGTAATCGGCGGTGGAGGTAGGGGGTAAACCATA  
AAGTGCTCGTAAAGACTAAGGCTTATTTCTCTGGGTGAGATTAGAGGCCATATACACT  
TCTGCTTAGGATGATAATTGGAGGCAAGTGAATCCTGAGCGTGATTTGATAATGACCTAAT  
AATGATGGGTTTTATTTCCAGacttctctgctgatggtcatcatggcgagctggaaccagtgaggggaagatcaaacat  
caggacggattcttttgcagtcagttctcatggtatcatgctggaccattaaggagaatcattttggagtgcctacgatgaataccggt  
acagaagcgtgatcaaggcctgccagctggaggaagacattagcaagttccagaaaaagataacatcgtgctgggggagggcgggatt  
actctgagtggaggccagcggccagaatctcactggctcgcgagtgataaggacgctgatctgtatctgctgactctccctcggcta  
cctggacgtgctgaccgagaagaatcttcgagagttgctgtgtaagctgatggctaacaaaaccggattcgtgacatcaaatgag  
aacacctgaagaaagcagacaaaatcctgatctgatgggctcaagctactttatgggacctcagcgaactgcagaatctgcagccc  
gattttccttaagctgatgggatgtgactcctttgatcagttctctgccaaaaggcgcaactccatcctgactgagaccctgcacagattcag  
cctggaagcgcagcctccctgagctggacagactaagaacagctcttttaagcagacagggcaggttcggggaagcgaataata  
gcatcctgaacccaataatagattcggaaagtctcaatcgtgcagaaaactcccctgcagatgaacggcattgaggaagactccgatgag  
ccactggaacgacggctgagcctgggctccgattccgagcagggagaagccatcctgcctaggtacagcgtcattccactggcccaacc  
ctgcaggtgagaagggccagagtgctgtaactgatgacacactcagtcacacagggccagaatcctcgggaagactaccgctct  
acaagaaaagtgagctgctggctccacagggcaaacctgactgagctggacatctacagccggcggtgtccaggagaccgggctggaat  
ttctgaggaatcaatgaggaagatgaaggaatccttttcgacgatagggagatccccggctgacaactggaacacttacctgctg  
ctatattaccgtccacaagtctgatctgtctgctgatctggtgctgctgctcctgctgaggtcgcagccagcctggtgctgctgctg  
gctgggaacaccccactgcaggaacggggaattctacacatagtagaacaatagctacggcctgatcattacctccacaagttcatact  
atgtcttcatcatctatgtggcgctgctgatacactgctggcaatgggggttttcaggggactgcctctgctgacacactgatcactgctct  
aagattctgaccataaaatgctcattctgtctgctgcaggctccaatgagtagcctgaacacactgaaggcagggggaatcctgaatcggttt  
agcaagacatcgccattctggacgatctgctgctctgaccatttttgattcatccagctgctgctgatcgtgattggagcaatcgtggtg  
cgccgtgctgcagccttacatttctgctgctactgctccagtcattgtggcctcatcatgctgctgctcctatttctgcagaccagccagcag  
ctgaagcagctggagtctgaagggcggagtcctacacactggtgactccctgaaaggactgtggaccctgagagcctcggca  
ggcagccctactttgagacactgtccacaaggctctgaacctgcatactgcaaatggtttctgtatctgctacccctgcaggtttcagatgc  
ggatcgagatgatttctgctatctttcattgcccgtcacctcatcagcattctgaccacaggggagggagaaggcagagtggtgcaatcattct  
gactctggccatgaacatcatgtagctcctcagtggtgctgtaatagtcctgacgtggtgactgactgctgctcagtcagccgagtggt  
taagttcatcgacatgccacagaggggaagcctactaatactaccaagccctacaaaacggcagcagctgagcaaatgatgatcattgaa  
aattccatgtcaagaaagcagacatctggcctagcggcggcagatgaccgtgaaggatctgaccgtaatacacagaaggaggcaa  
cgcaattctggagaatatctcctttctattagtcaggacagcagtggtgactgctgggacgaacagggcaggaagagcactctgctgt  
ccgattcctgaggctgctgaatactgagggaagaatccagattgacggcgtgctcctgggattctatccctgcagcagtgagaaaggc  
ttttggagtcatccctcagaaaagtgtttatfttcagcggcacattcaggaagaacctggaccatacgaacagtggtccgatcaggagatctg  
gaaagtgcagacgaagtgggactgctgctgctgattgaaagcttctgggaagctggactgctcctgctgctgctgctgctgctgctg  
agccacggccataaacagctgatgtgctggccggagtgctgctgcaaggctaaaatcctgctgctggacgagccaagcggccacctg  
gacccctgacctaccagatcattagaaggacactgaagcaggtcatttccgactgcaccgtgatcctgtgagcagcattgaaagctat  
gctggagtgccagcagttcctgctcagcaggaagaaaggtccggcagatgactctattcagaaactgctgaatgagcggagctgttta  
gacagccatctaccagcagatagggtgaagctgttccctaccgcaactctagtaagtgaatcaagccacagattgccgactgaa  
ggaaagactgaagaggaggtccaggatacagactgtgactgactgagatacagcgtacctcagctcagacatgataagatacat  
**tgatgagttggacaacacactagaatgcagtgaaaaaatgctttattgtgaaatttgatgctattgctttatttgaacca**  
**ttataagctgaataaacaagttaacaacaacaattgcattcattttatgtttcaggttcagggggaggtgtgggaggtttttCTG**  
GAGAGTTTTAAACAGAAGTAACAGGGCCACTTTGGCTAATGTTTTTAGGCTATTCTG

TAGGGAGACAAGGGAGGAAGCAAGGAGATGAGTTAGGAGTCTATTGTGCCAGTTCA  
GGCAAGTGATGATGGTGGCTTGATCCAGGTAGTAGTGGAAAGTAGTATAGTAGGAAG  
TGATCAGATTCAGGACATGCTTTGAAGGAAGATCCAATAGGATTAATGGATAAGTT  
GAACAATGGCATATGAGAAAAGTCACAGAGGAGTCAAAGATGATTCCAAGCTTTCT  
GGACTGAGTAACTGGAAGGATAAATGTGCCGTTTACTAGAAAAGATAATGGGAGAAA  
CAGGTTTTGGATGGAGCTTGGTTTGGGAATATTAAGTTTGAAATGCCTATTTGACAT  
CCAAATAGAGATGTTAGTTGGATGTACAAGTCTAGTTTCAAGGAAGAGGGGGCTGG  
TAGTGTGAAGATGGGGCTGGATAAGATTCTAAAGGAAAGAGGGTTGAGGTAACCAC  
GTGCGGACCGAGGCTGCAGCGTCGTCCTCCCTAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTG  
GCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGT  
CGCCCGACGCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGC  
**AGCTGCCTGCAGG** (SEQ ID NO: 341).

Прописные жирные буквы соответствуют последовательности, содержащей ITR AAV (SEQ ID NO: 15 для 5' концевой ITR и SEQ ID NO: 16 для 3' ITR); подчеркнутые заглавные буквы соответствуют нуклеотидной последовательности, содержащей 5' и 3' гомологичные рукава (SEQ ID NO: 348 и SEQ ID NO: 349, соответственно); прописные курсивные буквы соответствуют нуклеотидной последовательности, содержащей акцептор сайта сплайсинга (SEQ ID NO: 1); строчные буквы (нежирный шрифт) соответствуют нуклеотидной последовательности, содержащей экзона 11-27 CFTR (SEQ ID NO: 37); и строчные жирные буквы соответствуют нуклеотидной последовательности, содержащей элементы 3'UTR (SEQ ID NO: 159).

Целевой сайт 5343 интрона 10 CFTR.

енPHK:

tgcttctcccttgctccctaGUUUUAGUACUCUGGAAACAGAAUCUACUAAAACAAGGCAAA  
AUGCCGUGUUUAUCUCGUCACUUGUUGGCGAGAUUUU (SEQ ID NO: 33), где строчные буквы соответствуют нуклеотидной последовательности, содержащей спейсер енPHK, а прописные буквы соответствуют нуклеотидной последовательности, включающей каркас енPHK.

Донорная матрица:

**CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGCCGGGCAAA**  
**GCCCGGGCGTGGGCGACCTTTGGTGCCTCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCG**  
**CGCAGAGAGGGAGTGGCCA**ACTCCATCACTAGGGGTTCTGCGGCCGCACGCGT  
TATCATTTCAACTTATACACAGGAGGAATTTCTCTCTATATAAAGTGATCCTAGAAT  
CATAATGAAAAATATCACCAACTCATTAGGAAAAATGTACAAAGGATTGAATAGATA  
TCTCATCAAAAATAAAAATATAAGTGGCCTTTAAACATTGAAAGGTAACATTTGAAC  
AAAGACTTGCAGGAGGTGAGGGATTAGGGAATGCAGACTCTGGGAAGAGTCTTCCA  
AGTAGCAGGTGAAGCAAGTGCAAAGCTTTCAGATGGGACTGACTATACTGTCTGG  
TTTGAAGAACAGTAAGGAGGTCACTGAGGCTGGCATAGAGTAAGACAGGGAGGGT  
AGAATACTGTCAGAGAAGTAATCGGCGGTGGAGGTAGGGGGTAAACCATAAAGTGC  
TCGTAAGACTAAGGCTTATTTCTCTGGGTGAGATTAGAGGCCACTGGAGAGTTTTA

AACAGAAGTAACAGGGCCACTTTGGCTAATGTTTTTAGGCTATTCTGTAGTATACACT  
TCTGCTTAGGATGATAATTGGAGGCAAGTGAATCCTGAGCGTGATTTGATAATGACCTAAT  
AATGATGGGTTTTATTCCAGacttctctgctgatggctcatcatggcgagctggaaccagtgaggggaagatcaaacact  
caggacggatttcttttgcagtcagttctcatgatcatcctgggaccattaaggagaatatttttggagtgctctacgatgaataccggt  
acagaagcgtgatcaaggcctgcagctggaggaagacattagcaagttcgcagaaaaagataacatcgtgctgggggagggcgggatt  
actctgagtgaggccagcggccagaatctcactggctcgcgcagtgtaacaaggacgctgatctgtatctgctggactctccctcggcta  
cctggacgtgctgaccgagaagaatcttcgagagttgctgctgtaagctgatggctaacaaaaccggattctggtgacatcaaatgatgg  
aacacctgaagaaagcagacaaaatcctgattctgcatgagggctcaagctactttatgggacctcagcgaactcagaatctgcagccc  
gattttctcttaagctgatgggatgactcctttgatcagttctctgccaaaaggcgcaactccatcctgactgagaccctgcacagattcag  
cctggaaggcgacgctcccgtgagctggacagagactaagaacagctctttaagcagacagcgagttcggggaaaagcggaaaaata  
gcatctgaaccataatagtagttcgaagtctcaatcgtgcagaaaactcccctgcagatgaacggcattgaggaagactccgatgag  
ccactggaacgacggctgagcctggtgccgattccgagcagggagaagccatcctgcttaggatcagcgtcatttccactggcccaacc  
ctgcaggtagaaggcgccagagtgctgaatctgatgacacactcagtcaccagggccagaatattccatcggaagactaccgctct  
acaagaaaagtgagctgctccacaggcaaacctgactgagctggacatctacagccggcgctgctccaggagaccgggctggaaat  
ttctgagaaatcaatgaggaagatctgaaggaatgcttttgcagatatggagagtatccccgcctgacaacttggaaacttactctgcg  
ctatattaccgtccacaagctctgattttgctctgatctggtgctgctcatcttctgctgaggtcgcagccagcctggtgctctggtgct  
gctgggaaacaccctcagcagacaaggggaattctacacatagtagaaacaatagctacgcccgtgatcattaccacaagttcatact  
atgtctctacatctatgtggcgtcgtgatacactgctggcaatgggggttttcaggggactgcctctggtgcacacactgatcactgtctct  
aagattctgcaccataaaatgctgattctgtgctgcaggctccaatgagtagctgaacacactgaaggcagggggaatcctgaatcggttt  
agcaagacatcgccattctgagcagatctgctcctctgaccatttttatttcaatccagctgctgctgatcgtgattggagcaatcgctggt  
cgcctgctgcagccttcaatttctgctactgtgccagctattgtggccttcatgctgcgcctatttctcagaccagccagcag  
ctgaagcagctggagctgaagcccggagccaatcttaccacacctggtgacttccctgaaaggactgaggacctgagagcctcggca  
ggcagccctactttgagacactgttccacaaggctctgaacctgcatactgcaaattggtttctgtatctgtctaccctgcgatggtttcagatgc  
ggatcgagatgattttctgatcttttctgctcactgtgccatctcagcattctgaccacaggggagggagaaggcagagtgggcatcttct  
gactctggccatgaacatcatgagtagcctgagctgggctgtaaatgctccattgacgtggttactgatgcgctcagtcagccagtggt  
taagttcatcgacatgccacagaggggaagcctaactaatactaccaagccctacaaaacggacagctgagcaaatgagatcattgaa  
aattcccatgcaagaaagacgacatctggcctagcggcgccagatgacctgaagatctgacctaaatacacagaaggaggca  
cgcaattctggagaatatctcctttctattagtcaggacagcagtgaggactgctgggacgaacagggtcaggaagagcactctgctgt  
ccgattctgaggtgctgaatactgaggagaaatccagattgacggcgtgctcctgggatttctaccctgcagcagtgagaaaaggc  
tttggagctatccctcagaaaagtggtttttcagcggcactttaggaagaacctggaccatacgaacagtggctccgatcaggagatctg  
gaaagtcgacagcaagtgaggactgcgctctgtgattgaacagtttctgggaagctggacttctcctggtgagtgaggatgctgctg  
agccacggccataaacagctgatgctgcccggagtgctgctgcaaaaggctaaaatcctgctgctggacgagccaagcggcccactg  
gacccctgacctaccagatcattagaaggacactgaagcaggcatttgcgactgcaccgtgatcctgtgagcagcattgagctat  
gctggagtgccagcagttcctggtatcgaggaaaacaaggtccggcagtagtacttattcagaaactgctgaatgagcggagctgttta  
gacaggccatctcaccagcagatagggtgaagctgttccctaccgcaactctagtaagttaaatccaagccacagattgcccactgaa  
ggaagagactgaagaggaggtccaggatacaagactgtgactgactgagatacagcgtacctcagctcacagacatgataagatacat  
**tgatgattggacaaaccacaactagaatgcagtgaaaaaatgctttattgtgaaatttgatgctattgctttattgtaacca**  
**ttataagctgaataaacaagttaacaacaacaattgattcattttatgtttcaggttcagggggaggtgtgggaggtttttGGA**  
GACAAGGGAGGAAGCAAGGAGATGAGTTAGGAGTCTATTGTGCCAGTTCAGGCAAG  
TGATGATGGTGGCTTGATCCAGGTAGTAGTGGAAGTAGTATAGTAGGAAGTGATCA

GATTCAGGACATGCTTTGAAGGAAGATCCAATAGGATTAATGGATAAGTTGAACAA  
TGGCATATGAGAAAAGTCACAGAGGAGTCAAAGATGATTCCAAGCTTTCTGGACTG  
AGTAACTGGAAGGATAAATGTGCCGTTTACTAGAAAGATAATGGGAGAAACAGGTT  
TTGGATGGAGCTTGGTTTGGGAATATTAAGTTTAAAATGCCTATTTGACATCCAAAT  
AGAGATGTTAGTTGGATGTACAAGTCTAGTTTCAAGGAAGAGGGGGCTGGTAGTGT  
GAAGATGGGGCTGGATAAGATTCTAAAGGAAAGAGGGTTGATAAGAAGAGAAAAGG  
GGTGTAGGGGTTAGCCTAAGGGCATTCTAAGTATTAGAGGTTAAGGAGGGGTAACC  
ACGTGCGGACCGAGGCTGCAGCGTCGTCCTCCCTAGGAACCCCTAGTGATGGAGT  
TGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAG  
GTCGCCCGACGCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGC  
GCAGCTGCCTGCAGG (SEQ ID NO: 342).

Прописные жирные буквы соответствуют последовательности, содержащей ITR AAV (SEQ ID NO: 15 для 5' концевой ITR и SEQ ID NO: 16 для 3' ITR); подчеркнутые заглавные буквы соответствуют нуклеотидной последовательности, содержащей 5' и 3' гомологичные рукава (SEQ ID NO: 350 и SEQ ID NO: 351, соответственно); прописные курсивные буквы соответствуют нуклеотидной последовательности, содержащей акцептор сайта сплайсинга (SEQ ID NO: 1); строчные буквы (нежирный шрифт) соответствуют нуклеотидной последовательности, содержащей экзона 11-27 CFTR (SEQ ID NO: 37); и строчные жирные буквы соответствуют нуклеотидной последовательности, содержащей элементы 3'UTR (SEQ ID NO: 159).

Целевой сайт 5538 интрона 10 CFTR.

енPHK:

tggcatatgagaaaagtcacagGUUUUAGUACUCUGGAAACAGAAUCUACUAAAACAAGGCAA  
AAUGCCGUGUUUUAUCUCGUCAACUUGUUGGCGAGAUUUU (SEQ ID NO: 34), где строчные буквы соответствуют нуклеотидной последовательности, содержащей спейсер енPHK, а прописные буквы соответствуют нуклеотидной последовательности, включающей каркас енPHK.

Донорная матрица:

**CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAA**  
**GCCCCGGGCGTGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCG**  
**CGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTAGGGGTTCTGCGGCCGCACGCGT**  
GGATTAGGGAATGCAGACTCTGGGAAGAGTCTTCCAAGTAGCAGGTGAAGCAAGTG  
CAAAGCTTTTCAGATGGGACTGACTATACCTGTCTGGTTTGAAGAACAGTAAGGAGG  
TCACTGAGGCTGGCATAGAGTAAGACAGGGAGGGTAGAATACTGTGAGAGAAGTAA  
TCGGCGGTGGAGGTAGGGGGTAAACCATAAAGTGCTCGTAAAGACTAAGGCTTATT  
TCTCTGGGTGAGATTAGAGGCCACTGGAGAGTTTTAAACAGAAGTAACAGGGCCAC  
TTTGGCTAATGTTTTTAGGCTATTCTGTAGGGAGACAAGGGAGGAAGCAAGGAGAT  
GAGTTAGGAGTCTATTGTGCCAGTTCAGGCAAGTGATGATGGTGGCTTGATCCAGGT  
AGTAGTGAAGTAGTATAGTAGGAAGTGATCAGATTCAGGACATGCTTTGAAGGAA  
GATCCAATAGGATTAATGGATAAGTTGAACAATGGCATATGAGAAAAGTCATATACA

CTCTGCTTAGGATGATAATTGGAGGCAAGTGAATCCTGAGCGTGATTGATAATGACCTA  
 ATAATGATGGGTTTTATTTCAGacttctctgctgatggtcatcatggcgagctggaaccagtgagggaagatcaaac  
 actcaggacggattcttttgcagtcagttctcatgcatcctgggaccattaaggagaatatcattttggagtgctctacgatgaatacc  
 ggtacagaagcgtgatcaaggcctgaccagctggaggaagacattagcaagttcgagaaaaagataacatcgtgctggggaggcg  
 gattactctgagtgaggccagcgggccaagaatctcactggctcgcgcagtgtaacaggacgctgatctgtatctgctgactctccctcg  
 gctacctggacgtgctgaccgagaaagaaatcttcgagagtgctgctgtaagctgatggctaacaaaacccggattctggtgacatcaag  
 atggaacacctgaaagagcagacaaaatctgattctgcatgagggctcaagctactttatgggaccttcagcgaactgcagaatctgca  
 gcccattttctctaagctgatgggatgtgactcctttgatcagttctctgccgaaaggcgaactccatcctgactgagaccctgcacaga  
 ttacgctggaaggcagcctccctgagctggacagagactaagaaacagctctttaagcagacagggcgagttcgggaaaaagcga  
 aaatagcatcctgaacccaatcaatagtattcggaagtctcaatcgtgcagaaaaactcccctgcagatgaacggcattgaggaagactccg  
 atgagccactggaaacagcggtgagcctgggtcccattccgagcaggaggaagccatcctgcctaggatcagcgtcattccactggcc  
 caaccctgcaggctagaaggcggcagagtgctgtaactgatgacacactcagtaaccaggggcagaataatccatcggaagactaccg  
 cctctacaagaaaagtgagctggctccacaggcaaacctgactgagctggacatctacagccggcggtgtccaggagaccgggctg  
 gaaatttctgagaaatcaatgaggaagatctgaaggaatcttttcgacgatagagagatccccccggtgacaactggaacacttac  
 ctgcgctatattaccgtccacaagtctctgatttttctctgatctggtgctggtcatcttctggctgaggtcgcagccagcctggtgctctg  
 ggctgctgggaaacacccactgcaggacaaggggaattctacatagtagaacaatagctacccgtgatcattacctccacaagttc  
 atactatgtctctacatctatgtggcgtcgtgatacactgctggcaatggggttttcaggggactgcctctggtgcacacactgatcactg  
 tctctaagattctgcaccataaaatgctgactctgctgctgaggtccaatgagtagccctgaacacactgaaggcagggggaatcctgaatc  
 ggtttagcaagacatccattctgacgatctgctgctcctgacatttttatttcaaccagctgctgctgatcgtgattggagcaatcgctg  
 tggctcccgtgctgacgcttacattttctgctgactgtgccagtcatttggccttcatcatgctgctgctgcctatttctgcagaccagccag  
 cagctgaagcagctggagctgaaggccggagtcattttacacactggtgacttccctgaaaggactgtggaccctgagagcctcg  
 gcaggcagccctactttgagacactgtccacaaggctgtaacctgcatactgcaaatggfctgtatctgtctaccctgcgatggtttcag  
 atgaggatcgagatgatttctgctgatttttctgctgacccctcagcattctgaccacaggggagggagaaggcagagtggtgcatc  
 attctgactctggccatgaacatcatgagtagcctgcagtgggctgtgaatagctccattgacgtgattcaactgatgctcagcagccga  
 gtgttaagtcatcgacatgcccacagaggggaagcctactaaatctaccaagcccaaaaaacggacagctgagcaaatgatgatcat  
 tgaattccatgtcaagaagacgacatctggcctagcggcgggcagatgacctgaaggatctgaccgctaatacacagaaggag  
 gcaacgcaattctgagaataatctctttctattagtcaggacagcagtgaggactgctgggacgaacagggtcaggaaagagcactct  
 gctgtccgattctgaggctgctgaatactgagggagaaatccagattgacggcgtgctctgggattctatcaccctgcagcagtgaggaa  
 aggttttggagctatccctcagaaagtgtttttcagcggcaccattcaggaaagacctggaccatacgaacagtggtccgatcaggaga  
 tctggaagtgcagacgaagtgggactgcgctctgtgattgaacagtttctgggaagctggacttctctggtgagtgagggatgctg  
 gctgagccacggccataaacagctgatgtgctgcccggagtgctgtcaaaaggctaaaatcctgctgctggacgagccaagcggccca  
 cctggacccctgacctaccagatcattagaaggacactgaagcaggtatttccgactgcaccgtgatcctgtgctgagcatcgattgaa  
 gctatgctggagtgccagcagttcctgctcatcaggaaacaaggtccggcagtagctctattcagaactgctgaatgagcggagct  
 gtttagacagccatctcaccagcagtagggtaggtggtccctaccgcaactctagtaagttaaatcaagccacagattgccgac  
 tgaaggagagactgaagagggtccaggatacaagactgtgactgactgagatacagcgtacctcagctcacagacatgataagat  
**acattgatgagttggacaacccaactagaatgcagtgaaaaaatgctttatttgaatttggatgctattgctttatttga**  
**accattataagctgcaataaacaagtfaacaacaacaattgcattctttatgtttcaggttcaggggaggtgtggagggttttt**  
CAGAGGAGTCAAAGATGATTCCAAGCTTCTGGACTGAGTAACTGGAAGGATAAAT  
GTGCCGTTTACTAGAAAGATAATGGGAGAAACAGGTTTTGGATGGAGCTTGGTTTTG  
GGAATATTAAGTTGAAATGCCTATTTGACATCCAATAGAGATGTTAGTTGGATGT

ACAAGTCTAGTTTCAAGGAAGAGGGGGCTGGTAGTGTGAAGATGGGGCTGGATAAG  
ATTCTAAAGGAAAGAGGGTTGATAAGAAGAGAAAGGGGTGTAGGGGTTAGCCTAA  
GGGCATTCTAAGTATTAGAGGTTAAGGAGGTGGGTGAAGAAAACCCAATAAAATAA  
AAGTCTGAGAAGACAAAGCTAGTGAATGAATGTGGTATCCCGGAACCCAAGTATG  
TCAAGCAGAAGGGTGTATCAACTAGGTCAAATGCTCATTTCATCAAGTAAGATGAA  
ACTGTTATAATTAACCGGTGTCTTCTGAAATACGGAGATAACTCGTGAAGTATGAA  
CCACGTGCGGACCGAGGCTGCAGCGTCGTCCTCCCTAGGAACCCCTAGTGAATGGA  
GTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAA  
AGGTCGCCCAGCGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGC  
GCGCAGCTGCCTGCAGG (SEQ ID NO: 343).

Прописные жирные буквы соответствуют последовательности, содержащей ITR AAV (SEQ ID NO: 15 для 5' концевой ITR и SEQ ID NO: 16 для 3' ITR); подчеркнутые заглавные буквы соответствуют нуклеотидной последовательности, содержащей 5' и 3' гомологичные рукава (SEQ ID NO: 352 и SEQ ID NO: 353, соответственно); прописные курсивные буквы соответствуют нуклеотидной последовательности, содержащей акцептор сайта сплайсинга (SEQ ID NO: 1); строчные буквы (нежирный шрифт) соответствуют нуклеотидной последовательности, содержащей экзона 11-27 CFTR (SEQ ID NO: 37); и строчные жирные буквы соответствуют нуклеотидной последовательности, содержащей элементы 3'UTR (SEQ ID NO: 159).

Целевой сайт 6150 интрона 10 CFTR.

енРНК:

*ccttattctttgatatactccGUUUUAGUACUCUGGAAACAGAAUCUACUAAAACAAGGCAAAA*  
 UGCCGUGUUUAUCUCGUCAACUUGUUGGCGAGAUUUU (SEQ ID NO: 35), где строчные буквы соответствуют нуклеотидной последовательности, содержащей спейсер енРНК, а прописные буквы соответствуют нуклеотидной последовательности, включающей каркас енРНК.

Донорная матрица:

**CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAA**  
**GCCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCG**  
**CGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTAGGGGTTCTGCGGCCGCACGCGT**  
GGAATATTAAGTTTGAAATGCCTATTTGACATCCAAATAGAGATGTTAGTTGGATGT  
ACAAGTCTAGTTTCAAGGAAGAGGGGGCTGGTAGTGTGAAGATGGGGCTGGATAAG  
ATTCTAAAGGAAAGAGGGTTGATAAGAAGAGAAAGGGGTGTAGGGGTTAGCCTAA  
GGGCATTCTAAGTATTAGAGGTTAAGGAGGTGGGTGAAGAAAACCCAATAAAATAA  
AAGTCTGAGAAGACAAAGCTAGTGAATGAATGTGGTATCCCGGAACCCAAGTATG  
TCAAGCAGAAGGGTGTATCAACTAGGTCAAATGCTCATTTCATCAAGTAAGATGAA  
ACTGTTATAATTAACCGGTGTCTTCTGAAATACGGAGATAACTCGTGAAGTAAATGAA  
AGCAATAGTAGAGAAGGTCAAACCTTGACCAGAATGAAATTAGAAAGAATAAGAGG  
AAAGAAAAGACCAAATACAGACAACCATTGATGCCTTATCTTTGATATACTATAC  
ACTTCTGCTTAGGATGATAATTGGAGGCAAGTGAATCCTGAGCGTGATTTGATAATGACCT

AATAATGATGGGTTTTATTCCAGacttctctgctgatggatcatcatggcgagctggaacccagtgaggggaagatcaa  
 aactcaggacggatttcttttgcagtcagtttcatggatcatgctggaccattaaggagaataatcattttgagtgctctacgatgaata  
 ccggtacagaagcgtgatcaaggcctccagctggaggagacattagcaagttcgcagaaaaagataacatcgtctgggggagggc  
 gggattactctgagtgaggccagcgggccaagaatctcactggctcgcgagtgatagaagacgctgalctgatctgctggactctccct  
 cggctacctggagctgctgaccgagaaagaatcttcgagagtgctgtgtaagctgatggctaacaaaacccgattctggtgacatcaa  
 agatggaacacctgaagaaagcagacaaaatcctgattctgcatgaggctcaagctactttatgggacctcagcgaactgcagaatcg  
 cagccccgattttcttaagctgatgggatgactccttggatcgtctcggaaaggcgcaactccatctgactgagaccctgcaca  
 gattcagcctggaaggcgagctcccgtgagctggacagagactaagaaacagctctttaagcagacagggcaggtcggggaaaagcga  
 aaaaatagcatcctgaacccaatcaatagttctcggaagtctcaatcgtgcagaaaactcccctgcagatgaacggcattgaggaagactc  
 cgtatgaccactggaacgacggctgagcctgggtcccgatccgagcagggaagccatcctgcttaggatcagcgtcatttccactgg  
 cccaacctgcaggctagaaggcgccagagtgctgtaatctgatcacactcagtaaccaggccagaataatcctcggaagactac  
 cgcctctacaagaaaagtgagtgctggctccacagcgaacctgactgagctggacatctacagccggcggtgtcccaggagaccgggc  
 tggaaattctgaggaatcaatgaggagatctgaaggaatgcttttgcagcatatggagagatcccccgctgacaactggaacatt  
 acctgctatattaccgtccacaagctctgattttgctgctgctggtgtctgctccttctggctgaggtcgcagccagcctggtgctc  
 tggctgctgaggaaacacccccactgcagagcaagggaattctacacatagtagaaacaatagctacgctgtatcattcctcacaag  
 ttacatactgcttctacatctatgtggcgtcgtgatacactgctggcaatggggttttcaggggactgctctgtgacacactgatca  
 tgtcttaagattctgaccataaaatgctcattctgtgctgcaggctccaatgagtaacctgaacacactgaaggcagggggaatcctgaa  
 tcggttagcaaagacatcgccattctggacgatctgctgcctctgaccattttgattcatccagctgctgctgatctgattggagcaatcgc  
 tgtgctgcccgtgctgcagccttaccatttctgctgactgtgcccagtcattgtggcctcatcatgctgcgcccatttctgcagaccagcc  
 agcagctgaagcagctggagctgaaggccggagtcacattttacacacctggtgactccctgaaaggactgtggaccctgagagcctt  
 cggcaggcagccctactttgagacactgtccacaaggctctgaacctgcatactgcaaattggtttctgtatctgtctaccctcgatggttc  
 agatgcccagatgagatgatttctgactcttttctcctccctcactcctcagcattctgaccacaggggagggagaaggcagagtgggca  
 tcatctgactctggccatgaacatcatgagtaacctgcagtgggctgtgaaatgctccattgacgtggattcactgatcgctcagtcagccg  
 agtgttaagttcatcgacatcccacagaggggaagcctactaaatctaccaagccctacaaaaacggacagctgagcaaatgtagatc  
 attgaaaatcccatgtaagaagacgacatctggcctagcggcgagatgacctgaaggatctgaccgctaaatacacagaagga  
 ggcaacgcaattctggagaatctccttttctattagtcaggacagcagtgaggactgctgggacgaacagggtcaggaaagagcactc  
 tctgtcccattcctgagcctgtaactactgagggagaatccagattgacggcgtgctcctggattctatcacctcgcagcagtgagaga  
 aaggctttggagtcacccctcagaaagtgtttttcagcggcacattcagggaagaacctggaccatacgaacagtggtccgatcaggag  
 atctggaaagtcgacagcaagtgaggactcgctctgtgattgaacatttctgggaagctggactcgtcctggtggatgggggatgctg  
 gctgagccacggccataaacagctgatgtgcctggcccggagtgctgtcaaaaggctaaaatcctgctgctgacagccaagcggccca  
 cctggaccctgacactaccagatcattagaaggacactgaagcaggcatttccgactgcaccgtgatcctgtgcgagcatcgattgaa  
 gctatctgagtgccagcagttcctgctcagggaaaacaaggctccgagctatgactctattcagaaactgctgaatgagcggagct  
 gtttagacagggccatctaccagcagatagggtgaagctgttccctcaccgcaactctagtaagttaaatccaagccacagattccgcac  
 tgaaggaagagactgaagagggtccaggatacaagactgtgactgactgagatacagcgtacctcagctcacagacatgataagat  
**acattgatgagttggacaaaccacaactagaatgcagtgaaaaaatgctttatttggaaatttggatgctattgctttatttga**  
**accattataagctcaataaacaagftaacaacaacaattgcattcattttatgttcagggtcagggggaggtgtgggaggttttt**  
TCCTGGAGTCCACTTGCTAATACAATTGACCCTTAAACAATACAGGCTTGAAGTCA  
TGGGTCCACTTATTTGTGAATTTTTTTTTCAGTTAATACATTGGAAAATTTTTGGGGTT  
TTTTGACAATTTGAAAAAACTCACAACTGTCTAGCCTAGAAAATACCGAGAAAATTA  
AGAAAAAGTAAGATATGCCATGAATGCATAAAATATATGTAGACACTAGCCTATTT  
TATCATTGCTACTATAAAATATACACAATCTATTATAAAAAGTTAAAATTTATCAA  
AACTTAACACACACTAACACCTACCCTACCTGGCACCACTTACAGTAAAGAGAAAT  
GTAATAAACATAAAAATGTAGTATTAACCATAATGGCATAAAAATAATTGTAGT  
ACATATGGTACTACTGTAATAATTTGGAAGCCACTTCTGTTGCTATTACGGTAAGC  
TCAAGCATTGTGGATAGCCATTTAAAACACCACGTGATGCTAATCAGGTAACCACGT  
 GCGGACCGAGGCTGCAGCGTCGTCCTCCCTAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGC  
 CACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTGC  
 CCCGACGCCCGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG  
 CTGCCTGCAGG (SEQ ID NO: 344).

Прописные жирные буквы соответствуют последовательности, содержащей ITR AAV (SEQ ID NO: 15 для 5' концевой ITR и SEQ ID NO: 16 для 3' ITR); подчеркнутые заглавные буквы соответствуют нуклеотидной последовательности, содержащей 5' и 3' гомологичные рукава (SEQ ID NO: 354 и SEQ ID NO: 355, соответственно); прописные курсивные буквы соответствуют нуклеотидной последовательности, содержащей акцептор сайта сплайсинга (SEQ ID NO: 1); строчные буквы (нежирный шрифт) соответствуют нуклеотидной последовательности, содержащей экзона 11-27 CFTR (SEQ ID NO: 37); и строчные жирные буквы соответствуют нуклеотидной последовательности, содержащей элементы 3'UTR (SEQ ID NO: 159).

#### Результаты.

Дизайн двойных систем генного редактирования AAV для исправления мутаций гена CFTR: На фиг. 1 показана схема, изображающая иллюстративные стратегии редактирования гена CFTR. Более 99% мутаций, вызывающих муковисцидоз, расположены между экзонами 11 и 27 гена CFTR. AAV может служить донором одноцепочечной ДНК для эффективной вставки ДНК, опосредованной гомологически направленной репарацией (HDR) в месте разреза CRISPR-Cas9. Наборы доноров AAV супер-экзона CFTR были сконструированы таким образом, чтобы содержать левый и правый гомологические плечи из выбранных сайтов разрезания CRISPR-Cas9 в интроне 10 CFTR (LHA и RHA), кДНК включающую экзон 11 до экзона 27 гена CFTR дикого типа, а также акцепторный сайт сплайсинга и стоп-сигнал. На фиг. 1A изображена стратегия, основанная на двух векторах AAV. Первый вектор AAV экспрессирует saCAS9 и енРНК для индуцирования специфического двухцепочечного разреза ДНК в интроне 10 гена CFTR, а второй вектор AAV служит донорной матрицей HDR. На фиг. 1B изображена стратегия, основанная на одном векторе AAV.

Идентификация эффективных комплексов генного редактирования saCAS9-gRNAs в интроне 10 CFTR: Клетки-предшественники легких (LPC) были электропорированы мРНК saCAS9 вместе с енРНК, нацеленной на сайт, расположенный в интроне CFTR (см. фиг. 2). Положительным и отрицательным контролем были клетки, электропорированные мРНК saCAS9 вместе с VEGFA нРНК или без нРНК, соответственно. Процент инделов определяли с помощью анализа TIDE через 72 часа после электропорации. нРНК с частотой инделов выше порогового значения рассматривались как активные сайты нРНК. Пороговое значение было установлено как 7,5% частоты инделов (4 SD значения выше среднего значения отрицательного контроля). Выживаемость клеток показана в процентах, при этом контрольные электропорации были произвольно приняты за 100%. Индел и выживаемость клеток на фиг. 2 представляют собой средние значения 2 независимых экспериментов (n=3). 10 нРНК-кандидатов были отобраны на основе частоты инделов, выживаемости клеток и расположения в интроне 10 CFTR (белые треугольники). См. табл. 1 для последовательностей енРНК, протестированных в данном исследовании, вместе с показателями INDEL и выживаемости клеток.

Затем LPC, полученные от двух доноров с муковисцидозом (14071 и 14335), были электропорированы мРНК saCAS9 вместе с нРНК, нацеленной на один из 10 сайтов-мишеней интрона 10 CFTR. Процент инделов определяли с помощью анализа TIDE через 72 часа после электропорации. Не было обнаружено существенных различий в частоте инделов между донорами LPC для каждого из 10 целевых сайтов енРНК-кандидатов (фиг. 3).

Определение согласованности паттернов инделов в целевых сайтах 10 кандидатных енРНК: Паттерны инделов для 10 сайтов-мишеней енРНК-кандидатов (идентифицированы и помечены на фиг. 2) были определены в LPC от двух независимых доноров. Процент инделов определяли с помощью анализа TIDE через 72 часа после электропорации. Не было обнаружено существенных различий в частоте инделов между донорами LPC для каждого из 10 кандидатов выбранных нРНК (фиг. 4).

Определение процента инделов суперэкзона CFTR с помощью HDR в LPC: LPC электропорировали мРНК saCAS9 вместе с енРНК, нацеленной на один из 10 сайтов-мишеней-кандидатов. Клетки LPC помещали на среду, содержащую AAV-векторы суперэкзона CFTR. Уровень гомологически зависимой рекомбинации (HDR) измеряли методом кЦПЦП после 5 суток обработки в LPC и после 5 недель дифференциации LPC в НВЕ. Функция CFTR была измерена в 5-недельных дифференцированных НВЕ с помощью анализа Ussing (см. фиг. 6). Процент гомологически-зависимой рекомбинации (HDR) суперэкзона 11-27 CFTR и выживаемость клеток, соответствующих 10 целевым сайтам нРНК-кандидатов в LPC, показаны на фиг. 7.

Определение функциональной коррекции CFTR в НВЕ, полученных из LPC, подвергшихся генному редактированию: LPC dF508/dF508 электропорировали с или без мРНК saCAS9 и енРНК, нацеленной на один из 10 сайтов-мишеней-кандидатов. Клетки LPC помещали на среду, содержащую AAV-векторы суперэкзона CFTR. Уровень гомологически зависимой рекомбинации (HDR) измеряли методом кЦПЦП после 5 суток обработки в LPC и после 5 недель дифференциации LPC в НВЕ. Функция CFTR была измерена в 5-недельных дифференцированных НВЕ с помощью анализа Ussing (см. фиг. 6). Процент гомологически-зависимой рекомбинации (HDR) суперэкзона 11-27 CFTR и функциональная коррекция, соответствующих 10 целевым сайтам нРНК-кандидатов в LPC, показаны на фиг. 8.

### Другие варианты осуществления

Все признаки, раскрытые в данном описании, могут быть объединены в любой комбинации. Каждый признак, раскрытый в данном описании, может быть заменен альтернативным признаком, служащим той же, эквивалентной или аналогичной цели. Таким образом, если четко не указано иное, каждый раскрытый признак является только примером общей серии эквивалентных или аналогичных признаков.

Из приведенного выше описания специалист в данной области техники может легко установить существенные характеристики настоящего изобретения, не отступая от его сущности и объема, может внести различные изменения и модификации изобретения, чтобы адаптировать его к различным применениям и условиям. Таким образом, другие варианты осуществления также находятся в пределах формулы изобретения.

#### Эквиваленты.

Несмотря на то, что несколько патентоспособных вариантов осуществления были описаны и проиллюстрированы в данном документе, специалисты в данной области техники легко определяют множество других способов, и/или структур для обеспечения функции, и/или получения результатов, и/или одного или более преимуществ, описанных в настоящем документе, и каждый из таких вариантов и/или модификаций считается находящимся в пределах объема вариантов осуществления описанного в настоящем документе изобретения. В более общем смысле специалистам в данной области техники будет понятно, что все параметры, размеры, материалы и конфигурации, описанные в данном документе, предназначены для иллюстрации и что фактические параметры, размеры, материалы и/или конфигурации будут зависеть от конкретного применения или применений, для которых используются идеи изобретения. Специалисты в данной области техники узнают или смогут установить, используя не более чем обычные эксперименты, многие эквиваленты конкретных патентоспособных вариантов осуществления изобретения, описанных в данном документе. Следовательно, следует понимать, что вышеупомянутые варианты осуществления представлены только в качестве примера и что в рамках прилагаемой формулы изобретения и ее эквивалентов варианты осуществления изобретения могут быть реализованы иначе, чем конкретно описано и заявлено. Патентоспособные варианты осуществления настоящего изобретения направлены на каждый отдельный признак, систему, изделие, материал, набор и/или способ, описанный в данном документе. Кроме того, любая комбинация двух или более таких признаков, систем, изделий, материалов, наборов и/или способов, если такие признаки, системы, изделия, материалы, наборы и/или способы не противоречат друг другу, включается в объем настоящего изобретения.

Все определения, как они определены и используются в данном документе, следует понимать как контролирующие определения словаря, определения в документах, включенных посредством ссылки, и/или общепринятые значения определенных терминов.

Все ссылки, патенты и патентные заявки, раскрытые в данном документе, включены посредством ссылки в отношении объекта, для которого каждый из них цитируется, что в некоторых случаях может охватывать весь документ.

Упоминания единственного числа в описании и формуле изобретения, если явно не указано иное, следует понимать следует понимать как означающие "по меньшей мере один".

Фразу "и/или", употребляемую в данном документе в описании и в формуле изобретения, следует понимать как означающую "любой из или оба вместе" для элементов, соединенных таким образом, т.е. элементов, которые в одних случаях присутствуют вместе, а в других - раздельно. Множественные элементы, перечисленные с помощью "и/или", должны толковаться одинаково, то есть "один или более" из элементов, соединенных таким образом. Необязательно могут присутствовать другие элементы, отличные от элементов, конкретно обозначенных фразой "и/или", независимо от того, связаны они или не связаны с этими конкретно указанными элементами. Таким образом, в качестве неограничивающего примера ссылка на "А и/или В" при использовании в сочетании с неограничивающей формулировкой, такой как "содержащий", может относиться в одном варианте осуществления только к А (необязательно включая элементы, отличные от В); в другом варианте осуществления только к В (необязательно включая элементы, отличные от А); в еще одном варианте осуществления как к А, так и к В (необязательно включая другие элементы); и т.п.

Используемый в данном документе в описании и в формуле изобретения "или" следует понимать как имеющий то же значение, что и "и/или", как определено выше. Например, при разделении элементов в списке "или" или "и/или" следует интерпретировать как включающее, т.е., включение по меньшей мере одного, но также и более одного, из количества или списка элементов, и, необязательно, дополнительных элементов, не внесенных в список. Только термины, явно указывающие на обратное, такие как "только один из" или "ровно один из" или, при использовании в формуле изобретения, "состоящий из" будут относиться к включению ровно одного элемента из количества или списка элементов. Как правило, термин "или", используемый в данном документе, должен интерпретироваться только как указывающий на исключительные альтернативы (то есть "один или другой, но не оба"), когда ему предшествуют условия исключительности, такие как "либо", "один из", "только один из" или "ровно один из". "Состоящий по существу из" при использовании в формуле изобретения имеет свое обычное значение, используемое в области патентного права.

Используемая в данном документе в описании и формуле изобретения фраза "по меньшей мере один" в отношении списка из одного или более элементов должна пониматься как означающая по меньшей мере один элемент, выбранный из любого одного или более элементов в списке элементов, но не обязательно включая по меньшей мере один из каждого элемента, конкретно перечисленного в списке элементов, и не исключая любые комбинации элементов в списке элементов. Это определение также допускает, что могут необязательно присутствовать другие элементы помимо элементов, специально указанных в списке элементов, к которым относится фраза "по меньшей мере один", независимо от того, связаны они или не связаны с этими конкретно указанными элементами. Таким образом, в качестве неограничивающего примера "по меньшей мере один из А и В" (или, эквивалентно, "по меньшей мере один из А или В" или, что эквивалентно, "по меньшей мере один из А и/или В") может относиться в одном варианте осуществления по меньшей мере к одному, необязательно включающему более одного, А, при отсутствии В (и необязательно включая элементы, отличные от В); в другом варианте осуществления по меньшей мере к одному, необязательно включающему более одного, В, при отсутствии А (и необязательно включая элементы, отличные от А); в еще одном варианте осуществления по меньшей мере к одному, необязательно включающему более одного, А, и по меньшей мере к одному, необязательно включающему более одного, В (и необязательно включающему другие элементы); и т.п.

Также следует понимать, что, если явно не указано иное, в любых заявленных в данном документе способах, которые включают более одной стадии или действия, порядок стадий или действий способа не обязательно ограничивается порядком, в котором стадии или действия способа указаны.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Система редактирования генов для модификации гена трансмембранного регулятора муковисцидоза (CFTR), содержащая:

(a) первый полинуклеотид, который содержит первую нуклеотидную последовательность, кодирующую экзон 11-27 гена CFTR;

(b) РНК-направляемую ДНК-эндонуклеазу или второй полинуклеотид, содержащий вторую нуклеотидную последовательность, кодирующую РНК-направляемую ДНК-эндонуклеазу; и

(c) направляющую РНК (нРНК), причем нРНК направляет расщепление РНК-направляемой ДНК-эндонуклеазой на целевой сайт, где целевой сайт является положением 1220, 2068, 3821, 4262, 5041, 5052, 5278, 5343, 5538 или 6150 интрона 10 в гене CFTR, или третий полинуклеотид, который содержит третью нуклеотидную последовательность, кодирующую нРНК.

2. Система редактирования генов по п.1, в которой первая нуклеотидная последовательность не содержит последовательностей интрона.

3. Система редактирования генов по п.1 или 2, в которой первый полинуклеотид дополнительно содержит 5' гомологичное плечо выше первой нуклеотидной последовательности и 3' гомологичное плечо ниже первой нуклеотидной последовательности, где 5' гомологичное плечо включает четвертую последовательность нуклеиновой кислоты, которая гомологична области выше целевого сайта, и где 3' гомологичное плечо включает пятую последовательность нуклеиновой кислоты, которая гомологична области ниже целевого сайта.

4. Система редактирования генов по п.3, в которой 5' гомологичное плечо и 3' гомологичное плечо включают четвертую и пятую последовательности нуклеиновой кислоты, выбранные из группы, состоящей из:

- (i) SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18, соответственно;
- (ii) SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 20, соответственно;
- (iii) SEQ ID NO: 21 и SEQ ID NO: 22, соответственно;
- (iv) SEQ ID NO: 23 и SEQ ID NO: 24, соответственно;
- (v) SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 345, соответственно;
- (vi) SEQ ID NO: 346 и SEQ ID NO: 347, соответственно;
- (vii) SEQ ID NO: 348 и SEQ ID NO: 349, соответственно;
- (viii) SEQ ID NO: 350 и SEQ ID NO: 351, соответственно;
- (ix) SEQ ID NO: 352 и SEQ ID NO: 353, соответственно; и
- (x) SEQ ID NO: 354 и SEQ ID NO: 355, соответственно.

5. Система редактирования генов по любому из пп.1-4, в которой первый полинуклеотид дополнительно содержит 5' гомологичное плечо и первый фрагмент, расположенный выше первой нуклеотидной последовательности и ниже 5' гомологичного плеча, и при этом первый фрагмент содержит акцепторный сайт сплайсинга.

6. Система редактирования генов по п.5, в которой первый фрагмент включает нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1.

7. Система редактирования генов по любому из пп.1-6, в которой РНК-направляемая ДНК-эндонуклеаза содержит сигнал ядерной локализации (NLS), или второй полинуклеотид дополнительно содержит шестую нуклеотидную последовательность, кодирующую NLS, которая слита в рамке со вто-

рой нуклеотидной последовательностью.

8. Система редактирования генов по п.7, в которой NLS представляет собой NLS SV40.

9. Система редактирования генов по любому из пп.1-8, в которой РНК-направляемая ДНК-эндонуклеаза представляет собой эндонуклеазу Cas9.

10. Система редактирования генов по п.9, в которой эндонуклеаза Cas9 представляет собой фермент Cas9 *Staphylococcus aureus* (saCas9).

11. Система редактирования генов по любому из пп.1-10, в которой третья нуклеотидная последовательность включает одну из следующих:

(i) ACCCAGCCTGACACCAAATTTA (SEQ ID NO: 2);  
 (ii) TACTAAAAGGCAGCCTCCTAGA (SEQ ID NO: 3);  
 (iii) ATTGCTACCTTGGTTGGATGA (SEQ ID NO: 4);  
 (iv) GACACTGGCTATCCAGGATTC (SEQ ID NO: 5);  
 (v) ATTGCAGGAGGTGAGGGATTA (SEQ ID NO: 6);  
 (vi) ATTAGGAATGCAGACTCTGGG (SEQ ID NO: 7);  
 (vii) TGGGTGAGATTAGAGGCCACTG (SEQ ID NO: 8);  
 (viii) TGCTTCCTCCCTTGTCTCCCTA (SEQ ID NO: 9);  
 (iv) TGGCATATGAGAAAAGTCACAG (SEQ ID NO: 10); и  
 (x) CCTTATTCTTTTGATATACTCC (SEQ ID NO: 11); или  
 третья нуклеотидная последовательность содержит одну из следующих:

(i) ACCCAGCCUGACACCAAUUUA (SEQ ID NO: 51);  
 (ii) UACUAAAAGGCAGCCUCCUAGA (SEQ ID NO: 61);  
 (iii) AUUGGCUACCUUGGUUGGAUGA (SEQ ID NO: 88);  
 (iv) GACAGCUGGCUAUCCAGGAUUC (SEQ ID NO: 96);  
 (v) ACUUGCAGGAGGUGAGGGAUUA (SEQ ID NO: 109);  
 (vi) AUUAGGGAAUGCAGACUCUGGG (SEQ ID NO: 110);  
 (vii) UGGGUGAGAUUAGAGGCCACUG (SEQ ID NO: 114);  
 (viii) UGCUUCCUCCUUGUCUCCCUA (SEQ ID NO: 115);  
 (iv) UGGCAUAUGAGAAAAGUCACAG (SEQ ID NO: 119); и  
 (x) CCUUAUUCUUUUGAUUAUACUCC (SEQ ID NO: 137).

12. Система редактирования генов по п.11, в которой третья нуклеотидная последовательность дополнительно содержит каркасную последовательность.

13. Система редактирования генов по п.12, в которой каркасная последовательность включает нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 12.

14. Система редактирования генов по любому из пп.1-13, в которой (a), (b) и (c) расположены в едином векторе.

15. Система редактирования генов по любому из пп.1-13, в которой (a) и (c) расположены в первом векторе, а (b) расположена во втором векторе.

16. Система редактирования генов по любому из пп.1-13, в которой (a) расположена в первом векторе, а (b) и (c) расположены во втором векторе.

17. Система редактирования генов по любому из пп.14-16, в которой вектор(ы) является(ются) вирусным(и) вектором(ами).

18. Система редактирования генов по п.17, в которой вирусный вектор(ы) представляет собой аденоассоциированный вирусный (AAV) вектор(ы).

19. Вирусная частица, содержащая систему редактирования генов по любому одному из пп.1-18.

20. Вирусная частица по п.19, где вирусная частица, представляющая собой аденоассоциированную вирусную частицу (AAV).

21. Способ редактирования гена CFTR, включающий приведение в контакт клетки с (i) системой редактирования генов по любому из пп.1-18; или (ii) вирусной частицей по п.19 или 20.

22. Способ по п.21, в котором клетка содержит мутацию в одном или более экзонах 11-27 гена CFTR.

23. Способ по п.22, в котором мутация представляет собой F508del, I507del, G542X, S549N, G551D, R553X, D1152H, N1303K, W1282X, 2789+5G>A или 3849+10kbC>T.

24. Способ по любому из пп.21-23, в котором этап приведения в контакт выполняют путем введения системы редактирования генов или вирусной частицы нуждающемуся в этом субъекту.

25. Способ по п.24, в котором систему редактирования генов или вирусную частицу вводят в дыхательные пути субъекта.

26. Способ по п.24 или 25, в котором субъектом является человек-пациент, страдающий муковисцидозом.

27. Способ по п.26, в котором человек-пациент представляет собой ребенка.

28. Способ по любому из пп.21-23, в котором клетка представляет собой стволовую клетку.

29. Способ по п.28, в котором клетка представляет собой клетку iPSC или бронхоальвеолярную стволовую клетку.

30. Способ по п.28 или 29, дополнительно включающий введение клетки с отредактированным геном CFTR нуждающемуся в этом субъекту.

31. Способ по п.30, в котором клетку с отредактированным геном CFTR вводят в дыхательные пути субъекта.

32. Способ по п.30 или 31, в котором субъектом является человек-пациент, страдающий муковисцидозом.

33. Способ по п.32, в котором человек-пациент представляет собой ребенка.

34. Нуклеиновая кислота, содержащая:

(a) первую нуклеотидную последовательность, содержащую последовательность, кодирующую экзона с 11 по 27 гена трансмембранного регулятора проводимости муковисцидоза (CFTR);

(b) 5' гомологичное плечо выше первой нуклеотидной последовательности, где 5' гомологичное плечо включает вторую последовательность нуклеиновой кислоты, которая гомологична области выше целевого сайта в интроне 10 гена CFTR; и

(c) 3' гомологичное плечо ниже первой нуклеотидной последовательности, где 3' гомологичное плечо включает третью последовательность нуклеиновой кислоты, которая гомологична области ниже целевого сайта в интроне 10 гена CFTR;

при этом целевой сайт представляет собой положением 1220, 2068, 3821, 4262, 5041, 5052, 5278, 5343, 5538 или 6150 интрона 10 в гене CFTR.

35. Нуклеиновая кислота по п.34, в которой первая нуклеотидная последовательность не содержит последовательностей интрона.

36. Нуклеиновая кислота по п.34 или 35, в которой первая нуклеотидная последовательность дополнительно содержит первый фрагмент выше последовательности, кодирующей экзона с 11 по 27 гена CFTR, и ниже 5' гомологичного плеча, при этом первый фрагмент содержит акцепторный сайт сплайсинга; и/или четвертую нуклеотидную последовательность, кодирующую РНК-направляемую ДНК-эндонуклеазу, необязательно слитую в рамке с NLS.

37. Нуклеиновая кислота по любому из пп.34-36, в которой вторая и третья последовательности нуклеиновых кислот выбирают из группы, состоящей из:

(i) SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18, соответственно;

(ii) SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 20, соответственно;

(iii) SEQ ID NO: 21 и SEQ ID NO: 22, соответственно;

(iv) SEQ ID NO: 23 и SEQ ID NO: 24, соответственно;

(v) SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 345, соответственно;

(vi) SEQ ID NO: 346 и SEQ ID NO: 347, соответственно;

(vii) SEQ ID NO: 348 и SEQ ID NO: 349, соответственно;

(viii) SEQ ID NO: 350 и SEQ ID NO: 351, соответственно;

(ix) SEQ ID NO: 352 и SEQ ID NO: 353, соответственно; и

(x) SEQ ID NO: 354 и SEQ ID NO: 355, соответственно.

38. Нуклеиновая кислота по п.36 или 37, в которой первый фрагмент включает нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1.

39. Нуклеиновая кислота по любому из пп.34-38, дополнительно содержащая пятую нуклеотидную последовательность, кодирующую нРНК, причем нРНК направляет расщепление РНК-направляемой ДНК-эндонуклеазой в целевой сайт.

40. Нуклеиновая кислота по п.39, в которой пятая нуклеотидная последовательность включает одну из следующих:

(i) ACCCAGCCTGACACCAAATTTA (SEQ ID NO: 2);

(ii) TACTAAAAGGCAGCCTCCTAGA (SEQ ID NO: 3);

(iii) ATTGCTACCTTGGTTGGATGA (SEQ ID NO: 4);

(iv) GACAGCTGGCTATCCAGGATTC (SEQ ID NO: 5);

(v) ACTTGACAGGAGGTGAGGGATTA (SEQ ID NO: 6);

(vi) ATTAGGGAATGCAGACTCTGGG (SEQ ID NO: 7);

(vii) TGGGTGAGATTAGAGGCCACTG (SEQ ID NO: 8);

(viii) TGCTTCCTCCCTTGTCTCCCTA (SEQ ID NO: 9);

(iv) TGGCATATGAGAAAAGTCACAG (SEQ ID NO: 10); и

(x) CCTTATCTTTTGATATACTCC (SEQ ID NO: 11); или

где пятая нуклеотидная последовательность содержит одну из следующих:

(i) ACCCAGCCUGACACCAAUUUA (SEQ ID NO: 51);

(ii) UACUAAAAGGCAGCCUCCUAGA (SEQ ID NO: 61);

(iii) AUUGGCUACCUUGGUUGGAUGA (SEQ ID NO: 88);

(iv) GACAGCUGGCUAUCCAGGAUUC (SEQ ID NO: 96);

(v) ACUUGCAGGAGGUGAGGGAUUA (SEQ ID NO: 109);

(vi) AUUAGGGAAUGCAGACUCUGGG (SEQ ID NO: 110);

(vii) UGGGUGAGAUUAGAGGCCACUG (SEQ ID NO: 114);

- (viii) UGCUUCCUCCCUUGUCUCCCUA (SEQ ID NO: 115);
- (iv) UGGCAUAUGAGAAAAGUCACAG (SEQ ID NO: 119); и
- (x) CCUUAUUCUUUUGAUUAACUCC (SEQ ID NO: 137).

41. Нуклеиновая кислота по п.40, в которой пятая нуклеотидная последовательность дополнительно содержит каркасную последовательность.

42. Нуклеиновая кислота по п.41, в которой каркасная последовательность включает нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 12.

43. Нуклеиновая кислота по любому из пп.34-42, в которой нуклеиновая кислота представляет собой вирусный вектор.

44. Нуклеиновая кислота по п.43, в которой вирусный вектор представляет собой вектор AAV.

45. Нуклеиновая кислота, содержащая:

(a) первую нуклеотидную последовательность, кодирующую РНК-направляемую ДНК-эндонуклеазу, и

(b) вторую нуклеотидную последовательность, кодирующую нРНК, причем нРНК направляет расщепление РНК-направляемой ДНК-эндонуклеазой в целевой сайт гена CFTR, при этом целевой сайт является положением 2068, 3821, 4262, 5041, 5052, 5278, 5343, 5538 или 6150 интрона 10 в гене CFTR;

при этом каждая из первой нуклеотидной последовательности и второй нуклеотидной последовательности функционально связаны с промотором.

46. Нуклеиновая кислота по п.45, в которой РНК-направляемая ДНК-эндонуклеаза представляет собой эндонуклеазу Cas9.

47. Нуклеиновая кислота по п.46, в которой эндонуклеаза Cas9 представляет собой saCas9.

48. Нуклеиновая кислота по любому из пп.45-47, в которой вторая нуклеотидная последовательность включает одну из следующих:

- (i) TACTAAAAGGCAGCCTCCTAGA (SEQ ID NO: 3);
  - (ii) ATTGGCTACCTTGGTTGGATGA (SEQ ID NO: 4);
  - (iii) GACAGCTGGCTATCCAGGATTC (SEQ ID NO: 5);
  - (iv) ACTTGCAGGAGGTGAGGGATTA (SEQ ID NO: 6);
  - (v) ATTAGGGAATGCAGACTCTGGG (SEQ ID NO: 7);
  - (vi) TGGGTGAGATTAGAGGCCACTG (SEQ ID NO: 8);
  - (vii) TGCTTCCTCCCTTGTCTCCCTA (SEQ ID NO: 9);
  - (viii) TGGCATATGAGAAAAGTCACAG (SEQ ID NO: 10); и
  - (ix) CCTTATTCTTTTGATATACTCC (SEQ ID NO: 11); или
- где вторая нуклеотидная последовательность содержит одну из следующих:

- (i) UACUAAAAGGCAGCCUCCUAGA (SEQ ID NO: 61);
- (ii) AUUGGCUACCUUGGUUGGAUGA (SEQ ID NO: 88);
- (iii) GACAGCUGGCUAUCCAGGAUUC (SEQ ID NO: 96);
- (iv) ACUUGCAGGAGGUGAGGGAUUA (SEQ ID NO: 109);
- (v) AUUAGGGAUUGCAGACUCUGGG (SEQ ID NO: 110);
- (vi) UGGGUGAGAUUAGAGGCCACUG (SEQ ID NO: 114);
- (vii) UGCUUCCUCCCUUGUCUCCCUA (SEQ ID NO: 115);
- (viii) UGGCAUAUGAGAAAAGUCACAG (SEQ ID NO: 119); и
- (iv) CCUUAUUCUUUUGAUUAACUCC (SEQ ID NO: 137).

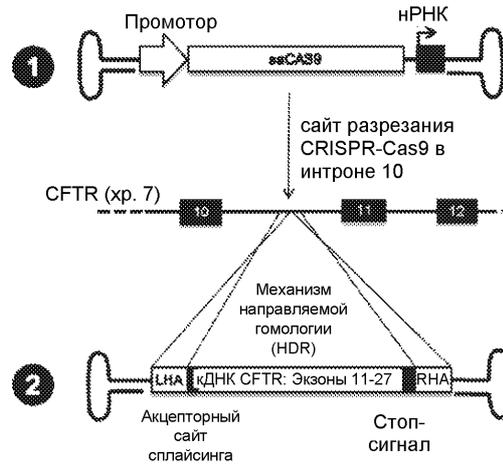
49. Нуклеиновая кислота по любому из пп.45-48, в которой вторая нуклеотидная последовательность дополнительно содержит каркасную последовательность.

50. Нуклеиновая кислота по п.49, в которой каркасная последовательность включает нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 12.

51. Нуклеиновая кислота по любому из пп.45-50, в которой нуклеиновая кислота расположена в вирусном векторе.

52. Нуклеиновая кислота по п.51, в которой вирусный вектор представляет собой вектор AAV.

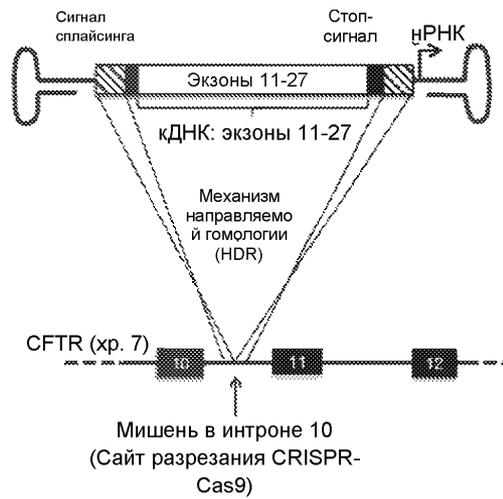
Вектор AAV, экспрессирующий saCAS9 и енРНК



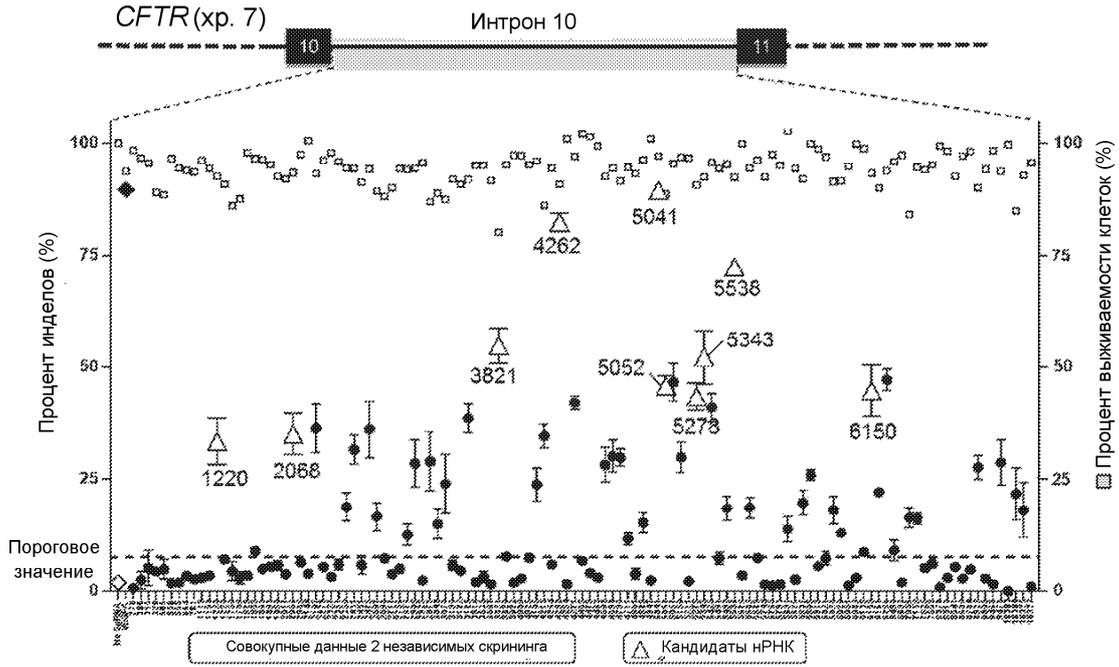
Вектор AAV с супер-экзонами 11-27 CFTR

Фиг. 1А

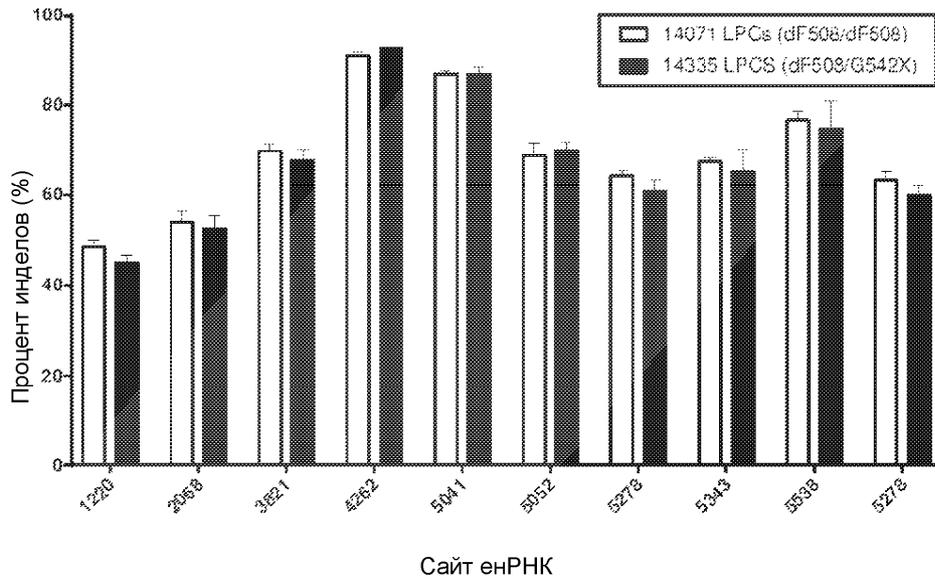
Вектор AAV с супер-экзонами 11-27 CFTR



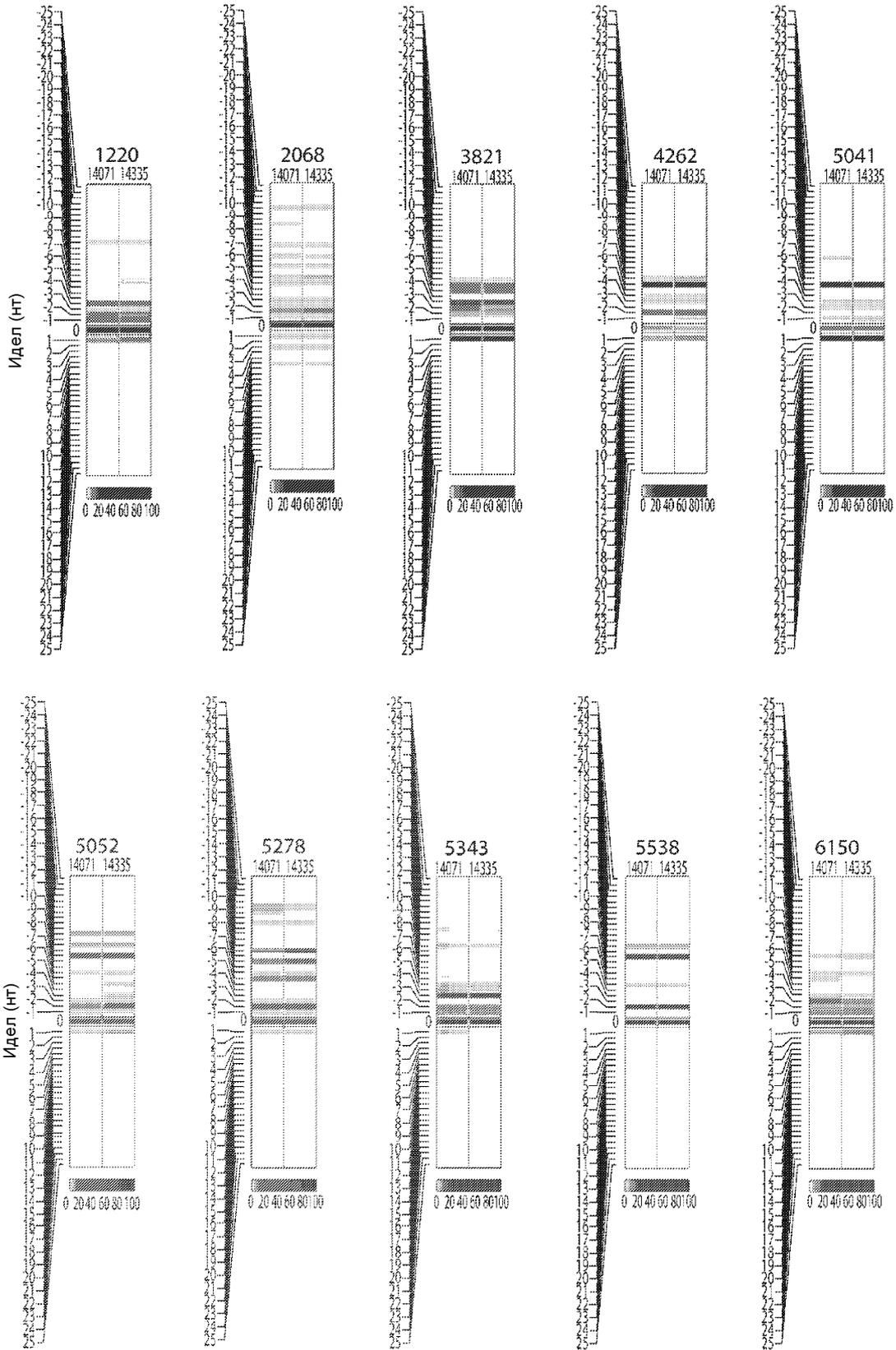
Фиг. 1В



Фиг. 2



Фиг. 3



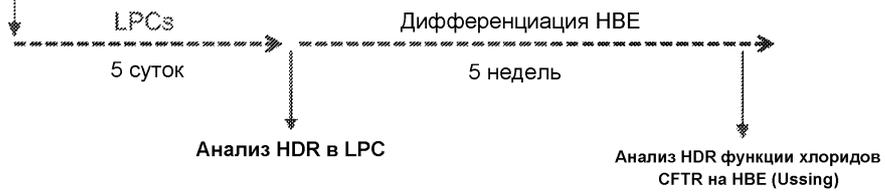
Фиг. 4

	1220	2068	3821	4262	5041	5052	5278	5343	5538	6150
Сводная информация результатов GUIDE-seq	Нет серьезных внецелевых отклонений при GS	Нет серьезных внецелевых отклонений при GS	Нет серьезных внецелевых отклонений при GS	Нет серьезных внецелевых отклонений при GS	Потенциал для внецелевого редактирования	Потенциал для внецелевого редактирования	Потенциал для внецелевого редактирования	Потенциал для внецелевого редактирования	Нет серьезных внецелевых отклонений при GS	Нет серьезных внецелевых отклонений при GS
Сводная информация результатов Hybrid capture	Нет серьезных внецелевых отклонений при GS+ HC	Нет серьезных внецелевых отклонений при GS+ HC	Нет серьезных внецелевых отклонений при HC	Нет серьезных внецелевых отклонений при HC	Значительное внецелевое редактирование при HC	Потенциал для внецелевого редактирования	Значительное внецелевое редактирование при HC	Нет серьезных внецелевых отклонений при HC	Нет серьезных внецелевых отклонений при GS+ HC	Нет серьезных внецелевых отклонений при GS+ HC
Средняя частота внецелевых инделов (%)	57.5	51.6	73.4	80.7	74.8	51.9	55.6	60.6	62.4	52.3
					*	*	*	*		

Фиг. 5

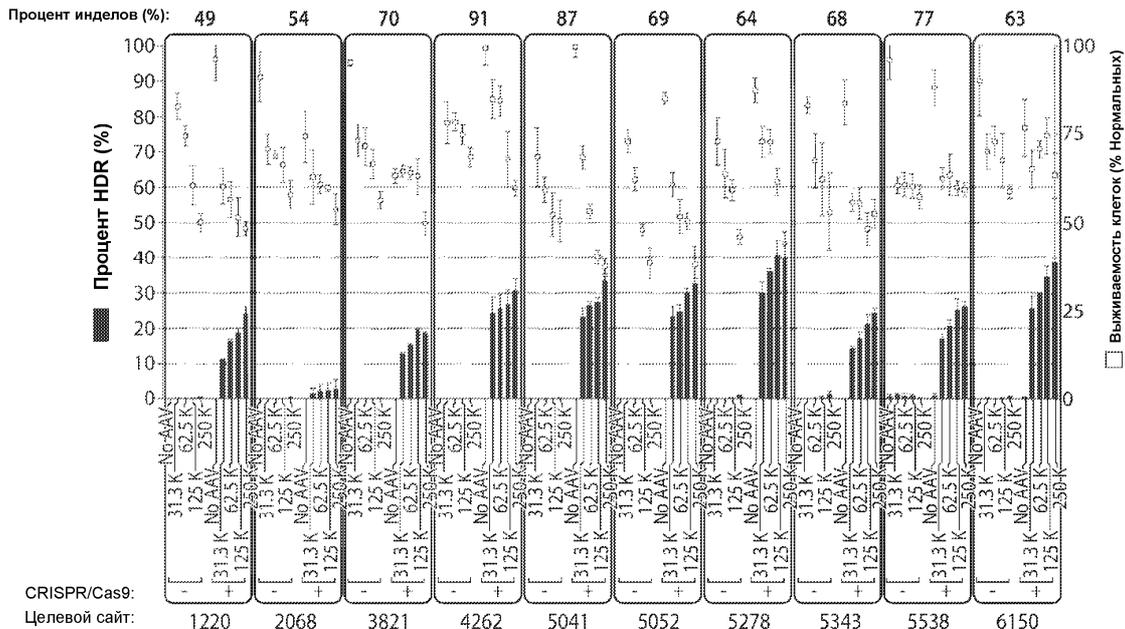
**Электропорация мРНК SaCAS9 и синтезированной енРНК**

**Трансдукция суперэкзона CFTR доноры AAV6:**



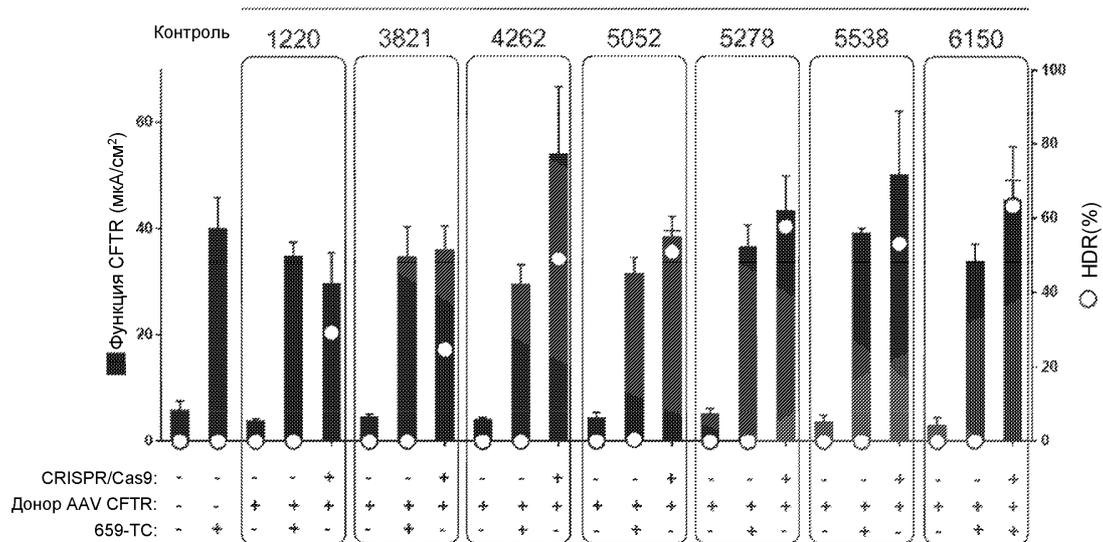
**Считывания**

Фиг. 6



Фиг. 7

## Сайты нРНК CFTR



Фиг. 8

