

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202490974** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
**2024.06.24**

(51) Int. Cl. *C12N 15/113* (2010.01)  
*C07K 14/81* (2006.01)  
*C12N 15/11* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
**2022.10.14**

---

(54) **КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ ДЕФИЦИТА АЛЬФА-1-АНТИТРИПСИНА**

---

(31) **63/256,365**

(32) **2021.10.15**

(33) **US**

(86) **PCT/US2022/078140**

(87) **WO 2023/064918 2023.04.20**

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

(72) Изобретатель:

**Сепп-Лорензино Лаура, Димек  
Зэкари У. (US)**

(74) Представитель:

**Медведев В.Н. (RU)**

---

(57) Предложены композиции и способы для экспрессии альфа-1-антитрипсина (ААТ) в клетке-хозяине. Также предложены композиции и способы для лечения субъектов, имеющих дефицит альфа-1-антитрипсина (ААТД).

**A1**

**202490974**

**202490974**

**A1**

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-580988EA/061

### КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ ДЕФИЦИТА АЛЬФА-1-АНТИТРИПСИНА

#### ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Настоящая заявка испрашивает приоритет предварительной заявки на патент США № 63/256365, поданной 15 октября 2021 г., содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

#### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Альфа-1-антитрипсин (ААТ или А1АТ) или ингибитор сывороточного трипсина представляет собой тип ингибитора сериновой протеазы (также называемого серпином), кодируемого геном *SERPINA1*. ААТ в основном синтезируется и секретируется гепатоцитами и подавляет активность эластазы нейтрофилов в легких. Без достаточного количества функционирующего ААТ эластаза нейтрофилов выходит из-под контроля и повреждает альвеолы в легких. Таким образом, мутации в *SERPINA1*, которые приводят к снижению уровня ААТ или снижению уровня правильно функционирующего ААТ, приводят к патологии легких. Более того, мутации в *SERPINA1*, приводящие к выработке деформированного ААТ, могут привести к патологии печени из-за накопления ААТ в гепатоцитах. Таким образом, недостаточный и неправильно сформированный ААТ, вызванный мутацией *SERPINA1*, может привести к патологии легких и печени.

Для гена *SERPINA1* описано более ста аллельных вариантов. Варианты обычно классифицируют в зависимости от их влияния на уровень ААТ в сыворотке. Например, аллели М представляют собой нормальные варианты, связанные с нормальными уровнями ААТ в сыворотке, тогда как аллели Z и S представляют собой мутантные варианты, связанные с пониженными уровнями ААТ. Наличие аллелей Z и S связано с дефицитом  $\alpha$ 1-антитрипсина (ААТD или А1АD), генетическим заболеванием, характеризующимся мутациями в гене *SERPINA1*, которое приводит к выработке аномального ААТ.

Существует множество форм и степеней родства ААТD. «Z-вариант» является наиболее распространенным и вызывает тяжелое клиническое заболевание как печени, так и легких. Z-вариант характеризуется единственным нуклеотидным изменением на 5'-конце 5<sup>-го</sup> экзона, которое приводит к миссенс-мутации глутаминовой кислоты на лизин в положении аминокислоты 342 (E342K). Симптомы возникают у пациентов, которые являются как гомозиготными (ZZ), так и гетерозиготными (MZ или SZ) по аллелю Z. Наличие одного или двух аллелей Z приводит к нестабильности мРНК *SERPINA1*, полимеризации и агрегации белка ААТ в гепатоцитах печени. Пациенты, имеющие хотя бы один аллель Z, имеют повышенную заболеваемость раком печени из-за накопления агрегированного белка ААТ в печени. Помимо патологии печени, ААТD, характеризующийся хотя бы одним аллелем Z, характеризуется также заболеванием легких вследствие снижения ААТ в альвеолах и, как следствие, снижения ингибирования эластазы нейтрофилов. Распространенность тяжелой ZZ-формы (*m.e.* гомозиготной

экспрессии Z-варианта) составляет 1:2000 в популяциях северной Европы и 1:4500 в США. Другой распространенной мутацией является S-вариант, в результате которого белок разрушается внутриклеточно перед секрецией. По сравнению с Z-вариантом, S-вариант вызывает более мягкое снижение уровня ААТ в сыворотке крови и меньший риск заболеваний легких.

Существует потребность в способах и композициях, которые смягчают негативное влияние ААТD как в печени, так и в легких.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение предоставляет композиции и способы для экспрессии гетерологичного ААТ в локусе генома человека, таком как безопасный сайт альбумина, тем самым обеспечивая секрецию гетерологичного ААТ и облегчая негативное влияние ААТD в легких. Настоящее изобретение также обеспечивает композиции и способы для нокаута или снижения экспрессии эндогенного гена *SERPINA1*, тем самым устраняя или снижая выработку мутантных форм ААТ, которые связаны с симптомами со стороны печени у пациентов с ААТD. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления представлены композиции и способы для вставки гетерологичного ААТ в безопасный сайт для восстановления функции ААТ в клетке или организме и блокирования экспрессии эндогенного аллеля *SERPINA1* (например, путем нацеливания на него направляющей РНК или киРНК).

В некоторых аспектах в настоящем документе предусмотрены двунаправленные конструкции нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления такие конструкции содержат: а) первый сегмент, содержащий первую последовательность, кодирующую полипептид альфа-1-антитрипсина (ААТ), причем частота использования кодонов в первой кодирующей полипептид ААТ последовательности отличается от частоты использования кодонов в гене *SERPINA1*; и б) второй сегмент, содержащий обратный комплемент второй кодирующей полипептид ААТ последовательности, причем частота использования кодонов во второй кодирующей полипептид ААТ последовательности отличается от частоты использования кодонов в первой кодирующей полипептид ААТ последовательности и от частоты использования кодонов в гене *SERPINA1*. В некоторых вариантах осуществления кодирующие последовательности первого сегмента и второго сегмента истощены по CpG. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты истощена по CpG. В некоторых вариантах осуществления конструкция не содержит промотор, который управляет экспрессией либо первой кодирующей полипептид ААТ последовательности, либо второй кодирующей полипептид ААТ последовательности. В некоторых вариантах осуществления второй сегмент находится 3' от первого сегмента. В некоторых вариантах осуществления конструкция не содержит плеча гомологии.

В настоящем документе кодирующая полипептид ААТ последовательность представляет собой нуклеотидную последовательность, которая кодирует активный

полипептид, ингибирующий эластазу нейтрофилов. Например, в некоторых вариантах осуществления кодирующая полипептид ААТ последовательность кодирует полипептид, содержащий последовательность SEQ ID NO: 700 или 702.

В некоторых вариантах осуществления первый сегмент двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты связан со вторым сегментом двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты с помощью линкера. В некоторых вариантах осуществления линкер имеет длину 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 500, 1000, 1500, 2000 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления линкер истощен по CpG.

В некоторых вариантах осуществления каждый из первого сегмента и второго сегмента двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты содержит хвостовую последовательность полиаденилирования, сигнальную последовательность полиаденилирования или сайт полиаденилирования. В некоторых вариантах осуществления конструкция содержит акцепторный сайт сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления конструкция содержит первый акцепторный сайт сплайсинга выше первого сегмента и второй (обратный) акцепторный сайт сплайсинга ниже второго сегмента. В некоторых вариантах осуществления акцепторный сайт сплайсинга представляет собой акцепторный сайт сплайсинга человека. В некоторых вариантах осуществления акцепторный сайт сплайсинга представляет собой мышинный акцепторный сайт сплайсинга.

В некоторых вариантах осуществления двунаправленная конструкция нуклеиновой кислоты является двухцепочечной, необязательно двухцепочечной ДНК. В некоторых вариантах осуществления конструкция является одноцепочечной, необязательно одноцепочечной ДНК.

В некоторых вариантах осуществления первая кодирующая полипептид ААТ последовательность двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты или вторая кодирующая полипептид ААТ последовательность двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты являются кодон-оптимизированными. В некоторых вариантах осуществления конструкция содержит одну или более из следующих концевых структур: шпильку, петли, инвертированные концевые повторы (ITR) или тороид. В некоторых вариантах осуществления терминальная структура истощена по CpG. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты истощена по CpG, но ITR не истощен по CpG.

В некоторых вариантах осуществления двунаправленная конструкция нуклеиновой кислоты содержит один, два или три инвертированных концевых повтора (ITR). В некоторых вариантах осуществления конструкция содержит не более двух ITR.

В некоторых вариантах осуществления кодирующие полипептид ААТ последовательности двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты имеют частоту использования кодонов, которая предотвращает или снижает способность нацеленных на *SERPINA1* кРНК, дцРНК или направляющей РНК нацеливаться на него.

В некоторых вариантах осуществления как первая кодирующая полипептид ААТ последовательность двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты, так и вторая кодирующая полипептид ААТ последовательность двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты, включают использование кодона не дикого типа в пределах области (или одной или более областей) последовательности, соответствующей основаниям 409-431, 409-410, 412-431, 415-418, 506-528, 506-525, 519-522, 527-528, 538-560, 538-557, 551-554, 559-560, 957-977, 970-976, 1403-1436, 1403-1425, 1410-1436, 1418-1424, 1423-1435 или любой их комбинации SEQ ID NO:703.

В некоторых вариантах осуществления как первая кодирующая полипептид ААТ последовательность двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты, так и вторая кодирующая полипептид ААТ последовательность двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты, включают по меньшей мере одно, по меньшей мере 2 или по меньшей мере 3 несовпадения (*например*, 1-10 несовпадений, 1-9 несовпадений, 1-8 несовпадений, 1-7 несовпадений, 1-6 несовпадений, 1-5 несовпадений, 1-4 несовпадений, 1-3 несовпадений, 1-2 несовпадений, 1 несовпадение, 2-10 несовпадений, 2-9 несовпадений, 2-8 несовпадений, 2-7 несовпадений, 2-6 несовпадений, 2-5 несовпадений, 2-4 несовпадения, 1-3 несовпадения, 2 несовпадения, 3-10 несовпадений, 3-9 несовпадений, 3-8 несовпадений, 3-7 несовпадений, 3-6 несовпадений, 3-5 несовпадений, 3-4 несовпадений, 3 несовпадения, 4-10 несовпадений, 4-9 несовпадений, 4-8 несовпадений, 4-7 несовпадений, 4-6 несовпадений, 4-5 несовпадений, 4 несовпадения, 5-10 несовпадений, 5-9 несовпадений, 5-8 несовпадений, 5-7 несовпадений, 5-6 несовпадений, 5 несовпадений, 6-10 несовпадений, 6-9 несовпадений, 6-8 несовпадений, 6-7 несовпадений, 6 несовпадений, 7-10 несовпадений, 7-9 несовпадений, 7-8 несовпадений, 7 несовпадений, 8-10 несовпадений, 8-9 несовпадений или 8 несовпадений) с последовательностью гена *SERPINA1* дикого типа в пределах области (или одной или более областей) кодирующей полипептид ААТ последовательности, соответствующей основаниям 409-431, 409-410, 412-431, 415-418, 506-528, 506-525, 519-522, 527-528, 538-560, 538-557, 551-554, 559-560, 957-977, 970-976, 1403-1436, 1403-1425, 1410-1436, 1418-1424, 1423-1435 или любой их комбинации SEQ ID NO: 703.

В некоторых вариантах осуществления ни на первую кодирующую полипептид ААТ последовательность двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты, ни на вторую кодирующую полипептид ААТ последовательность двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты, не нацелен агент РНКи, нацеленный на нуклеотиды 957-977, 1403-1425 или 1410-1436 SEQ ID NO: 703.

В некоторых вариантах осуществления ни на первую кодирующую полипептид ААТ последовательность двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты, ни на вторую кодирующую полипептид ААТ последовательность двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты, не нацелена нацеленная на *SERPINA1* направляющая РНК, имеющая нацеливающую последовательность SEQ ID NO: 1129, 1130 или 1131.

В некоторых вариантах осуществления как первая кодирующая полипептид ААТ

последовательность двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты, так и вторая кодирующая полипептид ААТ последовательность двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты, включают использование кодона не дикого типа в пределах области (или одной или более областей) последовательности, соответствующей основаниям 409-431, 409-410, 412-431, 415-418, 506-528, 506-525, 519-522, 527-528, 538-560, 538-557, 551-554, 559-560, 957-977, 970-976, 1403-1436, 1403-1425, 1410-1436, 1418-1424, 1423-1435 или любой их комбинации SEQ ID NO: 703.

В некоторых вариантах осуществления первая кодирующая полипептид ААТ последовательность двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 771, 772, 781, 782. В некоторых вариантах осуществления вторая кодирующая полипептид ААТ последовательность двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 771, 772, 781 и 782. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты выбрана из: SEQ ID NO: 770, 780 и 1564.

В некоторых аспектах в настоящем документе предложен способ введения последовательности нуклеиновой кислоты *SERPINA1* в клетку или популяцию клеток, включающий введение в клетку или популяцию клеток двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты, представленной в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение в клетку или популяцию клеток: i) двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты, представленной в настоящем документе, ii) РНК-направляемого ДНК-связывающего агента; и iii) направляющей РНК альбумина (нРНК); тем самым вводя нуклеиновую кислоту *SERPINA1* в клетку или популяцию клеток. В некоторых вариантах осуществления нРНК альбумина содержит последовательность, выбранную из: а) последовательности, которая составляет по меньшей мере 95% SEQ ID NO: 2-33; б) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33; с) последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33. В некоторых вариантах осуществления клетка или популяция клеток включает клетку печени (например, гепатоцит). В некоторых вариантах осуществления клетка или популяция клеток экспрессируют функциональный ААТ на уровне, который увеличен по меньшей мере на около 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% и 100% или более по сравнению с уровнем до введения.

В некоторых аспектах в настоящем документе предложен способ увеличения секреции альфа-1-антитрипсина (ААТ) клеткой или популяцией клеток печени, включающий введение в клетку или популяцию клеток печени конструкции двунаправленной нуклеиновой кислоты, представленной в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение в клетку или популяцию клеток печени: i) двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты, представленной в настоящем документе; ii) РНК-направляемого ДНК-связывающего агента; и iii)

направляющей РНК альбумина (нРНК); тем самым увеличивая секрецию ААТ клетками печени или популяцией клеток печени. В некоторых вариантах осуществления нРНК альбумина содержит последовательность, выбранную из: а) последовательности, которая составляет по меньшей мере 95% SEQ ID NO: 2-33; б) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33; в) последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33. В некоторых вариантах осуществления клетка печени представляет собой гепатоцит. В некоторых вариантах осуществления клетка или популяция клеток экспрессируют функциональный ААТ на уровне, который увеличен по меньшей мере на около 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% и 100% или более по сравнению с уровнем до введения.

В некоторых аспектах в настоящем документе предложен способ экспрессии альфа-1-антитрипсина (ААТ) у субъекта (например, субъекта, нуждающегося в этом), причем способ включает введение субъекту двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты, представленной в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту: i) двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты, представленной в настоящем документе; ii) РНК-направляемого ДНК-связывающего агента; и iii) направляющей РНК альбумина (нРНК); тем самым экспрессируя ААТ у субъекта. В некоторых вариантах осуществления направляющая РНК альбумина содержит последовательность, выбранную из: а) последовательности, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33; б) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33; и в) последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33.

В некоторых аспектах в настоящем документе предложен способ лечения дефицита альфа-1-антитрипсина (ААТД) у субъекта (например, субъекта, нуждающегося в этом), причем способ включает введение субъекту двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты, представленной в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту: i) двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты, представленной в настоящем документе; ii) РНК-направляемого ДНК-связывающего агента; и iii) направляющей РНК альбумина (нРНК); тем самым леча ААТД у субъекта. В некоторых вариантах осуществления направляющая РНК альбумина содержит последовательность, выбранную из: а) последовательности, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33; б) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33; и в) последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33.

В некоторых вариантах осуществления способов, представленных в настоящем документе, уровень функционального ААТ у субъекта увеличен по меньшей мере до около 500 мкг/мл. В некоторых вариантах осуществления уровень функционального ААТ

у субъекта увеличен по меньшей мере на около 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% или более по сравнению с уровнем функционального ААТ у субъекта до введения. В некоторых вариантах осуществления уровень ААТ измеряют в сыворотке или плазме. В некоторых вариантах осуществления уровень ААТ в сыворотке составляет по меньшей мере 500 мкг/мл, по меньшей мере 500 мкг/мл, по меньшей мере 571 мкг/мл, по меньшей мере 750 мкг/мл, по меньшей мере 1000 мкг/мл, 500-4000 мкг/мл, 500-3500 мкг/мл, 750-3500 мкг/мл, 1000-3500 мкг/мл, 1000-3000 мкг/мл или 1000-2700 мкг/мл. В некоторых вариантах осуществления уровень измеряют по меньшей мере через 8 недель, по меньшей мере через 9 недель, по меньшей мере через 10 недель, по меньшей мере через 11 недель или по меньшей мере через 12 недель после введения двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления уровень функционального ААТ у субъекта сохраняется в течение по меньшей мере года после введения.

В некоторых вариантах осуществления способов, представленных в настоящем документе, у субъекта нарушена функция печени или легких. В некоторых вариантах осуществления введение задерживает прогрессирование эмфиземы у субъекта.

В некоторых вариантах осуществления способы, предложенные в настоящем документе, дополнительно включают снижение экспрессии эндогенного гена *SERPINA1* без значительного снижения экспрессии кодирующих полипептид ААТ последовательностей двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение агента нуклеиновой кислоты, нацеленного на эндогенный ген *SERPINA1*. В некоторых вариантах осуществления агент нуклеиновой кислоты, нацеленный на эндогенный ген *SERPINA1*, представляет собой киРНК, дцРНК или направляющую РНК. В некоторых вариантах осуществления агент нуклеиновой кислоты, нацеленный на эндогенный ген *SERPINA1*, выбран из агента РНКи, нацеленного на нуклеотиды 957-977, 1403-1425 или 1410-1436 SEQ ID NO: 703, и направляющей РНК, нацеленной на эндогенный ген *SERPINA1* в положении, соответствующем нуклеотидам 412-431, 506-525 или 538-557 SEQ ID NO: 703.

В некоторых вариантах осуществления способы, предложенные в настоящем документе, дополнительно включают индуцирование двухцепочечного разрыва (DSB) в пределах эндогенного гена *SERPINA1*. В некоторых вариантах осуществления способ включает индуцирование двухцепочечного разрыва (DSB) в пределах эндогенного гена *SERPINA1* в положении, соответствующем нуклеотидам 412-431, 506-525 или 538-557 SEQ ID NO: 703. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает модификацию эндогенного гена *SERPINA1*. В некоторых вариантах осуществления DSB индуцируется в пределах эндогенного гена *SERPINA1* или эндогенный ген *SERPINA1* модифицируется после контакта с клеткой или популяцией клеток или введения субъекту двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты.

В некоторых вариантах осуществления способов, представленных в настоящем документе, агент нуклеиновой кислоты, нацеленный на эндогенный ген *SERPINA1*,

представляет собой направляющую РНК *SERPINA1*, которая по меньшей мере частично комплементарна целевой последовательности, присутствующей в экзоне 2, 3, 4 или 5 эндогенного гена *SERPINA1* человека, и который не нацелен ни на первую кодирующую полипептид ААТ последовательность, ни на вторую кодирующую полипептид ААТ последовательность. В некоторых вариантах осуществления агент нуклеиновой кислоты, нацеленный на эндогенный ген *SERPINA1*, представляет собой направляющую РНК *SERPINA1*, которая по меньшей мере частично комплементарна целевой последовательности в пределах эндогенного гена *SERPINA1* в положении, соответствующем нуклеотидам 412-431, 506-525 или 538-557 SEQ ID NO: 703. В некоторых вариантах осуществления направляющая РНК *SERPINA1* содержит: направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1129-1131; направляющую последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 1129-1131; или 17, 18, 19 или 20 последовательных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1129-1131.

В некоторых вариантах осуществления способов, представленных в настоящем документе, стадию введения осуществляют *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления конструкцию нуклеиновой кислоты вводят в векторе нуклеиновой кислоты или липидной наночастице. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нРНК альбумина доставляют или вводят в векторе нуклеиновой кислоты или липидной наночастице.

В некоторых вариантах осуществления, представленных в настоящем документе, РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нРНК *SERPINA1* доставляют или вводят в векторе нуклеиновой кислоты или липидной наночастице. В некоторых вариантах осуществления вектор нуклеиновой кислоты представляет собой вирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор выбран из аденоассоциированного вирусного (AAV) вектора, аденовирусного вектора, ретровирусного вектора и лентивирусного вектора. В некоторых вариантах осуществления вектор AAV выбран из группы, состоящей из AAV1, AAV2, AAV3, AAV3B, AAV4, AAV5, AAV6, AAV6.2, AAV7, AAVrh.64R1, AAVhu.37, AAVrh.8, AAVrh.32.33, AAV8, AAV9, AAV-DJ, AAV2/8, AAVrh10, AAVLK03, AV10, AAV11, AAV12, rh10, и их гибридов.

В некоторых вариантах осуществления способов, представленных в настоящем документе, РНК-направляемый ДНК-связывающий агент представляет собой нуклеазу Cas класса 2. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза Cas представляет собой нуклеазу Cas9. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза Cas9 представляет собой нуклеазу Cas9 *S. pyogenes*. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза Cas представляет собой нуклеазу.

В некоторых аспектах в настоящем документе предусмотрен вектор, содержащий двунаправленную конструкцию нуклеиновой кислоты, представленную в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой вектор аденоассоциированного вируса (AAV). В некоторых вариантах осуществления AAV

содержит одноцепочечный геном (ssAAV) или самокомплементарный геном (scAAV). В некоторых вариантах осуществления вектор AAV выбран из группы, состоящей из AAV1, AAV2, AAV3, AAV3B, AAV4, AAV5, AAV6, AAV6.2, AAV7, AAVrh.64R1, AAVhu.37, AAVrh.8, AAVrh.32.33, AAV8, AAV9, AAV-DJ, AAV2/8, AAVrh10, AAVLK03, AV10, AAV11, AAV12, rh10, и их гибридов. В некоторых вариантах осуществления вектор не содержит плеча гомологии. В некоторых вариантах осуществления вектор истощен по CpG.

В некоторых аспектах в настоящем документе предусмотрена липидная наночастица, содержащая двунаправленную конструкцию нуклеиновой кислоты, представленную в настоящем документе.

В некоторых аспектах в настоящем документе предусмотрена клетка-хозяин, содержащая двунаправленную конструкцию нуклеиновой кислоты, представленную в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку печени (например, гепатоцит). В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой тип неделящихся клеток. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин экспрессирует полипептид ААТ, кодируемый двунаправленной конструкцией.

В некоторых аспектах в настоящем документе предложен способ снижения экспрессии эндогенного альфа-1-антитрипсина (ААТ) у субъекта, включающий двунаправленную конструкцию нуклеиновой кислоты, представленную в настоящем документе (например, содержащейся в геноме одной или более клеток субъекта, таких как их клетки печени). В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту: РНК-направляемого ДНК-связывающего агента; и агента нуклеиновой кислоты, нацеленного на эндогенный ген *SERPINA1*, который снижает экспрессию эндогенного гена *SERPINA1* без значительного снижения экспрессии кодирующих полипептид ААТ последовательностей двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты.

В некоторых вариантах осуществления способов, представленных в настоящем документе, агент нуклеиновой кислоты, нацеленный на эндогенный ген *SERPINA1*, представляет собой кРНК, дцРНК или направляющую РНК. В некоторых вариантах осуществления агент нуклеиновой кислоты, нацеленный на эндогенный ген *SERPINA1*, выбран из агента РНКи, нацеленного на нуклеотиды 957-977, 1403-1425 или 1410-1436 SEQ ID NO: 703, и направляющей РНК, нацеленной на эндогенный ген *SERPINA1* в положении, соответствующем нуклеотидам 412-431, 506-525 или 538-557 SEQ ID NO: 703.

В некоторых вариантах осуществления способов включает индуцирование двухцепочечного разрыва (DSB) в пределах эндогенного гена *SERPINA1*. В некоторых вариантах осуществления способ включает индуцирование двухцепочечного разрыва (DSB) в эндогенном гене *SERPINA1* в положении, соответствующем нуклеотидам 412-431, 506-525 или 538-557 SEQ ID NO: 703. В некоторых вариантах осуществления способ включает модификацию эндогенного гена *SERPINA1*.

В некоторых вариантах осуществления агента нуклеиновой кислоты, нацеленный на

ген *SERPINA1*, представляет собой направляющую РНК *SERPINA1*, которая по меньшей мере частично комплементарна целевой последовательности, присутствующей в экзоне 2, 3, 4 или 5 эндогенного гена *SERPINA1* человека, и который не нацелен ни на первую кодирующую полипептид ААТ последовательность, ни на вторую кодирующую полипептид ААТ последовательность. В некоторых вариантах осуществления агент нуклеиновой кислоты, нацеленный на ген *SERPINA1*, представляет собой направляющую РНК *SERPINA1*, которая по меньшей мере частично комплементарна целевой последовательности в пределах эндогенного гена *SERPINA1* в положении, соответствующем нуклеотидам 412-431, 506-525 или 538-557 SEQ ID NO: 703. В некоторых вариантах осуществления направляющая РНК *SERPINA1* содержит: направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1129-1131; направляющую последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 1129-1131; или 17, 18, 19 или 20 последовательных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1129-1131.

В некоторых вариантах осуществления способы, предложенные в настоящем документе, дополнительно включают снижение экспрессии эндогенного гена *SERPINA1* без значительного снижения экспрессии кодирующих полипептид ААТ последовательностей двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты.

В некоторых вариантах осуществления способов, представленных в настоящем документе, у субъекта наблюдается повышенный уровень ферментов печени. В некоторых вариантах осуществления у субъекта уровень одного или более ферментов печени превышает верхнюю границу нормы (ВГН) по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 2,5 раза, по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 3,5 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 4,5 раза или по меньшей мере в 5 раз. В некоторых вариантах осуществления один или более ферментов печени выбраны из аланинаминотрансферазы (ALT) и аспартатаминотрансферазы (AST). В некоторых вариантах осуществления способ приводит к клинически значимому снижению уровня ферментов печени. В некоторых вариантах осуществления лечение приводит к снижению повышенного уровня ферментов печени в пределах 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5 или 5 раз от верхней границы нормы. В некоторых вариантах осуществления способ приводит к лечению или профилактике фиброза печени у субъекта.

В некоторых вариантах осуществления направляющие РНК используются для направленной вставки двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты, представленной в настоящем документе, в безопасный сайт человека, такой как интрон 1 безопасного сайта альбумина. В настоящем документе также предложены донорные конструкции (например, двунаправленная конструкция нуклеиновой кислоты, представленная в настоящем документе), содержащие кодирующую ААТ последовательность для использования при направленной вставке в безопасный сайт человека, такой как интрон 1 безопасного сайта альбумина. В некоторых вариантах осуществления двунаправленную конструкцию нуклеиновой кислоты, предложенную в

настоящем документе, можно использовать с любой одной или более системами редактирования генов (*например*, системой CRISPR/Cas; системой нуклеазы цинковых пальцев (ZFN); системой эффекторной нуклеазы, подобной активатору транскрипции (TALEN)).

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предлагает способ введения нуклеиновой кислоты *SERPINA1* в клетку или популяцию клеток, включающий введение: i) двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты, представленной в настоящем документе; ii) РНК-направляемого ДНК-связывающего агента; и iii) направляющей РНК альбумина (нРНК), содержащей последовательность, выбранную из: а) последовательности, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33; б) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33; в) последовательности, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33; и d) последовательности, которая комплементарна 15 последовательным нуклеотидам +/- 5 нуклеотидов геномных координат, указанных для SEQ ID NO: 2-33, тем самым вводя нуклеиновую кислоту *SERPINA1* в клетку или популяцию клеток.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает способ экспрессии ААТ у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение: i) двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты, представленной в настоящем документе; ii) РНК-направляемого ДНК-связывающего агента; и iii) направляющей РНК альбумина (нРНК), содержащей последовательность, выбранную из: а) последовательности, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33; б) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33; в) последовательности, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33; и d) последовательности, которая комплементарна 15 последовательным нуклеотидам +/- 5 нуклеотидов геномных координат, указанных для SEQ ID NO: 2-33, тем самым экспрессируя ААТ у нуждающегося в этом субъекта.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает способ лечения дефицита альфа-1-антитрипсина (ААТД) у субъекта, нуждающегося в белке ААТ, включающий введение: i) двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты, представленной в настоящем документе; ii) РНК-направляемого ДНК-связывающего агента; и iii) направляющей РНК альбумина (нРНК), содержащей последовательность, выбранную из: а) последовательности, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33; б) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных

нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33; с) последовательности, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33; и d) последовательности, которая комплементарна 15 последовательным нуклеотидам +/- 5 нуклеотидов геномных координат, указанных для SEQ ID NO: 2-33, тем самым леча ААТД у субъекта.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает способ увеличения секреции ААТ клетками печени или популяцией клеток, включающий введение: i) двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты, представленной в настоящем документе; ii) РНК-направляемого ДНК-связывающего агента; и iii) направляющей РНК альбумина (нРНК), содержащей последовательность, выбранную из: а) последовательности, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33; b) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33; с) последовательности, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33; и d) последовательности, которая комплементарна 15 последовательным нуклеотидам +/- 5 нуклеотидов геномных координат, указанных для SEQ ID NO: 2-33, тем самым увеличивая секрецию ААТ клеткой или популяцией клеток печени.

В некоторых вариантах осуществления двунаправленную конструкцию нуклеиновой кислоты, РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, нРНК альбумина и нРНК *SERPINA1* доставляют или вводят последовательно, в любом порядке или в любой комбинации.

В некоторых вариантах осуществления двунаправленную конструкцию нуклеиновой кислоты, РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, нРНК альбумина и нРНК *SERPINA1* доставляют или вводят одновременно, по отдельности или в любой комбинации.

В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или РНК-направляемый ДНК-связывающий агент и РНК альбумина в комбинации доставляют или вводят до введения двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты.

В некоторых вариантах осуществления двунаправленную конструкцию нуклеиновой кислоты доставляют или вводят до доставки или введения нРНК альбумина или РНК-направляемого ДНК-связывающего агента.

#### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ**

Файл патента или заявки содержит по меньшей мере один графический материал, выполненный в цвете. Копии этого патента или этой публикации заявки на патент с цветным графическим материалом(ами) будут предоставлены Ведомством по запросу и после уплаты необходимой пошлины.

На Фиг. 1 показан процент редактирования посредством образования индела в

вариантном трансгене hSERPINA1 PIZ в печени мышей после введения направляющих РНК, составленных в ЛНЧ, G000409, G000414 или G000415, нацеленных на SERPINA1 человека.

На Фиг. 2А и 2В показаны уровни hA1AT в сыворотке (А) в мкг/мл и (В) по сравнению с обработанным контролем (%TSS) в вариантном трансгене hSERPINA1 PIZ в печени мыши после введения направляющих РНК, составленных в ЛНЧ, G000409, G000414 или G000415, нацеленных на SERPINA1 человека.

На Фиг. 3 показана экспрессия белка A1AT (нг/мл) в первичных гепатоцитах мыши (PMH) после введения различных двунаправленных конструкций, кодирующих A1AT человека, с различной частотой использования кодонов в векторах AAV.

На Фиг. 4А и 4В показаны уровни (А) активности hA1AT в сыворотке и (В) активности ALT в сыворотке у мышей дикого типа (NGS) или у трансгенных мышей PIZ после введения двунаправленных конструкций, кодирующих hSERPINA1 или NanoLuc, в векторе AAV.

На Фиг. 5 показана экспрессия белка A1AT в первичных гепатоцитах мыши (PMH) при введении различных двунаправленных конструкций, кодирующих A1AT человека, с различной частотой использования кодонов в векторах AAV.

На Фиг. 6А-6С показаны результаты исследования зависимости ответа от дозы после введения различных двунаправленных конструкций (А) Конструкция 7, (В) Конструкция 8 и (С) Конструкция 9, каждая из которых кодирует A1AT человека с различной частотой использования кодонов в векторах AAV.

На Фиг. 7 показан процент редактирования (образование инделов) в локусе альбумина яванского макака в день 14 после обработки G009860 и Конструкцией 1, или обработки носителем.

На Фиг. 8 показано процентное редактирование (образование инделов) в cSERPINA1 в день 259 исследования, через 14 дней после обработки G014418, специфической для яванских макаков направляющей SERPINA1, или обработки носителем.

Фиг. 9А и 9В: (А) hA1AT и (В) cA1AT в сыворотке, оцененные в указанные моменты времени. Двунаправленную Конструкцию 1 вводили в день 1. Специфическую для яванских макаков направляющую SERPINA1, G014418, вводили в день 244 (указан стрелкой).

На Фиг. 10 показан процент редактирования (образование инделов) в локусе альбумина яванского макака в день 14 после обработки G009860 и Конструкцией 7 или Конструкцией 8, или обработки носителем.

На Фиг. 11 показаны уровни hA1AT в сыворотке у яванских макаков после лечения в день 1 с помощью G009860 и Конструкции 7 или Конструкции 8, или обработки носителем в указанные моменты времени. Заштрихованная область указывает на нормальный уровень hA1AT в кровотоке (около 1000-2700 мкг/мл или 20-53 мкМ).

На Фиг. 12А и 12В показана экспрессия A1AT из конструкций экспрессии Alb-A1AT и Нативный-A1AT (Фиг. 12А) и процентное ингибирование эластазы нейтрофилов

(Фиг. 12В).

На Фиг. 13А и 13В показаны уровни белка hA1AT, измеренные с помощью ИФА на 28-й день (до введения дозы) и на 32-й день (после введения дозы) (Фиг. 13А), а также процент нокдауна A1AT после введения дозы либо киРНК2, либо киРНК3 (Фиг. 13В).

На Фиг. 14 показаны уровни hA1AT в сыворотке крови через одну и две недели после введения дозы. Звездочкой (\*) обозначены 4 животных в группе.

#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Далее будут подробно рассмотрены некоторые варианты осуществления настоящего изобретения, примеры которых проиллюстрированы на прилагаемых чертежах. Хотя настоящее изобретение описано в сочетании с различными вариантами осуществления, оно не предназначено для ограничения изобретения этими вариантами осуществления. Напротив, настоящие идеи охватывают различные альтернативы, модификации и эквиваленты, что будет понятно специалистам в данной области техники.

Прежде чем настоящие идеи будут описаны более подробно, следует понимать, что раскрытие не ограничивается конкретными композициями или стадиями процессов, поскольку они могут варьироваться. Следует отметить, что использование в данном описании и прилагаемых вариантах осуществления формы единственного числа включает ссылки на множественное число, если из контекста явно не следует иное. Таким образом, ссылка на «конъюгат» включает множество конъюгатов, а ссылка на «клетку» включает множество клеток и тому подобное. В контексте настоящего документа слово «включать» и его грамматические варианты не предназначены для ограничения, так что перечисление элементов в списке не исключает других подобных элементов, которые могут быть заменены или добавлены к перечисленным элементам.

Числовые диапазоны включают в себя числа, определяющие диапазон. Измеряемые и измеримые значения считаются приблизительными с учетом значащих цифр и ошибки, связанной с измерением. Кроме того, применение слов «содержат», «содержит», «содержащий», «вмещают», «вмещает», «вмещающий», «включают», «включает» и «включающий» не является ограничивающим. Следует понимать, что как приведенное выше общее описание, так и приведенное ниже подробное описание являются просто иллюстративными и пояснительными и не ограничивают пункты заявленной формулы.

Если специально не указано в описании, варианты осуществления в описании, которые содержат «содержащие» различные компоненты, также рассматриваются как «состоящие из» или «состоящие по существу из» указанных компонентов; варианты осуществления в описании, которые содержат «состоящий из» различных компонентов, также рассматриваются как «содержащие» или «состоящие по существу из» указанных компонентов; и варианты осуществления в описании, в которых говорится, что «состоит по существу из» различных компонентов, также рассматриваются как «состоящие из» или «содержащие» указанные компоненты (эта взаимозаменяемость не применяется к применению этих терминов в вариантах осуществления).

Термин «или» применяется во всеобъемлющем смысле, *т. е.* эквивалентен «и/или», если контекст явно не указывает иное.

Термин «около», когда он используется перед перечнем, определяет каждого члена перечня. Термин «примерно» или «приблизительно» означает приемлемую ошибку для конкретного значения, как определено специалистом в данной области техники, которая частично зависит от того, как измеряется или определяется значение.

Термин «по меньшей мере» перед числом или серией чисел означает, что он включает число, примыкающее к числу «по меньшей мере», и все последующие числа или целые числа, которые логически могут быть включены, как ясно из контекста. Например, количество нуклеотидов в молекуле нуклеиновой кислоты должно быть целым числом. Например, «по меньшей мере 17 нуклеотидов из 20-нуклеотидной молекулы нуклеиновой кислоты» означает, что 17, 18, 19 или 20 нуклеотидов обладают указанным свойством. Когда «по меньшей мере» присутствует перед серией чисел или диапазоном, подразумевается, что «по меньшей мере» может изменить каждое из чисел в серии или диапазоне.

Как используется в данном документе, «не более» или «менее» понимается как значение, примыкающее к данному выражению, и логически более низким значениям или целым числам, как логично из контекста, до нуля. Например, дуплексная область «не более чем из 2 пар нуклеотидных оснований» имеет 2, 1 или 0 пар нуклеотидных оснований. Когда перед рядом чисел или диапазоном присутствует «не более» или «менее», подразумевается, что каждое из чисел в ряду или диапазоне изменяется. В контексте данного документа диапазоны включают как верхний, так и нижний предел.

При использовании в данном документе подразумевается, что когда максимальная величина значения представлена 100% (например, 100% ингибирования), это значение ограничено методом обнаружения. Например, под 100% ингибирования понимается ингибирование до уровня ниже уровня обнаружения анализа.

Заголовки разделов, используемые в данном документе, предназначены только для организационных целей и не должны рассматриваться как ограничивающие объект изобретения каким-либо образом. В случае, если какой-либо материал, включенный в качестве ссылки, противоречит любому термину, определенному в данном описании, или любому другому прямому содержанию в данном описании, это описание является превалярующим.

#### Определения

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

В настоящем документе «полинуклеотид» и «нуклеиновая кислота» применяется для обозначения мультимерного соединения, включающего нуклеозиды или аналоги нуклеозидов, которые имеют азотсодержащие гетероциклические основания или аналоги оснований, связанные друг с другом вдоль основной цепи, включая обычные РНК, ДНК, смешанные РНК-ДНК и полимеры, которые являются их аналогами. «Скелет»

нуклеиновой кислоты может состоять из различных связей, включая одну или большее количество связей сахар-фосфодиэфир, связей пептид-нуклеиновой кислоты («пептидные нуклеиновые кислоты» или PNA; РСТ № WO 95/32305), фосфоротиоатных связей, метилфосфонатные связи или их комбинации. Фрагменты сахара нуклеиновой кислоты могут представлять собой рибозу, дезоксирибозу или аналогичные соединения с необязательными заменами, *например*, 2'-метокси- или 2'-галогенидными заменами. Азотистые основания могут представлять собой обычные основания (A, G, C, T, U), их аналоги (*например*, модифицированные уридины, такие как 5-метоксиуридин, псевдоуридин или N1-метилпсевдоуридин или другие); инозин; производные пуринов или пиримидинов (*например*, N<sup>4</sup>-метилдезоксигуанозин, деаза- или аза-пурины, деаза- или аза-пиримидины, пиримидиновые основания с заместителями в позициях 5 или 6 (*например*, 5-метилцитозин), пуриновые основания с заместителем в позициях 2, 6 или 8, 2-амино-6-метиламинопурин, O<sup>6</sup>-метилгуанин, 4-тиопиримидины, 4-аминопиримидины, 4-диметилгидразин-пиримидины и O<sup>4</sup>-алкилпиримидины; патент США, № 5378825 и РСТ № WO 93/13121). Для общего обсуждения, см. *The Biochemistry of the Nucleic Acids* 5-36, Adams et al., ed., 11<sup>th</sup> ed., 1992). Нуклеиновые кислоты могут включать один или большее количество остатков «с удаленным азотистым основанием», где остов не включает азотистое основание для позиции(ий) полимера (патент США № 5585481). Нуклеиновая кислота может содержать только обычные сахара РНК или ДНК, основания и связи или может включать как обычные компоненты, так и замены (*например*, обычные нуклеозиды с 2'-метокси-заместителями или полимеры, содержащие как обычные нуклеозиды, так и один или более аналогов нуклеозидов). Нуклеиновая кислота включает «замкнутую нуклеиновую кислоту» (ЗНК), аналог, содержащий один или большее количество нуклеотидных мономеров ЗНК с бициклической фуранозной единицей, замкнутой в конформации сахара, имитирующего РНК, что повышает аффинность гибридизации с комплементарными последовательностями РНК и ДНК (Vester and Wengel, 2004, *Biochemistry* 43(42):13233-41). РНК и ДНК имеют разные фрагменты сахара и могут различаться наличием урацила или его аналогов в РНК и тимина или его аналогов в ДНК.

«Направляющая РНК», «нРНК» и просто «направляющая» используются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения либо направляющей, которая содержит направляющую последовательность, *например*, либо сгРНК (также известной как РНК CRISPR), либо комбинации сгРНК и трРНК (также известной как tracrРНК сгРНК (также известной как РНК CRISPR), либо комбинации сгРНК и трРНК (также известной как tracrРНК). сгРНК и трРНК могут быть связаны в виде одной молекулы РНК (одиночная направляющая РНК, онРНК) или, например, в виде двух отдельных молекул РНК (двойная направляющая РНК, днРНК). Термин «направляющая РНК» или «нРНК» относится к каждому типу. трРНК может быть природной последовательностью или последовательностью трРНК с модификациями или вариациями по сравнению с природными последовательностями. Направляющие РНК, такие как онРНК или днРНК, могут включать модифицированные РНК, как описано в настоящем документе.

Используемый в данном документе термин «направляющая последовательность» относится к последовательности в направляющей РНК, которая является комплементарной целевой последовательности и функционирует для направления направляющей РНК к целевой последовательности для связывания или модификации (например, расщепления) РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом. «Направляющая последовательность» также может называться «нацеливающей последовательностью» или «спейсерной последовательностью». Направляющая последовательность может иметь длину 20 пар оснований, например, в случае *Streptococcus pyogenes* (*m. e.* Spy Cas9) и родственных гомологов/ортологов Cas9. Более короткие или более длинные последовательности также могут быть применены в качестве направляющих, например, длиной 15, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 23, 24 или 25 нуклеотидов. Например, в некоторых вариантах осуществления направляющая последовательность содержит по меньшей мере 15, 16, 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов направляющей последовательности альбумина, выбранной из SEQ ID NO: 2-33, или направляющей последовательности SERPINA1, выбранной из SEQ ID NO: 1000-1131. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения целевая последовательность находится в гене или на хромосоме, например, и является комплементарной направляющей последовательности. В некоторых вариантах степень комплементарности или идентичности между направляющей последовательностью и соответствующей ей целевой последовательностью может составлять около 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100%. Например, в некоторых вариантах осуществления направляющая последовательность содержит последовательность, имеющую около 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% идентичности по меньшей мере с 15, 16, 17, 18, 19 или 20 смежными нуклеотидами направляющей последовательности альбумина, выбранной из SEQ ID NO: 2-33, или направляющей последовательности SERPINA1, выбранной из SEQ ID NO: 1000-1131. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения направляющая последовательность и целевая область могут быть на 100% комплементарными или идентичными. В других вариантах осуществления настоящего изобретения направляющая последовательность и целевая область могут содержать по меньшей мере одно несовпадение. Например, направляющая последовательность и целевая последовательность могут содержать 1, 2, 3 или 4 несовпадения, при этом общая длина целевой последовательности составляет по меньшей мере 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более пар оснований. В некоторых вариантах осуществления направляющая последовательность и целевая область могут содержать 1-4 несовпадения, при этом направляющая последовательность содержит по меньшей мере 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления направляющая последовательность и целевая область могут содержать 1, 2, 3 или 4 несовпадения, когда направляющая последовательность содержит 20 нуклеотидов.

Целевые последовательности для РНК-направляемых ДНК-связывающих агентов включают как положительные, так и отрицательные цепи геномной ДНК (*m.e.* заданная

последовательность и обратный комплемент последовательности), в качестве субстрата нуклеиновой кислоты для РНК-направляемого ДНК-связывающего агента представляет собой двухцепочечную нуклеиновую кислоту. Соответственно, когда о направляющей последовательности говорят, что она «комплементарна целевой последовательности», следует понимать, что направляющая последовательность может направлять направляющую РНК связываться со смысловой или антисмысловой цепью (*например*, обратным комплементом) целевой последовательности. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления, где направляющая последовательность связывает обратный комплемент целевой последовательности, направляющая последовательность идентична некоторым нуклеотидам целевой последовательности (*например*, целевой последовательности, не содержащей РАМ), за исключением замены U на T в направляющей последовательности.

В контексте данного документа «РНК-направляемый ДНК-связывающий агент» означает полипептид или комплекс полипептидов, обладающих РНК- и ДНК-связывающей активностью, или ДНК-связывающую субъединицу такого комплекса, причем ДНК-связывающая активность является специфической для последовательности и зависит от последовательности РНК. Термин «РНК-направляемый ДНК-связывающий агент» также включает нуклеиновые кислоты, кодирующие такие полипептиды. Типичные РНК-направляемые ДНК-связывающие агенты включают клевазы/никазы Cas. Типичные РНК-направляемые ДНК-связывающие агенты могут включать их инактивированные формы («ДНК-связывающие агенты dCas»), *например* если эти агенты модифицированы для обеспечения расщепления ДНК, *например* посредством слияния с доменом клевазы FokI. Термин «нуклеаза Cas», используемый в настоящем документе, включает клевазы Cas и никазы Cas. Cas-клевазы и Cas-никазы включают комплекс Csm или Cmr системы CRISPR типа III, ее субъединицу Cas10, Csm1 или Cmr2, комплекс Cascade системы CRISPR типа I, ее субъединицу Cas3 и нуклеазы Cas 2 класса. Используемый в данном документе термин «Cas-нуклеаза класса 2» представляет собой одноцепочечный полипептид с РНК-направляемой ДНК-связывающей активностью. Нуклеазы Cas класса 2 включают клевазы/никазы Cas класса 2 (*например*, варианты H840A, D10A или N863A), которые дополнительно обладают РНК-направляемой клевазной или никазной активностью в отношении ДНК, а также ДНК-связывающие агенты dCas класса 2, в которых клевазная/никазная активность инактивирована, если эти агенты модифицированы для обеспечения расщепления ДНК. К нуклеазам Cas класса 2 относятся, например, белки Cas9, Cpf1, C2c1, C2c2, C2c3, HF Cas9 (*например*, варианты N497A, R661A, Q695A, Q926A), НураCas9 (*например*, варианты N692A, M694A, Q695A, H698A), eSPCas9(1.0) (*например*, варианты K810A, K1003A, R1060A) и eSPCas9(1.1) (*например*, варианты K848A, K1003A, R1060A) и их модификации. Белок Cpf1, Zetsche et al., *Cell*, 163: 1-13 (2015), также содержит RuvC-подобный нуклеазный домен. Последовательности Cpf1 из Zetsche включены посредством ссылки во всей их полноте. См., *например*, Zetsche, таблицы S1 и S3. См., *например*, Makarova et al., *Nat Rev Microbiol*,

13(11): 722-36 (2015); Shmakov et al., *Molecular Cell*, 60:385-397 (2015). В настоящем документе доставка РНК-направляемого ДНК-связывающего агента (*например*, нуклеазы Cas, нуклеазы Cas9 или нуклеазы Cas9 *S. pyogenes*) включает доставку полипептида или мРНК.

В настоящем документе термины «рибонуклеопротеин» (РНП) или «комплекс РНП» относятся к направляющей РНК вместе с РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом, таким как нуклеаза Cas, *например*, клеваза Cas, никаза Cas или ДНК-связывающий агент dCas (*например*, Cas9). В некоторых вариантах осуществления направляющая РНК направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, такой как Cas9, к целевой последовательности, а направляющая РНК гибридизируется с целевой последовательностью и связывается с ней; в случаях, когда агент представляет собой клевазу или никазу, за связыванием может следовать расщепление или никование.

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

В настоящем документе первая последовательность считается «X%

комплементарной» второй последовательности, если X% оснований первой последовательности образуют пары оснований со второй последовательностью. Например, первая последовательность 5'ААГАЗ' на 100% комплементарна второй последовательности 3'ТТСТ5', а вторая последовательность на 100% комплементарна первой последовательности. В некоторых вариантах осуществления первая последовательность 5'ААГАЗ' на 100% комплементарна второй последовательности 3'ТТСТГТГА5', тогда как вторая последовательность на 50% комплементарна первой последовательности.

В настоящем документе термин «истощенный по CpG» и тому подобное понимают как модификация нуклеотидной последовательности для уменьшения или предпочтительно устранения присутствия динуклеотидов CpG. Истощение по CpG в кодирующей последовательности без изменения кодируемой аминокислотной последовательности может быть легко достигнуто путем альтернативной частоты использования кодонов. В настоящем документе кодирующая последовательность белка A1AT, истощенная по CpG, содержит не более 3 динуклеотидов CpG (т.е. 3, 2, 1 или 0 динуклеотидов CpG), предпочтительно, кодирующая последовательность белка A1AT не содержит динуклеотидов CpG. Понятно, что другие части конструкций экспрессии могут быть выбраны или сконструированы так, чтобы они содержали минимальное количество динуклеотидов CpG (см., например, Wright JF, Mol Ther. 2020).

В настоящем документе «использование кодона не дикого типа» понимают как модификацию кодирующей последовательности без изменения кодируемой аминокислотной последовательности, которая может быть легко осуществлена путем альтернативной частоты использования кодонов. В настоящем документе использование кодона не дикого типа включает альтернативную частоту использования кодонов для по меньшей мере 10%, 20%, 30% или 40% кодонов дикого типа с кодонами не дикого типа в пределах определенной области. Поскольку некоторые области, определенные в данном документе, могут включать кодоны, которые частично находятся в пределах области, последовательность частичных кодонов сравнивают с последовательностью дикого типа. Если частичный кодон включает изменение последовательности дикого типа в пределах определенной области, считается, что кодон имеет частоту использования кодонов не дикого типа. Если частичный кодон не включает в себя изменение последовательности дикого типа в пределах определенной области, считается, что кодон имеет частоту использования кодонов дикого типа.

В данном контексте термин «мРНК» используется для обозначения полинуклеотида, который полностью или преимущественно представляет собой РНК или модифицированную РНК и содержит открытую рамку считывания, которая может транслироваться в полипептид (*т.е.* может служить субстратом для трансляции рибосомой и аминоацелированных тРНК). мРНК может содержать фосфатно-сахарный остов, включающий остатки рибозы или их аналоги, *например*, остатки 2'-метоксирибозы. В некоторых вариантах осуществления сахара фосфатно-сахарного остова мРНК состоят

по существу из остатков рибозы, остатков 2'-метоксирибозы или их комбинации.

Типичные направляющие последовательности, пригодные для композиций направляющих РНК и способов, описанных в настоящем документе, показаны в Таблице 1, Таблице 2 и во всей заявке.

В настоящем документе «инделы» относятся к инсерционно-делеционным мутациям, состоящим из ряда нуклеотидов, которые либо вставляют, либо удаляют в сайте двухцепочечных разрывов (DSB) в целевой нуклеиновой кислоте.

В настоящем документе термин «гетерологичный альфа-1-антитрипсин» используется взаимозаменяемо с «гетерологичным ААТ» или «гетерологичным А1АТ» или «трансгеном ААТ/А1АТ», который является генным продуктом гена *SERPINA1*, который является гетерологичным по отношению к сайту его вставки. В некоторых вариантах осуществления ген *SERPINA1* является экзогенным. Последовательность белка ААТ человека дикого типа доступна в NCBI по номеру NP\_000286; последовательность гена доступна в NCBI по номеру NM\_000295. кДНК ААТ человека дикого типа была секвенирована (см., *например*, Long et al., «Complete sequence of the cDNA for human alpha 1-antitrypsin and the gene for the S variant», *Biochemistry* 1984) и кодирует молекулу-предшественник, содержащую сигнальный пептид и зрелый пептид ААТ. Охарактеризованы домены пептида, ответственного за внутриклеточное нацеливание, прикрепление углеводов, каталитическую функцию, ингибирующую протеазы активность и др. (см., *например*, Kalsheker, «Alpha 1-antitrypsin: structure, function and molecular biology of the gene», *Biosci Rep.* 1989; Matamala et al., «Identification of Novel Short C-Terminal Transcripts of Human SERPINA1 Gene», *PLoS One* 2017; Niemann et al., «Isolation and serine protease inhibitory activity of the 44-residue, C-terminal fragment of alpha 1-antitrypsin from human placenta», *Matrix* 1992). В настоящем документе гетерологичная ААТ включает предшественник ААТ, зрелый ААТ, а также их варианты и фрагменты, *например*, функциональные фрагменты, *например*, фрагменты, которые сохраняют ингибирующую протеазы активность (*например*, по меньшей мере 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 96%, 98%, 99% или 100% по сравнению с ААТ дикого типа, *например*, согласно анализу с помощью коммерчески доступного анализа ингибирования протеазы или анализа ингибирования эластазы нейтрофилов человека (HNE)). В некоторых вариантах осуществления функциональный фрагмент является встречающимся в природе, *например*, коротким С-концевым фрагментом. В некоторых вариантах осуществления функциональный фрагмент является генетически сконструированным, *например*, гиперактивным функциональным фрагментом. В данном документе описаны примеры последовательности белка ААТ (*например*, SEQ ID NO: 700 или SEQ ID NO: 702). В настоящем документе гетерологичный ААТ также включает вариант ААТ, *например*, вариант, который обладает повышенной ингибирующей протеазы активностью по сравнению с ААТ дикого типа. В настоящем документе гетерологичный ААТ также включает вариант, который на 80%, 85%, 90%, 93%, 95%, 97%, 99% идентичен SEQ ID NO: 700, имеющий функциональную активность, *например*, по меньшей мере 60%, 70%,

80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 96%, 98%, 99%, 100% или более активности по сравнению с ААТ дикого типа, *например*, по данным анализа ингибирования HNE. В настоящем документе гетерологичный ААТ также включает фрагмент, который обладает функциональной активностью, *например*, по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 96%, 98%, 99%, 100% или более активности по сравнению с ААТ дикого типа, *например*, по данным анализа ингибирования HNE. В настоящем документе гетерологичный ААТ относится к ААТ, *например*, функциональному ААТ, пригодному для лечения ААТD, который может представлять собой ААТ дикого типа или его вариант, пригодный для лечения ААТD.

В настоящем документе термин «гетерологичный ген» относится к гену, который был введен в качестве экзогенного источника в сайт в геном клетки-хозяина (*например*, в геномный локус, такой как безопасной локус, включая сайт интрона 1 альбумина). Полипептид, экспрессируемый таким гетерологичным геном, называется «гетерологичным полипептидом». Гетерологичный ген может быть встречающимся в природе или сконструированным, а также может быть дикого типа или его вариантом. Гетерологичный ген может включать нуклеотидные последовательности, отличные от последовательности, кодирующей гетерологичный полипептид. Гетерологичный ген может представлять собой ген, который естественным образом встречается в геноме хозяина, такой как дикий тип или вариант (*например*, мутант). Например, хотя клетка-хозяин содержит интересующий ген (такой как дикого типа или вариант), тот же ген или его вариант можно ввести в качестве экзогенного источника, *например*, для экспрессии в локусе с высокой экспрессией. Гетерологичный ген также может представлять собой ген, который не встречается в природе в геноме хозяина или который экспрессирует гетерологичный полипептид, который не встречается в природе в геноме хозяина. «Гетерологичный ген», «экзогенный ген» и «трансген» используются взаимозаменяемо. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный ген или трансген включает экзогенную последовательность нуклеиновой кислоты, *например* последовательность нуклеиновой кислоты не является эндогенной для клетки-реципиента. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный ген может включать последовательность нуклеиновой кислоты ААТ, которая не встречается в природе в клетке-реципиенте. Последовательность, кодирующая полипептид ААТ, представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует активный полипептид, ингибирующий эластазу. Например, гетерологичный ААТ может быть гетерологичен в отношении сайта его вставки и в отношении его клетки-реципиента.

В настоящем документе «мутантный *SERPINA1*» или «мутантный аллель *SERPINA1*» относится к последовательности *SERPINA1*, имеющей изменение в нуклеотидной последовательности *SERPINA1* по сравнению с последовательностью дикого типа (идентификатор гена NCBI № 5265; NCBI NM\_000295; Ensembl: Ensembl:ENSG00000197249). В некоторых вариантах осуществления мутантный аллель *SERPINA1* кодирует нефункциональный или несекретируемый белок ААТ.

Используемые в данном документе термины «AATD» или «A1AD» относятся к дефициту альфа-1-антитрипсина. AATD включает заболевания и расстройства, вызванные различными генетическими мутациями *SERPINA1*. AATD может относиться к заболеванию, при котором экспрессируются сниженные уровни функционального ААТ (*например*, менее 100%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10% или 5% экспрессии гена или белка ААТ по сравнению с контрольным образцом, *например*, с помощью нефелометрии или иммунотурбидиметрии, *например*, ААТ менее чем около 100 мг/дл, 90 мг/дл, 80 мг/дл, 70 мг/дл, 60 мг/дл, 50 мг/дл, 40 мг/дл, 30 мг/дл, 20 мг/дл, 10 мг/дл или 5 мг/дл в сыворотке), функциональный ААТ не экспрессируется или экспрессируется мутантный или нефункциональный ААТ (*например*, образует агрегаты или не способен секретироваться, или имеет сниженную ингибирующую протеазы активность). См., *например*, Greulich and Vogelmeier, *Ther Adv Respir Dis* 2016; Stoller and Aboussouan, *Lancet*, 2005. В некоторых вариантах осуществления AATD относится к заболеванию, при котором ААТ агрегируется или накапливается внутриклеточно, *например*, в гепатоцитах, и не секретировается, *например*, в кровоток, где он может быть доставлен в легкие для выполнения функции ингибитора протеазы. В некоторых вариантах осуществления AATD можно обнаружить путем окрашивания PASD срезов ткани печени, *например*, для измерения агрегации. В некоторых вариантах осуществления AATD можно обнаружить по снижению ингибирования эластазы нейтрофилов, *например*, в легких.

Используемый в данном документе термин «целевая последовательность» относится к последовательности нуклеиновой кислоты в целевом гене, которая комплементарна направляющей последовательности мРНК. Взаимодействие целевой последовательности и направляющей последовательности направляет РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, для связывания и, возможно, нуклеотидного расщепления (в зависимости от активности агента) внутри целевой последовательности.

В настоящем документе «терапевтический агент нуклеиновой кислоты» понимается как терапевтический агент, содержащий нуклеотиды достаточной длины для специфичной гибридизации с целевой последовательностью в целевой нуклеиновой кислоте в клетке, так что гибридизация снижает уровни белка, кодируемого целевой нуклеиновой кислотой, *например*, ингибируя трансляцию или способствуя специфической деградации последовательности целевой нуклеиновой кислоты, или вызывая изменение в ДНК, кодирующей белок, приводящее к снижению экспрессии мРНК или белка. Типичные терапевтические агенты нуклеиновых кислот включают агенты РНКи, включая агенты дайсер-субстратной (дс) РНКи, или антисмысловые олигонуклеотидные агенты; или РНК-направляемые ДНК-связывающие агенты, включая CISPR, TALEN или нуклеазу цинковых пальцев (ZFN).

Термины «иРНК», «агент РНКи», «агент иРНК», «агент РНК-интерференции», «киРНК», «агент киРНК», используемые в данном документе взаимозаменяемо, относятся к агенту, который содержит РНК, как этот термин определен в настоящем документе, и

который опосредует целенаправленное расщепление транскрипта РНК, например, посредством пути РНК-индуцированного комплекса сайленсинга (RISC). иРНК направляет специфичную для последовательности деградацию мРНК посредством процесса, известного как РНК-интерференция (РНКи). В общем, «иРНК» включает рибонуклеотиды с химическими модификациями. Такие модификации могут включать все типы модификаций, описанные в данном документе или известные в данной области техники. Любые такие модификации, используемые в молекуле дцРНК, охватываются термином «иРНК» для целей данного описания и формулы изобретения. Агент РНКи может обрабатываться или не обрабатываться дайсером перед входом в путь RISC. То есть агент РНКи представляет собой терапевтический препарат нуклеиновой кислоты, который действует путем снижения экспрессии целевого гена, тем самым снижая экспрессию полипептида, кодируемого целевым геном. Типичные агенты иРНК, нацеленные на SERPINA1, представлены, например, в WO2018098117, WO2015003113 и WO2015195628A2.

В настоящем документе термин «терапевтический агент нуклеиновой кислоты, который снижает экспрессию SERPINA1» и т.п. в данном контексте понимают как терапевтический агент нуклеиновой кислоты, который снижает уровни РНК SERPINA1, белка A1AT, кодируемого SERPINA1, или как РНК SERPINA1, так и белка, кодируемого SERPINA1. В некоторых вариантах осуществления терапевтический агент нуклеиновой кислоты, который снижает экспрессию SERPINA1, представляет собой терапевтический агент, который способствует деградации мРНК, кодирующей SERPINA1, или ингибирует трансляцию мРНК, кодирующей SERPINA1. Такие агенты включают, помимо прочего, терапевтические средства нуклеиновых кислот, например, агенты РНКи-интерференции и антисмысловые олигонуклеотидные агенты. Такие агенты обычно могут ингибировать экспрессию как эндогенного SERPINA1 дикого типа, так и мутантного. В некоторых вариантах осуществления экспрессия эндогенного SERPINA1 может быть ингибирована, в то время как экспрессия гетерологичного SERPINA1 не ингибируется из-за конструкции гетерологичной кодирующей последовательности. В настоящем документе «нормальные» или «здоровые» индивиды включают тех индивидов, которые не имеют аллелей, ассоциированных с ААТД - *например*, аллелями, ассоциированными с ААТД, являются ZZ, MZ или SZ.

Применяемый в настоящем документе термин «лечение» относится к любому введению или применению терапевтического средства для лечения заболевания или расстройства у субъекта и включает ингибирование заболевания, остановку его развития, облегчение одного или большего количества симптомов заболевания, излечение заболевания или предотвращение повторного появления одного или более симптомов заболевания. ААТД может быть связана с заболеванием легких или печени; хрипами или одышкой; повышенным риском легочных инфекций; хронической обструктивной болезнью легких (COPD); бронхитом, астмой, диспноэ; циррозом печени; неонатальной желтухой; панникулитом; хроническим кашлем или мокротой; повторяющимися

простудными заболеваниями грудной клетки; пожелтением кожи или белой части глаз; отеком живота или ног. Например, лечение AATD может включать облегчение симптомов AATD, *например*, симптомов со стороны печени или легких. В некоторых вариантах осуществления лечение относится к повышению уровней ААТ в сыворотке, *например*, до защитных уровней. В некоторых вариантах осуществления лечение подразумевает повышение уровней ААТ в сыворотке крови, *например*, в пределах нормального диапазона. В некоторых вариантах осуществления лечение относится к повышению уровней ААТ в сыворотке крови, *например*, выше 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 мг/дл, *например*, при измерении с помощью нефелометрии или иммунотурбидиметрии и очищенного стандарта. В некоторых вариантах осуществления лечение означает улучшение исходного уровня ААТ в сыворотке крови по сравнению с контролем, *например*, до и после лечения. В некоторых вариантах осуществления лечение относится к улучшению гистологической оценки заболевания печени, связанного с AATD, *например*, на 1, 2, 3 или более баллов по сравнению с контролем, *например*, до и после лечения. В некоторых вариантах осуществления лечение означает улучшение оценку фиброза по шкале Исхака по сравнению с контролем, *например*, до и после лечения. В некоторых вариантах осуществления лечение относится к улучшению генотипического уровня ААТ в сыворотке, функции легких, спирометрического теста, флюорографии легких, компьютерной томографии легких, анализа крови на функцию печени или ультразвукового исследованию печени.

В контексте данного документа термин «нокдаун» относится к снижению экспрессии конкретного продукта гена (*например*, белка, мРНК или обоих). Нокдаун белка можно измерить, например, путем обнаружения белка, секретируемого тканью или популяцией клеток (*например*, в сыворотке или клеточной среде), или путем обнаружения общего клеточного количества белка в представляющей интерес ткани или популяции клеток. Способы измерения нокдауна мРНК известны и включают секвенирование мРНК, выделенной из интересующей ткани или популяции клеток. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения «нокдаун» может относиться к некоторой потере экспрессии конкретного продукта гена, например, к уменьшению количества транскрибируемой мРНК или уменьшению количества белка, экспрессируемого популяцией клеток (включая *in vivo* популяции, такие как были обнаруженные в тканях). В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению осуществляют «нокдаун» эндогенного ААТ в одной или более клетках (*например*, в популяции клеток, включая популяции *in vivo*, такие как те, которые обнаруживаются в тканях). Соответствующие клетки включают клетки, которые способны продуцировать ААТ. В некоторых вариантах осуществления предложенные в данном документе способы осуществляют нокдаун эндогенного мутантного аллеля *SERPINA1* или эндогенного аллеля *SERPINA1* дикого типа (*например*, у гетерозиготного по MZ индивида).

Применяемый в настоящем документе термин «нокаут» относится к потере экспрессии определенного белка в клетке. Нокаут можно измерить либо путем

определения количества белка, секретируемого тканью или популяцией клеток (например, в сыворотке или клеточной среде), либо путем определения общего клеточного количества белка в ткани или популяции клеток. Соответствующие клетки включают клетки, которые способны продуцировать ААТ. В некоторых вариантах осуществления способы, представленные в настоящем документе, «нокаутируют» эндогенный ААТ в одной или более клетках (*например*, в популяции клеток, включая популяции *in vivo*, такие как те, которые обнаруживаются в тканях). В некоторых вариантах осуществления способы по настоящему изобретению нокаутируют эндогенный мутантный аллель *SERPINA1* или эндогенный аллель *SERPINA1* дикого типа (*например*, у гетерозиготного по MZ индивида). В некоторых вариантах осуществления нокаут представляет собой полную потерю экспрессии эндогенного белка ААТ в клетке.

В настоящем документе термин «полипептид» относится к белку дикого типа или варианту белка (*например*, мутанту, фрагменту, слитому белку или их комбинации). Вариант полипептида может обладать по меньшей мере или около 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% функциональной активности полипептида дикого типа. В некоторых вариантах осуществления вариант по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичен последовательности полипептида дикого типа. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида может представлять собой гиперактивный вариант. В некоторых случаях вариант обладает от около 80% до около 120%, 140%, 160%, 180%, 200% функциональной активности полипептида дикого типа.

В настоящем документе «двунаправленная конструкция нуклеиновой кислоты» (взаимозаменяемо называемая в данном документе «двунаправленная конструкция») содержит по меньшей мере два сегмента нуклеиновой кислоты, причем один сегмент (первый сегмент) содержит кодирующую последовательность, которая кодирует представляющий интерес полипептид ( кодирующая последовательность может упоминаться в данном документе как «трансен» или первый трансен), в то время как другой сегмент (второй сегмент) содержит последовательность, в которой комплементарная последовательность кодирует представляющий интерес полипептид, или второй трансен. То есть по меньшей мере два сегмента могут кодировать одинаковые или разные полипептиды. Когда два сегмента кодируют идентичный полипептид, кодирующая последовательность первого сегмента не обязательно должна быть идентична комплементарной последовательности второго сегмента. В некоторых вариантах осуществления последовательность второго сегмента является обратным комплементом кодирующей последовательности первого сегмента. Двунаправленная конструкция может быть одноцепочечной или двухцепочечной. Двунаправленная конструкция, описанная в настоящем документе, включает конструкцию, которая способна экспрессировать любой представляющий интерес полипептид.

В настоящем документе термин «обратный комплемент» относится к последовательности, которая является последовательностью, комплементарной эталонной

последовательности, причем комплементарная последовательность записана в обратной ориентации. Например, для гипотетической последовательности 5' CTGGACCGA 3' (SEQ ID NO: 500) «идеальной» комплементарной последовательностью является 3' GACCTGGCT 5' (SEQ ID NO: 501), а «идеальный» обратный комплемент записан как 5' TCGGTCCAG 3' (SEQ ID NO: 502). Последовательность обратного комплемента не обязательно должна быть «идеальной» и может по-прежнему кодировать тот же полипептид или аналогичный полипептид, что и эталонная последовательность. Из-за избыточности частоты использования кодонов обратный комплемент может отличаться от эталонной последовательности, кодирующей тот же полипептид. Используемый в данном документе термин «обратный комплемент» также включает последовательности, которые, *например*, на 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичны последовательности обратного комплемента эталонной последовательности.

В некоторых вариантах осуществления конструкция двунаправленной нуклеиновой кислоты содержит первый сегмент, который содержит кодирующую последовательность, кодирующую первый полипептид (первый трансген), и второй сегмент, который содержит последовательность, в которой комплементарная последовательность кодирует второй полипептид (второй трансген). В некоторых вариантах осуществления первый и второй полипептиды являются по меньшей мере на 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичными. В некоторых вариантах осуществления первый и второй полипептиды содержат аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична, *например*, по 50, 100, 200, 500, 1000 или более аминокислотным остаткам.

Безопасный локус представляет собой локус внутри генома, в который ген может быть вставлен без значительного вредного воздействия на клетку-хозяина, *например*, гепатоцит, *например*, не вызывая апоптоза, некроза или старения или не вызывая более 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30% или 40% апоптоза, некроза или старения по сравнению с контрольной клеткой. См., *например*, Hsin et al., «Hepatocyte death in liver inflammation, fibrosis, and tumorigenesis», 2017. В некоторых вариантах осуществления безопасный локус обеспечивает сверхэкспрессию экзогенного гена без значительного вредного воздействия на клетку-хозяина, *например*, гепатоцит, не вызывая апоптоза, некроза или старения или не вызывая более 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30% или 40% апоптоза, некроза или старения по сравнению с контрольной клеткой. В некоторых вариантах осуществления желательным безопасным локусом может быть локус, в котором экспрессия вставленной последовательности гена не нарушается экспрессией сквозного считывания соседних генов. Безопасный локус может находиться в пределах гена альбумина, такого как ген альбумина человека. Безопасный локус может находиться в пределах области интрона 1 альбумина, *например*, интрона 1 альбумина человека. Безопасный локус может представлять собой безопасный локус человека, *например*, для

ткани печени или клетки-хозяина гепатоцита. В некоторых вариантах осуществления безопасный локус обеспечивает сверхэкспрессию экзогенного гена без значительного вредного воздействия на клетку-хозяина или популяцию клеток, таких как гепатоциты или клетки печени, *например*, гепатоцит, например не вызывая апоптоза, некроза или старения или не вызывая более 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30% или 40% апоптоза, некроза или старения по сравнению с контрольной клеткой.

В некоторых вариантах осуществления ген можно встроить в безопасный локус и использовать эндогенную сигнальную последовательность безопасного локуса, *например*, сигнальную последовательность альбумина, кодируемую экзоном 1. Например, последовательность, кодирующую ААТ, может быть вставлена в интрон 1 альбумина человека так, чтобы она находилась ниже сигнальной последовательности экзона 1 альбумина человека и сливалась с ней.

В некоторых вариантах осуществления ген может содержать собственную сигнальную последовательность, может быть вставлен в безопасный локус и может дополнительно использовать эндогенную сигнальную последовательность безопасного локуса. Например, кодирующая ААТ последовательность, содержащая сигнальную последовательность ААТ, может быть вставлена в интрон 1 альбумина человека так, чтобы она находилась ниже сигнальной последовательности альбумина человека, кодируемой экзоном 1, и сливалась с ней.

В некоторых вариантах осуществления ген может содержать собственную сигнальную последовательность и внутренний сайт посадки рибосомы (IRES), может быть вставлен в безопасный локус и может дополнительно использовать эндогенную сигнальную последовательность безопасного локуса. Например, кодирующая ААТ последовательность, содержащая сигнальную последовательность ААТ и последовательность IRES, может быть вставлена в интрон 1 альбумина человека так, чтобы она находилась ниже сигнальной последовательности альбумина человека, кодируемой экзоном 1, и сливалась с ней.

В некоторых вариантах осуществления ген может содержать собственную сигнальную последовательность и IRES, может быть вставлен в безопасный локус и не использует эндогенную сигнальную последовательность безопасного локуса. Например, кодирующая ААТ последовательность, содержащая сигнальную последовательность ААТ и последовательность IRES, может быть вставлена в интрон 1 альбумина человека так, чтобы она не сливалась с сигнальной последовательностью альбумина человека, кодируемой экзоном 1. В этих вариантах осуществления белок транслируется с сайта IRES и не является химерным (*например*, сигнальный пептид альбумина, слитый с белком ААТ), и он может быть преимущественно неиммуногенным или низкоиммуногенным. В некоторых вариантах осуществления белок не секретируется и не транспортируется внеклеточно.

В некоторых вариантах осуществления ген может быть вставлен в безопасный локус, может содержать IRES и не использовать какую-либо сигнальную

последовательность. Например, последовательность, кодирующая ААТ, содержащая последовательность IRES и не имеющая сигнальной последовательности ААТ, может быть вставлена в интрон 1 альбумина человека так, чтобы она не сливалась с сигнальной последовательностью альбумина человека, кодируемой экзоном 1. В некоторых вариантах осуществления белки транслируются с сайта IRES без необходимости какой-либо сигнальной последовательности. В некоторых вариантах осуществления белки не транспортируются внеклеточно.

В настоящем документе клетка, которая не подвергается митотическому делению, называется «неделяющейся» клеткой. «Неделяющиеся» клетки включают типы клеток, которые никогда или редко подвергаются митотическому делению клеток, *например*, многие типы нейронов. «Неделяющаяся» клетка также включает клетки, которые способны, но не подвергаются или собираются подвергнуться митотическому клеточному делению, *например*, покоящаяся клетка. Клетки печени, например, сохраняют способность делиться (*например*, при повреждении или резекции), но обычно не делятся. Во время митотического деления клеток гомологичная рекомбинация представляет собой механизм, с помощью которого геном защищается и восстанавливаются двухцепочечные разрывы. В некоторых вариантах осуществления «неделяющаяся» клетка относится к клетке, в которой гомологичная рекомбинация (HR) не является основным механизмом восстановления двухцепочечных разрывов ДНК в клетке, *например*, по сравнению с контрольной делящейся клеткой. В некоторых вариантах осуществления «неделяющаяся» клетка относится к клетке, в которой негомологичное соединение концов (NHEJ) является основным механизмом восстановления двухцепочечных разрывов ДНК в клетке, *например*, по сравнению с контрольной делящейся клеткой.

В литературе описаны типы неделящихся клеток, *например*, активными механизмами NHEJ восстановления разрывов двухцепочечной ДНК. См., *например*, Yuana, DNA Repair (Amst.) 2013, 12(8): 620-636. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин включает, помимо прочего, клетку печени, мышечную клетку или нейрональную клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой гепатоцит, такой как гепатоцит мыши, яванского макака или человека. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой миоцит, такой как миоцит мыши, яванского макака или человека. В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложена клетка-хозяин, описанная выше, которая содержит описанную в данном документе двунаправленную конструкцию. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин экспрессирует трансгенный полипептид, кодируемый двунаправленной конструкцией, описанной в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложена клетка-хозяин, полученная способом, описанным в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления клетку-хозяина получают путем введения или доставки в клетку-хозяина двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты, описанной в настоящем документе, и системы редактирования генов, такой как система ZFN, TALEN или CRISPR/Cas9.

## Композиции

Композиции, содержащие направляющую РНК (нРНК) безопасного локуса альбумина или направляющую РНК (нРНК) SERPINA1

В настоящем документе представлены композиции направляющей РНК альбумина, композиции матрицы ААТ и способы, пригодные для вставки и экспрессии гетерологичного гена ААТ (*например*, функционального ААТ или ААТ дикого типа) в геномном локусе, таком как безопасный локус гена клетки-хозяина. В частности, как показано в настоящем документе, нацеливание и вставка гетерологичного гена ААТ в локус альбумина (*например*, в интрон 1) позволяет использовать эндогенный промотор альбумина для обеспечения устойчивой экспрессии гетерологичного гена ААТ. Настоящее изобретение частично основано на идентификации направляющих РНК альбумина, которые специфически нацелены на сайты в пределах интрона 1 гена альбумина, последовательностей нуклеиновых кислот SERPINA1 с альтернативной частотой использования кодонов и направляющих РНК, которые связываются с нуклеиновыми кислотами эндогенного SERPINA1, но не с нуклеиновыми кислотами SERPINA1 с альтернативной частотой использования кодонов. Как показано в Примерах и дополнительно описано в данном документе, на экспрессию трансгена ААТ не влияет одновременное или неодновременное введение нРНК (или киРНК), которые специфически нацелены на нуклеиновые кислоты эндогенного SERPINA1.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе описаны композиции, пригодные для введения или вставки гетерологичного гена ААТ (*например*, функционального ААТ или ААТ дикого типа) в локус, такой как локус альбумина (*например*, интрон 1), клетки-хозяина, *например*, с использованием направляющей РНК альбумина, описанной в настоящем документе, с РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом (*например*, нуклеазой Cas) и конструкцией (*например*, донорной конструкцией или матрицей), содержащей нуклеиновую кислоту гетерологичного ААТ («трансген ААТ»). В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе описаны композиции, пригодные для экспрессии гетерологичного гена ААТ в локусе альбумина клетки-хозяина, *например*, с использованием направляющей РНК альбумина, описанной в настоящем документе, с РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом и конструкцией (*например*, донорной), содержащей нуклеиновую кислоту гетерологичного ААТ. В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе описаны композиции, пригодные для экспрессии гетерологичного ААТ в локусе альбумина клетки-хозяина, *например*, с использованием направляющей РНК альбумина, описанной в настоящем документе, с РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом и двунаправленной конструкцией, содержащей нуклеиновую кислоту гетерологичного ААТ. В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе описаны композиции, пригодные для индукции разрыва (*например*, двухцепочечного разрыва (DSB) или одноцепочечного разрыва (SSB или ника)) в пределах гена альбумина клетки-хозяина, *например*, с использованием направляющей РНК альбумина, описанной в настоящем документе, с

РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом (*например*, системой CRISPR/Cas). Композиции можно использовать *in vitro* или *in vivo*, *например*, для лечения ААТД.

В некоторых вариантах осуществления направляющие РНК альбумина, описанные в настоящем документе, содержат направляющую последовательность, которая связывается или способна связываться с интроном локуса альбумина. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения направляющие РНК альбумина связываются с областью интрона 1 гена альбумина человека SEQ ID NO: 1. Следует понимать, что не каждое основание направляющей последовательности альбумина должно связываться в пределах указанных областей. Например, в некоторых вариантах осуществления 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более оснований последовательности направляющей РНК альбумина связываются в пределах указанных областей. Например, в некоторых вариантах осуществления 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более смежных оснований последовательности направляющей РНК связываются с указанными областями.

В некоторых вариантах осуществления направляющие РНК альбумина, описанные в настоящем документе, опосредуют мишень-специфическое разрезание с помощью РНК-направляемого ДНК-связывающего агента (*например*, нуклеазы Cas) в сайте в пределах интрона 1 альбумина человека (SEQ ID NO: 1). Следует понимать, что в некоторых вариантах осуществления направляющие РНК содержат направляющие последовательности, которые связываются или способны связываться с указанными областями.

В некоторых вариантах осуществления направляющие РНК альбумина, описанные в настоящем документе, содержат направляющую последовательность, которая по меньшей мере на 95% или 90% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33.

В некоторых вариантах осуществления направляющие РНК альбумина, описанные в настоящем документе, содержат направляющую последовательность, содержащую по меньшей мере 15, 16, 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33.

В некоторых вариантах осуществления направляющая РНК альбумина (нРНК) содержит направляющую последовательность, выбранную из: а) последовательности, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32, 33; б) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32, 33; в) последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34, 40, 45, 51, 60, 61, 63, 64, 65, 66, 72, 77, 83, 92, 93, 95, 96 и 97; д) последовательности, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33; е) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33; ф) последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34-

97; и г) последовательности, которая комплементарна 15 последовательным нуклеотидам +/- 5 нуклеотидов геномных координат, указанных для SEQ ID NO: 2-33. В некоторых вариантах осуществления направляющая РНК альбумина содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32, 33. См. Таблицу 1.

Интрон 1 альбумина человека: (SEQ ID NO: 1)

GTAAGAAATCCATTTTTCTATTGTTCAACTTTTATTCTATTTTCCCAGTAAAAT  
AAAGTTTTAGTAAACTCTGCATCTTTAAAGAATTATTTTGGCATTATTTCTAAAATG  
GCATAGTATTTTGTATTTGTGAAGTCTTACAAGGTTATCTTATTAATAAAAATTCAAAC  
ATCCTAGGTAAAAAAGGTCAGAATTGTTTAGTGACTGTAATTTTCTTTTG  
CGCACTAAGGAAAGTGCAAAGTAACTTAGAGTGACTGAACTTCACAGAATAGGGT  
TGAAGATTGAATTCATAACTATCCCAAAGACCTATCCATTGCACTATGCTTTATTTA  
AAAACCACAAAACCTGTGCTGTTGATCTCATAAATAGAAGTTGTATTTATATTTATTT  
TCATTTTAGTCTGTCTTCTTGGTTGCTGTTGATAGACACTAAAAGAGTATTAGATATT  
ATCTAAGTTTGAATATAAGGCTATAAATATTTAATAATTTTAAAATAGTATTCTTGG  
TAATTGAATTATTCTTCTGTTTAAAGGCAGAAGAAATAATTGAACATCATCCTGAGT  
TTTTCTGTAGGAATCAGAGCCCAATATTTTGAAACAAATGCATAATCTAAGTCAAAT  
GGAAAGAAATATAAAAAGTAACATTATTACTTCTTGTTTTCTTCAGTATTTAACAAT  
CSTTTTTTTTCTTCCCTTGCCCAG

**Таблица 1: Последовательности направляющей РНК человека, нацеленные на альбумин, и хромосомные координаты**

<b>ID направляющей</b>	<b>Направляющая последовательность</b>	<b>Геномные координаты</b>	<b>SEQ ID NO:</b>
G009844	GAGCAACCUCACUCUUGUCU	chr4:73405113-73405133	2
G009851	AUGCAUUUGUUUCAAAAUAU	chr4:73405000-73405020	3
G009852	UGCAUUUGUUUCAAAAUAUU	chr4:73404999-73405019	4
G009857	AUUUAUGAGAUCAACAGCAC	chr4:73404761-73404781	5
G009858	GAUCAACAGCACAGGUUUUG	chr4:73404753-73404773	6
G009859	UUAAAUAAGCAUAGUGCAA	chr4:73404727-73404747	7
G009860	UAAAGCAUAGUGCAAUGGAU	chr4:73404722-73404742	8
G009861	UAGUGCAAUGGAUAGGUCUU	chr4:73404715-73404735	9
G009866	UACUAAAACUUUAUUUUACU	chr4:73404452-73404472	10
G009867	AAAGUUGAACAAUAGAAAAA	chr4:73404418-73404438	11
G009868	AAUGCAUAAUCUAAGUCAAA	chr4:73405013-73405033	12
G009874	UAAUAAAUAUCAACAUCU	chr4:73404561-73404581	13
G012747	GCAUCUUUAAAGAAUUAUUU	chr4:73404478-73404498	14

G012748	UUUGGCAUUUAUUUCUAAAA	chr4:73404496-73404516	15
G012749	UGUAUUUGUGAAGUCUUACA	chr4:73404529-73404549	16
G012750	UCCUAGGUAAAAAAAAAAAA	chr4:73404577-73404597	17
G012751	UAAUUUUCUUUUGCGCACUA	chr4:73404620-73404640	18
G012752	UGACUGAAACUUCACAGAAU	chr4:73404664-73404684	19
G012753	GACUGAAACUUCACAGAAUA	chr4:73404665-73404685	20
G012754	UUCAUUUUAGUCUGUCUUCU	chr4:73404803-73404823	21
G012755	AUUAUCUAAGUUUGAAUAUA	chr4:73404859-73404879	22
G012756	AAUUUUUAAAAUAGUAUUCU	chr4:73404897-73404917	23
G012757	UGAAUUAUUCUUCUGUUUAA	chr4:73404924-73404944	24
G012758	AUCAUCCUGAGUUUUUCUGU	chr4:73404965-73404985	25
G012759	UUACUAAAACUUUAUUUUAC	chr4:73404453-73404473	26
G012760	ACCUUUUUUUUUUUUUUACCU	chr4:73404581-73404601	27
G012761	AGUGCAAUGGAUAGGUCUUU	chr4:73404714-73404734	28
G012762	UGAUUCCUACAGAAAAACUC	chr4:73404973-73404993	29
G012763	UGGGCAAGGGAAGAAAAAAA	chr4:73405094-73405114	30
G012764	CCUCACUCUUGUCUGGGCAA	chr4:73405107-73405127	31
G012765	ACCUCACUCUUGUCUGGGCA	chr4:73405108-73405128	32
G012766	UGAGCAACCUCACUCUUGUC	chr4:73405114-73405134	33

Описанные в данном документе направляющие РНК альбумина опосредуют мишень-специфическое разрезание, приводящее к двухцепочечному разрыву (DSB). Описанные в данном документе направляющие РНК альбумина опосредуют мишень-специфическое разрезание, приводящее к одноцепочечному разрыву (SSB или ник).

В некоторых вариантах осуществления направляющие РНК альбумина, описанные в настоящем документе, связываются с областью, расположенной выше прилегающего к протоспейсеру мотива (PAM). Как будет понятно специалистам в данной области техники, последовательность PAM находится на цепи, противоположной цепи, которая содержит целевую последовательность. То есть последовательность PAM находится на комплементарной цепи целевой цепи (цепи, которая содержит целевую последовательность, с которой связывается направляющая РНК). В некоторых вариантах осуществления PAM выбран из группы, состоящей из NGG, NNGRRT, NNGRR(N), NNAGAAW, NNNNG(A/C)TT и NNNNRYAC. В некоторых вариантах осуществления PAM представляет собой NGG.

В некоторых вариантах осуществления последовательности направляющей РНК, представленные в настоящем документе, комплементарны последовательности, соседней с последовательностью PAM.

В некоторых вариантах осуществления последовательность направляющей РНК

содержит последовательность, которая комплементарна последовательности в пределах геномной области, выбранной из приведенных в данном документе таблиц в соответствии с координатами в эталонном геноме человека hg38. В некоторых вариантах осуществления последовательность направляющей РНК содержит последовательность, которая комплементарна последовательности, которая содержит 15, 16, 17, 18, 19 или 20 последовательных нуклеотидов в пределах геномной области, выбранной из таблиц в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления последовательность направляющей РНК содержит последовательность, которая комплементарна последовательности, которая содержит 15, 16, 17, 18, 19 или 20 последовательных нуклеотидов, охватывающих геномную область, выбранную из таблиц в настоящем документе.

Описанные в данном документе направляющие РНК опосредуют мишень-специфическое разрезание, приводящее к двухцепочечному разрыву (DSB). Описанные в данном документе направляющие РНК опосредуют мишень-специфическое разрезание, приводящее к одноцепочечному разрыву (SSB или ник).

В некоторых вариантах осуществления направляющие РНК альбумина, описанные в настоящем документе, опосредуют мишень-специфическое разрезание с помощью РНК-направляемого ДНК-связывающего агента (*например*, нуклеазы Cas, как описано в настоящем документе), при этом результирующий сайт разреза позволяет вставить нуклеиновую кислоту гетерологичного ААТ (*например*, функциональный ААТ или ААТ дикого типа) в интрон 1 гена альбумина. В некоторых вариантах осуществления направляющая РНК или сайт разреза обеспечивают от 25 до 30%, от 30 до 35%, от 35 до 40%, от 40 до 45%, от 45 до 50%, от 50 до 55%, от 55 до 60%, от 60 до 65%, от 65 до 70%, от 70 до 75%, от 75 до 80%, от 80 до 85%, от 85 до 90%, от 90 до 95% вставку гетерологичного гена ААТ. В некоторых вариантах осуществления направляющая РНК или сайт разреза обеспечивают 25-90%, 25-80%, 25-70%, 25-50%, 35-80% или 35-70% вставку гетерологичного гена ААТ. В некоторых вариантах осуществления направляющая РНК или сайт разреза обеспечивают по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% вставку гетерологичной нуклеиновой кислоты ААТ. Показатели вставки можно измерить *in vitro* или *in vivo*. Например, в некоторых вариантах осуществления показатель вставки можно определить путем обнаружения и измерения вставленной гетерологичной нуклеиновой кислоты ААТ в популяции клеток и расчета процента популяции, которая содержит вставленную нуклеиновую кислоту гетерологичного ААТ. Способы измерения показателя вставки известны и доступны в данной области техники. Такие способы включают, *например*, секвенирование сайта вставки или секвенирование мРНК, выделенной из представляющей интерес ткани или популяции клеток.

В некоторых вариантах осуществления направляющая РНК обеспечивает увеличение экспрессии или секреции гетерологичного гена ААТ на от 50 до 55%, от 55 до

60%, от 60 до 65%, от 65 до 70%, от 70 до 75%, от 75 до 80%, от 80 до 85%, от 85 до 90%, от 90 до 95%, от 95 до 99% или более. В некоторых вариантах осуществления РНК обеспечивает по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100% нижнего предела нормы экспрессии ААТ. В некоторых вариантах осуществления экспрессируемый уровень представляет собой комбинацию эндогенного белка и гетерологичного белка. Например, в некоторых вариантах осуществления увеличенная экспрессия или секреция может быть определена путем обнаружения и измерения уровня полипептида ААТ и сравнения этого уровня с уровнем полипептида ААТ до, *например*, обработки клеток или введения субъекту. Увеличенную экспрессию или секрецию гетерологичного гена ААТ можно измерить *in vitro* или *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления секрецию или экспрессию ААТ измеряют либо путем обнаружения белка, секретлируемого тканью или популяцией клеток (*например*, в сыворотке или клеточной среде), либо путем определения общего клеточного количества белка в представляющей интерес ткани или популяции клеток, используя, *например*, иммуноферментный анализ (ИФА), ВЭЖХ, масс-спектрометрию (*например*, жидкостную масс-спектрометрию (*например*, ЖХ-МС, ЖХ-МС/МС) или анализ вестерн-блоттинг с культуральной средой или экстрактом клеток или тканей (*например*, печени). В некоторых вариантах осуществления секрецию или экспрессию ААТ измеряют в первичных гепатоцитах человека, *например*, образцах среды или клеток. В некоторых вариантах осуществления секрецию ААТ измеряют в клетках HUH7, *например*, образцах среды. В некоторых вариантах осуществления используемая клетка представляет собой клетки HUH7. В некоторых вариантах осуществления количество ААТ сравнивают с количеством глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы GAPDH (конститутивный ген) для контроля изменений количества клеток. В некоторых вариантах осуществления ААТ можно оценить путем окрашивания PASD срезов ткани печени, *например*, для измерения агрегации. В некоторых вариантах осуществления ААТ можно оценить путем измерения ингибирования эластазы нейтрофилов, *например*, в легких.

В некоторых вариантах осуществления направляющая РНК обеспечивает увеличение активности на от 50 до 55%, от 55 до 60%, от 60 до 65%, от 65 до 70%, от 70 до 75%, от 75 до 80%, от 80 до 85%, от 85 до 90%, от 90 до 95%, от 95 до 99% или более, возникающая в результате экспрессии гетерологичного гена ААТ (*например*, функционального ААТ или ААТ дикого типа). В некоторых вариантах осуществления направляющая РНК обеспечивает уровень активности ААТ по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100% от нижнего предела нормы у субъекта, не страдающего ААТД. В некоторых вариантах осуществления активность представляет собой комбинацию эндогенного белка и гетерологичного белка. Например, увеличенную активность можно определить путем обнаружения и измерения уровня активности ингибитора протеазы и сравнения этого уровня с уровнем активности до, *например*, обработки клеток или введения субъекту. Такие способы доступны и известны в данной области. См., *например*, Mullins et al., «Standardized automated assay for functional alpha 1-antitrypsin», 1984; Eckfeldt

et al., «Automated assay for alpha-1-antitrypsin with N-a-benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide as trypsin substrate and standardized with p-nitrophenyl-p'-guanidinobenzoate as titrant for trypsin active sites», 1982.

В некоторых вариантах осуществления целевая последовательность или область в интроне 1 локуса альбумина человека (SEQ ID NO: 1) может быть комплементарна направляющей последовательности направляющей РНК альбумина. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения степень комплементарности или идентичности между направляющей последовательностью направляющей РНК и соответствующей целевой последовательностью может составлять по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 100%. В некоторых вариантах осуществления целевая последовательность и направляющая последовательность нРНК могут быть на 100% комплементарны или идентичны. В других вариантах осуществления целевая последовательность и направляющая последовательность нРНК могут содержать по меньшей мере одно несовпадение. Например, целевая последовательность и направляющая последовательность нРНК могут содержать 1, 2, 3 или 4 несовпадения, при этом общая длина направляющей последовательности составляет около 20 или 20 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления целевая последовательность и направляющая последовательность нРНК могут содержать 1-4 несовпадения, при этом длина направляющей последовательности составляет около 20 или 20 нуклеотидов.

Как описано и проиллюстрировано в настоящем документе, направляющие РНК альбумина можно использовать для вставки и экспрессии гетерологичного гена ААТ (*например*, функционального ААТ или ААТ дикого типа) в интроне 1 гена альбумина в комбинации с направляющей РНК SERPINA1 для нокдауна или нокаута эндогенного гена SERPINA1 (*например*, мутантного гена SERPINA1). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает композиции, содержащие одну или более направляющих РНК SERPINA1 (нРНК), содержащих направляющие последовательности, которые направляют РНК-направляемый ДНК-связывающий агент (*например*, Cas9) к целевой последовательности ДНК в SERPINA1. нРНК может содержать одну или более направляющих последовательностей, показанных в Таблице 2. В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предусмотрены одна или более направляющих РНК SERPINA1, содержащих направляющую последовательность любой из SEQ ID NO: 1000-1131.

В одном аспекте изобретение относится к нРНК SERPINA1, которая содержит направляющую последовательность, которая по меньшей мере на 95% или на 90% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1000-1131.

В других вариантах осуществления композиция содержит по меньшей мере две нРНК SERPINA1, содержащие направляющие последовательности, выбранные из любых двух или более направляющих последовательностей SEQ ID NO: 1000-1131. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит по меньшей мере две нРНК, каждая из которых по меньшей мере на 95% идентична или на 90% идентична любой из

нуклеиновых кислот SEQ ID NO: 1000-1131.

Композиции направляющей РНК *SERPINA1*, представленные в настоящем документе, предназначены для распознавания целевой последовательности в гене *SERPINA1*. Например, целевая последовательность *SERPINA1* может быть распознана и расщеплена предлагаемым РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом. В некоторых вариантах осуществления белок Cas может быть направлен направляющей РНК *SERPINA1* к целевой последовательности гена *SERPINA1*, при этом направляющая последовательность направляющей РНК гибридизуется с целевой последовательностью, а белок Cas расщепляет целевую последовательность.

В некоторых вариантах осуществления выбор одной или более направляющих РНК *SERPINA1* определяется на основе целевых последовательностей в гене *SERPINA1*.

Не привязываясь к какой-либо конкретной теории, мутации в критических областях гена могут быть менее переносимыми, чем мутации в некритических областях гена, поэтому расположение DSB является важным фактором, определяющим количество или тип нокдауна или нокаута белка, который может произойти. В некоторых вариантах осуществления нРНК *SERPINA1*, комплементарная или обладающая комплементарностью к целевой последовательности в *SERPINA1*, используется для направления белка Cas в определенное место в гене *SERPINA1*. В некоторых вариантах осуществления нРНК *SERPINA1* разработаны так, чтобы иметь направляющие последовательности, которые комплементарны или обладают комплементарностью к целевым последовательностям в экзонах 2, 3, 4 или 5 *SERPINA1*.

В некоторых вариантах осуществления нРНК *SERPINA1* созданы так, чтобы они были комплементарны или обладали комплементарностью к целевым последовательностям в экзонах *SERPINA1*, которые кодируют N-концевую область ААТ.

**Таблица 2: Номенклатура, хромосомные координаты и последовательность контрольных направляющих последовательностей и направляющих последовательностей, нацеленных на *SERPINA1***

SEQ ID NO:	ID направляющей	Описание	Хромосомные координаты человека (hg38)	Направляющие последовательности
1000	CR001261	Контроль 1	Chr1:55039269-55039291	GCCAGACUCCAAGU UCUGCC
1001	CR001262	Контроль 2	Chr1:55039155-55039177	UAAGGCCAGUGGA AAGAAUU
1002	CR001263	Контроль 3	Chr1:55039180-55039202	GGCAGCGAGGAGUC CACAGU
1003	CR001264	Контроль 4	Chr1:55039149-55039171	UCUUUCCACUGGCC UUAACC

1004	CR001367	Экзон 2	Chr14:94383211-94383233	CAAUGCCGUCUUCU GUCUCG
1005	CR001368	Экзон 2	Chr14:94383210-94383232	AAUGCCGUCUUCUG UCUCGU
1006	CR001369	Экзон 2	Chr14:94383209-94383231	AUGCCGUCUUCUGU CUCGUG
1007	CR001370	Экзон 2	Chr14:94383206-94383228	AUGCCCCACGAGAC AGAAGA
1008	CR001371	Экзон 2	Chr14:94383195-94383217	CUCGUGGGGCAUCC UCCUGC
1009	CR001372	Экзон 2	Chr14:94383152-94383174	GGAUCCUCAGCCAG GGAGAC
1010	CR001373	Экзон 2	Chr14:94383146-94383168	UCCCUGGCUGAGGA UCCCA
1011	CR001374	Экзон 2	Chr14:94383145-94383167	UCCCUGGGGAUCCU CAGCCA
1012	CR001375	Экзон 2	Chr14:94383144-94383166	CUCCCUGGGGAUCC UCAGCC
1013	CR001376	Экзон 2	Chr14:94383115-94383137	GUGGGAUGUAUCU GUCUUCU
1014	CR001377	Экзон 2	Chr14:94383114-94383136	GGUGGGAUGUAUC UGUCUUC
1015	CR001378	Экзон 2	Chr14:94383105-94383127	AGAUACAUCCCACC AUGAUC
1016	CR001379	Экзон 2	Chr14:94383097-94383119	UGGGUGAUCCUGA UCAUGGU
1017	CR001380	Экзон 2	Chr14:94383096-94383118	UUGGGUGAUCCUG AUCAUGG
1018	CR001381	Экзон 2	Chr14:94383093-94383115	AGGUUGGGUGAUC CUGAUCA
1019	CR001382	Экзон 2	Chr14:94383078-94383100	GGGUGAUCUUGUU GAAGGUU
1020	CR001383	Экзон 2	Chr14:94383077-94383099	GGGGUGAUCUUGU UGAAGGU

1021	CR001384	Экзон 2	Chr14:94383069- 94383091	CAACAAGAUCACCC CCAACC
1022	CR001385	Экзон 2	Chr14:94383057- 94383079	AGGCGAACUCAGCC AGGUUG
1023	CR001386	Экзон 2	Chr14:94383055- 94383077	GAAGGCGAACUCAG CCAGGU
1024	CR001387	Экзон 2	Chr14:94383051- 94383073	GGCUGAAGGCGAAC UCAGCC
1025	CR001388	Экзон 2	Chr14:94383037- 94383059	CAGCUGGCGGUAUA GGCUGA
1026	CR001389	Экзон 2	Chr14:94383036- 94383058	CUUCAGCCUAUACC GCCAGC
1027	CR001390	Экзон 2	Chr14:94383030- 94383052	GGUGUGCCAGCUGG CGGUAU
1028	CR001391	Экзон 2	Chr14:94383021- 94383043	UGUUGGACUGGUG UGCCAGC
1029	CR001392	Экзон 2	Chr14:94383009- 94383031	AGAUAUUGGUGCU GUUGGAC
1030	CR001393	Экзон 2	Chr14:94383004- 94383026	GAAGAAGAUAUUG GUGCUGU
1031	CR001394	Экзон 2	Chr14:94382995- 94383017	CACUGGGGAGAAG AAGAUAU
1032	CR001395	Экзон 2	Chr14:94382980- 94383002	GGCUGUAGCGAUGC UCACUG
1033	CR001396	Экзон 2	Chr14:94382979- 94383001	AGGCUGUAGCGAU GCUCACU
1034	CR001397	Экзон 2	Chr14:94382978- 94383000	AAGGCUGUAGCGA UGCUCAC
1035	CR001398	Экзон 2	Chr14:94382928- 94382950	UGACACUCACGAUG AAAUCC
1036	CR001399	Экзон 2	Chr14:94382925- 94382947	CACUCACGAUGAAA UCCUGG
1037	CR001400	Экзон 2	Chr14:94382924- 94382946	ACUCACGAUGAAAU CCUGGA

1038	CR001401	Экзон 2	Chr14:94382910-94382932	GGUUGAAAUUCAG GCCCUCC
1039	CR001402	Экзон 2	Chr14:94382904-94382926	GGGCCUGAAUUUCA ACCUCA
1040	CR001403	Экзон 2	Chr14:94382895-94382917	UUUCAACCUCACGG AGAUUC
1041	CR001404	Экзон 2	Chr14:94382892-94382914	CAACCUCACGGAGA UUCGG
1042	CR001405	Экзон 2	Chr14:94382889-94382911	GAGCCUCCGGAAUC UCCGUG
1043	CR001406	Экзон 2	Chr14:94382876-94382898	CCGGAGGCUCAGAU CCAUGA
1044	CR001407	Экзон 2	Chr14:94382850-94382872	UGAGGGUACGGAG GAGUUC
1045	CR001408	Экзон 2	Chr14:94382841-94382863	CUGGCUGGUUGAG GGUACGG
1046	CR001409	Экзон 2	Chr14:94382833-94382855	CUGGCUGUCUGGCU GGUUGA
1047	CR001410	Экзон 2	Chr14:94382810-94382832	CUCCAGCUGACCAC CGGCAA
1048	CR001411	Экзон 2	Chr14:94382808-94382830	GGCCAUUGCCGGUG GUCAGC
1049	CR001412	Экзон 2	Chr14:94382800-94382822	GAGGAACAGGCCAU UGCCGG
1050	CR001413	Экзон 2	Chr14:94382797-94382819	GCUGAGGAACAGGC CAUUGC
1051	CR001414	Экзон 2	Chr14:94382793-94382815	CAAUGGCCUGUUC UCAGCG
1052	CR001415	Экзон 2	Chr14:94382792-94382814	AAUGGCCUGUUCU CAGCGA
1053	CR001416	Экзон 2	Chr14:94382787-94382809	UCAGGCCUCGCUG AGGAAC
1054	CR001417	Экзон 2	Chr14:94382781-94382803	CUAGCUUCAGGCC UCGCUG

1055	CR001418	Экзон 2	Chr14:94382778- 94382800	CAGCGAGGGCCUGA AGCUAG
1056	CR001419	Экзон 2	Chr14:94382769- 94382791	AAAACUUAUCCACU AGCUUC
1057	CR001420	Экзон 2	Chr14:94382766- 94382788	GAAGCUAGUGGAU AAGUUUU
1058	CR001421	Экзон 2	Chr14:94382763- 94382785	GCUAGUGGAUAAG UUUUUGG
1059	CR001422	Экзон 2	Chr14:94382724- 94382746	UGACAGUGAAGGC UUCUGAG
1060	CR001423	Экзон 2	Chr14:94382716- 94382738	AAGCCUUCACUGUC AACUUC
1061	CR001424	Экзон 2	Chr14:94382715- 94382737	AGCCUUCACUGUCA ACUUCG
1062	CR001425	Экзон 2	Chr14:94382713- 94382735	GUCCCCGAAGUUGA CAGUGA
1063	CR001426	Экзон 2	Chr14:94382703- 94382725	CAACUUCGGGGACA CCGAAG
1064	CR001427	Экзон 2	Chr14:94382689- 94382711	GAUCUGUUUCUUG GCCUCUU
1065	CR001428	Экзон 2	Chr14:94382680- 94382702	GUAAUCGUUGAUC UGUUUCU
1066	CR001429	Экзон 2	Chr14:94382676- 94382698	GAAACAGAUCAACG AUUACG
1067	CR001430	Экзон 2	Chr14:94382670- 94382692	GAUCAACGAUUACG UGGAGA
1068	CR001431	Экзон 2	Chr14:94382669- 94382691	AUCAACGAUUACGU GGAGAA
1069	CR001432	Экзон 2	Chr14:94382660- 94382682	UACGUGGAGAAGG GUACUCA
1070	CR001433	Экзон 2	Chr14:94382659- 94382681	ACGUGGAGAAGGG UACUCA
1071	CR001434	Экзон 2	Chr14:94382643- 94382665	UCAAGGGAAAAUU GUGGAUU

1072	CR001435	Экзон 2	Chr14:94382637- 94382659	GAAAAUUGUGGAU UUGGUCA
1073	CR001436	Экзон 2	Chr14:94382607- 94382629	CAGAGACACAGUUU UUGCUC
1074	CR001437	Экзон 3	Chr14:94381127- 94381149	UCCCCUCUCUCCAG GCAAU
1075	CR001438	Экзон 3	Chr14:94381098- 94381120	CUCGGUGUCCUUGA CUUCA
1076	CR001439	Экзон 3	Chr14:94381097- 94381119	CUUUGAAGUCAAG GACACCG
1077	CR001440	Экзон 3	Chr14:94381080- 94381102	CACGUGGAAGUCCU CUUCCU
1078	CR001441	Экзон 3	Chr14:94381079- 94381101	CGAGGAAGAGGAC UUCCACG
1079	CR001442	Экзон 3	Chr14:94381073- 94381095	AGAGGACUCCACG UGGACC
1080	CR001443	Экзон 3	Chr14:94381064- 94381086	CGGUGGUCACCUGG UCCACG
1081	CR001444	Экзон 3	Chr14:94381058- 94381080	GGACCAGGUGACCA CCGUGA
1082	CR001445	Экзон 3	Chr14:94381055- 94381077	GCACCUUCACGGUG GUCACC
1083	CR001446	Экзон 3	Chr14:94381047- 94381069	CAUCAUAGGCACCU UCACGG
1084	CR001447	Экзон 3	Chr14:94381036- 94381058	GUGCCUAUGAUGA AGCGUUU
1085	CR001448	Экзон 3	Chr14:94381033- 94381055	AUGCCUAAACGCUU CAUCAU
1086	CR001449	Экзон 3	Chr14:94381001- 94381023	UGGACAGCUUCUUA CAGUGC
1087	CR001450	Экзон 3	Chr14:94380995- 94381017	CUGUAAGAAGCUG UCCAGCU
1088	CR001451	Экзон 3	Chr14:94380974- 94380996	GGUGCUGCUGAUG AAAUACC

1089	CR001452	Экзон 3	Chr14:94380973- 94380995	GUGCUGCUGAUGA AAUACCU
1090	CR001453	Экзон 3	Chr14:94380956- 94380978	AGAUGGCGGUGGC AUUGCCC
1091	CR001454	Экзон 3	Chr14:94380945- 94380967	AGGCAGGAAGAAG AUGGCGG
1092	CR001474	Экзон 5	Chr14:94378611- 94378633	GGUCAGCACAGCCU UAUGCA
1093	CR001475	Экзон 5	Chr14:94378581- 94378603	AGAAAGGGACUGA AGCUGCU
1094	CR001476	Экзон 5	Chr14:94378580- 94378602	GAAAGGGACUGAA GCUGCUG
1095	CR001477	Экзон 5	Chr14:94378565- 94378587	UGCUGGGGCCAUGU UUUUAG
1096	CR001478	Экзон 5	Chr14:94378557- 94378579	GGGUAUGGCCUCUA AAAACA
1097	CR001483	Экзон 5	Chr14:94378526- 94378548	UGUUGAACUUGACC UCGGGG
1098	CR001484	Экзон 5	Chr14:94378521- 94378543	GGGUUGUUGAAC UUGACCU
1099	CR003190	Экзон 2	Chr14:94383131- 94383153	UUCUGGGCAGCAUC UCCCUG
1100	CR003191	Экзон 2	Chr14:94383129- 94383151	UCUUCUGGGCAGCA UCUCCC
1101	CR003196	Экзон 2	Chr14:94383024- 94383046	UGGACUGGUGUGCC AGCUGG
1102	CR003204	Экзон 2	Chr14:94382961- 94382983	AGCCUUUGCAAUGC UCUCCC
1103	CR003205	Экзон 2	Chr14:94382935- 94382957	UUCAUCGUGAGUG UCAGCCU
1104	CR003206	Экзон 2	Chr14:94382901- 94382923	UCUCCGUGAGGUUG AAAUUC
1105	CR003207	Экзон 2	Chr14:94382822- 94382844	GUCAGCUGGAGCUG GCUGUC

1106	CR003208	Экзон 2	Chr14:94382816-94382838	AGCCAGCUCCAGCU GACCAC
1107	CR003217	Экзон 3	Chr14:94380942-94380964	AUCAGGCAGGAAG AAGAUGG
1108	CR003218	Экзон 3	Chr14:94380938-94380960	CAUCUUCUCCUGC CUGAUG
1109	CR003219	Экзон 3	Chr14:94380937-94380959	AUCUUCUCCUGCC UGAUGA
1110	CR003220	Экзон 3	Chr14:94380881-94380903	CGAUAUCAACCA AGUUC
1111	CR003221	Экзон 4	Chr14:94379554-94379576	CAGAUCAUAGGUUC CAGUAA
1112	CR003222	Экзон 4	Chr14:94379507-94379529	AUCACUAAGGUCUU CAGCAA
1113	CR003223	Экзон 4	Chr14:94379506-94379528	UCACUAAGGUCUUC AGCAAU
1114	CR003224	Экзон 4	Chr14:94379505-94379527	CACUAAGGUCUUCA GCAAUG
1115	CR003225	Экзон 4	Chr14:94379453-94379475	CUCACCUUGGAGAG CUUCAG
1116	CR003226	Экзон 4	Chr14:94379452-94379474	UCUCACCUUGGAGA GCUUCA
1117	CR003227	Экзон 4	Chr14:94379451-94379473	AUCUCACCUUGGAG AGCUUC
1118	CR003235	Экзон 5	Chr14:94378525-94378547	UUGUUGAACUUGA CCUCGGG
1119	CR003236	Экзон 5	Chr14:94378524-94378546	UUUGUUGAACUUG ACCUCGG
1120	CR003237	Экзон 5	Chr14:94378523-94378545	GUUUGUUGAACUU GACCUCG
1121	CR003238	Экзон 5	Chr14:94378522-94378544	GGUUUGUUGAACU UGACCUC
1122	CR003240	Экзон 5	Chr14:94378501-94378523	UCAAUCAUUAAGA AGACAAA

1123	CR003241	Экзон 5	Chr14:94378500-94378522	UCAAUCAUUAAG AAGACAA
1124	CR003242	Экзон 5	Chr14:94378472-94378494	UACCAAGUCUCCCC UCUUCA
1125	CR003243	Экзон 5	Chr14:94378471-94378493	ACCAAGUCUCCCCU CUUCAU
1126	CR003244	Экзон 5	Chr14:94378463-94378485	UCCCCUCUUCAUGG GAAAAG
1127	CR003245	Экзон 5	Chr14:94378461-94378483	CACCACUUUCCCA UGAAGA
1128	CR003246	Экзон 5	Chr14:94378460-94378482	UCACCACUUUCCC AUGAAG
1129	GR000409	Экзон 2	chr14:94382932-94382952	ACUCACGAUGAAAU CCUGGA
1130	GR000414	Экзон 2	chr14:94382900-94382920	CAACCUCACGGAGA UUCCGG
1131	GR000415	Экзон 2	chr14:94383026-94383046	UGUUGGACUGGUG UGCCAGC

Каждая из направляющих последовательностей альбумина и направляющих последовательностей SERPINA1, описанных в настоящем документе, может дополнительно содержать дополнительные нуклеотиды для образования сРНК или направляющей РНК, *например*, со следующей типичной нуклеотидной последовательностью, следующей за направляющей последовательностью на ее 3'-конце: GUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG (SEQ ID NO: 900) в ориентации от 5' к 3'. В случае онРНК вышеуказанные направляющие последовательности (направляющие последовательности альбумина и направляющие последовательности SERPINA1, показанные в Таблице 1 с SEQ ID NO: 2-33 и Таблице 2 с SEQ ID NO: 1000-1131, соответственно) могут дополнительно содержать дополнительные нуклеотидов с образованием онРНК, *например*, со следующей типичной нуклеотидной последовательностью, следующей за 3'-концом направляющей последовательности: GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGA AAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (SEQ ID NO: 901) в ориентации от 5' до 3'.

В случае онРНК направляющие последовательности могут быть интегрированы в следующий модифицированный мотив:

mN\*mN\*mN\*NNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUm  
AmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmA  
mGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU\*mU\*mU\*mU (SEQ ID

NO: 300), где «N» может представлять собой любой природный или неприродный нуклеотид, предпочтительно нуклеотид РНК; сахарные фрагменты нуклеотида могут представлять собой рибозу, дезоксирибозу или подобные соединения с заменами; m представляет собой 2'-О-метилмодифицированный нуклеотид, а \* представляет собой фосфоротиоатную связь между нуклеотидными остатками; и где N вместе представляют собой нуклеотидную последовательность направляющей последовательности.

В случае онРНК направляющие последовательности могут дополнительно содержать последовательность онРНК SpyCas9. Пример последовательности онРНК SpyCas9 показан ниже (SEQ ID NO: 902: GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGA AAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC - «Примерная онРНК-1 SpyCas9»), включенная на 3'-конце направляющей последовательности и снабженная доменами, как показано в таблице ниже. LS представляет собой нижний стебель. В представляет собой выпетливание. US представляет собой верхний стебель. Н1 и Н2 представляют собой шпильку 1 и шпильку 2, соответственно. Вместе Н1 и Н2 представляют собой область шпильки. Модель структуры представлена на Фиг. 10А в WO 2019237069, которая включена в данный документ посредством ссылки.

Нуклеотидная последовательность Примерной онРНК-1 SpyCas9 может служить в качестве матричной последовательности для конкретных химических модификаций, замен и усечения последовательности.

В некоторых вариантах осуществления нРНК представляет собой, например, онРНК или днРНК и необязательно включает химическую модификацию. В некоторых вариантах осуществления модифицированная онРНК содержит направляющую последовательность и последовательность онРНК SpyCas9, например, Примерную онРНК-1 SpyCas9. нРНК, такая как онРНК, может включать модификации на 5'-конце направляющей последовательности и/или на 3'-конце последовательности онРНК SpyCas9, такие как, например, Примерная онРНК-1 SpyCas9 на одном или более из концевых нуклеотидов, например, на 1, 2, 3 или 4 нуклеотидах на 3'-конце или на 5'-конце. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модифицированный нуклеотид выбирают из 2'-О-метил (2'-ОМе) модифицированного нуклеотида, 2'-О-(2-метоксиэтил) (2'-О-мое) модифицированного нуклеотида, 2'-фтор-(2'-F) модифицированного нуклеотида, фосфоротиоатной (PS) связи между нуклеотидами, инвертированного модифицированного нуклеотида с удаленным азотистым основанием, или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модифицированный нуклеотид включает модифицированный нуклеотид 2'-ОМе. В некоторых вариантах осуществления модифицированный нуклеотид включает PS-связь. В некоторых вариантах осуществления модифицированный нуклеотид включает модифицированный нуклеотид 2'-ОМе и PS-связь.

В некоторых вариантах осуществления, используя SEQ ID NO: 201 («Примерная онРНК-1 SpyCas9») в качестве примера, Примерная онРНК-1 SpyCas9 дополнительно

включает одну или более из следующего:

А. укороченная область шпильки 1 или замещенная и необязательно укороченная область шпильки 1, причем

1. по меньшей мере одна из следующих пар нуклеотидов заменена в шпильке 1 нуклеотидами пары Уотсона-Крика: Н1-1 и Н1-12, Н1-2 и Н1-11, Н1-3 и Н1-10 или Н1-4 и Н1-9, а в области шпильки 1 необязательно отсутствуют

а. любой один или два из от Н1-5 до Н1-8,

б. одна, две или три из следующих пар нуклеотидов: Н1-1 и Н1-12, Н1-2 и Н1-11, Н1-3 и Н1-10, а также Н1-4 и Н1-9, или

с. 1-8 нуклеотидов области шпильки 1; или

2. в укороченной области шпильки 1 отсутствуют 4-8 нуклеотидов, предпочтительно 4-6 нуклеотидов; и

а. одно или более положений Н1-1, Н1-2 или Н1-3 удалены или заменены относительно Примерной онРНК-1 SpyCas9 (SEQ ID NO: 201) или

б. одно или более положений от Н1-6 до Н1-10 заменены по отношению к Примерной онРНК-1 SpyCas9 (SEQ ID NO: 902); или

3. в укороченной области шпильки 1 отсутствуют 5-10 нуклеотидов, предпочтительно 5-6 нуклеотидов, и одно или более положений Н18, Н1-12 или п заменены относительно Примерной онРНК-1 SpyCas9 (SEQ ID NO: 902); или

В. укороченная область верхнего стебля, при этом в укороченной области верхнего стебля отсутствуют 1-6 нуклеотидов и при этом 6, 7, 8, 9, 10 или 11 нуклеотидов укороченной области верхнего стебля включают менее или равно 4 заменам по сравнению с Примерной онРНК-1 SpyCas9 (SEQ ID NO: 201); или

С. замена относительно Примерной онРНК-1 SpyCas9 (SEQ ID NO: 902) в любом одном или более из LS6, LS7, US3, US10, B3, N7, N15, N17, H2-2 и H2-14, при этом замещающий нуклеотид не является ни пиримидином, за которым следует аденин, ни аденином, которому предшествует пиримидин; или

Д. Примерная онРНК-1 SpyCas9 (SEQ ID NO: 902) с областью верхнего стебля, причем модификация верхнего стебля включает модификацию любого одного или более из US1-US12 в области верхнего стебля, причем

1. модифицированный нуклеотид необязательно выбран из 2'-О-метил (2'-ОМе) модифицированного нуклеотида, 2'-О-(2-метоксиэтил) (2'-О-мое) модифицированного нуклеотида, 2'-фтор-(2'-F) модифицированного нуклеотида, фосфоротиоатной (PS) связи между нуклеотидами, инвертированного модифицированного нуклеотида с удаленным азотистым основанием, или их комбинации; или

2. модифицированный нуклеотид необязательно включает модифицированный 2'-ОМе.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Примерная онРНК-1 SpyCas9 или онРНК, такая как онРНК, содержащая Примерную онРНК-1 SpyCas9, дополнительно включает 3'-хвост, например, 3'-хвост из 1, 2, 3, 4 или более

нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения хвост включает один или большее количество модифицированных нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модифицированный нуклеотид выбирают из 2'-О-метил (2'-ОМе) модифицированного нуклеотида, 2'-О-(2-метоксиэтил) (2'-О-мое) модифицированного нуклеотида, 2'-фтор-(2'-F) модифицированного нуклеотида, фосфоротиоатной (PS) связи между нуклеотидами, инвертированного модифицированного нуклеотида с удаленным азотистым основанием, или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модифицированный нуклеотид включает модифицированный нуклеотид 2'-ОМе. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модифицированный нуклеотид включает PS-связь между нуклеотидами. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модифицированный нуклеотид включает модифицированный нуклеотид 2'-ОМе и PS-связь между нуклеотидами.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения область шпильки включает один или более модифицированных нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модифицированный нуклеотид выбирают из 2'-О-метил (2'-ОМе) модифицированного нуклеотида, 2'-О-(2-метоксиэтил) (2'-О-мое) модифицированного нуклеотида, 2'-фтор-(2'-F) модифицированного нуклеотида, фосфоротиоатной (PS) связи между нуклеотидами, инвертированного модифицированного нуклеотида с удаленным азотистым основанием, или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модифицированный нуклеотид включает модифицированный нуклеотид 2'-ОМе.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения область верхнего стебля включает один или более модифицированных нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модифицированный нуклеотид выбирают из 2'-О-метил (2'-ОМе) модифицированного нуклеотида, 2'-О-(2-метоксиэтил) (2'-О-мое) модифицированного нуклеотида, 2'-фтор-(2'-F) модифицированного нуклеотида, фосфоротиоатной (PS) связи между нуклеотидами, инвертированного модифицированного нуклеотида с удаленным азотистым основанием, или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модифицированный нуклеотид включает модифицированный нуклеотид 2'-ОМе.

В некоторых вариантах осуществления Примерная онРНК-1 SpyCas9 содержит один или более динуклеотидов YA, где Y представляет собой пиримидин, причем динуклеотид YA включает модифицированный нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модифицированный нуклеотид выбирают из 2'-О-метил (2'-ОМе) модифицированного нуклеотида, 2'-О-(2-метоксиэтил) (2'-О-мое) модифицированного нуклеотида, 2'-фтор-(2'-F) модифицированного нуклеотида, фосфоротиоатной (PS) связи между нуклеотидами, инвертированного модифицированного нуклеотида с удаленным азотистым основанием, или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модифицированный

нуклеотид включает модифицированный нуклеотид 2'-ОМе.

В некоторых вариантах осуществления Примерная онРНК-1 SpyCas9 содержит один или более динуклеотидов YA, где Y представляет собой пиримидин, причем динуклеотид YA включает замещенный нуклеотид, т.е. последовательность с замещенным нуклеотидом, где пиримидин заменен на пурин. В некоторых вариантах осуществления, когда пиримидин образует пару оснований по Уотсону-Крику в одиночной направляющей, нуклеотид на основе модели Уотсона-Крика замещенного пиримидинового нуклеотида замещен для поддержания спаривания оснований по Уотсону-Крику.

Примерная онРНК-1 spyCas9 (SEQ ID NO: 902)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3
G	U	U	U	U	A	G	A	G	C	U	A	G	A	A	A	U	A	G	C	A	A	G	U	U	A	A	A	A	A	U	
LS1-LS6						B1- B2	US1-US12										B2-B6			LS7-LS12											
3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	6	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0		
A	A	G	G	C	U	A	G	U	C	C	G	U	U	A	U	C	A	A	C	U	U	G	A	A	A	A	A	A	G	U	
Нексус										от H1-1 до H1-12																					
61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76																
G	G	C	A	C	C	G	A	G	U	C	G	G	U	G	C																
К- во	от H2-1 до H2-15																														

Таблица 3. онРНК человека и профили модификаций

ID направляющей	Полная последовательность	SEQ ID NO:	Полная модифицированная последовательность	SEQ ID NO:
G009844	GAGCAACCUCACUC UUGUCUGUUUU AGAGCUAGAAUA GCAAGUAAAAU AAGGCUAGUCCGU UAUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGA GUCGGUGCUUUU	34	mG*mA*mG*CAACC UCACUCUUGUCUGU UUUAGAmGmCmUm AmGmAmAmAmUm AmGmCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCC GUUAUCAmAmCmU mUmGmAmAmAmAm AmGmUmGmGmCmA	66

			mCmCmGmAmGmUm CmGmGmUmGmCmU *mU*mU*mU	
G009851	AUGCAUUUGUUUC AAAAUAUGUUUU AGAGCUAGAAAUA GCAAGUAAAAAU AAGGCUAGUCCGUU AUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAG UCGGUGCUUUU	35	mA*mU*mG*CAUUU GUUUCAAAAUAUG UUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmUm AmGmCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCG UUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmA m GmUmGmGmCmAmC mCmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU*m U*mU*mU	67
G009852	UGCAUUUGUUUCA AAAUUUGUUUU AGAGCUAGAAAUA GCAAGUAAAAAU AAGGCUAGUCCGUU AUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAG UCGGUGCUUUU	36	mU*mG*mC*AUUUG UUUCAAAAUAUUG U UUUAGAmGmCmUm AmGmAmAmAmUmA m GmCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUU A UCAmAmCmUmUmG mAmAmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCmC mGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmU*mU*m U*mU	68
G009857	AUUUAUGAGAUCA ACAGCACGUUUU AGAGCUAGAAAUA GCAAGUAAAAAU	37	mA*mU*mU*UAUGA GAUCAACAGCACGU UUUAGAmGmCmUm AmGmAmAmAmUmA	69

	<p>AAGGCUAGUCCGUU  AUCAACUUGAA  AAAGUGGCACCGAG  UCGGUGCUUUU</p>		<p>m  GmCAAGUUAAAAU  AAGGCUAGUCCGUU  A  UCAmAmCmUmUmG  mAmAmAmAmAmGm  UmGmGmCmAmCmC  mGmAmGmUmCmGm  GmUmGmCmU*mU*m  U*mU</p>	
G009858	<p>GAUCAACAGCACAG  GUUUUGGUUUU  AGAGCUAGAAAUA  GCAAGUUAAAAU  AAGGCUAGUCCGUU  AUCAACUUGAA  AAAGUGGCACCGAG  UCGGUGCUUUU</p>	38	<p>mG*mA*mU*CAACA  GCACAGGUUUUGG  U  UUUAGAmGmCmUm  AmGmAmAmAmUmA  m  GmCAAGUUAAAAU  AAGGCUAGUCCGUU  A  UCAmAmCmUmUmG  mAmAmAmAmAmGm  UmGmGmCmAmCmC  mGmAmGmUmCmGm  GmUmGmCmU*mU*m  U*mU</p>	70
G009859	<p>UUAAAUAAGCAU  AGUGCAAGUUUU  AGAGCUAGAAAUA  GCAAGUUAAAAU  AAGGCUAGUCCGUU  AUCAACUUGAA  AAAGUGGCACCGAG  UCGGUGCUUUU</p>	39	<p>mU*mU*mA*AAUAA  AGCAUAGUGCAAG  UUUUAGAmGmCmU  mAmGmAmAmAmUm  AmGmCAAGUUAAA  AUAAGGCUAGUCCG  UUAUCAmAmCmUm  UmGmAmAmAmAmA  mGmUmGmGmCmAm  CmCmGmAmGmUmC</p>	71

			mGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	
G009860	UAAAGCAUAGUGC AAUGGAUGUUUU AGAGCUAGAAAUA GCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUU AUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAG UCGGUGCUUUU	40	mU*mA*mA*AGCAU AGUGCAAUGGAUG UUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmUm AmGmCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCG UUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmA mGmUmGmGmCmAm CmCmGmAmGmUmC mGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	72
G009861	UAGUGCAAUGGAU AGGUCUUGUUUU AGAGCUAGAAAUA GCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUU AUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAG UCGGUGCUUUU	41	mU*mA*mG*UGCAA UGGAUAGGUCUUG UUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmUm AmGmCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCG UUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmA mGmUmGmGmCmAm CmCmGmAmGmUmC mGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	73
G009866	UACUAAAACUUUA UUUUACUGUUUU AGAGCUAGAAAUA GCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUU AUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAG UCGGUGCUUUU	42	mU*mA*mC*UAAAA CUUUAUUUUACUG UUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmUm AmGmCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCG UUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmA mGmUmGmGmCmAm	74

			CmCmGmAmGmUmC mGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	
G009867	AAAGUUGAACAAU AGAAAAAGUUUU AGAGCUAGAAAUA GCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUU AUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAG UCGGUGCUUUU	43	mA*mA*mA*GUUGA ACAAUAGAAAAAG UUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmUm AmGmCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCG UUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmA mGmUmGmGmCmAm CmCmGmAmGmUmC mGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	75
G009868	AAUGCAUAAUCUA AGUCAAGUUUU AGAGCUAGAAAUA GCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUU AUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAG UCGGUGCUUUU	44	mA*mA*mU*GCAUA AUCUAAGUCAAG UUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmUm AmGmCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCG UUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmA mGmUmGmGmCmAm CmCmGmAmGmUmC mGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	76
G009874	UAAUAAAAUCAA ACAUCCUGUUUU AGAGCUAGAAAUA GCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUU AUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAG UCGGUGCUUUU	45	mU*mA*mA*UAAAA UUCAACAUCUGU UUUAGAmGmCmUm AmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUUAAA UAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmU mGmAmAmAmAmAm	77

			GmUmGmGmCmAmC mCmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU*m U*mU*mU	
G012747	GCAUCUUUAAAAGA AUUAUUUGUUUU AGAGCUAGAAAUA GCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUU AUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAG UCGGUGCUUUU	46	mG*mC*mA*UCUUU AAAGAAUUAUUUG UUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmUm AmGmCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCG UUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmA mGmUmGmGmCmAm CmCmGmAmGmUmC mGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	78
G012748	UUUGGCAUUUAUU UCUAAAAGUUUU AGAGCUAGAAAUA GCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUU AUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAG UCGGUGCUUUU	47	mU*mU*mU*GGCAU UUAUUUCUAAAAG UUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmUm AmGmCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCG UUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmA mGmUmGmGmCmAm CmCmGmAmGmUmC mGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	79
G012749	UGUAUUUGUGAAG UCUUACAGUUUU AGAGCUAGAAAUA GCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUU AUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAG	48	mU*mG*mU*AUUUG UGAAGUCUUACAG UUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmUm AmGmCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCG UUAUCAmAmCmUm	80

	UCGGUGCUUUU		UmGmAmAmAmAmA mGmUmGmGmCmAm CmCmGmAmGmUmC mGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	
G012750	UCCUAGGUAAAAA AAAAAAGUUUU AGAGCUAGAAAUA GCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUU AUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAG UCGGUGCUUUU	49	mU*mC*mC*UAGGU AAAAAAAAAAAAAG UUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmUm AmGmCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCG UUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmA mGmUmGmGmCmAm CmCmGmAmGmUmC mGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	81
G012751	UAAUUUUCUUUUG CGCACUAGUUUU AGAGCUAGAAAUA GCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUU AUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAG UCGGUGCUUUU	50	mU*mA*mA*UUUUC UUUUGCGCACUAGU UUUAGAmGmCmUm AmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUUAAAA UAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmU mGmAmAmAmAmAm GmUmGmGmCmAmC mCmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU*m U*mU*mU	82
G012752	UGACUGAAACUUCA CAGAAUGUUUU AGAGCUAGAAAUA GCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUU AUCAACUUGAA	51	mU*mG*mA*CUGAA ACUUCACAGAAUGU UUUAGAmGmCmUm AmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUUAAAA UAAGGCUAGUCCGU	83

	AAAGUGGCACCGAG UCGGUGCUUUU		UAUCAmAmCmUmU mGmAmAmAmAmAm GmUmGmGmCmAmC mCmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU*m U*mU*mU	
G012753	GACUGAAACUUCAC AGAAUAGUUUU AGAGCUAGAAAUA GCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUU AUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAG UCGGUGCUUUU	52	mG*mA*mC*UGAAA CUUCACAGAAUAGU UUUAGAmGmCmUm AmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUUAAAA UAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmU mGmAmAmAmAmAm GmUmGmGmCmAmC mCmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU*m U*mU*mU	84
G012754	UUCAUUUUAGUCU GUCUUCUGUUUU AGAGCUAGAAAUA GCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUU AUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAG UCGGUGCUUUU	53	mU*mU*mC*AUUUU AGUCUGUCUUCUGU UUUAGAmGmCmUm AmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUUAAAA UAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmU mGmAmAmAmAmAm GmUmGmGmCmAmC mCmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU*m U*mU*mU	85
G012755	AUUAUCUAAGUUU GAAUAUAGUUUU AGAGCUAGAAAUA GCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUU	54	mA*mU*mU*AUCUA AGUUUGAAUAUAG UUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmUm AmGmCAAGUUAAA	86

	AUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAG UCGGUGCUUUU		AUAAGGCUAGUCCG UUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmA mGmUmGmGmCmAm CmCmGmAmGmUmC mGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	
G012756	AAUUUUUAAAAUA GUAUUCUGUUUU AGAGCUAGAAAUA GCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUU AUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAG UCGGUGCUUUU	55	mA*mA*mU*UUUUA AAAUAGUAUUCUG UUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmUm AmGmCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCG UUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmA mGmUmGmGmCmAm CmCmGmAmGmUmC mGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	87
G012757	UGAAUUAUUCUUC UGUUUAAGUUUU AGAGCUAGAAAUA GCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUU AUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAG UCGGUGCUUUU	56	mU*mG*mA*AUUAU UCUUCUGUUUAAG UUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmUm AmGmCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCG UUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmA mGmUmGmGmCmAm CmCmGmAmGmUmC mGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	88
G012758	AUCAUCCUGAGUUU UUCUGUGUUUU AGAGCUAGAAAUA GCAAGUUAAAAU	57	mA*mU*mC*AUCCU GAGUUUUUCUGUG UUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmUm	89

	AAGGCUAGUCCGUU AUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAG UCGGUGCUUUU		AmGmCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCG UUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmA mGmUmGmGmCmAm CmCmGmAmGmUmC mGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	
G012759	UUACUAAAACUUU AUUUUACGUUUU AGAGCUAGAAAUA GCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUU AUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAG UCGGUGCUUUU	58	mU*mU*mA*CUAAA ACUUUAUUUUACG UUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmUm AmGmCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCG UUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmA mGmUmGmGmCmAm CmCmGmAmGmUmC mGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	90
G012760	ACCUUUUUUUUUU UUUACCUGUUUU AGAGCUAGAAAUA GCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUU AUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAG UCGGUGCUUUU	59	mA*mC*mC*UUUUU UUUUUUUUACCUG UUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmUm AmGmCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCG UUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmA mGmUmGmGmCmAm CmCmGmAmGmUmC mGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	91
G012761	AGUGCAAUGGAUA GGUCUUUGUUUU AGAGCUAGAAAUA	60	mA*mG*mU*GCAAU GGAUAGGUCUUUG UUUUAGAmGmCmU	92

	GCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUU AUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAG UCGGUGCUUUU		mAmGmAmAmAmUm AmGmCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCG UUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmA mGmUmGmGmCmAm CmCmGmAmGmUmC mGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	
G012762	UGAUUCCUACAGAA AAACUCGUUUU AGAGCUAGAAAUA GCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUU AUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAG UCGGUGCUUUU	61	mU*mG*mA*UCCCU ACAGAAAAACUCGU UUUAGAmGmCmUm AmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUUAAAA UAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmU mGmAmAmAmAmAm GmUmGmGmCmAmC mCmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU*m U*mU*mU	93
G012763	UGGGCAAGGGAAG AAAAAAGUUUU AGAGCUAGAAAUA GCAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUU AUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAG UCGGUGCUUUU	62	mU*mG*mG*GCAAG GGAAGAAAAAAG UUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmUm AmGmCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCG UUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmA mGmUmGmGmCmAm CmCmGmAmGmUmC mGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	94
G012764	CCUCACUCUUGUCU GGGCAAGUUUU	63	mC*mC*mU*CACUC UUGUCUGGGCAAG	95

	AGAGCUAGAAAUA GCAAGUAAAAU AAGGCUAGUCCGUU AUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAG UCGGUGCUUUU		UUUUAGAmGmCmU mAmGmAmAmAmUm AmGmCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCG UUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmA mGmUmGmGmCmAm CmCmGmAmGmUmC mGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU	
G012765	ACCUCACUCUUGUC UGGGCAGUUUU AGAGCUAGAAAUA GCAAGUAAAAU AAGGCUAGUCCGUU AUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAG UCGGUGCUUUU	64	mA*mC*mC*UCACU CUUGUCUGGGCAGU UUUAGAmGmCmUm AmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUUAAA UAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmU mGmAmAmAmAmAm GmUmGmGmCmAmC mCmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU*m U*mU*mU	96
G012766	UGAGCAACCUCACU CUUGUCGUUUU AGAGCUAGAAAUA GCAAGUAAAAU AAGGCUAGUCCGUU AUCAACUUGAA AAAGUGGCACCGAG UCGGUGCUUUU	65	mU*mG*mA*GCAAC CUCACUCUUGUCGU UUUAGAmGmCmUm AmGmAmAmAmUmA mGmCAAGUUAAA UAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmU mGmAmAmAmAmAm GmUmGmGmCmAmC mCmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmU*m U*mU*mU	97

**Таблица 4. Направляющая РНК мышиноного альбумина**

<b>ID направляющей</b>	<b>Направляющая последовательность</b>	<b>Геномные координаты мыши (mm10)</b>	<b>SEQ ID NO:</b>
G000551	AUUUGCAUCUGAGAACCCUU	chr5:90461148-90461168	98
G000552	AUCGGGAACUGGCAUCUUCA	chr5:90461590-90461610	99
G000553	GUUACAGGAAAAUCUGAAGG	chr5:90461569-90461589	100
G000554	GAUCGGGAACUGGCAUCUUC	chr5:90461589-90461609	101
G000555	UGCAUCUGAGAACCCUUAGG	chr5:90461151-90461171	102
G000666	CACUCUUGUCUGUGGAAACA	chr5:90461709-90461729	103
G000667	AUCGUUACAGGAAAAUCUGA	chr5:90461572-90461592	104
G000668	GCAUCUUCAGGGAGUAGCUU	chr5:90461601-90461621	105
G000669	CAAUCUUUAAAUAUGUUGUG	chr5:90461674-90461694	106
G000670	UCACUCUUGUCUGUGGAAAC	chr5:90461710-90461730	107
G011722	UGCUUGUAUUUUUCUAGUAA	chr5:90461039-90461059	108
G011723	GUAAAUAUCUACUAAGACAA	chr5:90461425-90461445	109
G011724	UUUUUCUAGUAAUGGAAGCC	chr5:90461047-90461067	110
G011725	UUAUAUUUAUGAUUAUUUU	chr5:90461174-90461194	111
G011726	GCACAGAUUAACACUUA	chr5:90461480-90461500	112
G011727	CACAGAUUAACACUUAAC	chr5:90461481-90461501	113
G011728	GGUUUUAAAAUAAUAUGU	chr5:90461502-90461522	114
G011729	UCAGAUUUUCCUGUAACGAU	chr5:90461572-90461592	115
G011730	CAGAUUUUCCUGUAACGAUC	chr5:90461573-90461593	116
G011731	CAAUGGUAAAUAAGAAUAA	chr5:90461408-90461428	117
G013018	GGAAAUCUGAAGGUGGCAA	chr5:90461563-90461583	118
G013019	GGCGAUCUCACUCUUGUCUG	chr5:90461717-90461737	119

**Таблица 5. направляющая онРНК мышиноного альбумина и профиль модификации**

<b>ID направляющей</b>	<b>Полная последовательность</b>	<b>SEQ ID NO:</b>	<b>Полная модифицированная последовательность</b>	<b>SEQ ID NO:</b>
G000551	AUUUGCAUCUGA GAACCCUUGUUUU AGAGCUAGAAU AGCAAGUUAAA	120	mA*mU*mU*UGCAUCU GAGAACCCUUGUUUU AGAmGmCmUmAmGm AmAmAmUmAmGmCA	142

	UAAGGCUAGUCCG UUAUCAACUUGA AAAAGUGGCACCG AGUCGGUGCUUU U		AGUUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAmAm CmUmUmGmAmAmAm AmAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmUmC mGmGmUmGmCmU*mU *mU*mU	
G000552	AUCGGGAACUGGC AUCUUCA GUUUUAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAAAUAA GGCUAGUC CGUUAUCAACUUG AAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUUUU	121	mA*mU*mC*GGGAACU GGCAUCUUCAGUUUU AGAmGmCmUmAmGm AmAmAmUmAmGmCA AGUUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAmAm CmUmUmGmAmAmAm AmAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmUmC mGmGmUmGmCmU*mU *mU*mU	143
G000553	GUUACAGGAAAA UCUGAAGG GUUUUAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAAAUAA GGCUAGUC CGUUAUCAACUUG AAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUUUU	122	mG*mU*mU*ACAGGAA AAUCUGAAGGGUUUU AGAmGmCmUmAmGm AmAmAmUmAmGmCA AGUUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAmAm CmUmUmGmAmAmAm AmAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmUmC mGmGmUmGmCmU*mU *mU*mU	144
G000554	GAUCGGGAACUG GCAUCUUC GUUUUAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAAAUAA GGCUAGUC	123	mG*mA*mU*CGGGAAC UGGCAUCUUCGUUUU AGAmGmCmUmAmGm AmAmAmUmAmGmCA AGUUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAmAm	145

	CGUUAUCAACUUG AAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUIUUU		CmUmUmGmAmAmAm AmAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmUmC mGmGmUmGmCmU*mU *mU*mU	
G000555	UGCAUCUGAGAAC CCUUAGG GUUUUAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAAAUAA GGCUAGUC CGUUAUCAACUUG AAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUIUUU	124	mU*mG*mC*AUCUGAG AACCCUUAGGGUUUU AGAmGmCmUmAmGm AmAmAmUmAmGmCA AGUUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAmAm CmUmUmGmAmAmAm AmAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmUmC mGmGmUmGmCmU*mU *mU*mU	146
G000666	CACUCUUGUCUGU GGAAACA GUUUUAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAAAUAA GGCUAGUC CGUUAUCAACUUG AAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUIUUU	125	mC*mA*mC*UCUUGUC UGUGGAAACAGUUUU AGAmGmCmUmAmGm AmAmAmUmAmGmCA AGUUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAmAm CmUmUmGmAmAmAm AmAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmUmC mGmGmUmGmCmU*mU *mU*mU	147
G000667	AUCGUUACAGGA AAAUCUGA GUUUUAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAAAUAA GGCUAGUC CGUUAUCAACUUG AAAAAGU	126	mA*mU*mC*GUUACAG GAAAUCUGAGUUUU AGAmGmCmUmAmGm AmAmAmUmAmGmCA AGUUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAmAm CmUmUmGmAmAmAm AmAmGmUmGmGmCm	148

	GGCACCGAGUCGG UGCUIUUU		AmCmCmGmAmGmUmC mGmGmUmGmCmU*mU *mU*mU	
G000668	GCAUCUUCAGGGA GUAGCUU GUUUUAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAAAUAA GGCUAGUC CGUUAUCAACUUG AAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUIUUU	127	mG*mC*mA*UCUUCAG GGAGUAGCUUGUUUU AGAmGmCmUmAmGm AmAmAmUmAmGmCA AGUUAAAAUAAAGGCU AGUCCGUUAUCAmAm CmUmUmGmAmAmAm AmAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmUmC mGmGmUmGmCmU*mU *mU*mU	149
G000669	CAAUCUUUAAAU AUGUUGUG GUUUUAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAAAUAA GGCUAGUC CGUUAUCAACUUG AAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUIUUU	128	mC*mA*mA*UCUUUAA AUAUGUUGUGGUUUU AGAmGmCmUmAmGm AmAmAmUmAmGmCA AGUUAAAAUAAAGGCU AGUCCGUUAUCAmAm CmUmUmGmAmAmAm AmAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmUmC mGmGmUmGmCmU*mU *mU*mU	150
G000670	UCACUCUUGUCUG UGGAAAC GUUUUAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAAAUAA GGCUAGUC CGUUAUCAACUUG AAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUIUUU	129	mU*mC*mA*CUCUUGU CUGUGGAAACGUUUU AGAmGmCmUmAmGm AmAmAmUmAmGmCA AGUUAAAAUAAAGGCU AGUCCGUUAUCAmAm CmUmUmGmAmAmAm AmAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmUmC mGmGmUmGmCmU*mU	151

			*mU*mU	
G011722	UGCUUGUAUUUU UCUAGUAA GUUUUAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAAAUAA GGCUAGUC CGUUAUCAACUUG AAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUUUU	130	mU*mG*mC*UUGUAUU UUUCUAGUAAGUUUU AGAmGmCmUmAmGm AmAmAmUmAmGmCA AGUUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAmAm CmUmUmGmAmAmAm AmAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmUmC mGmGmUmGmCmU*mU *mU*mU	152
G011723	GUAAAUAUCUAC UAAGACAA GUUUUAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAAAUAA GGCUAGUC CGUUAUCAACUUG AAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUUUU	131	mG*mU*mA*AAUAUCU ACUAAGACAAGUUUU AGAmGmCmUmAmGm AmAmAmUmAmGmCA AGUUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAmAm CmUmUmGmAmAmAm AmAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmUmC mGmGmUmGmCmU*mU *mU*mU	153
G011724	UUUUUCUAGUAA UGGAAGCC GUUUUAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAAAUAA GGCUAGUC CGUUAUCAACUUG AAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUUUU	132	mU*mU*mU*UUCUAGU AAUGGAAGCCGUUUU AGAmGmCmUmAmGm AmAmAmUmAmGmCA AGUUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAmAm CmUmUmGmAmAmAm AmAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmUmC mGmGmUmGmCmU*mU *mU*mU	154
G011725	UUAUAUUAUUGA	133	mU*mU*mA*UAUUAUU	155

	UAUUUUUU GUUUUAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAAAUAA GGCUAGUC CGUUAUCAACUUG AAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUUUU		GAUAUAUUUUGUUUU AGAmGmCmUmAmGm AmAmAmUmAmGmCA AGUUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAmAm CmUmUmGmAmAmAm AmAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmUmC mGmGmUmGmCmU*mU *mU*mU	
G011726	GCACAGAUUAA ACACUUA GUUUUAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAAAUAA GGCUAGUC CGUUAUCAACUUG AAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUUUU	134	mG*mC*mA*CAGAUAU AAACACUUAAGUUUU AGAmGmCmUmAmGm AmAmAmUmAmGmCA AGUUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAmAm CmUmUmGmAmAmAm AmAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmUmC mGmGmUmGmCmU*mU *mU*mU	156
G011727	CACAGAUUAAAC ACUUAAC GUUUUAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAAAUAA GGCUAGUC CGUUAUCAACUUG AAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUUUU	135	mC*mA*mC*AGAUUA AACACUUAACGUUUU AGAmGmCmUmAmGm AmAmAmUmAmGmCA AGUUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAmAm CmUmUmGmAmAmAm AmAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmUmC mGmGmUmGmCmU*mU *mU*mU	157
G011728	GGUUUUAAAAAU AAUAAUGU GUUUUAGAGCUA	136	mG*mG*mU*UUUAAAA AUAAUAAUGUGUUUU AGAmGmCmUmAmGm	158

	GAAAUAGC AAGUUAAAUA GGCUAGUC CGUUAUCAACUUG AAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUIUUU		AmAmAmUmAmGmCA AGUUAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAmAm CmUmUmGmAmAmAm AmAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmUmC mGmGmUmGmCmU*mU *mU*mU	
G011729	UCAGAUUUUCCUG UAACGAU GUUUUAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAAUA GGCUAGUC CGUUAUCAACUUG AAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUIUUU	137	mU*mC*mA*GAUUUUC CUGUAACGAUGUUUU AGAmGmCmUmAmGm AmAmAmUmAmGmCA AGUUAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAmAm CmUmUmGmAmAmAm AmAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmUmC mGmGmUmGmCmU*mU *mU*mU	159
G011730	CAGAUUUUCCUGU AACGAUC GUUUUAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAAUA GGCUAGUC CGUUAUCAACUUG AAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUIUUU	138	mC*mA*mG*AUUUUCC UGUAACGAUCGUUUU AGAmGmCmUmAmGm AmAmAmUmAmGmCA AGUUAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAmAm CmUmUmGmAmAmAm AmAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmUmC mGmGmUmGmCmU*mU *mU*mU	160
G011731	CAAUGGUAAAUA AGAAAUA GUUUUAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAAUA	139	mC*mA*mA*UGGUAAA UAAGAAAUAAGUUUU AGAmGmCmUmAmGm AmAmAmUmAmGmCA AGUUAAAUAAGGCU	161

	GGCUAGUC CGUUAUCAACUUG AAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUUUU		AGUCCGUUAUCAmAm CmUmUmGmAmAmAm AmAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmUmC mGmGmUmGmCmU*mU *mU*mU	
G013018	GGAAAUCUGAA GGUGGCAAGUUU UAGAGCUAGAAA UAGCAAGUAAAA AUAAGGCUAGUCC GUUAUCAACUUG AAAAAGUGGCACC GAGUCGGUGCUU UU	140	mG*mG*mA*AAAUCUG AAGGUGGCAAGUUUU AGAmGmCmUmAmGm AmAmAmUmAmGmCA AGUUA AAAUAAAGGCU AGUCCGUUAUCAmAm CmUmUmGmAmAmAm AmAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmUmC mGmGmUmGmCmU*mU *mU*mU	162
G013019	GGCGAUCUCACUC UUGUCUGGUUUU AGAGCUAGAAAU AGCAAGUAAAA UAAGGCUAGUCCG UUAUCAACUUGA AAAAGUGGCACCG AGUCGGUGCUUU U	141	mG*mG*mC*GAUCUCA CUCUUGUCUGGUUUU AGAmGmCmUmAmGm AmAmAmUmAmGmCA AGUUA AAAUAAAGGCU AGUCCGUUAUCAmAm CmUmUmGmAmAmAm AmAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmUmC mGmGmUmGmCmU*mU *mU*mU	163

**Таблица 6: Направляющая РНК альбумина яванского макака**

<b>ID направляющей</b>	<b>Направляющая последовательность</b>	<b>Геномные координаты яванского макака (mf5)</b>	<b>SEQ ID NO:</b>
G009844	GAGCAACCUCACUCUUGU CU	chr5:61198711-61198731	2*
G009845	AGCAACCUCACUCUUGUC UG	chr5:61198712-61198732	165

G009846	ACCUCACUCUUGUCUGGG GA	chr5:61198716-61198736	166
G009847	CCUCACUCUUGUCUGGGG AA	chr5:61198717-61198737	167
G009848	CUCACUCUUGUCUGGGGA AG	chr5:61198718-61198738	168
G009849	GGGGAAGGGGAGAAAAA AAA	chr5:61198731-61198751	169
G009850	GGGAAGGGGAGAAAAA AAA	chr5:61198732-61198752	170
G009851	AUGCAUUUGUUUCAAUAU AU	chr5:61198825-61198845	3*
G009852	UGCAUUUGUUUCAAUAU UU	chr5:61198826-61198846	4*
G009853	UGAUUCCUACAGAAAAAG UC	chr5:61198852-61198872	173
G009854	UACAGAAAAAGUCAGGAU AA	chr5:61198859-61198879	174
G009855	UUUCUUCUGCCUUUAAAC AG	chr5:61198889-61198909	175
G009856	UUAUAGUUUUUAUUAU AAC	chr5:61198957-61198977	176
G009857	AUUUAUGAGAUAACAGC AC	chr5:61199062-61199082	5*
G009858	GAUCAACAGCACAGGUUU UG	chr5:61199070-61199090	6*
G009859	UUAAAUAAAGCAUAGUGC AA	chr5:61199096-61199116	7*
G009860	UAAAGCAUAGUGCAAUGG AU	chr5:61199101-61199121	8*
G009861	UAGUGCAAUGGAUAGGUC UU	chr5:61199108-61199128	9*
G009862	AGUGCAAUGGAUAGGUCU UA	chr5:61199109-61199129	182

G009863	UUACUUUGCACUUUCCUU AG	chr5:61199186-61199206	183
G009864	UACUUUGCACUUUCCUUA GU	chr5:61199187-61199207	184
G009865	UCUGACCUUUUAUUUUAC CU	chr5:61199238-61199258	185
G009866	UACUAAAACUUUAUUUUA CU	chr5:61199367-61199387	10*
G009867	AAAGUUGAACAAUAGAA AAA	chr5:61199401-61199421	11*
G009868	AAUGCAUAAUCUAAGUCA AA	chr5:61198812-61198832	12*
G009869	AUUAUCCUGACUUUUUCU GU	chr5:61198860-61198880	189
G009870	UGAAUUAUCCUCUGUUU AA	chr5:61198901-61198921	190
G009871	UAAUUUUCUUUUGCCCAC UA	chr5:61199203-61199223	191
G009872	AAAAGGUCAGAAUUGUU UAG	chr5:61199229-61199249	192
G009873	AACAUCCUAGGUAAAAUA AA	chr5:61199246-61199266	193
G009874	UAAUAAAAUCAAACAUC CU	chr5:61199258-61199278	13
G009875	UUGUCAUGUAUUUCUAAA AU	chr5:61199322-61199342	195
G009876	UUUGUCAUGUAUUUCUAA AA	chr5:61199323-61199343	196

SEQ ID NO, отмеченные знаком «\*» выше, указывают на то, что указанная нРНК применима как к яванскому макаку, так и к человеку.

**Таблица 7: онРНК яванского макака и профиль модификаций**

ID направляющей	Полная последовательность	SEQ ID NO:	Полная модифицированная последовательность	SEQ ID NO:
G009844	GAGCAACCUCACU	34*	mG*mA*mG*CAACCUCACU	66*

	<p>CUUGUCU  GUUUUAGAGCUA  GAAAUAGC  AAGUUAAAAUAA  GGCUAGUC  CGUUAUCAACUU  GAAAAAGU  GGCACCGAGUCGG  UGCUUUU</p>		<p>CUUGUCUGUUUUAG  AmGmCmUmAmGmAmAmA  mUmAmGmCAAGUUA  AAAUAAGGCUAGUCCGUU  AUCAmAmCmUmUm  GmAmAmAmAmAmGmUmG  mGmCmAmCmCmGm  AmGmUmCmGmGmUmGmC  mU*mU*mU*mU</p>	
G009845	<p>AGCAACCUCACUC  UUGUCUG  GUUUUAGAGCUA  GAAAUAGC  AAGUUAAAAUAA  GGCUAGUC  CGUUAUCAACUU  GAAAAAGU  GGCACCGAGUCGG  UGCUUUU</p>	198	<p>mA*mG*mC*AACCUCACUC  UUGUCUGGUUUUAG  AmGmCmUmAmGmAmAmA  mUmAmGmCAAGUUA  AAAUAAGGCUAGUCCGUU  AUCAmAmCmUmUm  GmAmAmAmAmAmGmUmG  mGmCmAmCmCmGm  AmGmUmCmGmGmUmGmC  mU*mU*mU*mU</p>	231
G009846	<p>ACCUCACUCUUGU  CUGGGGA  GUUUUAGAGCUA  GAAAUAGC  AAGUUAAAAUAA  GGCUAGUC  CGUUAUCAACUU  GAAAAAGU  GGCACCGAGUCGG  UGCUUUU</p>	199	<p>mA*mC*mC*UCACUCUUGU  CUGGGGAGUUUU  AGAmGmCmUmAmGmAmA  mAmUmAmGmCAA  GUUAAAAUAAGGCUAGUC  CGUUAUCAmAmCm  UmUmGmAmAmAmAmAmG  mUmGmGmCmAmCm  CmGmAmGmUmCmGmGmU  mGmCmU*mU*mU*mU</p>	232
G009847	<p>CCUCACUCUUGUC  UGGGGAA  GUUUUAGAGCUA  GAAAUAGC  AAGUUAAAAUAA  GGCUAGUC</p>	200	<p>mC*mC*mU*CACUCUUGUC  UGGGGAAGUUUUA  GAmGmCmUmAmGmAmAm  AmUmAmGmCAAGU  UAAAAUAAGGCUAGUCCG  UUAUCAmAmCmUm</p>	233

	CGUUAUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUIUUU		UmGmAmAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmCm GmAmGmUmCmGmGmUmG mCmU*mU*mU*mU	
G009848	CUCACUCUUGUCU GGGGAAG GUUUUAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAAAUAA GGCUAGUC CGUUAUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUIUUU	201	mC*mU*mC*ACUCUUGUCU GGGGAAGGUUUU AGAmGmCmUmAmGmAmA mAmUmAmGmCAA GUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCm UmUmGmAmAmAmAmAmG mUmGmGmCmAmCm CmGmAmGmUmCmGmGmU mGmCmU*mU*mU*mU	234
G009849	GGGGAAGGGGAG AAAAAAA GUUUUAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAAAUAA GGCUAGUC CGUUAUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUIUUU	202	mG*mG*mG*GAAGGGGAG AAAAAAAAGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmA mUmAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUA UCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmG mCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*m U*mU*mU	235
G009850	GGGAAGGGGAGA AAAAAAA GUUUUAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAAAUAA GGCUAGUC CGUUAUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUIUUU	203	mG*mG*mG*AAGGGGAGA AAAAAAAAGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmA mUmAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUA UCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmG mCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*m U*mU*mU	236
G009851	AUGCAUUUGUUU	35*	mA*mU*mG*CAUUUGUUU	67*

	CAAAUAU GUUUUAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAAUA GGCUAGUC CGUUAUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUUUU		CAAAUAUGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmA mUmAmGmCAAGUUA AAUAAGGCUAGUCCGUUA UCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmG mCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*m U*mU*mU	
G009852	UGCAUUUGUUUC AAAUAU GUUUUAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAAUA GGCUAGUC CGUUAUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUUUU	36*	mU*mG*mC*AUUUGUUUC AAAUAUUGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmA mUmAmGmCAAGUUA AAUAAGGCUAGUCCGUUA UCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmG mCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*m U*mU*mU	68*
G009853	UGAUCCUACAG AAAAAGUC GUUUUAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAAUA GGCUAGUC CGUUAUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUUUU	206	mU*mG*mA*UCCUACAGA AAAAGUCGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmA mUmAmGmCAAGUUA AAUAAGGCUAGUCCGUUA UCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmG mCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*m U*mU*mU	239
G009854	UACAGAAAAGU CAGGAUAA GUUUUAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAAUA GGCUAGUC	207	mU*mA*mC*AGAAAAGU CAGGAUAAGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmA mUmAmGmCAAGUUA AAUAAGGCUAGUCCGUUA UCAmAmCmUmUmGm	240

	CGUUAUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUIUUU		AmAmAmAmAmGmUmGmG mCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*m U*mU*mU	
G009855	UUUCUUCUGCCUU UAAACAG GUUUUAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAAAUAA GGCUAGUC CGUUAUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUIUUU	208	mU*mU*mU*CUUCUGCCUU UAAACAGGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmA mUmAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUA UCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmG mCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*m U*mU*mU	241
G009856	UUAUAGUUUUUAU AUUCAAAC GUUUUAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAAAUAA GGCUAGUC CGUUAUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUIUUU	209	mU*mU*mA*UAGUUUUUAU AUUCAAACGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmA mUmAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUA UCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmG mCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*m U*mU*mU	242
G009857	AUUUAUGAGAUC AACAGCAC GUUUUAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAAAUAA GGCUAGUC CGUUAUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUIUUU	37*	mA*mU*mU*UAUGAGAUC AACAGCACGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmA mUmAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUA UCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmG mCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*m U*mU*mU	69*
G009858	GAUCAACAGCACA	38*	mG*mA*mU*CAACAGCACA	70*

	GGUUUUG GUUUUAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAAAUAA GGCUAGUC CGUUAUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUUUU		GGUUUUGGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmA mUmAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUA UCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmG mCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*m U*mU*mU	
G009859	UUAAAUAAGCA UAGUGCAA GUUUUAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAAAUAA GGCUAGUC CGUUAUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUUUU	39*	mU*mU*mA*AAUAAAGCA UAGUGCAAGUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmA mUmAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUA UCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmG mCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*m U*mU*mU	71*
G009860	UAAAGCAUAGUG CAAUGGAU GUUUUAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAAAUAA GGCUAGUC CGUUAUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUUUU	40*	mU*mA*mA*AGCAUAGUG CAAUGGAUGUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmA mUmAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUA UCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmG mCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*m U*mU*mU	72*
G009861	UAGUGCAAUGGA UAGGUCUU GUUUUAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAAAUAA GGCUAGUC	41*	mU*mA*mG*UGCAAUGGA UAGGUCUUGUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmA mUmAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUA UCAmAmCmUmUmGm	73*

	CGUUAUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUIUUU		AmAmAmAmAmGmUmGmG mCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*m U*mU*mU	
G009862	AGUGCAAUGGAU AGGUCUUA GUUUUAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAAAUAA GGCUAGUC CGUUAUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUIUUU	215	mA*mG*mU*GCAAUGGAU AGGUCUUAGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmA mUmAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUA UCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmG mCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*m U*mU*mU	248
G009863	UUACUUUGCACU UCCCUUAG GUUUUAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAAAUAA GGCUAGUC CGUUAUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUIUUU	216	mU*mU*mA*CUUUGCACUU UCCCUUAGGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmA mUmAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUA UCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmG mCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*m U*mU*mU	249
G009864	UACUUUGCACUU UCCCUUAGU GUUUUAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAAAUAA GGCUAGUC CGUUAUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUIUUU	217	mU*mA*mC*UUUGCACUUU CCCUUAGUGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmA mUmAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUA UCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmG mCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*m U*mU*mU	250
G009865	UCUGACCUUUUA	218	mU*mC*mU*GACCUUUUAU	251

	UUUUACCU GUUUUAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAAAUAA GGCUAGUC CGUUAUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUUUU		UUUACCUGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmA mUmAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUA UCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmG mCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*m U*mU*mU	
G009866	UACUAAAACUUU AUUUUACU GUUUUAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAAAUAA GGCUAGUC CGUUAUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUUUU	42*	mU*mA*mC*UAAAACUUU AUUUUACUGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmA mUmAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUA UCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmG mCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*m U*mU*mU	74*
G009867	AAAGUUGAACAA UAGAAAAA GUUUUAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAAAUAA GGCUAGUC CGUUAUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUUUU	43*	mA*mA*mA*GUUGAACAA UAGAAAAAGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmA mUmAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUA UCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmG mCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*m U*mU*mU	75*
G009868	AAUGCAUAAUCU AAGUCAA GUUUUAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAAAUAA GGCUAGUC	44*	mA*mA*mU*GCAUAAUCU AAGUCAAGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmA mUmAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUA UCAmAmCmUmUmGm	76*

	CGUUAUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUIUUU		AmAmAmAmAmGmUmGmG mCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*m U*mU*mU	
G009869	AUUAUCCUGACU UUUUCUGU GUUUUAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAAAUAA GGCUAGUC CGUUAUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUIUUU	222	mA*mU*mU*AUCCUGACUU UUUCUGUGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmA mUmAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUA UCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmG mCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*m U*mU*mU	255
G009870	UGAAUUAUUCU CUGUUUAA GUUUUAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAAAUAA GGCUAGUC CGUUAUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUIUUU	223	mU*mG*mA*AUUAUUCUC UGUUUAAGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmA mUmAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUA UCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmG mCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*m U*mU*mU	256
G009871	UAAUUUUCUUUU GCCCACUA GUUUUAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAAAUAA GGCUAGUC CGUUAUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUIUUU	224	mU*mA*mA*UUUUCUUUU GCCCACUAGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmA mUmAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUA UCAmAmCmUmUm GmAmAmAmAmAmGmUmG mGmCmAmCmCmGm AmGmUmCmGmGmUmGmC mU*mU*mU*mU	257
G009872	AAAAGGUCAGAA	225	mA*mA*mA*AGGUCAGAA	258

	<p>UUGUUUAG  GUUUUAGAGCUA  GAAAUAGC  AAGUUAAAAUAA  GGCUAGUC  CGUUAUCAACUU  GAAAAAGU  GGCACCGAGUCGG  UGCUUUU</p>		<p>UUGUUUAGGUUUUAG  AmGmCmUmAmGmAmAmA  mUmAmGmCAAGUUAA  AAUAAGGCUAGUCCGUUA  UCAmAmCmUmUmGm  AmAmAmAmAmGmUmGmG  mCmAmCmCmGmAmGm  UmCmGmGmUmGmCmU*m  U*mU*mU</p>	
G009873	<p>AACAUCCUAGGU  AAAAUAAA  GUUUUAGAGCUA  GAAAUAGC  AAGUUAAAAUAA  GGCUAGUC  CGUUAUCAACUU  GAAAAAGU  GGCACCGAGUCGG  UGCUUUU</p>	226	<p>mA*mA*mC*AUCCUAGGUA  AAAUAAGUUUUAG  AmGmCmUmAmGmAmAmA  mUmAmGmCAAGUUAA  AAUAAGGCUAGUCCGUUA  UCAmAmCmUmUmGm  AmAmAmAmAmGmUmGmG  mCmAmCmCmGmAmGm  UmCmGmGmUmGmCmU*m  U*mU*mU</p>	259
G009874	<p>UAAUAAAAUUCA  AACAUCCU  GUUUUAGAGCUA  GAAAUAGC  AAGUUAAAAUAA  GGCUAGUC  CGUUAUCAACUU  GAAAAAGU  GGCACCGAGUCGG  UGCUUUU</p>	45*	<p>mU*mA*mA*UAAAAUUCA  AACAUCCUGUUUUAG  AmGmCmUmAmGmAmAmA  mUmAmGmCAAGUUAA  AAUAAGGCUAGUCCGUUA  UCAmAmCmUmUmGm  AmAmAmAmAmGmUmGmG  mCmAmCmCmGmAmGm  UmCmGmGmUmGmCmU*m  U*mU*mU</p>	77*
G009875	<p>UUGUCAUGUAUU  UCUAAAAU  GUUUUAGAGCUA  GAAAUAGC  AAGUUAAAAUAA  GGCUAGUC</p>	228	<p>mU*mU*mG*UCAUGUAUU  UCUAAAAUGUUUUAG  AmGmCmUmAmGmAmAmA  mUmAmGmCAAGUUAA  AAUAAGGCUAGUCCGUUA  UCAmAmCmUmUmGm</p>	261

	CGUUAUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUUUU		AmAmAmAmAmGmUmGmG mCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*m U*mU*mU	
G009876	UUUGUCAUGUAU UUCUAAAA GUUUUAGAGCUA GAAAUAGC AAGUUAAAAUAA GGCUAGUC CGUUAUCAACUU GAAAAAGU GGCACCGAGUCGG UGCUUUU	229	mU*mU*mU*GUCAUGUAU UUCUAAAAGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmAmA mUmAmGmCAAGUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUA UCAmAmCmUmUmGm AmAmAmAmAmGmUmGmG mCmAmCmCmGmAmGm UmCmGmGmUmGmCmU*m U*mU*mU	262

SEQ ID NO, отмеченные знаком «\*» выше, указывают на то, что указанная онПНК применима как к яванскому макаку, так и к человеку.

**Таблица 8: онПНК SERPINA и модификации**

Направляющая	Целевой сайт	Немодифицированная	Модифицированная
G000409	ACUCACGAU GAAAUCCUG GA SEQ ID NO: 1129	ACUCACGAUGAAAUC CUGGAGUUUUAGAG CUAGAAAUAGCAAG UAAAAUAAGGCUA GUCCGUUAUCAACUU GAAAAAGUGGCACCG AGUCGGUGCUUUU (SEQ ID NO: 1132)	mA*mC*mU*CACGAUG AAAUCCUGGAGUUUUA GAmGmCmUmAmGmAm AmAmUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmAmG mUmGmGmCmAmCmCm GmAmGmUmCmGmGmU mGmCmU*mU*mU*mU (SEQ ID NO: 1133)
G000414	CAACCUCAC GGAGAUUCC GG (SEQ ID NO: 1130)	CAACCUCACGGAGAU UCCGGGUUUUAGAGC UAGAAAUAGCAAGU UAAAAUAAGGCUAG UCCGUUAUCAACUUG AAAAAGUGGCACCGA	mC*mA*mA*CCUCACGG AGAUUCCGGGUUUUAG AmGmCmUmAmGmAmA mAmUmAmGmCAAGUU AAAAUAAGGCUAGUCC GUUAUCAmAmCmUmU

		GUCGGUGCUUUU (SEQ ID NO: 1134)	mGmAmAmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmGmUm GmCmU*mU*mU*mU (SEQ ID NO: 1135)
G000415	UGUUGGACU GGUGUGCCA GC (SEQ ID NO: 1131)	UGUUGGACUGGUGU GCCAGCGUUUUAGAG CUAGAAAUAGCAAG UUAAAAUAAGGCUA GUCCGUUAUCAACUU GAAAAAGUGGCACCG AGUCGGUGCUUUU (SEQ ID NO: 1136)	mU*mG*mU*UGGACUG GUGUGCCAGCGUUUUA GAmGmCmUmAmGmAm AmAmUmAmGmCAAGU UAAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmAmG mUmGmGmCmAmCmCm GmAmGmUmCmGmGmU mGmCmU*mU*mU*mU (SEQ ID NO: 1137)

SEQ ID NO, отмеченные знаком «\*» выше, указывают на то, что указанная онРНК применима как к яванскому макаку, так и к человеку.

Направляющая РНК альбумина или SERPINA1 может дополнительно содержать trРНК. В каждом воплощении композиции и способа, описанных в настоящем документе, сгРНК и trРНК могут быть связаны как одиночная РНК (онРНК) или могут находиться на отдельных РНК (днРНК). В контексте онРНК компоненты сгРНК и trРНК могут быть ковалентно связаны, *например*, посредством фосфодиэфирной связи или другой ковалентной связи. В некоторых вариантах осуществления онРНК содержит одну или более связей между нуклеотидами, которые не являются фосфодиэфирными связями.

В каждом из вариантов осуществления композиции, применения и способа, описанных в настоящем документе, направляющая РНК может содержать две молекулы РНК в качестве «двойной направляющей РНК» или «днРНК». днРНК содержит первую молекулу РНК, содержащую сгРНК, содержащую, *например*, направляющую последовательность, показанную в Таблице 1 или Таблице 2, и вторую молекулу РНК, содержащую trРНК. Молекулы первой и второй РНК могут не быть ковалентно связаны, но могут образовывать дуплекс РНК за счет спаривания оснований между частями сгРНК и trРНК.

В каждом из вариантов композиции, применений и способа, описанных в настоящем документе, направляющая РНК (нРНК альбумина или нРНК SERPINA1) может содержать одну молекулу РНК в качестве «одиночной направляющей РНК» или «онРНК». онРНК может содержать сгРНК (или ее часть), содержащую направляющую

последовательность, показанную в Таблице 1 или Таблице 2, ковалентно связанную с trРНК. онРНК может содержать 15, 16, 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов направляющей последовательности, показанной в Таблице 1 или Таблице 2. В некоторых вариантах осуществления сгРНК и trРНК ковалентно связаны через линкер. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения онРНК образует стержне-петлевую структуру за счет спаривания оснований между частями сгРНК и trРНК. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения сгРНК и trРНК ковалентно связаны посредством одной или большего количества связей, которые не являются фосфодиэфирной связью. В некоторых вариантах осуществления направляющая РНК содержит онРНК, представленную в любой из SEQ ID NO: 34-67 или 120-163. В некоторых вариантах осуществления направляющая РНК содержит онРНК, содержащую любую из направляющих последовательностей SEQ ID NO: 2-33, 98-119, 165-170, 172, 174-176, 182-185, 189-193, 195-193, 195 или 196, и нуклеотиды SEQ ID NO: 901 или 902, при этом нуклеотиды SEQ ID NO: 901 или 902 находятся на 3'-конце направляющей последовательности, и при этом онРНК может быть модифицирована, как показано в Таблицах 9, 11 или 13 или SEQ ID NO: 300.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения trРНК может содержать всю или часть последовательности trРНК, полученной из природной системы CRISPR/Cas. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения trРНК содержит укороченную или модифицированную trРНК дикого типа. Длина trРНК зависит от применяемой системы CRISPR/Cas. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения trРНК содержит или состоит из 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 или более 100 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения trРНК может содержать определенные вторичные структуры, такие как, например, одну или большее количество структур шпильки или стержне-петлевой, или одну или большее количество структур выпуклости.

В некоторых вариантах осуществления композиция или состав, описанные в данном документе, содержат мРНК, содержащую открытую рамку считывания (ORF), кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, такой как нуклеаза Cas, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается, применяется или вводится мРНК, содержащая ORF, кодирующая РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, такой как Cas нуклеаза.

### С. Модифицированные нРНК и мРНК

В некоторых вариантах осуществления нРНК, описанная в настоящем документе (*например*, нРНК альбумина или SERPINA1), химически модифицирована. нРНК, содержащая один или более модифицированных нуклеозидов или нуклеотидов, называется «модифицированной» нРНК или «химически модифицированной» нРНК для описания присутствия одного или более неприродных или природных компонентов или конфигураций, которые используются вместо или в дополнение к каноническим остаткам А, G, C и U. В некоторых вариантах осуществления модифицированная нРНК

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

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

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

Немодифицированные нуклеиновые кислоты могут быть подвержены деградации,

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

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

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

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

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

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

Примеры модификаций 2'-гидроксильной группы могут включать алкокси или арилокси (OR, где «R» может представлять собой, *например*, алкил, циклоалкил, арил, аралкил, гетероарил или сахар); полиэтиленгликоли (PEG),  $O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OR$ , где R может представлять собой, *например*, H или необязательно замещенный алкил, а n может представлять собой целое число от 0 до 20 (*например*, от 0 до 4, от 0 до 8, от 0 до 10, от 0 до 16, от 1 до 4, от 1 до 8, от 1 до 10, от 1 до 16, от 1 до 20, от 2 до 4, от 2 до 8, от 2 до 10, от 2 до 16, от 2 до 20, от 4 до 8, от 4 до 10, от 4 до 16 и от 4 до 20). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модификация 2'-гидроксильной группы может представлять собой 2'-O-Me. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модификация 2'-гидроксильной группы может представлять собой модификацию 2'-фтора, которая заменяет 2'-гидроксильную группу фторидом. В некоторых вариантах осуществления модификация 2'-гидроксильной группы может включать «замкнутые» нуклеиновые кислоты (ЗНК), в которых 2'-гидроксил может быть соединен, *например*, с помощью C<sub>1-6</sub>-алкиленового или C<sub>1-6</sub>-гетероалкиленового мостика с 4'-углеродом того же сахара рибозы, где примерные мостики могут включать метиленовые, пропиленовые, эфирные или аминостики; O-амино (где амино может представлять собой, *например*, NH<sub>2</sub>; алкиламино, диалкиламино, гетероциклил, ариламино, диариламино, гетероариламино или дигетероариламино, этилендиамин или полиамино) и аминококси, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-амино, (где амино может представлять собой, *например*, NH<sub>2</sub>; алкиламино, диалкиламино, гетероциклил, ариламино, диариламино, гетероариламино или дигетероариламино, этилендиамин или полиамино). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модификация 2'-гидроксильной группы может включать «незаблокированные» нуклеиновые кислоты (UNA), в которых в кольце рибозы отсутствует связь C2'-C3'. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения модификация 2'-гидроксильной группы может включать метоксиэтильную группу (МОЕ), (OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, *например*, производное PEG).

Модификации «дезоксиды» 2' могут включать водород (*т.е.* дезоксирибозные сахара, *например*, в выступающих частях частично дсРНК); галоген (*например*, бром, хлор, фтор или йод); amino (при этом amino может представлять собой, *например*, NH<sub>2</sub>; алкиламино, диалкиламино, гетероциклил, ариламино, диариламино, гетероариламино, дигетероариламино или аминокислоту); NH(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH)<sub>n</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-амино (при этом amino может быть, *например*, таким, как описано в настоящем документе), -NHC(O)R (при этом R может быть, *например*, алкилом, циклоалкилом, арилом, аралкилом, гетероариллом или сахаром), циано; меркапто; алкилтиоалкил; тиоалкокси; и алкил, циклоалкил, арил, алкенил и алкинил, которые могут быть необязательно замещены, *например*, amino, как описано в настоящем документе.

Модификация сахара может включать сахарную группу, которая также может содержать один или более атомов углерода, обладающих стереохимической конфигурацией, противоположной конфигурации соответствующего углерода в рибозе. Таким образом, модифицированная нуклеиновая кислота может включать нуклеотиды, содержащие, *например*, арабинозу в качестве сахара. Модифицированные нуклеиновые кислоты могут также включать сахара с удаленным азотистым основанием. Эти сахара с удаленным азотистым основанием также могут быть дополнительно модифицированы по одному или большим количеством составляющим атомам сахара. Модифицированные нуклеиновые кислоты могут также включать один или большее количество сахаров в L форме, *например* L нуклеозиды.

Описанные в настоящем документе модифицированные нуклеозиды и модифицированные нуклеотиды, которые могут быть включены в модифицированную нуклеиновую кислоту, могут включать модифицированное основание, также называемое нуклеиновым основанием. Примеры нуклеиновых оснований включают, помимо прочего, аденин (A), гуанин (G), цитозин (C) и урацил (U). Эти нуклеиновые основания могут быть модифицированы или полностью заменены для получения модифицированных остатков, которые могут быть включены в модифицированные нуклеиновые кислоты. Нуклеиновое основание нуклеотида может быть независимо выбрано из пурина, пиримидина, аналога пурина или аналога пиримидина. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нуклеиновое основание может включать, например, встречающиеся в природе и синтетические производные основания.

В вариантах осуществления, в которых используется двойная направляющая РНК, каждая из сгРНК и trасгРНК может содержать модификации. Такие модификации могут быть на одном или обоих концах сгРНК или trасгРНК. В вариантах осуществления, включающих онРНК, один или более остатков на одном или обоих концах онРНК могут быть химически модифицированы, или внутренние нуклеозиды могут быть модифицированы, или вся онРНК может быть химически модифицирована. Некоторые варианты осуществления настоящего изобретения включают модификацию 5'-конца. Некоторые варианты осуществления настоящего изобретения включают модификацию 3'-конца.

В некоторых вариантах осуществления направляющие РНК, описанные в настоящем документе, содержат один из профилей модификации, описанных в WO2018/107028 A1, поданной 8 декабря 2017 г., с названием «Химически модифицированные направляющие РНК», содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме. В некоторых вариантах осуществления направляющие РНК, описанные в настоящем документе, содержат одну из структур/профилей модификаций, описанных в US 20170114334, содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме. В некоторых вариантах осуществления направляющие РНК, описанные в настоящем документе, содержат одну из структур/профиль модификаций, описанных в WO2017/136794, WO2017004279, US2018187186, US2019048338, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

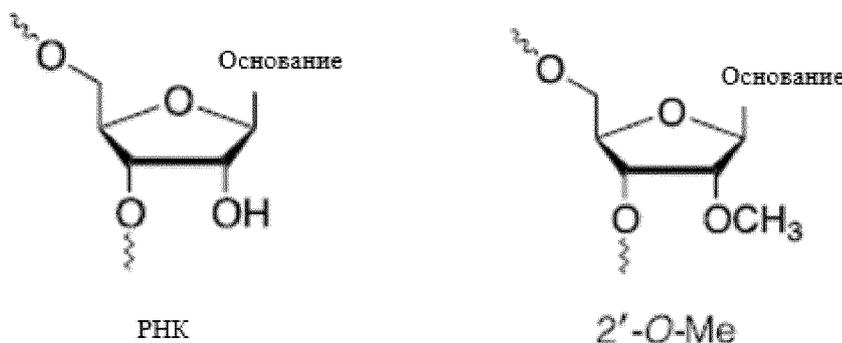
В некоторых вариантах осуществления модифицированная онРНК содержит следующую последовательность:

mN\*mN\*mN\*NNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU\*mU\*mU\*mU (SEQ ID NO: 300), где «N» может представлять собой любой природный или неприродный нуклеотид, и где совокупность N содержит направляющую последовательность интрона 1 альбумина, как описано в Таблице 1; и направляющие последовательности SERPINA1, как описано в Таблице 2. Например, в настоящий документ включена SEQ ID NO: 300, где N заменены любой из направляющих последовательностей, описанных в данном документе в Таблице 1 (SEQ ID NO: 2-33) или Таблице 2 (SEQ ID No: 1000-1131).

Любая из модификаций, описанных ниже, может присутствовать в описанных в данном документе нРНК и мРНК.

Термины «mA», «mC», «mU» или «mG» могут применяться для обозначения нуклеотида, модифицированного 2'-O-Me.

Модификацию 2'-O-метила можно изобразить следующим образом:

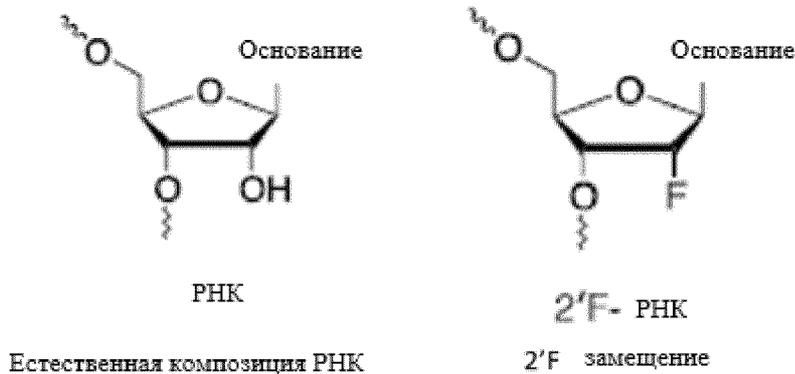


Другой химической модификацией, которая, как было показано, влияет на нуклеотидные сахарные кольца, является замена галогеном. Например, замена 2'-фтор (2'-F) в нуклеотидных сахарных кольцах может повысить аффинность связывания

олигонуклеотидов и стабильность нуклеаз.

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

Замещение 2'-F можно изобразить следующим образом:

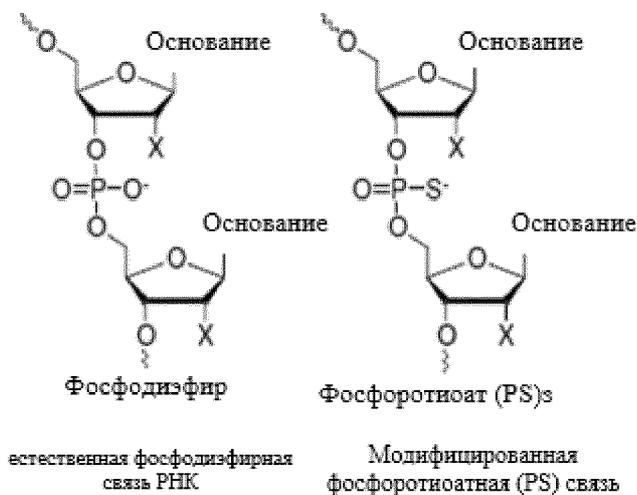


Фосфоротиоатная (PS) связь или соединение относится к связи, в которой сера заменяет один немостиновый атом кислорода фосфата в фосфодиэфирной связи, например, в связях между основаниями нуклеотидов. Когда фосфоротиоаты используются для получения олигонуклеотидов, модифицированные олигонуклеотиды также могут называться S-олигонуклеотидами.

Знак «\*» может применяться для обозначения PS модификации. В данной заявке термины A\*, C\*, U\* или G\* могут использоваться для обозначения нуклеотида, который связан со следующим (*например*, 3') нуклеотидом PS-связью.

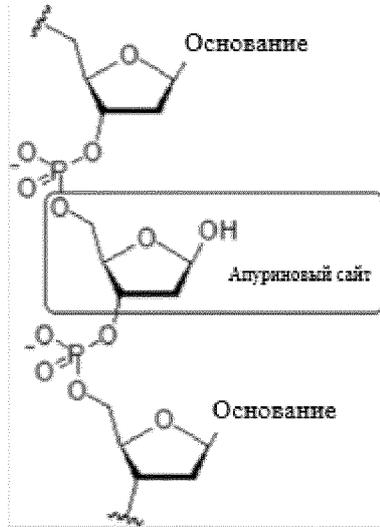
В данной заявке термины «mA\*», «mC\*», «mU\*» или «mG\*» могут применяться для обозначения нуклеотида, который был заменен на 2'-O-Me и который связан со следующим (*например*, 3') нуклеотидом PS-связью.

На диаграмме ниже показано замещение S- на немостиновый атом кислорода фосфата, в результате чего образуется PS-связь вместо фосфодиэфирной связи:

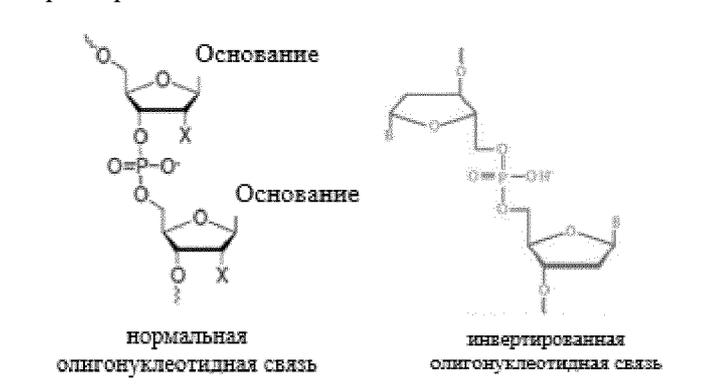


Нуклеотиды с удаленным азотистым основанием относятся к нуклеотидам, в

которых отсутствуют азотистые основания. На Фиг. ниже изображен олигонуклеотид с участком с удаленным азотистым основанием (также известным как апуриновый), в котором отсутствует основание:



Инвертированные основания относятся к основаниям со связями, которые инвертированы по сравнению с обычной связью 5'-3' (*т.е.* либо связью 5'-5', либо связью 3'-3'). Например:



Нуклеотид с удаленным азотистым основанием может быть присоединен инвертированной связью. Например, нуклеотид с удаленным азотистым основанием может быть присоединен к терминальному нуклеотиду на 5'-конце посредством связи 5'-5', или нуклеотид с удаленным азотистым основанием может быть присоединен к концевому 3'-нуклеотиду посредством связи 3'-3'. Инвертированный нуклеотид с удаленным азотистым основанием либо на концевом 5'-, либо на 3'-нуклеотиде также можно назвать инвертированным концевым кэпом с удаленным азотистым основанием.

В некоторых вариантах осуществления модифицируют один или более из первых трех, четырех или пяти нуклеотидов на 5'-конце и один или более из последних трех, четырех или пяти нуклеотидов на 3'-конце. В некоторых вариантах осуществления модификация представляет собой 2'-O-Me, 2'-F, инвертированный нуклеотид с удаленным азотистым основанием, PS-связь или другую модификацию нуклеотида, хорошо известную в данной области техники для повышения стабильности или

эффективности.

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

В некоторых вариантах осуществления первые три нуклеотида на 5'-конце и последние три нуклеотида на 3'-конце содержат 2'-О-метил (2'-O-Me) модифицированный нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления первые три нуклеотида на 5'-конце и последние три нуклеотида на 3'-конце содержат 2'-фтор (2'-F) модифицированный нуклеотид. В некоторых вариантах осуществления первые три нуклеотида на 5'-конце и последние три нуклеотида на 3'-конце содержат инвертированный нуклеотид с удаленным азотистым основанием.

В некоторых вариантах осуществления любая из направляющих РНК, описанных в настоящем документе, содержит модифицированную онРНК. В некоторых вариантах осуществления онРНК содержит профиль модификации, показанный в SEQ ID NO: 200, где N представляет собой любой природный или неприродный нуклеотид, и где совокупность N содержит направляющую последовательность (*например*, как показано в Таблице 1 или Таблице 2), которая направляет нуклеазу к целевой последовательности (*например*, в интроне 1 альбумина человека или *SERPINA1*).

Как отмечено выше, в некоторых вариантах осуществления композиция или состав, описанные в данном документе, содержат мРНК, содержащую открытую рамку считывания (ORF), кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, такой как нуклеаза Cas, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается, применяется или вводится мРНК, содержащая ORF, кодирующая РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, такой как Cas нуклеаза. Как описано ниже, мРНК, содержащая нуклеазу Cas, может содержать нуклеазу Cas9, такую как нуклеаза Cas9 *S. pyogenes*, обладающая расщепляющей, никазой или сайт-специфической ДНК-связывающей активностью. В некоторых вариантах осуществления ORF, кодирующая РНК-направляемую ДНК-связывающую нуклеазу, представляет собой «модифицированную ORF РНК-направляемого ДНК-связывающего агента» или просто «модифицированную ORF», которые используются для краткого обозначения того, что ORF модифицирована.

ORF Cas9, включая модифицированные ORF Cas9, представлены в настоящем документе и известны в данной области техники. В качестве одного из примеров, ORF Cas9 может быть кодон-оптимизированной, так что кодирующая последовательность включает один или более альтернативных кодонов для одной или более аминокислот. Термин «альтернативный кодон», используемый в настоящем документе, относится к вариантам частоты использования кодонов для данной аминокислоты и может быть или не быть предпочтительным или оптимизированным кодоном (кодон-оптимизированным) для данной системы экспрессии. Предпочтительная частота использования кодонов или кодоны, которые хорошо переносятся в данной системе экспрессии, известны в данной области техники. Последовательности, кодирующие Cas9, мРНК Cas9 и

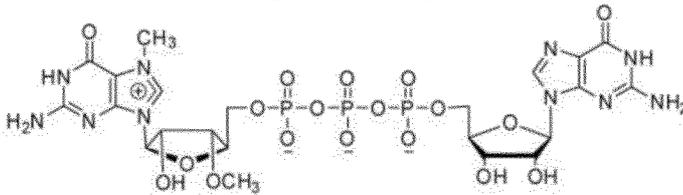
последовательности белка Cas9 из WO2013/176772, WO2014/065596, WO2016/106121 и WO2019/067910 включены в настоящий документ посредством ссылки. В частности, аминокислотные последовательности ORF и Cas9 из таблицы в абзаце [0449] WO2019/067910, а также мРНК Cas9 и ORF из абзацев [0214]-[0234] WO2019/067910 включены в настоящий документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления модифицированная ORF может содержать модифицированный уридин по меньшей мере в одном, множестве или всех положениях уридина. В некоторых вариантах осуществления модифицированный уридин представляет собой уридин, модифицированный в положении 5, *например*, галогеном, метилом или этилом. В некоторых вариантах осуществления модифицированный уридин представляет собой псевдоуридин, модифицированный в положении 1, *например*, галогеном, метилом или этилом. Модифицированный уридин может представлять собой, например, псевдоуридин, N1-метилпсевдоуридин, 5-метоксиуридин, 5-йодоуридин или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления модифицированный уридин представляет собой 5-метоксиуридин. В некоторых вариантах осуществления модифицированный уридин представляет собой 5-йодоуридин. В некоторых вариантах осуществления модифицированный уридин представляет собой псевдоуридин. В некоторых вариантах осуществления модифицированный уридин представляет собой N1-метилпсевдоуридин. В некоторых вариантах осуществления модифицированный уридин представляет собой комбинацию псевдоуридина и N1-метилпсевдоуридина. В некоторых вариантах осуществления модифицированный уридин представляет собой комбинацию псевдоуридина и 5-метоксиуридина. В некоторых вариантах осуществления модифицированный уридин представляет собой комбинацию N1-метилпсевдоуридина и 5-метоксиуридина. В некоторых вариантах осуществления модифицированный уридин представляет собой комбинацию 5-йодоуридина и N1-метилпсевдоуридина. В некоторых вариантах осуществления модифицированный уридин представляет собой комбинацию псевдоуридина и 5-йодоуридина. В некоторых вариантах осуществления модифицированный уридин представляет собой комбинацию 5-йодоуридина и 5-метоксиуридина.

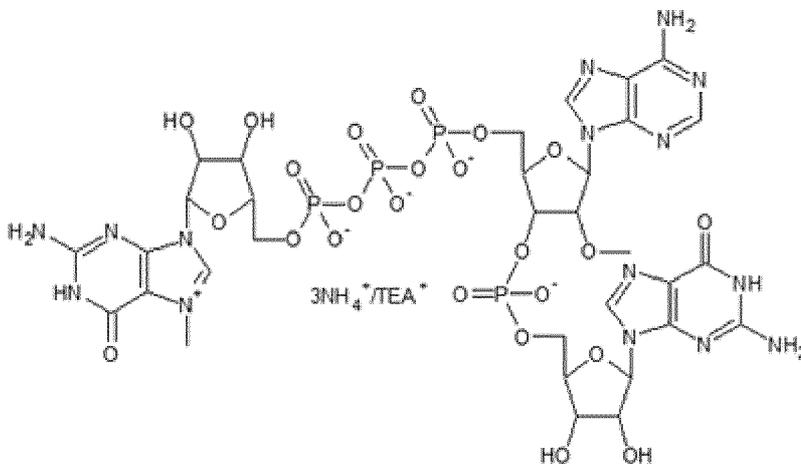
В некоторых вариантах осуществления мРНК, описанная в данном документе, содержит 5'-кэп, такой как кэп 0, кэп 1 или кэп 2. 5'-кэп, как правило, представляет собой 7-метилгуаниновый рибонуклеотид (который может быть дополнительно модифицирован, как обсуждается ниже, *например*, в отношении ARCA), связанный через 5'-трифосфат с положением 5' первого нуклеотида 5'-3' цепи мРНК, *т. е.* первого кэп-проксимального нуклеотида. В кэпе 0 рибозы первого и второго кэп-проксимальных нуклеотидов мРНК содержат 2'-гидроксил. В кэпе 1 рибозы первого и второго транскрибируемых нуклеотидов мРНК содержат 2'-метокси и 2'-гидроксил, соответственно. В кэпе 2 рибозы первого и второго кэп-проксимальных нуклеотидов мРНК содержат 2'-метокси. См., *например*, Katibah et al. (2014) *Proc Natl Acad Sci USA* 111(33):12025-30; Abbas et al. (2017) *Proc Natl Acad Sci USA* 114(11):E2106-E2115. Большинство эндогенных мРНК высших

эукариот, включая мРНК млекопитающих, таких как мРНК человека, содержат кэп 1 или кэп 2. Кэп 0 и другие кэп-структуры, отличающиеся от кэпа 1 и кэпа 2, могут быть иммуногенными для млекопитающих, таких как люди, из-за распознавания как «чужие» компонентами врожденной иммунной системы, такими как IFIT-1 и IFIT-5, что может привести к повышенным уровням цитокинов, включая интерферон I типа. Компоненты врожденной иммунной системы, такие как IFIT-1 и IFIT-5, могут также конкурировать с eIF4E за связывание мРНК с кэпом, отличным от кэпа 1 или кэпа 2, потенциально ингибируя трансляцию мРНК.

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



CleanCap™ AG (m7G(5')ppp(5')(2'OMeA)pG; TriLink Biotechnologies, кат. № N-7113) или CleanCap™ GG (m7G(5')ppp(5')(2'OMeG)pG; TriLink Biotechnologies Cat. No. N-7133) могут быть использованы для обеспечения структуры Cap1 ко-транскрипционно. 3'-О-метилованные версии CleanCap™ AG и CleanCap™ GG также доступны от TriLink Biotechnologies как № N-7413 и N-7433, соответственно. Структура CleanCap™ AG приведена ниже.



Альтернативно, кэп может быть добавлен к РНК после транскрипции. Например, коммерчески доступен кэпирующий фермент вируса осповакцины (New England Biolabs

кат. № M2080S) и имеет активности РНК-трифосфатазы и гуанилилтрансферазы, обеспечиваемые его субъединицей D1, и гуанинметилтрансферазы, обеспечиваемой его субъединицей D12. Поэтому он может добавлять 7-метилгуанин к РНК, так что образуется кэп 0, в присутствии S-аденозилметионина и GTP. См., *например*, Guo, P. and Moss, B. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 4023-4027; Mao, X. and Shuman, S. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 24472-24479.

В некоторых вариантах осуществления мРНК дополнительно содержит полиадениловый поли(А)хвост. В некоторых вариантах осуществления поли(А)хвост содержит по меньшей мере 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 аденинов, необязательно до 300 аденинов. В некоторых вариантах осуществления поли(А)хвост содержит 95, 96, 97, 98, 99 или 100 адениновых нуклеотидов.

#### D. Донорные конструкции

Композиции и способы, описанные в настоящем документе, включают использование конструкции нуклеиновой кислоты, которая содержит последовательность, кодирующую гетерологичный ген ААТ (*например*, функциональный ААТ или ААТ дикого типа), для вставки в сайт разреза, созданный направляющей РНК по данному изобретению, и РНК-направляемого ДНК-связывающего агента. В некоторых вариантах осуществления донорная конструкция представляет собой двунаправленную конструкцию нуклеиновой кислоты, представленную в настоящем документе. В настоящем документе такую конструкцию иногда называют «донорной конструкцией/матрицей». В некоторых вариантах осуществления конструкция представляет собой конструкцию ДНК. Способы конструирования и внесения различных функциональных/структурных модификаций в донорные конструкции известны в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления конструкция может содержать любую одну или более из последовательности хвоста полиаденилирования, сигнальной последовательности полиаденилирования, акцепторного сайта сплайсинга или селективного маркера. В некоторых вариантах осуществления последовательность хвоста полиаденилирования кодируется, *например*, как участок «поли-А» на 3'-конце кодирующей последовательности. Способы конструирования подходящей последовательности хвоста полиаденилирования или сигнальной последовательности полиаденилирования хорошо известны в данной области техники. Например, сигнальная последовательность полиаденилирования AAUAAA (SEQ ID NO: 800) обычно используется в системах млекопитающих, хотя были идентифицированы такие варианты, как UAUAAA (SEQ ID NO: 801) или AU/GUAAA (SEQ ID NO: 802). См., *например*, NJ Proudfoot, *Genes & Dev.* 25(17):1770-82, 2011.

В вариантах осуществления донорная конструкция представляет собой двунаправленную конструкцию нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления такие конструкции содержат: а) первый сегмент, содержащий первую последовательность, кодирующую полипептид альфа-1-антитрипсина (ААТ), причем частота использования кодонов в первой кодирующей полипептид ААТ

последовательности отличается от частоты использования кодонов в гене *SERPINA1*; и b) второй сегмент, содержащий обратный комплемент второй кодирующей полипептид ААТ последовательности, причем частота использования кодонов во второй кодирующей полипептид ААТ последовательности отличается от частоты использования кодонов в первой кодирующей полипептид ААТ последовательности, от частоты использования кодонов в гене *SERPINA1*. В некоторых вариантах осуществления кодирующие последовательности первого сегмента и второго сегмента истощены по CpG. В некоторых вариантах осуществления конструкция не содержит промотор, который управляет экспрессией либо первой кодирующей полипептид ААТ последовательности, либо второй кодирующей полипептид ААТ последовательности. В некоторых вариантах осуществления второй сегмент находится 3' от первого сегмента. В некоторых вариантах осуществления конструкция не содержит плеча гомологии.

В некоторых вариантах осуществления кодирующие полипептид ААТ последовательности двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты имеют частоту использования кодонов, которая предотвращает или снижает способность нацеленных на *SERPINA1* кРНК, дцРНК или направляющей РНК нацеливаться на него.

В некоторых вариантах осуществления как первая кодирующая полипептид ААТ последовательность двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты, так и вторая кодирующая полипептид ААТ последовательность двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты, включают использование кодона не дикого типа в пределах области (или одной или более областей) последовательности, соответствующей основаниям 409-431, 409-410, 412-431, 415-418, 506-528, 506-525, 519-522, 527-528, 538-560, 538-557, 551-554, 559-560, 957-977, 970-976, 1403-1436, 1403-1425, 1410-1436, 1418-1424, 1423-1435 или любой их комбинации SEQ ID NO:703.

В некоторых вариантах осуществления как первая кодирующая полипептид ААТ последовательность двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты, так и вторая кодирующая полипептид ААТ последовательность двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты, включают по меньшей мере одно, по меньшей мере 2 или по меньшей мере 3 несовпадения (*например*, 1-10 несовпадений, 1-9 несовпадений, 1-8 несовпадений, 1-7 несовпадений, 1-6 несовпадений, 1-5 несовпадений, 1-4 несовпадений, 1-3 несовпадений, 1-2 несовпадений, 1 несовпадение, 2-10 несовпадений, 2-9 несовпадений, 2-8 несовпадений, 2-7 несовпадений, 2-6 несовпадений, 2-5 несовпадений, 2-4 несовпадения, 1-3 несовпадения, 2 несовпадения, 3-10 несовпадений, 3-9 несовпадений, 3-8 несовпадений, 3-7 несовпадений, 3-6 несовпадений, 3-5 несовпадений, 3-4 несовпадений, 3 несовпадения, 4-10 несовпадений, 4-9 несовпадений, 4-8 несовпадений, 4-7 несовпадений, 4-6 несовпадений, 4-5 несовпадений, 4 несовпадения, 5-10 несовпадений, 5-9 несовпадений, 5-8 несовпадений, 5-7 несовпадений, 5-6 несовпадений, 5 несовпадений, 6-10 несовпадений, 6-9 несовпадений, 6-8 несовпадений, 6-7 несовпадений, 6 несовпадений, 7-10 несовпадений, 7-9 несовпадений, 7-8 несовпадений, 7 несовпадений, 8-10 несовпадений, 8-9 несовпадений или 8 несовпадений)

с последовательностью гена *SERPINA1* дикого типа в пределах области (или одной или более областей) кодирующей полипептид ААТ последовательности, соответствующей основаниям 409-431, 409-410, 412-431, 415-418, 506- 528, 506-525, 519-522, 527-528, 538-560, 538-557, 551-554, 559-560, 957-977, 970-976, 1403-1436, 1403-1425, 1410-1436, 1418-1424, 1423-1435 или любой их комбинации SEQ ID NO: 703.

В некоторых вариантах осуществления ни на первую кодирующую полипептид ААТ последовательность двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты, ни на вторую кодирующую полипептид ААТ последовательность двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты, не нацелен агент РНКи, нацеленный на нуклеотиды 957-977, 1403-1425 или 1410-1436 SEQ ID NO: 703.

В некоторых вариантах осуществления ни на первую кодирующую полипептид ААТ последовательность двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты, ни на вторую кодирующую полипептид ААТ последовательность двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты, не нацелена нацеленная на *SERPINA1* направляющая РНК, имеющая нацеливающую последовательность SEQ ID NO: 1129, 1130 или 1131.

В некоторых вариантах осуществления как первая кодирующая полипептид ААТ последовательность двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты, так и вторая кодирующая полипептид ААТ последовательность двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты, включают использование кодона не дикого типа в пределах области (или одной или более областей) последовательности, соответствующей основаниям 409-431, 409-410, 412-431, 415-418, 506-528, 506-525, 519-522, 527-528, 538-560, 538-557, 551-554, 559-560, 957-977, 970-976, 1403-1436, 1403-1425, 1410-1436, 1418-1424, 1423-1435 или любой их комбинации SEQ ID NO:703.

В некоторых вариантах осуществления первая кодирующая полипептид ААТ последовательность двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 711, 712, 721, 722, 731, 732, 741, 742, 751, 752, 761, 762, 771, 772, 781, 782, 791, 792, 796 и 797. В некоторых вариантах осуществления вторая кодирующая полипептид ААТ последовательность двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 711, 712, 721, 722, 731, 732, 741, 742, 751, 752, 761, 762, 771, 772, 781, 782, 791, 792, 796 и 797. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты выбрана из: SEQ ID NO: 711, 712, 721, 722, 731, 732, 741, 742, 751, 752, 761, 762, 771, 772, 781, 782, 791, 792, 796 и 797.

Длина конструкции может варьироваться в зависимости от размера встраиваемого гена и может составлять, например, от 200 пар оснований (п.о.) до около 5000 п.о., например, от около 200 п.о. до около 2000 п.о., например от около 500 п.о. до около 1500 п.о. В некоторых вариантах осуществления длина донорной матрицы ДНК составляет около 200 п.о., или около 500 п.о., или составляет около 800 п.о., или составляет около 1000 пар оснований, или составляет около 1500 пар оснований. В других вариантах

осуществления длина донорной матрицы составляет по меньшей мере 200 п.о., или по меньшей мере 500 п.о., или составляет по меньшей мере 800 п.о., или составляет по меньшей мере 1000 п.н., или составляет по меньшей мере 1500 п.о., или по меньшей мере 2000, или по меньшей мере 2500, или по меньшей мере 3000, или по меньшей мере 3500, или по меньшей мере 4000, или по меньшей мере 4500, или по меньшей мере 5000.

Конструкция может представлять собой ДНК или РНК, одноцепочечную, двухцепочечную или частично одно- и частично двухцепочечную и может быть введена в клетку-хозяина в линейной или кольцевой (*например*, миникольцевой) форме. См., *например*, публикации патентов США №№ 2010/0047805, 2011/0281361, 2011/0207221. При введении в линейной форме, концы донорной последовательности можно защитить (*например*, от экзонуклеолитического расщепления) способами, известными специалистам в данной области техники. Например, один или более дидезоксинуклеотидных остатков добавляют к 3'-концу линейной молекулы и/или самокомплементарные олигонуклеотиды лигируют с одним или обоими концами. 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. Конструкция может быть введена в клетку как часть векторной молекулы, имеющей дополнительные последовательности, такие как, например, точки начала репликации, промоторы и гены, кодирующие устойчивость к антибиотикам. В конструкции могут отсутствовать вирусные элементы. Кроме того, донорные конструкции могут быть введены в виде голой нуклеиновой кислоты, нуклеиновой кислоты в комплексе с таким агентом, как липосома или полксамер, или могут доставляться вирусами (*например*, аденовирусом, AAV, герпесвирусом, ретровирусом, лентивирусом).

В некоторых вариантах осуществления конструкция может быть вставлена таким образом, чтобы ее экспрессия управлялась эндогенным промотором в сайте вставки (*например*, эндогенным промотором альбумина, когда донор интегрирован в локус альбумина клетки-хозяина). В таких случаях у трансгена может отсутствовать регуляторные элементы (*например*, промотор или энхансер), которые управляют его экспрессией (*например*, беспромоторная конструкция). Тем не менее, будет очевидно, что в других случаях конструкция может содержать промотор или энхансер, например, конститутивный промотор или индуцибельный или тканеспецифичный (*например*, печеночно- или тромбоцитарно-специфичный) промотор, который управляет экспрессией функционального белка после интеграции. Конструкция может содержать последовательность, кодирующую гетерологичный белок ААТ, расположенный ниже сигнальной последовательности, кодирующей сигнальный пептид, и функционально связанную с ней. В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид представляет собой сигнальный пептид из белка, секретируемого гепатоцитами. В некоторых вариантах

осуществления сигнальный пептид представляет собой сигнальный пептид ААТ. В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид представляет собой сигнальный пептид альбумина. В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид представляет собой сигнальный пептид фактора IX. Конструкция может содержать последовательность, кодирующую гетерологичный белок ААТ, расположенный ниже сигнальной последовательности, кодирующей сигнальный пептид ААТ, и функционально связанную с ней, *например*, SEQ ID NO: 700. Конструкция может содержать последовательность, кодирующую гетерологичный белок ААТ, расположенный ниже сигнальной последовательности, кодирующей гетерологичный сигнальный пептид, и функционально связанную с ней. В различных вариантах осуществления способы включают последовательность, кодирующую гетерологичный белок ААТ, расположенный ниже сигнальной последовательности, кодирующей сигнальный пептид альбумина, и функционально связанную с ней. В некоторых вариантах осуществления конструкция нуклеиновой кислоты обеспечивает независимую от гомологии вставку нуклеиновой кислоты, которая кодирует белок ААТ. В некоторых вариантах осуществления конструкция нуклеиновой кислоты работает в неделящихся клетках, *например*, в клетках, в которых NHEJ, а не HR, является основным механизмом восстановления двухцепочечных разрывов ДНК. Нуклеиновая кислота может представлять собой независимую от гомологии донорную конструкцию.

В некоторых вариантах осуществления донорная конструкция содержит гетерологичный ген ААТ, который кодирует функциональный белок ААТ. В некоторых вариантах осуществления функциональный белок ААТ представляет собой последовательность белка ААТ человека дикого типа согласно SEQ ID NO: 700. В некоторых вариантах осуществления функциональный белок ААТ представляет собой последовательность белка ААТ человека дикого типа согласно SEQ ID NO: 702. Нуклеиновые кислоты, кодирующие ААТ, также приведены в качестве примеров и описаны в данном документе. В некоторых вариантах осуществления конструкция содержит гетерологичный ген ААТ, который кодирует функциональный вариант ААТ, *например*, вариант, который обладает повышенной ингибирующей протеазы активностью по сравнению с ААТ дикого типа. В некоторых вариантах осуществления конструкция содержит гетерологичный ген ААТ, который кодирует функциональный вариант, который на 80%, 85%, 90%, 93%, 95%, 97%, 99% идентичен SEQ ID NO: 700, обладающий функциональной активностью, которая составляет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 96%, 98%, 99%, 100% или более активности по сравнению с ААТ дикого типа. В некоторых вариантах осуществления конструкция содержит гетерологичный ген ААТ, который кодирует функциональный вариант, который на 80%, 85%, 90%, 93%, 95%, 97%, 99% идентичен SEQ ID NO: 702, обладающий функциональную активность, которая составляет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 96%, 98%, 99%, 100% или более активности по сравнению с ААТ дикого типа. В некоторых вариантах осуществления конструкция содержит гетерологичный ген ААТ, который кодирует фрагмент белка ААТ,

обладающий функциональной активностью, которая составляет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 96%, 98%, 99%, 100% или более активности по сравнению с ААТ дикого типа.

В данном документе также описаны двунаправленные конструкции нуклеиновой кислоты, которые обеспечивают усиленную вставку и экспрессию гетерологичного гена ААТ. Вкратце, различные двунаправленные конструкции, описанные в настоящем документе, содержат по меньшей мере два сегмента нуклеиновой кислоты, причем один сегмент (первый сегмент) содержит кодирующую последовательность, которая кодирует гетерологичный ААТ (иногда взаимозаменяемо называемую в данном документе «трансген»), в то время как другой сегмент (второй сегмент) содержит последовательность, в которой комплементарная последовательность кодирует гетерологичный ААТ. Двунаправленные конструкции могут содержать по меньшей мере два *цис*-сегмента нуклеиновой кислоты, при этом один сегмент (первый сегмент) содержит кодирующую последовательность, которая кодирует гетерологичный ААТ в одной ориентации, тогда как другой сегмент (второй сегмент) содержит последовательность, комплемент которой кодирует гетерологичный ААТ в другой ориентации. То есть первый сегмент является комплементарным второму сегменту, но не является идеально комплементарным; комплемент второго сегмента является обратно комплементарным первому сегменту, но не является идеально обратно комплементарным; и оба кодируют гетерологичный ААТ). Двунаправленная конструкция может содержать первую кодирующую последовательность, которая кодирует гетерологичный ААТ, связанную с акцептором сплайсинга, и вторую кодирующую последовательность, в которой комплемент кодирует гетерологичный ААТ в другой ориентации, также связанную с акцептором сплайсинга. При использовании в комбинации с системой редактирования генов (*например*, системой CRISPR/Cas; системой нуклеазы цинковых пальцев (ZFN); системой эффекторной нуклеазы, подобной активатору транскрипции (TALEN)), как описано в настоящем документе, двунаправленность конструкций нуклеиновой кислоты позволяет создавать инсерционную конструкцию в любом направлении (не ограничиваясь вставкой в одном направлении) в целевой сайт вставки, обеспечивая экспрессию гетерологичного ААТ либо из а) кодирующей последовательности одного сегмента, либо б) из комплемента другого сегмента, тем самым повышая эффективность вставки и экспрессии, как показано в настоящем документе. В практике настоящего изобретения можно использовать различные известные системы редактирования генов, включая, *например*, систему CRISPR/Cas; систему нуклеазы цинковых пальцев (ZFN); систему эффекторной нуклеазы, подобной активатору транскрипции (TALEN).

Описанные в данном документе двунаправленные конструкции могут быть модифицированы для включения любого подходящего структурного признака, необходимого для любого конкретного применения или придающего одну или более желаемых функций. В некоторых вариантах осуществления двунаправленная конструкция

нуклеиновой кислоты, описанная в настоящем документе, не содержит плеча гомологии. В некоторых вариантах осуществления двунаправленная конструкция нуклеиновой кислоты, описанная в настоящем документе, представляет собой независимую от гомологии донорную конструкцию. В некоторых вариантах осуществления, отчасти благодаря двунаправленной функции конструкции нуклеиновой кислоты, двунаправленную конструкцию можно вставить в геномный локус в любом направлении (ориентации), как описано в настоящем документе, чтобы обеспечить эффективную вставку или экспрессию интересующего полипептида (*например*, гетерологичный ААТ).

В некоторых вариантах осуществления двунаправленная конструкция нуклеиновой кислоты не содержит промотор, который управляет экспрессией гетерологичного гена ААТ. Например, экспрессия полипептида управляется промотором клетки-хозяина (*например*, эндогенным промотором альбумина, когда трансген интегрирован в локус альбумина клетки-хозяина). В некоторых вариантах осуществления двунаправленная конструкция нуклеиновой кислоты включает первый сегмент и второй сегмент, каждый из которых имеет акцептор сплайсинга перед трансгеном. В некоторых вариантах осуществления акцептор сплайсинга совместим с донорной последовательностью сплайсинга безопасного сайта клетки-хозяина, *например* донором сплайсинга интрона 1 гена альбумина человека.

В некоторых вариантах осуществления двунаправленная конструкция нуклеиновой кислоты содержит первый сегмент, содержащий кодирующую последовательность гетерологичного ААТ, и второй сегмент, содержащий обратный комплемент кодирующей последовательности гетерологичного ААТ. Таким образом, кодирующая последовательность в первом сегменте способна экспрессировать гетерологичный ААТ, тогда как комплемент обратного комплемента во втором сегменте также способен экспрессировать гетерологичный ААТ. В настоящем документе термин «кодирующая последовательность», относящийся ко второму сегменту, содержащему обратную комплементарную последовательность, относится к комплементарной (кодирующей) цепи второго сегмента (*т.е.* к комплементарной кодирующей последовательности обратного комплементарной последовательности во втором сегменте).

Кодирующая последовательность, которая кодирует гетерологичный ААТ в первом сегменте, менее чем на 100% комплементарна обратному комплементу кодирующей последовательности, которая также кодирует гетерологичный ААТ. То есть в некоторых вариантах осуществления первый сегмент содержит кодирующую последовательность (1) для гетерологичного ААТ, а второй сегмент представляет собой обратный комплемент кодирующей последовательности (2) для гетерологичного ААТ, причем кодирующая последовательность (1) не идентична кодирующей последовательности (2). Например, кодирующая последовательность (1) или кодирующая последовательность (2), которая кодирует гетерологичный ААТ, может быть оптимизирована по кодонам, так что кодирующая последовательность (1) и обратный комплемент кодирующей последовательности (2) обладают менее чем 100% комплементарностью. В некоторых

вариантах осуществления кодирующая последовательность второго сегмента кодирует гетерологичный ААТ с использованием одного или более альтернативных кодонов для одной или более аминокислот того же самого (*m.e.* одной и той же аминокислотной последовательности) гетерологичного ААТ, кодируемого кодирующей последовательностью в первом сегменте. Термин «альтернативный кодон», используемый в настоящем документе, относится к вариантам частоты использования кодонов для данной аминокислоты и может быть или не быть предпочтительным или оптимизированным кодоном (кодон-оптимизированным) для данной системы экспрессии. Предпочтительная частота использования кодонов или кодоны, которые хорошо переносятся в данной системе экспрессии, известны в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления второй сегмент содержит обратно комплементарную последовательность, в которой используется частота использования кодонов, отличная от частоты использования кодонов кодирующей последовательности первого сегмента, чтобы уменьшить образование шпилек. Такой обратный комплемент образует пары оснований с меньшим количеством нуклеотидов, чем все нуклеотиды кодирующей последовательности в первом сегменте, но при этом он необязательно кодирует тот же полипептид. В таких случаях кодирующая последовательность, *например*, полипептида А, первого сегмента может быть гомологичной, но не идентичной кодирующей последовательности, *например*, полипептида А, второй половины двунаправленной конструкции. В некоторых вариантах осуществления второй сегмент содержит обратно комплементарную последовательность, которая по существу не комплементарна (*например*, не более чем на 70%) кодирующей последовательности в первом сегменте. В некоторых вариантах осуществления второй сегмент содержит обратно комплементарную последовательность, которая в значительной степени комплементарна (*например*, по меньшей мере на 90%) кодирующей последовательности в первом сегменте. В некоторых вариантах осуществления второй сегмент содержит обратно комплементарную последовательность, на по меньшей мере около 30%, около 35%, около 40%, около 45%, около 50%, около 55%, около 60%, около 65%, около 70% около 75%, около 80%, около 85%, около 90%, около 95%, около 97% или около 99% комплементарную кодирующей последовательности в первом сегменте.

В некоторых вариантах осуществления первый сегмент и второй сегмент истощены по CpG.

Кодирующая последовательность, которая кодирует полипептид, может необязательно содержать одну или более дополнительных последовательностей, таких как последовательности, кодирующие amino- или карбокси-концевые аминокислотные последовательности, такие как сигнальная последовательность, последовательность метки или гетерологичная функциональная последовательность (*например*, последовательность ядерной локализации (NLS)), связанных с полипептидом. Кодирующая последовательность, которая кодирует полипептид, может необязательно содержать последовательности, кодирующие одну или более аминоконцевых последовательностей

сигнального пептида. Каждая из этих дополнительных последовательностей может быть одинаковой или различной в первом сегменте и втором сегменте конструкции.

Описанная в данном документе двунаправленная конструкция может быть использована для экспрессии ААТ, как описано в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления двунаправленная конструкция нуклеиновой кислоты является линейной. Например, первый и второй сегменты соединены линейным образом через линкерную последовательность. В некоторых вариантах осуществления 5'-конец второго сегмента, который содержит обратную комплементарную последовательность, связан с 3'-концом первого сегмента. В некоторых вариантах осуществления 5'-конец первого сегмента связан с 3'-концом второго сегмента, который содержит обратную комплементарную последовательность. В некоторых вариантах осуществления линкерная последовательность имеет длину около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150, 200, 250, 300, 500, 1000, 1500, 2000 или более. Специалистам в данной области техники будет понятно, что между первым и вторым сегментами могут быть вставлены другие структурные элементы в дополнение или вместо линкерной последовательности.

Описанные в данном документе конструкции могут быть модифицированы для включения любого подходящего структурного признака, необходимого для любого конкретного применения или придающего одну или более желаемых функций. В некоторых вариантах осуществления двунаправленная конструкция нуклеиновой кислоты, описанная в настоящем документе, не содержит плеча гомологии. В некоторых вариантах осуществления, отчасти благодаря двунаправленной функции конструкции нуклеиновой кислоты, двунаправленную конструкцию можно вставить в геномный локус в любом направлении, как описано в настоящем документе, чтобы обеспечить эффективную вставку или экспрессию интересующего полипептида.

В некоторых вариантах осуществления один или оба из первого и второго сегмента содержат хвостовую последовательность полиаденилирования или сигнальную последовательность или сайт полиаденилирования ниже открытой рамки считывания. В некоторых вариантах осуществления хвостовая последовательность полиаденилирования кодируется, *например*, как участок «поли-А» на 3'-конце первого или второго сегмента. В некоторых вариантах осуществления хвостовая последовательность полиаденилирования обеспечивается котранскрипционно в результате сигнальной последовательности или сайта полиаденилирования, который кодируется на или рядом с 3'-концом первого или второго сегмента. Способы конструирования подходящей хвостовой последовательности полиаденилирования или сигнальной последовательности полиаденилирования хорошо известны в данной области техники. Подходящие последовательности акцептора сплайсинга описаны и проиллюстрированы в данном документе, включая мышинный альбумин и акцепторные сайты сплайсинга FIX человека. В некоторых вариантах осуществления сигнальная последовательность полиаденилирования AAUAAA (SEQ ID NO: 800) обычно используется в системах млекопитающих, хотя были идентифицированы

такие варианты, как UAUAAA (SEQ ID NO: 801) или AU/GUAAA (SEQ ID NO: 802). См., *например*, NJ Proudfoot, Genes & Dev. 25(17):1770-82, 2011. В некоторых вариантах осуществления включена хвостовая последовательность полиА.

В некоторых вариантах осуществления конструкции, описанные в настоящем документе, могут представлять собой ДНК или РНК, одноцепочечные, двухцепочечные или частично одноцепочечные и частично двухцепочечные. Например, конструкции могут представлять собой одно- или двухцепочечную ДНК. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота может быть модифицирована (*например*, с использованием аналогов нуклеозидов), как описано в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления конструкции, описанные в настоящем документе, содержат акцепторный сайт сплайсинга на одном или обоих концах конструкции, *например*, 5'-конце открытой рамки считывания в первом или втором сегментах или 5'-конце одной или обеих последовательностей транскрипта. В некоторых вариантах осуществления акцепторный сайт сплайсинга содержит NAG. В дополнительных вариантах осуществления акцепторный сайт сплайсинга состоит из NAG. В некоторых вариантах осуществления акцептор сплайсинга представляет собой акцептор сплайсинга альбумина, *например*, акцептор сплайсинга альбумина, используемый при сплайсинге экзонов 1 и 2 альбумина. В некоторых вариантах осуществления акцептор сплайсинга получен из гена альбумина человека. В некоторых вариантах осуществления акцептор сплайсинга получен из гена альбумина мыши. В некоторых вариантах осуществления акцептор сплайсинга представляет собой акцептор сплайсинга мышечного альбумина, *например*, акцептор сплайсинга мышечного альбумина, используемый при сплайсинге экзонов 1 и 2 альбумина. В некоторых вариантах осуществления акцептор сплайсинга получен из гена альбумина человека. Дополнительные подходящие акцепторные сайты сплайсинга, пригодные для эукариот, включая искусственные акцепторы сплайсинга, известны и могут быть получены из уровня техники. См., *например*, Shapiro, et al., 1987, Nucleic Acids Res., 15, 7155-7174, Burset, et al., 2001, Nucleic Acids Res., 29, 255-259.

В некоторых вариантах осуществления конструкции, описанные в настоящем документе, могут быть модифицированы на одном или обоих концах для включения одного или более подходящих структурных признаков, если это необходимо, или для придания одного или более функциональных преимуществ. Например, структурные модификации могут варьироваться в зависимости от способа(ов), используемого для доставки описанных в данном документе конструкций в клетку-хозяина - *например*, использование доставки с помощью вирусного вектора или упаковки в липидные наночастицы для доставки. Такие модификации включают, помимо прочего, *например*, концевые структуры, такие как инвертированные концевые повторы (ITR), шпильки, петли и другие структуры, такие как тороид. В некоторых вариантах осуществления конструкции, описанные в настоящем документе, содержат один, два или три ITR. В некоторых вариантах осуществления конструкции, описанные в настоящем документе,

содержат не более двух ITR. В данной области техники известны различные способы структурных модификаций.

В некоторых вариантах осуществления один или оба конца конструкции можно защитить (*например*, от экзонуклеолитической деградации) способами, известными в данной области техники. Например, к 3'-концу линейной молекулы добавляют один или более дидезоксинуклеотидных остатков или к одному или обоим концам лигируют самокомплементарные олигонуклеотиды. 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 конструкций от деградации включают в себя, но не ограничиваются этим, добавление концевых аминогрупп и применение модифицированных межнуклеотидных связей, таких как, например, тиофосфаты, фосфорамидаты и остатки O-метилрибозы или дезоксирибозы.

В некоторых вариантах осуществления конструкции, описанные в настоящем документе, могут быть введены в клетку как часть векторной, имеющей дополнительные последовательности, такие как, например, точки начала репликации, промоторы и гены, кодирующие устойчивость к антибиотикам. В некоторых вариантах осуществления конструкции могут быть введены в виде голый нуклеиновой кислоты, в виде комплекса нуклеиновой кислоты с таким агентом, как липосома, полимер или поллоксамер, или могут быть доставлены с помощью вирусных векторов (*например*, аденовируса, AAV, герпесвируса, ретровируса, лентивируса).

В некоторых вариантах осуществления, хотя и не требуется для экспрессии, конструкции, описанные в настоящем документе, могут также включать регуляторные последовательности транскрипции или трансляции, например, промоторы, энхансеры, инсуляторы, внутренние сайты посадки рибосомы, последовательности, кодирующие пептиды, или сигналы полиаденилирования.

В некоторых вариантах осуществления конструкции, содержащие кодирующую последовательность интересующего полипептида, могут включать одну или более из следующих модификаций: оптимизацию кодонов (*например*, кодонов человека) или добавление одного или более сайтов гликозилирования. См., *например*, McIntosh et al. (2013) *Blood* (17):3335-44.

В некоторых вариантах осуществления конструкции, содержащие альтернативные кодирующие последовательности, могут быть разработаны так, чтобы они были устойчивы к снижению экспрессии терапевтическими агентами нуклеиновых кислот. В данном документе предложены терапевтические агенты нуклеиновых кислот, нацеленные на ген SERPINA1. Эффективные нРНК включают G000409, G000414 и G000415, нацеленные на нуклеотиды 506-525, 538-557 и 412-431, соответственно. Агенты РНКи, нацеленные на SERPINA1, известны в данной области техники, см., например, WO2018098117, WO2015003113 и WO2015195628, направленные на агенты иРНК, нацеленные на SERPINA1. Эффективные агенты РНКи, представленные в этих заявках, нацелены на нуклеотиды 1403-1425, 1410-1436 и 957-997 номера доступа GenBank №

NM\_001127700.2 (в версии, доступной на дату подачи настоящей заявки). В настоящем документе предложены способы тестирования устойчивости кодирующих последовательностей и конструкций экспрессии к терапевтическим агентам нуклеиновых кислот. Кроме того, в данной области техники известны способы нацеливания терапевтических препаратов нуклеиновых кислот на их целевые сайты и, следовательно, способы нарушения нацеливания терапевтических препаратов нуклеиновых кислот на конкретные целевые сайты. Нарушение нацеливания направляющих РНК может включать возникновение несовпадений между нацеливающей последовательностью и в РАМ в направляющей и комплементарной последовательностью в конструкции экспрессии. Коровая последовательность, расположенная в положениях от +4 до +7 выше РАМ, особенно чувствительна к несовпадению с Cas9 *S. pyogenes* (см., например, Zheng et al., *Sci Rep*, 2017). Нарушение нацеливания агентов РНКи может включать обеспечение несовпадений между антисмысловой цепью и комплементарной последовательностью в конструкции экспрессии. Затравочная область агента РНКи, т.е. гексамерная или гептамерная затравка в положениях 2-7 или 2-8 антисмысловой цепи кРНК, особенно чувствительна к несовпадениям (см., например, Birmingham et al., *Nature Methods*, 2006). Поскольку стандарт лечения ААТД основан на добавлении белка ААТ путем инфузии ААТ из сыворотки, экспрессия ААТ из двунаправленной конструкции может быть достаточной для лечения заболевания. Однако, поскольку патология печени, по меньшей мере, частично обусловлена накоплением неправильно свернутых белков, при развитии повреждения печени можно использовать терапевтический агент нуклеиновой кислоты для снижения экспрессии эндогенного гена *SERPINA1* без снижения или существенного снижения (например, снижения не более чем на 5%, снижения не более чем на 10%) экспрессии гетерологичного ААТ из двунаправленной конструкции для экспрессии гетерологичного ААТ, где обе гетерологичные кодирующие последовательности устойчивы, т.е. не являются мишенью для терапевтических нуклеиновых кислот. Двунаправленные конструкции, описанные в настоящем документе, разработаны с учетом устойчивости к типовым терапевтическим агентам нуклеиновых кислот, известным в данной области техники и продемонстрировавшим устойчивую активность. Однако на момент подачи настоящей заявки ни один из агентов не получил одобрения регулирующего органа для использования в лечении человека. Также возможно, что будут разработаны другие терапевтические средства нуклеиновых кислот, нацеленные на *SERPINA1*. При наличии стратегий и способов, представленных в настоящем документе, специалист в данной области техники может разработать дополнительные двунаправленные конструкции, устойчивые к недавно разработанным терапевтическим средствам нуклеиновых кислот, нацеленным на *SERPINA1*.

Таким образом, в настоящем документе предложено применение нуклеиновой кислоты, нацеленной на эндогенный ген *SERPINA1*, в способе лечения ААТД у субъекта с одним или более симптомами повреждения печени, связанного с ААТД, при этом субъекта ранее лечили двунаправленной конструкцией, кодирующей гетерологичный

ААТ, где обе кодирующие последовательности в двунаправленной конструкции включают частоту использования кодонов не дикого типа, причем на кодирующие последовательности в двунаправленной конструкции не нацелен терапевтический агент нуклеиновой кислоты, нацеленный на эндогенный ген SERPINA1, так что терапевтический агент нуклеиновой кислоты снижает экспрессию эндогенного гена SERPINA1 без снижения или существенного снижения (например, снижение не более чем на 5%, снижение не более чем на 10%) экспрессии гетерологичного ААТ из двунаправленной конструкции.

#### Е. Система редактирования генов

Для направленной вставки двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты, описанной в настоящем документе, можно использовать различные известные системы редактирования генов, включая, *например*, систему CRISPR/Cas; система нуклеазы цинковых пальцев (ZFN); и систему эффекторной нуклеазы, подобной активатору транскрипции (TALEN). Как правило, системы редактирования генов включают применение сконструированных систем расщепления для индуцирования двухцепочечного разрыва (DSB) или ника (*например*, одноцепочечного разрыва или SSB) в целевой последовательности ДНК. Расщепление или никование может осуществляться с помощью специфических нуклеаз, таких как сконструированные ZFN, TALEN, или с помощью системы CRISPR/Cas со сконструированной направляющей РНК для управления специфическим расщеплением или никованием целевой последовательности ДНК. Кроме того, были разработаны целевые нуклеазы и разрабатываются дополнительные нуклеазы, например, на основе системы Argonaute (*например*, из *T. thermophilus*, известной как «TtAgo», см. Swarts et al (2014) *Nature* 507(7491): 258-261), которые также могут иметь потенциал для использования в редактировании генома и генной терапии.

Следует понимать, что для способов, в которых используются направляющие РНК для нуклеазы Cas, такой как нуклеаза Cas9, описанная в настоящем документе, способы включают использование системы CRISPR/Cas (и любой донорной конструкции, описанной в настоящем документе, которая содержит последовательность, кодирующую гетерологичный ААТ). Также следует понимать, что настоящее изобретение рассматривает способы направленной вставки и экспрессии гетерологичного ААТ с использованием описанный в данном документе двунаправленных конструкций, которые можно осуществлять с помощью описанных в данном документе направляющих РНК альбумина или без них (*например*, с использованием системы ZFN для того, чтобы вызвать разрыв целевой последовательности ДНК, создавая сайт для вставки двунаправленной конструкции).

В некоторых вариантах осуществления систему CRISPR/Cas (*например*, направляющую РНК и РНК-направляемый ДНК-связывающий агент) можно использовать для создания сайта для вставки в желаемом локусе в геноме хозяина, в этот сайт можно вставить донорную конструкцию (*например*, двунаправленную конструкцию),

содержащую последовательность, кодирующую гетерологичный ААТ, описанный в настоящем документе, для экспрессии гетерологичного ААТ. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный трансген ААТ может быть гетерологичным в отношении сайта его вставки, например, вставленного в безопасный локус, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления направляющая РНК, описанная в настоящем документе (SEQ ID NO: 2-33), которая нацелена на локус альбумина человека (*например*, интрон 1), может быть использована в соответствии с настоящими способами с РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом (*например*, Cas нуклеаза) для создания сайта вставки, в который может быть вставлена донорная конструкция (*например*, двунаправленная конструкция), содержащая последовательность, кодирующую гетерологичный ААТ, для экспрессии гетерологичного ААТ. В данном документе представлены примеры и описания направляющих РНК, содержащих направляющие последовательности для целенаправленной вставки гетерологичного гена ААТ в интрон 1 локуса альбумина человека (см., *например*, Таблицу 1).

Способы использования различных РНК-направляемых ДНК-связывающих агентов, *например*, нуклеазы, такой как нуклеаза Cas, *например*, Cas9, также хорошо известны в данной области техники. Следует понимать, что, в зависимости от контекста, РНК-направляемый ДНК-связывающий агент может быть представлен в виде нуклеиновой кислоты (*например*, ДНК или мРНК) или в виде белка. В некоторых вариантах осуществления настоящий способ можно применять на практике в клетке-хозяине, которая уже экспрессирует РНК-направляемый ДНК-связывающий агент.

В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, такой как нуклеаза Cas9, обладает клевазной активностью, которая также может упоминаться как двухцепочечная эндонуклеазная активность. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, такой как нуклеаза Cas9, обладает никазной активностью, которая также может упоминаться как активность одноцепочечной эндонуклеазы. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит нуклеазу Cas. Примеры нуклеаз Cas9 включают в себя системы CRISPR типа II *S. pyogenes*, *S. aureus* и других прокариот (см., *например*, перечень в следующем абзаце) и их мутантные (*например*, сконструированные или другие варианты) версии. См., *например*, US2016/0312198 A1; US 2016/0312199 A1.

Неограничивающие иллюстративные виды, из которых может быть получена нуклеаза Cas, включают *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*, *Lactobacillus gasseri*, *Francisella novicida*, *Wolinella succinogenes*, *Sutterella wadsworthensis*, *Gammaproteobacterium*, *Neisseria meningitidis*, *Campylobacter jejuni*, *Pasteurella multocida*, *Fibrobacter succinogene*, *Rhodospirillum rubrum*, *Nocardiopsis dassonvillei*, *Streptomyces pristinaespiralis*, *Streptomyces viridochromogenes*, *Streptomyces viridochromogenes*, *Streptosporangium roseum*, *Streptosporangium roseum*, *Alicyclobacillus acidocaldarius*, *Bacillus pseudomycooides*, *Bacillus*

*selenitireducens*, *Exiguobacterium sibiricum*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus buchneri*, *Treponema denticola*, *Microscilla marina*, *Burkholderiales bacterium*, *Polaromonas naphthalenivorans*, *Polaromonas sp.*, *Crocospaera watsonii*, *Cyanothece sp.*, *Microcystis aeruginosa*, *Synechococcus sp.*, *Acetohalobium arabaticum*, *Ammonifex degensii*, *Caldicelulosiruptor becscii*, *Candidatus Desulfurudis*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile*, *Fingoldia magna*, *Natranaerobius thermophilus*, *Pelotomaculum thermopropionicum*, *Acidithiobacillus caldus*, *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Allochromatium vinosum*, *Marinobacter sp.*, *Nitrosococcus halophilus*, *Nitrosococcus watsoni*, *Pseudoalteromonas haloplanktis*, *Ktedonobacter racemifer*, *Methanohalobium evestigatum*, *Anabaena variabilis*, *Nodularia spumigena*, *Nostoc sp.*, *Arthrospira maxima*, *Arthrospira platensis*, *Arthrospira sp.*, *Lyngbya sp.*, *Microcoleus chthonoplastes*, *Oscillatoria sp.*, *Petrotoga mobilis*, *Thermosiphon africanus*, *Streptococcus pasteurianus*, *Neisseria cinerea*, *Campylobacter lari*, *Parvibaculum lavamentivorans*, *Corynebacterium diphtheria*, *Acidaminococcus sp.*, *Lachnospiraceae sp. ND2006*, и *Acaryochloris marina*.

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

В некоторых вариантах осуществления нРНК вместе с РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом называется рибонуклеопротеиновым комплексом (РНП). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент представляет собой нуклеазу Cas. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нРНК вместе с Cas нуклеазой называется РНП Cas. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНП содержит компоненты типа I, типа II или типа III. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Cas нуклеаза представляет собой Cas9 белок из системы

CRISPR/Cas типа II. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нРНК вместе с Cas9 называется РНК Cas9.

Cas9 дикого типа имеет два нуклеазных домена: RuvC и HNH. Домен RuvC расщепляет нецелевую цепь ДНК, а домен HNH расщепляет целевую цепь ДНК. В некоторых вариантах осуществления белок Cas9 содержит более одного домена RuvC или более одного домена HNH. В некоторых вариантах осуществления белок Cas9 представляет собой Cas9 дикого типа. В каждом из вариантов композиции, применения и способа Cas индуцирует двухцепочечный разрыв направляющей ДНК.

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

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

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения РНК-направляемый ДНК-связывающий агент обладает одноцепочечной никазной активностью, *то есть* может разрезать одну цепь ДНК с образованием одноцепочечного разрыва, также известного как «ник». В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент содержит никазу Cas. Никаза представляет собой фермент, который создает разрез в dsДНК, *т.е.* разрезает одну цепь, но не разрезает другую цепь двойной спирали ДНК. В некоторых вариантах осуществления никаза Cas представляет собой вариант нуклеазы Cas (*например*, нуклеазы Cas рассмотренной выше), в которой активный сайт эндонуклеолиза инактивирован, *например*, путем одного или более изменений (*например*, точечных мутаций) в каталитическом домене. См., *например*, патент США № 8,889,356 для получения информации о Cas никазах и типовых изменениях каталитических доменов. В некоторых вариантах осуществления никаза Cas, такая как никаза Cas9, имеет инактивированный домен RuvC или HNH.

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

пониженной активностью. В некоторых вариантах осуществления применяют никазу, имеющую неактивный домен RuvC. В некоторых вариантах осуществления применяют никазу, имеющую домен HNH с пониженной активностью. В некоторых вариантах осуществления применяют никазу, имеющую неактивный домен HNH.

В некоторых вариантах осуществления консервативную аминокислоту в домене белка нуклеазы Cas замещают для снижения или изменения нуклеазной активности. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза Cas может содержать аминокислотную замену в RuvC или RuvC-подобном нуклеазном домене. Типовые аминокислотные замены в RuvC или RuvC-подобном нуклеазном домене включают D10A (на основе белка Cas9 *S. pyogenes*). См., например, Zetsche et al. (2015) *Cell* 22 октября: 163 (3): 759-771. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза Cas может содержать аминокислотную замену в HNH или HNH-подобном нуклеазном домене. Типовые аминокислотные замены в HNH или HNH-подобном нуклеазном домене включают E762A, H840A, N863A, H983A и D986A (на основе белка Cas9 *S. pyogenes*). См., например, Zetsche et al. (2015). Другие типовые аминокислотные замены включают D917A, E1006A и D1255A (на основе последовательности Cpf1 *Francisella novicida* U112 (FnCpf1) (UniProtKB - A0Q7Q2 (CPF1\_FRATN))).

В некоторых вариантах осуществления никаза представлена в комбинации с парой направляющих РНК, которые комплементарны смысловой и антисмысловой цепям целевой последовательности, соответственно. В данном варианте осуществления настоящего изобретения направляющие РНК направляют никазу на целевую последовательность и вводят DSB путем образования ника на противоположных цепях целевой последовательности (*m.e.*, двойное никование). В некоторых вариантах осуществления никаза используется вместе с двумя отдельными направляющими РНК, нацеленными на противоположные цепи ДНК, для создания двойного ника в целевой ДНК. В некоторых вариантах осуществления никаза используется вместе с двумя отдельными направляющими РНК, которые выбраны так, чтобы они находились в непосредственной близости, для создания двойного ника в целевой ДНК.

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

В некоторых вариантах настоящего изобретения гетерологичный функциональный домен может облегчать транспорт РНК-направляемого ДНК-связывающего агента в ядро клетки. Например, гетерологичный функциональный домен может представлять собой сигнал ядерной локализации (NLS). В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент может быть слит с 1-10 NLS. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент может быть слит с 1-5 NLS. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент может быть слит с одним NLS. Если используется один NLS, то NLS может быть

связан на N-конце или С-конце последовательности РНК-направляемого ДНК-связывающего агента. Он также может быть вставлен в последовательность РНК-направляемого ДНК-связывающего агента. В других вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент может быть слит с более чем одним NLS. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент может быть слит с 2, 3, 4 или 5 NLS. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент может быть слит с двумя NLS. В определенных обстоятельствах два NLS могут быть одинаковыми (*например*, два NLS SV40) или разными. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент сливаются с двумя последовательностями NLS SV40, связанными на С-конце. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент может быть слит с двумя NLS, один из которых связан на N-конце, а другой - на С-конце. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент может быть слит с 3 NLS. В некоторых вариантах осуществления РНК-направляемый ДНК-связывающий агент может быть слит без NLS. В некоторых вариантах осуществления NLS может представлять собой однокомпонентную последовательность, такую как, *например*, NLS SV40, PKKKRKV (SEQ ID NO: 600) или PKKKRRV (SEQ ID NO: 601). В некоторых вариантах реализации NLS может представлять собой двойную последовательность, такую как NLS нуклеоплазмина, KRPAATKKAGQAKKKK (SEQ ID NO: 602). В конкретном варианте осуществления один NLS PKKKRKV (SEQ ID NO: 600) может быть связан с С-концом РНК-направляемого ДНК-связывающего агента. В сайт слияния необязательно включены один или более линкеров.

#### Способы доставки

Направляющая РНК (нРНК альбумина; нРНК SERPINA1), РНК-направляемые ДНК-связывающие агенты (*например*, нуклеаза Cas) и конструкции нуклеиновых кислот (*например*, двунаправленная конструкция), описанные в настоящем документе, могут быть доставлены в клетку-хозяина или субъекту *in vivo* или *ex vivo* с использованием различных известных и подходящих способов, доступных в данной области техники. Направляющая РНК, РНК-направляемые ДНК-связывающие агенты и конструкции нуклеиновых кислот могут быть доставлены по отдельности или вместе в любой комбинации, используя одни и те же или разные способы доставки, в зависимости от ситуации.

Обычные вирусные и невирусные способы доставки генов можно использовать для введения описанной в данном документе направляющей РНК, а также РНК-направляемого ДНК-связывающего агента и донорной конструкции в клетки (*например*, клетки млекопитающих) и целевые ткани. Как дополнительно предусмотрено в настоящем документе, нуклеиновые кислоты систем доставки невирусных векторов, такие как невирусные векторы, плазмидные векторы и, например, голая нуклеиновая кислота и нуклеиновая кислота в комплексе со средством доставки, таким как липосома, липидная наночастица (ЛНЧ) или полуксамер. Системы доставки вирусных векторов включают

ДНК- и РНК-вирусы.

Способы и композиции для невирусной доставки нуклеиновых кислот включают электропорацию, липофекцию, микроинъекцию, биолистику, виросомы, липосомы, иммунолипосомы, ЛНЧ, поликатионы или конъюгаты липид:нуклеиновая кислота, голую нуклеиновую кислоту (*например*, голую ДНК/РНК), искусственные вирионы и усиленные агентами поглощение ДНК. Сонопорацию с помощью, *например*, системы Sonitron 2000 (Rich-Mar) также можно применять для доставки нуклеиновых кислот.

Дополнительные типичные системы доставки нуклеиновых кислот включают системы, предоставленные AmaxaBiosystems (Кельн, Германия), Maxcyte, Inc. (Роквилл, Мэриленд), VTX Molecular Delivery Systems (Холлистон, Массачусетс) и Copernicus Therapeutics Inc. (см., например, патент США № 6008336). Липофекция описана, *например*, в патентах США №№ 5049386; 4946787 и 4897355), а реагенты для липофекции доступны в коммерческой продаже (*например*, Transfectam™ и Lipofectin™). Получение комплексов липид:нуклеиновая кислота, включая нацеленные липосомы, такие как иммунолипидные комплексы, хорошо известно в данной области техники и описано в данном документе.

Различные системы доставки (*например*, векторы, липосомы, ЛНЧ), содержащие направляющие РНК, РНК-направляемый ДНК-связывающий агент и донорную конструкцию, по отдельности или в комбинации, также можно вводить в организм для доставки в клетки *in vivo* или вводить в клетку, или культуру клеток *ex vivo*. Введение осуществляют любым из способов, обычно применяемых для приведения молекулы в окончательный контакт с кровью, жидкостью или клетками, включая, помимо прочего, инъекцию, инфузию, местное нанесение и электропорацию. Подходящие способы введения таких нуклеиновых кислот доступны и хорошо известны специалистам в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к векторам ДНК или РНК, кодирующим любую одну или более композиций, описанных в настоящем документе - *например*, направляющую РНК (нРНК альбумина; или нРНК SERPINA1), содержащую любую одну или более направляющих последовательностей, описанных в настоящем документе; конструкцию (*например*, двунаправленную конструкцию), содержащую последовательность, кодирующую гетерологичный ААТ; или последовательность, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит векторы ДНК или РНК, кодирующие любую одну или более композиций, описанных в настоящем документе, или в любой комбинации. В некоторых вариантах осуществления векторы дополнительно содержат, *например*, промоторы, энхансеры и регуляторные последовательности. В некоторых вариантах осуществления вектор, который содержит двунаправленную конструкцию, содержащую последовательность, кодирующую гетерологичный ААТ, не содержит промотор, который управляет экспрессией гетерологичного ААТ. В некоторых вариантах осуществления вектор, который содержит направляющую РНК, содержащую

любую одну или более направляющих последовательностей, описанных в настоящем документе (нРНК альбумина; или нРНК SERPINA1), также содержит одну или более нуклеотидных последовательностей, кодирующих сгРНК, trРНК или сгРНК и trРНК, как описано в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую направляющую РНК (нРНК альбумина или нРНК SERPINA1), описанную в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления вектор содержит одну копию направляющей РНК. В других вариантах осуществления вектор содержит более одной копии направляющей РНК. В вариантах осуществления с более чем одной направляющей РНК направляющие РНК могут быть неидентичными, так что они нацелены на разные целевые последовательности, или могут быть идентичными, поскольку они нацелены на одну и ту же целевую последовательность. В некоторых вариантах осуществления, где векторы содержат более одной направляющей РНК, каждая направляющая РНК может обладать другими различными свойствами, такими как активность или стабильность в комплексе с РНК-направляемой ДНК-нуклеазой, такой как комплекс РНП Cas. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая направляющую РНК, может быть функционально связана по меньшей мере с одной последовательностью, регулирующей транскрипцию или трансляцию, такой как промотор, 3'-UTR или 5'-UTR. В одном варианте осуществления промотор может представлять собой промотор тРНК, *например*, тРНК<sup>Lys3</sup> или химеру тРНК. См. Mefferd et al., *RNA*. 2015 21:1683-9; Scherer et al., *Nucleic Acids Res.* 2007 35: 2620-2628. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения промотор может распознаваться РНК-полимеразой III (Pol III). Неограничивающие примеры промоторов Pol III включают промоторы U6 и H1. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нуклеотидная последовательность, кодирующая направляющую РНК, может быть функционально связана с промотором U6 мыши или человека. В других вариантах осуществления настоящего изобретения нуклеотидная последовательность, кодирующая направляющую РНК, может быть функционально связана с промотором H1 мыши или человека. В вариантах осуществления с более чем одной направляющей РНК промоторы, используемые для управления экспрессией, могут быть одинаковыми или разными. В некоторых вариантах осуществления нуклеотид, кодирующий сгРНК из направляющей РНК, и нуклеотид, кодирующий trРНК из направляющей РНК, могут быть представлены в одном и том же векторе. В некоторых вариантах осуществления нуклеотид, кодирующий сгРНК, и нуклеотид, кодирующий trРНК, могут управляться одним и тем же промотором. В некоторых вариантах осуществления сгРНК и trРНК могут быть транскрибированы в одном транскрипте. Например, сгРНК и trРНК могут быть процессированы из одного транскрипта с образованием двойной молекулы направляющей РНК. Альтернативно, сгРНК и trРНК могут быть транскрибированы в одномолекулярную направляющую РНК (онРНК) В других вариантах осуществления сгРНК и trРНК могут управляться соответствующими

промоторами на одном и том же векторе. В других вариантах осуществления sgРНК и trРНК могут кодироваться разными векторами.

В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая направляющую РНК (нРНК альбумина; или нРНК SERPINA1), может быть расположена в том же векторе, содержащем нуклеотидную последовательность, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, такой как белок Cas. В некоторых вариантах осуществления одна или более нРНК альбумина или одна или более нРНК SERPINA1 могут быть расположены в одном и том же векторе. В некоторых вариантах осуществления одна или более нРНК альбумина или одна или более нРНК SERPINA1 могут быть расположены в том же векторе с нуклеотидной последовательностью, кодирующей РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, такой как белок Cas. В некоторых вариантах осуществления экспрессия направляющей РНК и РНК-направляемого ДНК-связывающего агента, такого как белок Cas, может управляться их собственными соответствующими промоторами. В некоторых вариантах осуществления экспрессия направляющей РНК может управляться тем же промотором, который управляет экспрессией РНК-направляемого ДНК-связывающего агента, такого как белок Cas. В некоторых вариантах осуществления направляющая РНК и РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, такой как транскрипт белка Cas, могут содержаться в одном транскрипте. Например, направляющая РНК может находиться в нетранслируемой области (UTR) РНК-направляемого ДНК-связывающего агента, такого как транскрипт белка Cas. В некоторых вариантах осуществления направляющая РНК может находиться в пределах 5'-UTR транскрипта. В других вариантах осуществления направляющая РНК может находиться в пределах 3'-UTR транскрипта. В некоторых вариантах осуществления внутриклеточный период полужизни транскрипта может быть уменьшен за счет включения направляющей РНК в ее 3'-UTR и тем самым сокращения длины ее 3'-UTR. В дополнительных вариантах осуществления направляющая РНК может находиться внутри интрона транскрипта. В некоторых вариантах осуществления подходящие сайты сплайсинга могут быть добавлены в интрон, внутри которого расположена направляющая РНК, так что направляющая РНК сплайсируется из транскрипта должным образом. В некоторых вариантах осуществления экспрессия РНК-направляемого ДНК-связывающего агента, такого как белок Cas и направляющая РНК, из одного и того же вектора в непосредственной временной близости может способствовать более эффективному образованию комплекса РНП CRISPR.

В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая направляющую РНК (нРНК альбумина; или нРНК SERPINA1) или РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, может быть расположена в том же векторе, содержащем конструкцию, которая содержит гетерологичный ген ААТ. В некоторых вариантах осуществления близость конструкции, содержащей ген ААТ и направляющую РНК (или РНК-направляемый ДНК-связывающий агент) в одном и том же векторе, может способствовать более эффективной вставке конструкции в сайт вставки, созданный

направляющей РНК/РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения вектор содержит одну или более нуклеотидных последовательностей, кодирующих онРНК (нРНК альбумина; или нРНК SERPINA1) и мРНК, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, который может представлять собой белок Cas, такой как Cas9 или Cpf1. В некоторых вариантах осуществления вектор содержит одну или более нуклеотидных последовательностей, кодирующих РНК, trРНК и мРНК, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, который может представлять собой белок Cas, такой как Cas9 или Cpf1. В одном варианте осуществления настоящего изобретения Cas9 получен из *Streptococcus pyogenes* (*m.e.* Cas9 Spy). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нуклеотидная последовательность, кодирующая crРНК, trРНК или crРНК и trРНК (которая может представлять собой онРНК), содержит или состоит из направляющей последовательности, фланкированной полностью или частью повторяющейся последовательности из встречающейся в природе системы CRISPR/Cas. Нуклеиновая кислота, содержащая или состоящая из crРНК, trРНК или crРНК и trРНК, может дополнительно содержать векторную последовательность, при этом векторная последовательность содержит или состоит из нуклеиновых кислот, которые не встречаются в природе вместе с crРНК, trРНК или crРНК и trРНК.

В некоторых вариантах осуществления crРНК и trРНК кодируются несмежными нуклеиновыми кислотами в одном векторе. В других вариантах осуществления crРНК и trРНК могут кодироваться смежной нуклеиновой кислотой. В некоторых вариантах осуществления crРНК и trРНК кодируются противоположными цепями одной нуклеиновой кислоты. В других вариантах осуществления crРНК и trРНК кодируются одной и той же цепью одной нуклеиновой кислоты.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит донорную конструкцию (*например*, двунаправленную конструкцию нуклеиновой кислоты), содержащую последовательность, которая кодирует гетерологичный ААТ, как описано в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления в дополнение к донорной конструкции (*например*, двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты), описанной в настоящем документе, вектор может дополнительно содержать нуклеиновые кислоты, которые кодируют направляющие РНК альбумина, описанные в настоящем документе, или нуклеиновую кислоту, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент (*например*, нуклеаза Cas, такая как Cas9). В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая направляющую РНК альбумина, или нуклеиновая кислота, кодирующая РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, каждая из них или обе, находятся в векторе, отдельном от вектора, который содержит донорную конструкцию (*например*, двунаправленную конструкцию), описанную в настоящем документе. В любом из вариантов осуществления вектор может включать другие последовательности, которые включают, помимо прочего, промоторы, энхансеры, регуляторные последовательности, как описано в настоящем документе. В некоторых

вариантах осуществления промотор не стимулирует экспрессию гетерологичного ААТ донорной конструкции (*например*, двунаправленной конструкции). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения вектор содержит одну или большее количество нуклеотидных последовательностей, кодирующих сгРНК, trРНК или сгРНК и trРНК. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения вектор содержит одну или большее количество нуклеотидных последовательностей, кодирующих онРНК и мРНК, кодирующую РНК-направляемую ДНК-нуклеазу, которая может представлять собой нуклеазу Cas (*например*, Cas9). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения вектор содержит одну или более нуклеотидных последовательностей, кодирующих сгРНК, trРНК и мРНК, кодирующую РНК-направляемую ДНК-нуклеазу, которая может представлять собой белок Cas, такой как Cas9. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения Cas9 получен из *Streptococcus pyogenes* (*m.e.* Cas9 Spy). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нуклеотидная последовательность, кодирующая сгРНК, trРНК или сгРНК и trРНК (которая может представлять собой онРНК), содержит или состоит из направляющей последовательности, фланкированной полностью или частью повторяющейся последовательности из встречающейся в природе системы CRISPR/Cas. Нуклеиновая кислота, содержащая или состоящая из сгРНК, trРНК или сгРНК и trРНК, может дополнительно содержать векторную последовательность, при этом векторная последовательность содержит или состоит из нуклеиновых кислот, которые не встречаются в природе вместе с сгРНК, trРНК или сгРНК и trРНК.

В некоторых вариантах осуществления вектор может быть кольцевым. В других вариантах осуществления вектор может быть линейным. В некоторых вариантах осуществления вектор может быть заключен в липидную наночастицу, липосому, нелипидную наночастицу или вирусный капсид. Неограничивающие иллюстративные векторы включают плазмиды, фагмиды, космиды, искусственные хромосомы, минихромосомы, транспозоны, вирусные векторы и векторы экспрессии.

В некоторых вариантах осуществления вектор может представлять собой вирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор может быть генетически модифицирован по сравнению с его аналогом дикого типа. Например, вирусный вектор может включать вставку, делецию или замену одного или более нуклеотидов для облегчения клонирования или так, что изменяется одно или более свойств вектора. Такие свойства могут включать упаковочную способность, эффективность трансдукции, иммуногенность, интеграцию генома, репликацию, транскрипцию и трансляцию. В некоторых вариантах осуществления часть вирусного генома может быть удалена таким образом, чтобы вирус был способен упаковывать экзогенные последовательности, имеющие больший размер. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор может обладать повышенной эффективностью трансдукции. В некоторых вариантах осуществления иммунный ответ, индуцируемый вирусом у хозяина, может быть снижен. В некоторых вариантах осуществления вирусные гены (такие как, *например*, интеграза),

которые способствуют интеграции вирусной последовательности в геном хозяина, могут быть мутированы таким образом, что вирус становится неинтегрируемым. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор может быть дефектным по репликации. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор может содержать экзогенные последовательности, регулирующие транскрипцию или трансляцию, для управления экспрессией кодирующих последовательностей в векторе. В некоторых вариантах осуществления вирус может быть хелпер-зависимым. Например, вирусу может потребоваться один или более хелперных вирусов для обеспечения вирусных компонентов (таких как, *например*, вирусные белки), необходимых для амплификации и упаковки векторов в вирусные частицы. В таком случае один или более хелперных компонентов, включая один или более векторов, кодирующих вирусные компоненты, могут быть введены в клетку-хозяина вместе с векторной системой, описанной в настоящем документе. В других вариантах осуществления вирус может быть без хелперных вирусов. Например, вирус может быть способен амплифицировать и упаковывать векторы без хелперных вирусов. В некоторых вариантах осуществления векторная система, описанная в настоящем документе, также может кодировать вирусные компоненты, необходимые для амплификации и упаковки вируса.

Неограничивающие иллюстративные вирусные векторы включают вектор аденоассоциированного вируса (AAV), лентивирусные векторы, аденовирусные векторы, хелпер-зависимые аденовирусные векторы (HDAd), векторы вируса простого герпеса (HSV-1), бактериофаг T4, бакуловирусные векторы и ретровирусные векторы. В некоторых вариантах осуществления, вирусный вектор может представлять собой вектор AAV. В других вариантах осуществления вирусный вектор может представлять собой лентивирусный вектор.

В некоторых вариантах осуществления «AAV» относится ко всем серотипам, подтипам и встречающимся в природе AAV, а также к рекомбинантным AAV. «AAV» может использоваться для обозначения самого вируса или его производного. Термин «AAV» включает в себя AAV1, AAV2, AAV3, AAV3B, AAV4, AAV5, AAV6, AAV6.2, AAV7, AAVrh.64R1, AAVhu.37, AAVrh.8, AAVrh.32.33, AAV8, AAV9, AAV-DJ, AAV2/8, AAVrh10, AAVLK03, AV10, AAV11, AAV12, rh10, и их гибриды, птичий AAV, бычий AAV, собачий AAV, лошадиный AAV, AAV приматов, AAV неприматов и овечий AAV. В некоторых вариантах хелперных вирусов термин «AAV» включает AAV3B, AAVhu.37, AAV9, AAV-DJ, AAV2/8, AAVrh10, AAVLK03 и AAV8. Геномные последовательности различных серотипов AAV, а также последовательности нативных концевых повторов (TR), белков Rep и субъединиц капсида известны в данной области техники. Такие последовательности можно найти в литературе или в общедоступных базах данных, таких как GenBank. «Вектор AAV» в настоящем документе относится к вектору AAV, содержащему гетерологичную последовательность, не происходящую из AAV (*т.е.* последовательность нуклеиновой кислоты, гетерологичную AAV), обычно содержащую последовательность, кодирующую представляющий интерес гетерологичный полипептид

(например, AAT). Конструкция может содержать капсидную последовательность AAV1, AAV2, AAV3, AAV3B, AAV4, AAV5, AAV6, AAV6.2, AAV7, AAVrh.64R1, AAVhu.37, AAVrh.8, AAVrh.32.33, AAV8, AAV9, AAV-DJ, AAV2/8, AAVrh10, AAVLK03, AV10, AAV11, AAV12, rh10, и их гибридов, птичьего AAV, бычьего AAV, собачьего AAV, лошадиного AAV, AAV приматов, AAV неприматов и овечьего AAV. В общем, гетерологичная последовательность нуклеиновой кислоты (трансен) фланкирована по меньшей мере одной, по меньшей мере двумя или по меньшей мере тремя последовательностями инвертированных концевых повторов (ITR) AAV. Вектор AAV может быть одноцепочечным (ssAAV) или самокомплементарным (scAAV). В некоторых вариантах осуществления одна или более областей вектора AAV могут быть истощены по CpG. В некоторых вариантах осуществления ITR не истощены по CpG. В некоторых вариантах осуществления ITR истощены по CpG.

В некоторых вариантах осуществления лентивирус может быть неинтегрирующим. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор может представлять собой аденовирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления аденовирус может представлять собой аденовирус с высокой способностью к клонированию или «слабый» аденовирус, в котором все кодирующие вирусные области, кроме 5'- и 3'-концевых инвертированных повторов (ITR) и сигнала упаковки («I»), удалены из вируса, чтобы увеличить его упаковочную способность. В других вариантах осуществления вирусный вектор может представлять собой вектор HSV-1. В некоторых вариантах осуществления вектор на основе HSV-1 зависит от помощника, а в других вариантах осуществления он не зависит от помощника. Например, вектор ампликона, который сохраняет только последовательность упаковки, требует вируса-помощника со структурными компонентами для упаковки, в то время как вектор HSV-1 с делецией 30 т.п.н., который удаляет несущественные вирусные функции, не требует вируса-помощника. В дополнительных вариантах осуществления вирусный вектор может представлять собой бактериофаг T4. В некоторых вариантах осуществления бактериофаг T4 может упаковывать любые линейные или кольцевые молекулы ДНК или РНК, когда головка вируса пуста. В дополнительных вариантах осуществления вирусный вектор может представлять собой бакуловирусный вектор. В других дополнительных вариантах осуществления вирусный вектор может представлять собой ретровирусный вектор. В вариантах осуществления, использующих AAV или лентивирусные векторы, которые имеют меньшую способность к клонированию, может быть необходимо использовать более одного вектора для доставки всех компонентов векторной системы, как раскрыто в настоящем документе. Например, один вектор AAV может содержать последовательности, кодирующие РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, такой как белок Cas (например, Cas9), тогда как второй вектор AAV может содержать одну или более направляющих последовательностей.

В некоторых вариантах осуществления векторная система может быть способна стимулировать экспрессию одной или более кодирующих последовательностей в клетке.

В некоторых вариантах осуществления вектор не содержит промотор, который управляет экспрессией одной или более кодирующих последовательностей после его интеграции в клетку (*например*, использует эндогенный промотор клетки-хозяина, *например*, при вставке в интрон 1 локуса альбумина, как показано на примере в данном документе). В некоторых вариантах осуществления клетка может быть прокариотической клеткой, такой как, *например*, бактериальная клетка. В некоторых вариантах осуществления клетка может быть эукариотической клеткой, такой как, *например*, клетка дрожжей, растений, насекомых или млекопитающих. В некоторых вариантах осуществления эукариотическая клетка может представлять собой клетку млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления эукариотическая клетка может представлять собой клетку грызуна. В некоторых вариантах осуществления эукариотическая клетка может представлять собой клетку человека. Подходящие промоторы для управления экспрессией в различных типах клеток известны в данной области. В некоторых вариантах осуществления промотор может быть дикого типа. В других вариантах осуществления промотор может быть модифицирован для более эффективной или действенной экспрессии. В других вариантах осуществления промотор может быть укорочен, но при этом сохранять свою функцию. *Например*, промотор может иметь нормальный размер или уменьшенный размер, подходящий для надлежащей упаковки вектора в вирус.

В некоторых вариантах осуществления вектор может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, такой как белок Cas (*например*, Cas9), описанный в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления нуклеаза, кодируемая вектором, может представлять собой белок Cas. В некоторых вариантах осуществления векторная система может содержать одну копию нуклеотидной последовательности, кодирующей нуклеазу. В других вариантах осуществления векторная система может содержать более одной копии нуклеотидной последовательности, кодирующей нуклеазу. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая нуклеазу, может быть функционально связана по меньшей мере с одной последовательностью, регулирующей транскрипцию или трансляцию. В некоторых вариантах осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая нуклеазу, может быть функционально связана по меньшей мере с одним промотором.

В некоторых вариантах осуществления вектор может содержать любую одну или более конструкций, содержащих гетерологичный ген ААТ, описанный в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный ген ААТ может быть функционально связан по меньшей мере с одной последовательностью, регулирующей транскрипцию или трансляцию. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный ген ААТ может быть функционально связан по меньшей мере с одним промотором. В некоторых вариантах осуществления гетерологичный ген не связан с промотором, который управляет экспрессией гетерологичного гена.

В некоторых вариантах осуществления промотор может быть конститутивным,

индуцируемым или тканеспецифическим. В некоторых вариантах осуществления промотор может быть конститутивным промотором. Неограничивающие иллюстративные конститутивные промоторы включают промотор непосредственно раннего цитомегаловируса (CMV), промотор вируса обезьян (SV40), промотор большого позднего аденовируса (MLP), промотор вируса саркомы Рауса (RSV), промотор вируса опухоли молочной железы мыши (MMTV), фосфоглицераткиназу (PGK), промотор фактора элонгации-альфа (EF1a), промоторы убиквитина, промоторы актина, промоторы тубулина, промоторы иммуноглобулина, их функциональный фрагмент или комбинацию любого из вышеперечисленного. В некоторых вариантах осуществления промотор может быть промотором CMV. В некоторых вариантах осуществления промотор может быть укороченным промотором CMV. В других вариантах осуществления промотор может представлять собой промотор EF1a. В некоторых вариантах осуществления промотор может представлять собой индуцируемый промотор. Неограничивающие иллюстративные индуцируемые промоторы включают промоторы, индуцируемые тепловым шоком, светом, химическими веществами, пептидами, металлами, стероидами, антибиотиками или алкоголем. В некоторых вариантах осуществления индуцибельный промотор может иметь низкий базовый (неиндуцированный) уровень экспрессии, такой как, *например*, промотор Tet-On<sup>®</sup> (Clontech).

В некоторых вариантах осуществления промотор может быть тканеспецифическим промотором, *например*, промотором, специфичным для экспрессии в печени.

В некоторых вариантах осуществления композиции содержат векторную систему. В некоторых вариантах осуществления векторная система может содержать один единственный вектор. В других вариантах осуществления векторная система может содержать два вектора. В дополнительных вариантах осуществления векторная система может содержать три вектора. Когда для мультиплексирования используются разные направляющие РНК или когда используются несколько копий направляющей РНК, векторная система может содержать более трех векторов.

В некоторых вариантах осуществления векторная система может содержать индуцируемые промоторы для начала экспрессии только после ее доставки в клетку-мишень. Неограничивающие иллюстративные индуцируемые промоторы включают промоторы, индуцируемые тепловым шоком, светом, химическими веществами, пептидами, металлами, стероидами, антибиотиками или алкоголем. В некоторых вариантах осуществления индуцибельный промотор может иметь низкий базовый (неиндуцированный) уровень экспрессии, такой как, *например*, промотор Tet-On<sup>®</sup> (Clontech).

В дополнительных вариантах осуществления векторная система может содержать тканеспецифические промоторы для начала экспрессии только после ее доставки в конкретную ткань.

Вектор, содержащий: одну или более направляющих РНК (нРНК альбумина или нРНК SERPINA1), РНК-связывающий ДНК-связывающий агент или донорную

конструкцию, содержащую последовательность, кодирующую гетерологичный белок ААТ, по отдельности или в любой комбинации, может быть доставлен с помощью липосомы, наночастицы, экзосомы или микровезикулы. Вектор также может быть доставлен с помощью липидных наночастиц (ЛНЧ). Одна или более направляющих РНК (нРНК альбумина или нРНК SERPINA1), РНК-связывающий ДНК-связывающий агент (*например*, мРНК) или донорная конструкция, содержащая последовательность, кодирующую гетерологичный белок ААТ, по отдельности или в любой комбинации, могут быть доставлены с помощью липосомы, наночастицы, экзосомы или микровезикулы. Одна или более направляющих РНК (нРНК альбумина или нРНК SERPINA1), РНК-связывающий ДНК-связывающий агент (*например*, мРНК) или донорная конструкция, содержащая последовательность, кодирующую гетерологичный белок ААТ, по отдельности или в любой комбинации, могут быть доставлены с помощью ЛНЧ.

Липидные наночастицы (ЛНЧ) являются хорошо известным средством доставки нуклеотидного и белкового груза и могут использоваться для доставки любой из направляющих РНК (*например*, нРНК альбумина; или нРНК SERPINA1), РНК-направляемого ДНК-связывающего агента или донорной конструкции (*например*, двунаправленной конструкции), описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ доставляют композиции в форме нуклеиновой кислоты (*например*, ДНК или мРНК) или белка (*например*, нуклеазы Cas) или нуклеиновой кислоты вместе с белком, в зависимости от обстоятельств.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложен способ доставки любой из описанных в данном документе направляющих РНК (нРНК альбумина; или нРНК SERPINA1) или донорной конструкции (*например*, двунаправленной конструкции), описанной в настоящем документе, по отдельности или в комбинации, в клетку-хозяина или субъекту, при этом любой один или более компонентов связаны с ЛНЧ. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает РНК-направляемый ДНК-связывающий агент (*например*, Cas9 или последовательность, кодирующую Cas9).

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложена композиция, содержащая любую из описанных в данном документе направляющих РНК (нРНК альбумина; или нРНК SERPINA1) или донорную конструкцию (*например*, двунаправленную конструкцию), описанную в настоящем документе, по отдельности или в комбинации с ЛНЧ. В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно содержит РНК-направляемый ДНК-связывающий агент (*например*, Cas9 или последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую Cas9).

В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ содержат биоразлагаемые ионизируемые липиды. В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ содержат (9Z,12Z)-3-(((4,4-бис(октилокси)бутаноил)окси)-2-(((3-(диэтиламино)пропокси)карбонил)окси)метил)пропил)октадека-9,12-диеноат, также называемый 3-(((4,4-бис(октилокси)бутаноил)окси)-2-(((3-(диэтиламино)пропокси)карбонил)окси)метил)пропил(9Z,12Z)-октадека-9,12-

диеноат) или другой ионизируемый липид. См., *например*, липиды из WO2019067992, WO/2017/173054, WO2015/095340 и WO2014/136086, а также приведенные в них ссылки. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения термины «катионный» и «ионизируемый» в контексте липидов ЛНЧ являются взаимозаменяемыми, *например*, при этом ионизируемые липиды являются катионными в зависимости от pH.

В некоторых вариантах осуществления ЛНЧ, связанные с описанной в данном документе двунаправленной конструкцией, предназначены для применения при приготовлении лекарственного средства для лечения заболевания или расстройства. Заболевание или расстройство может представлять собой заболевание, связанное с дефицитом  $\alpha$ 1-антитрипсина (AATD).

В некоторых вариантах осуществления любая из описанных в данном документе направляющих РНК, описанных в данном документе РНК-направляемых ДНК-связывающих агентов или донорной конструкции (*например*, двунаправленной конструкции), описанной в настоящем документе, по отдельности или в комбинации, в чистом виде или как часть вектора, составлены в виде или вводятся посредством липидных наночастиц; см., *например*, WO/2017/173054, содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

Будет очевидно, что любая одна или более направляющих РНК, описанных в настоящем документе (нРНК альбумина; или нРНК SERPINA1), РНК-направляемый ДНК-связывающий агент (*например*, нуклеаза Cas или нуклеиновая кислота, кодирующая нуклеазу Cas) и донорная конструкция (*например*, двунаправленная конструкция), содержащая последовательность, кодирующую гетерологичный ААТ, может быть доставлена с использованием одной и той же или разных систем. Например, направляющая РНК, РНК-направляемый ДНК-связывающий агент (*например*, нуклеаза Cas) и конструкция могут переноситься одним и тем же вектором (*например*, AAV). Альтернативно, РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, такой как нуклеаза Cas (в виде белка или мРНК) или нРНК (нРНК альбумина; или нРНК SERPINA1), может переноситься плазмидой или ЛНЧ, тогда как донорная конструкция может переноситься вектором, таким как AAV. При использовании любой из множества комбинаций следует руководствоваться, *например*, практичностью и эффективностью их использования. Кроме того, разные системы доставки можно вводить одним и тем же или разными способами (*например*, путем инфузии; путем инъекции, такой как внутримышечная инъекция, инъекция в хвостовую вену или другая внутривенная инъекция; путем внутрибрюшинного введения или внутримышечной инъекции).

Различные системы доставки могут быть доставлены *in vitro* или *in vivo* одновременно или в любом последовательном порядке. В некоторых вариантах осуществления донорная конструкция, направляющая РНК (нРНК альбумина; или нРНК SERPINA1) и нуклеаза Cas могут быть доставлены *in vitro* или *in vivo* одновременно, *например*, в одном векторе, двух векторах, трех векторах, отдельных векторах, одной ЛНЧ, двух ЛНЧ, трех ЛНЧ, отдельных ЛНЧ или их комбинации. В некоторых вариантах

осуществления донорная конструкция может быть доставлена *in vivo* или *in vitro* в виде вектора или связана с ЛНЧ до (*например*, около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или более дней) доставки направляющей РНК альбумина или нуклеазы Cas в виде вектора или связанной с ЛНЧ по отдельности или вместе в виде рибонуклеопротеина (РНП). В некоторых вариантах осуществления донорная конструкция доставляется за одно введение. В некоторых вариантах осуществления донорную конструкцию можно доставлять при многократном введении. В качестве дополнительного примера, направляющая РНК альбумина и нуклеазы Cas в виде вектора или мРНК или связанные с ЛНЧ по отдельности или вместе в виде рибонуклеопротеина (РНП) могут быть доставлены *in vivo* или *in vitro* перед доставкой конструкции в виде вектор или связанной с ЛНЧ. В некоторых вариантах осуществления направляющая РНК альбумина доставляется за одно введение. В некоторых вариантах осуществления направляющую РНК альбумина можно доставлять при многократном введении. Аналогичным образом, направляющую РНК SERPINA1 и нуклеазу Cas в виде вектора или мРНК или связанные с ЛНЧ по отдельности или вместе в виде рибонуклеопротеина (РНП).

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение также обеспечивает фармацевтические составы для введения любой из направляющих РНК (нРНК альбумина; или нРНК SERPINA1), описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления фармацевтический состав включает РНК-направляемый ДНК-связывающий агент (*например*, нуклеазу Cas) и донорную конструкцию, содержащую кодирующую последовательность гетерологичного ААТ, как описано в настоящем документе. Фармацевтические составы, подходящие для доставки субъекту (*например*, человеку), хорошо известны в данной области техники.

#### Способы применения

Ген, кодирующий ААТ, расположен на хромосоме 14q32.1 и является частью локуса ингибитора протеазы (Pi). Нормальный ААТ может называться PiM. Мутация PiZ может вызывать симптомы со стороны печени или легких, в том числе у гомозиготных (ZZ) и гетерозиготных (MZ или SZ) особей. Мутация PiS может вызывать более мягкое снижение уровня ААТ в сыворотке и снижение риска заболеваний легких. В данной области техники известны многочисленные другие аллельные мутации. См., *например*, Greulich et al. «Alpha-1-antitrypsin deficiency: increasing awareness and improving diagnosis», Ther Adv Respir Dis. 2016.

ААТД может быть диагностирован способами, известными в данной области техники, *например*, по наличию одного или более физиологических симптомов, анализам крови или генетическим тестам на одну или более из 150+ известных мутаций ААТ, о которых сообщалось на сегодняшний день. См., *например*, *id.* Примеры анализов крови включают, помимо прочего, анализ уровней ААТ в сыворотке крови, выявление мутаций с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) или секвенирования нового поколения (NGS), изоэлектрическое фокусирование (ИЭФ) с иммуноблоттингом или без него, секвенирование локуса гена ААТ и карты для разделения сыворотки (анализ латерального

потока для обнаружения белка Z).

В некоторых вариантах осуществления уровни ААТ в сыворотке можно считать нормальными в диапазоне 150-350 мг/дл с использованием методов иммунодиффузии (которые могут завышать уровни в сыворотке). В этих вариантах осуществления уровень 80 мг/дл можно рассматривать как защитный, *например*, снижающий риск развития одного или более симптомов, *например*, эмфиземы, несмотря на то, что он ниже нормального диапазона.

В некоторых вариантах осуществления уровни ААТ в сыворотке можно считать нормальными в диапазоне 90-200 мг/дл с использованием нефелометрии или иммунотурбидиметрии и очищенного стандарта. В этих вариантах осуществления уровень 50 мг/дл можно рассматривать как защитный, *например*, снижающий риск одного или более симптомов, *например*, эмфиземы, несмотря на то, что он ниже нормального диапазона.

В некоторых вариантах осуществления уровни ААТ в сыворотке менее около 130 мг/дл, 125 мг/дл, 120 мг/дл, 115 мг/дл, 110 мг/дл, 105 мг/дл или 100 мг/дл указывают на низкую вероятность гомозиготной мутации ААТ, и дальнейшее генетическое тестирование может не потребоваться. В некоторых вариантах осуществления уровни ААТ в сыворотке около 104 мг/дл указывают на низкую вероятность гомозиготного PiS, а 113 мг/дл указывают на низкую вероятность гомозиготного PiZ. В некоторых вариантах осуществления уровни ААТ в сыворотке могут предоставить ограниченную информацию об исключении гетерозиготных носителей, и может потребоваться дальнейшее генетическое тестирование, поскольку уровни ААТ в сыворотке около 150 мг/дл указывают на низкую вероятность гетерозиготного носителя PiMZ, а уровни ААТ в сыворотке около 220 мг/дл указывают на низкую вероятность гетерозиготного носителя piMS.

Примеры обнаруживаемых физиологических симптомов включают, помимо прочего, заболевание легких или печени; хрипы или одышку; повышенный риск легочных инфекций; хроническую обструктивную болезнь легких (COPD); бронхит, астму, диспноэ; цирроз печени; неонатальную желтуху; панникулит; хронический кашель или мокроту; повторяющиеся простудные заболевания грудной клетки; пожелтение кожи или белой части глаз; отек живота или ног. В некоторых вариантах осуществления индивиды могут быть подвергнуты анализу крови или генетическим тестам, если они являются пациентами с COPD, астматическими пациентами, не отвечающими на лечение, пациентами с бронхоэктатической болезнью неизвестной этиологии, индивидами с криптогенным циррозом/заболеванием печени, гранулематозом с полиангиитом, некротизирующим панникулитом или родственниками первой степени пациентов/носителей ААТD. В некоторых вариантах осуществления можно выполнить тестирование функции легких (PFT), определить функциональную остаточную емкость (RFC) или потерю плотности легких при общей емкости легких (TLC).

В некоторых вариантах осуществления субъекты, подлежащие лечению, включают

индивидов с уровнем ААТ в сыворотке крови ниже нормального диапазона. В некоторых вариантах осуществления субъекты, подлежащие лечению, включают индивидов с любой комбинацией аллельных мутаций, *например*, ZZ, MZ, MS. В некоторых вариантах осуществления субъекты, подлежащие лечению, включают индивидов с FEV1 после бронхолитика, составляющим по меньшей мере 30%, 40%, 50%, 60% от прогнозируемого нормального значения. В некоторых вариантах осуществления субъекты, подлежащие лечению, включают индивидов, которым показана бронхоскопия. В некоторых вариантах осуществления субъекты, подлежащие лечению, включают индивидов с адекватной функцией печени и почек, некурящих, индивидов, которым не была проведена лобэктомия легких или печени, трансплантация, индивидов, которым не была проведена операция по уменьшению объема легких, индивидов, у которых не было острой инфекции дыхательных путей или обострения COPD непосредственно перед лечением, или индивидов, у которых нет нестабильного легочного сердца.

Как описано в настоящем документе, настоящее изобретение предоставляет композиции и способы для экспрессии гетерологичного ААТ (*например*, функционального ААТ или ААТ дикого типа) в безопасном сайте человека, таком как безопасный сайт альбумина, что обеспечивает секрецию белка. В некоторых вариантах осуществления способы таким образом облегчают негативные эффекты ААТД в легких. Настоящее изобретение также обеспечивает композиции и способы, позволяющие нокаутировать эндогенный ген *SERPINA1*, тем самым устраняя продукцию мутантных форм ААТ, связанных с полимеризацией и агрегацией белка ААТ в гепатоцитах печени, которые приводят к симптомам со стороны печени у пациентов с ААТД. См. WO/2018/119182, полностью включенный посредством ссылки. Соответственно, композиции и способы, описанные в настоящем документе, лечат ААТД, облегчая негативные последствия заболевания в легких, а также в печени.

ААТ в основном синтезируется и секретируется гепатоцитами и подавляет активность эластазы нейтрофилов в легких. Без достаточного количества функционирующего ААТ эластаза нейтрофилов выходит из-под контроля и повреждает альвеолы в легких. Таким образом, мутации в *SERPINA1*, которые приводят к снижению уровня ААТ или снижению уровня правильно функционирующего ААТ, приводят к патологии легких, включая, *например*, хроническую обструктивную болезнь легких (COPD), бронхит или астму.

нРНК альбумина, донорная конструкция (*например*, двунаправленная конструкция, содержащая последовательность, кодирующую функциональный гетерологичный ААТ), и РНК-направляемые ДНК-связывающие агенты, описанные в настоящем документе, пригодны для введения гетерологичной нуклеиновой кислоты ААТ в клетку-хозяина *in vivo* или *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления нРНК альбумина, донорная конструкция (*например*, двунаправленная конструкция, содержащая последовательность, кодирующую гетерологичный ААТ), и РНК-направляемые ДНК-связывающие агенты, описанные в настоящем документе, пригодны для экспрессии функционального

гетерологичного ААТ в клетке-хозяине или у субъекта, нуждающегося в этом. В некоторых вариантах осуществления нРНК альбумина, донорная конструкция (*например*, двунаправленная конструкция, содержащая последовательность, кодирующую гетерологичный ААТ), и РНК-направляемые ДНК-связывающие агенты, описанные в настоящем документе, пригодны для лечения ААТД у субъекта, нуждающегося в этом. В некоторых вариантах осуществления лечение ААТД путем экспрессии гетерологичного ААТ в локусе альбумина усиливает секрецию функционального (*например*, дикого типа) ААТ и облегчает один или более симптомов ААТД, *например*, негативное воздействие на легкие. *Например*, гетерологичная экспрессия ААТ может облегчить заболевание легких или печени; хрипы или одышку; повышенный риск легочных инфекций; COPD; бронхит, астму, одышку; цирроз печени; неонатальную желтуху; панникулит; хронический кашель или мокроту; повторяющиеся простудные заболевания грудной клетки; пожелтение кожи или белой части глаз; отек живота или ног. Введение любой одной или более нРНК альбумина, донорной конструкции (*например*, двунаправленной конструкции, содержащей последовательность, кодирующую гетерологичный ААТ), и РНК-направляемых ДНК-связывающих агентов, описанных в настоящем документе, приводит к увеличению экспрессии функционального гена ААТ (*например*, дикого типа), уровней белка ААТ (*например*, уровней в кровотоке, в сыворотке или в плазме) или уровней активности ААТ (*например*, ингибирования трипсина) (*например*, экспрессия гена ААТ или уровни белка увеличены более чем на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% по сравнению с необработанным контролем, *например*, по данным нефелометрии или иммунотурбидиметрии, *например*, ААТ превышает около 40 мг/дл, 45 мг/дл, 50 мг/дл, 60 мг/дл, 70 мг/дл, 80 мг/дл, 90 мг/дл, 100 мг/дл или 110 мг/дл в сыворотке). В некоторых вариантах осуществления эффективность лечения можно оценить путем измерения активности ААТ в сыворотке или плазме, при этом увеличение уровня или активности ААТ в сыворотке или плазме субъекта указывает на эффективность лечения. В некоторых вариантах осуществления эффективность лечения можно оценить путем измерения уровней белка или активности ААТ в сыворотке или плазме, при этом повышение уровня или активности ААТ в сыворотке или плазме субъекта указывает на эффективность лечения. В некоторых вариантах осуществления эффективность лечения можно оценить путем окрашивания PASD срезов ткани печени, *например*, для измерения агрегации. В некоторых вариантах осуществления эффективность лечения можно оценить путем измерения ингибирования эластазы нейтрофилов, *например*, в легких. В некоторых вариантах осуществления эффективность лечения можно оценить по генотипическому уровню ААТ в сыворотке, функции легких, спирометрическому тесту, флюорографии легких, компьютерной томографии легких, анализу крови на функцию печени или ультразвуковому исследованию печени.

В некоторых вариантах осуществления лечение относится к повышению уровней ААТ в сыворотке, *например*, до защитных уровней. В некоторых вариантах осуществления лечение подразумевает повышение уровней ААТ в сыворотке крови,

*например*, в пределах нормального диапазона. В некоторых вариантах осуществления лечение относится к повышению уровней ААТ в сыворотке крови, *например*, выше 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 мг/дл, *например*, при измерении с помощью нефелометрии или иммунотурбидиметрии и очищенного стандарта.

В некоторых вариантах осуществления лечение относится к повышению уровней ААТ в сыворотке, *например*, до защитных уровней. В некоторых вариантах осуществления лечение подразумевает повышение уровней ААТ в сыворотке крови, *например*, в пределах нормального диапазона. В некоторых вариантах осуществления лечение относится к повышению уровней ААТ в сыворотке крови, *например*, выше 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 мг/дл, *например*, при измерении с помощью нефелометрии или иммунотурбидиметрии и очищенного стандарта. В некоторых вариантах осуществления лечение означает улучшение исходного уровня ААТ в сыворотке крови по сравнению с контролем, *например*, до и после лечения. В некоторых вариантах осуществления лечение относится к улучшению гистологической оценки заболевания печени, связанного с ААТД, *например*, на 1, 2, 3 или более баллов по сравнению с контролем, *например*, до и после лечения. В некоторых вариантах осуществления лечение означает улучшение оценку фиброза по шкале Исхака по сравнению с контролем, *например*, до и после лечения.

У нормальных или здоровых людей (*например*, у людей, которые не обладают аллелями ZZ, MZ или SZ) уровни ААТ в сыворотке варьируются от около 500 мкг/мл до около 3000 мкг/мл. Клинически уровень ААТ в кровотоке можно измерить с помощью ферментологического или иммунологического анализа (*например*, ИФА), способы которого хорошо известны в данной области техники. См., *например*, Stoller, J. and Aboussouan, L. (2005) Alpha1-antitrypsin deficiency. Lancet 365: 2225-2236; Kanakoudi F, Drossou V, Tzimouli V, et al: Serum concentrations of 10 acute-phase proteins in healthy term and pre-term infants from birth to age 6 months. Clin Chem 1995;41:605-608; Morse JO: Alpha-1-antitrypsin deficiency. N Engl J Med 1978;299:1045-1048, 1099-1105; Cox DW: Alpha-1-antitrypsin deficiency. In The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease. Vol 3. Seventh edition. Edited by CR Scriver, AL Beaudet, WS Sly, D Valle. New York, McGraw-Hill Book Company, 1995, pp 4125-4158.

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления композиции и способы, описанные в настоящем документе, пригодны для повышения уровней ААТ в сыворотке или плазме (*например*, функционального ААТ или ААТ дикого типа) у субъекта, страдающего ААТД (*например*, у индивидов, которые обладают ZZ, MZ или SZ аллель) или с риском развития ААТД (*например*, у индивидов, обладающих аллелями ZZ, MZ или SZ) до около 500 мкг/мл или более. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы, описанные в настоящем документе, пригодны для повышения уровня белка ААТ до около 1500 мкг/мл. В некоторых вариантах осуществления композиции и способы, описанные в настоящем документе, пригодны для повышения уровней белка ААТ от около 1000 мкг/мл до около 1500 мкг/мл, от около 1500 мкг/мл до около 2000 мкг/мл, от около 2000 мкг/мл до около 2500 мкг/мл, от около 2500 мкг/мл до около 3000 мкг/мл, или

более. Например, композиции и способы, описанные в настоящем документе, пригодны для повышения уровней ААТ в сыворотке или плазме у субъекта, имеющего ААТD, до около 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2100, 2200, 2300, 2400, 2500, 2600, 2700, 2800, 2900, 3000 мкг/мл, или более.

В некоторых вариантах осуществления композиции и способы, описанные в настоящем документе, пригодны для повышения уровней ААТ в сыворотке или плазме у субъектов, страдающих ААТD (*например*, индивидов, которые обладают аллелем ZZ, MZ или SZ) или с риском развития ААТD (*например*, индивидов, которые обладают аллелями ZZ, MZ или SZ) на около 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, или более по сравнению с уровнем ААТ в сыворотке или плазме субъекта до введения.

В некоторых вариантах осуществления композиции и способы, описанные в настоящем документе, пригодны для увеличения гетерологического функционального белка ААТ или активности ААТ в клетке-хозяине на около 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200% или более по сравнению с уровнем ААТ до введения в клетку-хозяина, *например*, нормальным уровнем. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клетка представляет собой клетку печени.

В некоторых вариантах осуществления клетка (клетка-хозяин) или популяция клеток способны экспрессировать ААТ, *например*, клетки, которые происходят из ткани любого одного или более органов: печени, легких, гастральных органов, почек, желудка, проксимального и дистального отдела тонкой кишки, поджелудочной железы, надпочечников или мозга.

В некоторых вариантах осуществления способ включает введение направляющей РНК и РНК-направляемого ДНК-связывающего агента (такого как мРНК, кодирующая нуклеазу Cas9) в ЛНЧ. В дополнительных вариантах осуществления способ включает введение конструкции нуклеиновой кислоты AAV, кодирующей белок ААТ, такой как двунаправленная конструкция ААТ. ЛНЧ CRISPR/Cas9, содержащий направляющую РНК и мРНК, кодирующую Cas9, можно вводить внутривенно. Донорную конструкцию ААТ AAV можно вводить внутривенно. Примерная дозировка ЛНЧ CRISPR/Cas9 включает около 0,1, 0,25, 0,3, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 или 10 мг/кг (РНК). Единицы мг/кг и «*mpk*» используются в данном документе взаимозаменяемо. Типичная дозировка AAV, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую белок ААТ, включает MOI около  $10^{11}$ ,  $10^{12}$ ,  $10^{13}$  и  $10^{14}$  вг/кг, необязательно MOI может составлять от около  $1 \times 10^{13}$  до  $1 \times 10^{14}$  вг/кг.

В некоторых вариантах осуществления способ включает экспрессию терапевтически эффективного количества белка ААТ. В некоторых вариантах

осуществления способ включает достижение терапевтически эффективного уровня активности ААТ в кровотоке у индивида. В конкретных вариантах осуществления способ включает достижение активности ААТ на уровне по меньшей мере от около 5% до около 50% от нормы. Способ может включать достижение активности ААТ на уровне по меньшей мере от около 50% до около 150% от нормы. В некоторых вариантах осуществления способ включает достижение увеличения активности ААТ по сравнению с исходной активностью ААТ пациента, составляющую по меньшей мере от около 1% до около 50% нормальной активности ААТ или по меньшей мере от около 5% до около 50% нормальной активности ААТ, или по меньшей мере от около 50% до около 150% нормальной активности ААТ.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает достижение длительного эффекта, *например*, по меньшей мере 1 год. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает достижение терапевтического эффекта длительным и устойчивым образом, *например*, по меньшей мере 1 год. В некоторых вариантах осуществления уровень активности ААТ в сыворотке или уровень является стабильным в течение по меньшей мере 1 года. В некоторых вариантах осуществления активность в равновесном состоянии или уровень белка ААТ достигается по меньшей мере через 7 дней, по меньшей мере 14 дней или по меньшей мере 28 дней. В дополнительных вариантах осуществления способ включает поддержание активности или уровней ААТ после однократного приема в течение по меньшей мере 1 года.

В дополнительных вариантах осуществления, включающих вставку в локус альбумина, уровни альбумина в кровотоке у индивида являются нормальными. Способ может включать поддержание уровней альбумина в кровотоке у индивида в пределах  $\pm 5\%$ ,  $\pm 10\%$ ,  $\pm 15\%$ ,  $\pm 20\%$  или  $\pm 50\%$  от нормальных уровней альбумина в кровотоке. В некоторых вариантах осуществления уровни альбумина у индивида не изменяются по сравнению с уровнями альбумина у индивидов без лечения по меньшей мере на 4-й неделе, 8-й неделе, 12-й неделе или 20-й неделе. В некоторых вариантах осуществления уровни альбумина у индивида временно падают, а затем возвращаются к нормальным уровням. В частности, способы могут включать обнаружение отсутствия существенных изменений в уровнях альбумина в плазме.

В некоторых вариантах осуществления способы, предложенные в настоящем документе, включают способ или применение модификации (*например*, создания двухцепочечного разрыва) гена альбумина, такого как ген альбумина человека, включающий введение или доставку в клетку-хозяина или популяцию клеток-хозяев любой одной или более нРНК, донорной конструкции (*например*, двунаправленной конструкции, содержащей последовательность, кодирующую ААТ), и РНК-направляемых ДНК-связывающих агентов (*например*, нуклеазы Cas), описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления способ включает способ или применение модификации (*например*, создания двухцепочечного разрыва) области интрона 1 альбумина, такого как интрон 1 альбумина человека, включающий введение или доставку

в клетку-хозяина или популяцию клеток-хозяев любой одной или более нРНК, донорной конструкции (*например*, двунаправленной конструкции, содержащей последовательность, кодирующую ААТ), и РНК-направляемых ДНК-связывающих агентов (*например*, нуклеазы Cas), описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления способ включает способ или применение модификации (*например*, создания двухцепочечного разрыва) безопасного локуса человека, такого как ткань печени или клетка-хозяин гепатоцит, включающий введение или доставку в клетку-хозяина или популяцию клеток-хозяев любой одной или более нРНК, донорной конструкции (*например*, двунаправленной конструкции, содержащей последовательность, кодирующую ААТ), и РНК-направляемых ДНК-связывающих агентов (*например*, нуклеазы Cas), описанных в настоящем документе. Вставка в безопасный локус, такой как локус альбумина, позволяет сверхэкспрессировать ген *SERPINA1* без значительного вредного воздействия на клетку-хозяина или популяцию клеток, например, клеток печени.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает способ или применение модификации (*например*, создания двухцепочечного разрыва) интрона 1 локуса альбумина человека, включающего введение или доставку в клетку-хозяина любой одной или более нРНК альбумина, донорной конструкции (*например*, двунаправленной конструкции, содержащей последовательность, кодирующую гетерологичный ААТ), и РНК-направляемых ДНК-связывающих агентов (*например*, нуклеазы Cas), описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления направляющая РНК альбумина содержит направляющую последовательность, которая содержит по меньшей мере 15, 16, 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов, которые способны связываться с областью в пределах интрона 1 локуса альбумина человека (SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления направляющая РНК альбумина содержит по меньшей мере 15, 16, 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33. В некоторых вариантах осуществления направляющая РНК альбумина содержит последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична или на 90% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33. В некоторых вариантах осуществления нРНК альбумина содержит направляющую последовательность, содержащую последовательность любой из SEQ ID NO: 4, 13, 17, 19, 27, 28, 30 или 31. В некоторых вариантах осуществления введение осуществляется *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления введение осуществляется *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления донорная конструкция представляет собой двунаправленную конструкцию, которая содержит последовательность, кодирующую гетерологичный ААТ. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку печени.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает способ или применение введения двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты, представленной в настоящем документе, в клетку-хозяина, включающий введение или доставку любой одной или более нРНК альбумина, донорной конструкции (*например*,

предложенной в настоящем документе двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты) и РНК-направляемых ДНК-связывающих агентов (*например*, нуклеазы Cas), описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления нРНК альбумина содержит направляющую последовательность, которая содержит по меньшей мере 15, 16, 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов, которые способны связываться с областью а пределах интрона 1 локуса альбумина человека (SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления направляющая РНК альбумина содержит по меньшей мере 15, 16, 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33. В некоторых вариантах осуществления направляющая РНК альбумина содержит последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична или на 90% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33. В некоторых вариантах осуществления нРНК альбумина содержит направляющую последовательность, содержащую последовательность любой из SEQ ID NO: 4, 13, 17, 19, 27, 28, 30 или 31. В некоторых вариантах осуществления нРНК альбумина содержит последовательность, выбранную из: а) последовательности, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32 или 33; б) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32 или 33; в) последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34, 40, 45, 51, 60, 61, 63, 64, 65, 66, 72, 77, 83, 92, 93, 95, 96 или 97; д) последовательности, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33; е) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33; ф) последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34-97; и г) последовательности, которая комплементарна 15 последовательным нуклеотидам +/- 5 нуклеотидов геномных координат, указанных для SEQ ID NO: 2-33. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку печени.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает способ или применение экспрессии гетерологичного ААТ (*например*, функционального ААТ или ААТ дикого типа) в клетке-хозяине, включающий введение или доставку любой одной или более нРНК альбумина, предложенной в настоящем документе двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты и РНК-направляемых ДНК-связывающих агентов (*например*, нуклеазы Cas), описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления субъект, нуждающийся в этом, находится в возрасте от рождения до 2 лет; от 2 до 12 лет; или от 12 до 21 года. В некоторых вариантах осуществления нРНК альбумина содержит направляющую последовательность, которая содержит по меньшей мере 15, 16, 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов, которые способны связываться с областью а пределах интрона 1 локуса альбумина человека (SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления нРНК альбумина содержит по меньшей

мере 15, 16, 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33. В некоторых вариантах осуществления нРНК альбумина содержит последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична или на 90% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33. В некоторых вариантах осуществления нРНК альбумина содержит направляющую последовательность, содержащую последовательность любой из SEQ ID NO: 4, 13, 17, 19, 27, 28, 30 или 31. В некоторых вариантах осуществления нРНК альбумина содержит последовательность, выбранную из: а) последовательности, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32 или 33; б) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32 или 33; в) последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34, 40, 45, 51, 60, 61, 63, 64, 65, 66, 72, 77, 83, 92, 93, 95, 96 или 97; д) последовательности, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33; е) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33; ф) последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34-97; и г) последовательности, комплементарной 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 последовательным нуклеотидам в пределах геномных координат или охватывающих геномные координаты, указанные для SEQ ID NO: 2-33. В некоторых вариантах осуществления введение осуществляется *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления введение осуществляется *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку печени.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предлагает способ или применение лечения ААТД, включающее введение или доставку двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты, представленной в настоящем документе, и РНК-направляемых ДНК-связывающих агентов (*например*, нуклеазы Cas), описанных в настоящем документе, субъекту, нуждающемуся в этом. В некоторых вариантах осуществления нРНК альбумина содержит направляющую последовательность, которая содержит по меньшей мере 15, 16, 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов, которые способны связываться с областью а в пределах интрона 1 локуса альбумина мыши или человека (SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления нРНК альбумина содержит по меньшей мере 15, 16, 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33. В некоторых вариантах осуществления нРНК альбумина содержит последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична или на 90% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33. В некоторых вариантах осуществления нРНК альбумина содержит направляющую последовательность, содержащую последовательность любой из SEQ ID NO: 4, 13, 17, 19, 27, 28, 30 или 31. В некоторых

вариантах осуществления нРНК альбумина содержит последовательность, выбранную из: а) последовательности, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32, 33; б) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 8, 13, 19, 28, 29, 31, 32, 33; в) последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34, 40, 45, 51, 60, 61, 63, 64, 65, 66, 72, 77, 83, 92, 93, 95, 96 и 97; д) последовательности, которая по меньшей мере на 95%, 90%, 85%, 80% или 75% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33; е) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33; ф) последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34-97; и г) последовательности, которая комплементарна 15 последовательным нуклеотидам +/- 5 нуклеотидов геномных координат, указанных для SEQ ID NO: 2-33. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку печени.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предлагает способ или применение увеличения функциональной секреции ААТ клеткой печени, включающие введение или доставку любой одной или более нРНК альбумина, предложенной в настоящем документе двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты и РНК-направляемых ДНК-связывающих агентов (*например*, нуклеазы Cas), описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления нРНК альбумина содержит направляющую последовательность, которая содержит по меньшей мере 15, 16, 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов, которые способны связываться с областью а пределах интрона 1 локуса альбумина мыши или человека (SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах осуществления нРНК альбумина содержит по меньшей мере 15, 16, 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33. В некоторых вариантах осуществления нРНК альбумина содержит последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична или на 90% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33. В некоторых вариантах осуществления нРНК альбумина содержит направляющую последовательность, содержащую последовательность любой из SEQ ID NO: 4, 13, 17, 19, 27, 28, 30 или 31. В некоторых вариантах осуществления введение осуществляется *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления введение осуществляется *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку печени.

Как описано в настоящем документе, двунаправленная конструкция нуклеиновой кислоты, представленная в настоящем документе, нРНК альбумина и РНК-направляемый ДНК-связывающий агент могут быть доставлены с использованием любой подходящей системы доставки и способа, известных в данной области техники. Композиции можно доставлять *in vitro* или *in vivo* одновременно или в любом последовательном порядке. В некоторых вариантах осуществления двунаправленная конструкция нуклеиновой кислоты, представленная в настоящем документе, нРНК альбумина и нуклеаза Cas могут быть

доставлены *in vitro* или *in vivo* одновременно, *например*, в одном векторе, двух векторах, отдельных векторах, одной ЛНЧ, двух ЛНЧ, отдельных ЛНЧ или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления двунаправленная конструкция нуклеиновой кислоты, представленная в настоящем документе, может быть доставлена *in vivo* или *in vitro* в виде вектора или связана с ЛНЧ до (*например*, около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или более дней) доставки нРНК альбумина или нуклеазы Cas в виде вектора или связанной с ЛНЧ по отдельности или вместе в виде рибонуклеопротеина (РНП). В качестве дополнительного примера направляющая РНК и нуклеаза Cas в виде вектора или связанные с ЛНЧ по отдельности или вместе в виде рибонуклеопротеина (РНП) могут быть доставлены *in vivo* или *in vitro* до (*например*, около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или более дней) доставки конструкции в виде вектора или связанной с ЛНЧ. В некоторых вариантах осуществления направляющая РНК и нуклеаза Cas связаны с ЛНЧ и доставляются в клетку-хозяина до доставки двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты, представленной в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления двунаправленная конструкция нуклеиновой кислоты, представленная в настоящем документе, содержит последовательность, кодирующую гетерологичный ААТ, причем последовательность ААТ представляет собой ААТ дикого типа, *например*, SEQ ID NO: 700 или 702. В некоторых вариантах осуществления последовательность кодирует функциональный вариант ААТ. Например, этот вариант обладает повышенной активностью ингибирования трипсина, чем ААТ дикого типа. В некоторых вариантах осуществления последовательность кодирует вариант ААТ, который на 80%, 85%, 90%, 93%, 95%, 97%, 99% идентичен SEQ ID NO: 702, содержащий по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 96%, 98%, 99%, 100% или более активности по сравнению с ААТ дикого типа. В некоторых вариантах осуществления последовательность кодирует функциональный фрагмент ААТ, причем этот фрагмент обладает по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 92%, 94%, 96%, 98%, 99%, 100% или более активностью по сравнению с ААТ дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления двунаправленную конструкцию нуклеиновой кислоты, представленную в настоящем документе, вводят в векторе нуклеиновой кислоты, таком как вектор AAV, *например*, AAV8. В некоторых вариантах осуществления донорная конструкция не содержит плеча гомологии.

В некоторых вариантах осуществления субъектом является млекопитающее. В некоторых вариантах осуществления субъектом является человек.

В некоторых вариантах осуществления двунаправленную конструкцию нуклеиновой кислоты, представленную в настоящем документе, нРНК альбумина и РНК-направляемый ДНК-связывающий агент вводят внутривенно. В некоторых вариантах осуществления двунаправленную конструкцию нуклеиновой кислоты, представленную в настоящем документе, нРНК альбумина и РНК-направляемый ДНК-связывающий агент вводят в печеночный кровоток.

В некоторых вариантах осуществления однократное введение двунаправленной

конструкции нуклеиновой кислоты, представленной в настоящем документе, нРНК альбумина и РНК-направляемого ДНК-связывающего агента достаточно для увеличения экспрессии и секреции ААТ до желательного уровня. В других вариантах осуществления более чем одно введение композиции, содержащей двунаправленную конструкцию нуклеиновой кислоты, представленную в настоящем документе, нРНК альбумина и РНК-направляемый ДНК-связывающий агент, может быть полезным для максимизации терапевтического эффекта.

В некоторых вариантах осуществления многократные введения двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты, представленной в настоящем документе, нРНК альбумина и РНК-направляемого ДНК-связывающего агента используют для увеличения экспрессии и секреции ААТ до желаемого уровня или максимального редактирования за счет кумулятивных эффектов. В некоторых вариантах осуществления многократное введение направляющей РНК альбумина используется для увеличения экспрессии и секреции ААТ до желаемого уровня или максимального редактирования за счет кумулятивных эффектов. В некоторых вариантах осуществления многократное введение нуклеазы Cas используется для увеличения экспрессии и секреции ААТ до желаемого уровня или максимального редактирования за счет кумулятивных эффектов. .

В некоторых вариантах осуществления способ лечения ААТД дополнительно включает введение направляющей РНК SERPINA1, содержащей любую одну или более направляющих последовательностей SEQ ID NO: 1000-1131. В некоторых вариантах осуществления нРНК SERPINA1, содержащие любую одну или более направляющих последовательностей SEQ ID NO: 1000-1131, вводят для лечения ААТД. Направляющие РНК SERPINA1 можно вводить вместе с белком Cas или мРНК или вектором, кодирующим белок Cas, такой как, например, Cas9.

В некоторых вариантах осуществления способ лечения ААТД включает снижение или предотвращение накопления ААТ (*например*, мутантного, нефункционального ААТ) в сыворотке, печени, ткани печени, клетках печени или гепатоцитах субъекта, включающий введение направляющей РНК SERPINA1, содержащей любую одну или более направляющих последовательностей SEQ ID NO: 1000-1131. В некоторых вариантах осуществления нРНК SERPINA1, содержащие любую одну или более направляющих последовательностей SEQ ID NO: 1000-1131, вводят для снижения или предотвращения накопления ААТ (*например*, мутантного, нефункционального ААТ) в печени, тканях печени, клетках печени или гепатоцитах. нРНК можно вводить вместе с РНК-направляемым ДНК-связывающим агентом, таким как белок Cas или мРНК или вектор, кодирующий белок Cas, такой как, например, Cas9.

В некоторых вариантах осуществления нРНК SERPINA1, содержащие направляющие последовательности из Таблицы 2, вместе с белком Cas индуцируют DSB, а негомологичное соединение концов (NHEJ) во время репарации приводит к мутации в гене *SERPINA1*. В некоторых вариантах осуществления NHEJ приводит к делеции или вставке нуклеотида(ов), что индуцирует сдвиг рамки считывания или нонсенс-мутацию в

гене *SERPINA1*. В некоторых вариантах осуществления нРНК, содержащие направляющие последовательности из Таблицы 2, вместе с белком Cas индуцируют DSB, а репарация NHEJ опосредует вставку конструкции матричной нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления вставка матричной нуклеиновой кислоты увеличивает уровни секретируемого белка ААТ. В некоторых вариантах осуществления вставка матричной нуклеиновой кислоты увеличивает уровни секретируемого гетерологичного белка ААТ. В некоторых вариантах осуществления вставка матричной нуклеиновой кислоты увеличивает уровни белка ААТ в крови, сыворотке или плазме.

В некоторых вариантах осуществления введение направляющих РНК *SERPINA1*, описанных в настоящем документе, снижает уровни эндогенного альфа-1-антитрипсина (ААТ), продуцируемого субъектом, и, следовательно, предотвращает накопление и агрегацию ААТ в печени.

В некоторых вариантах осуществления однократное введение направляющей РНК *SERPINA1*, описанной в настоящем документе, достаточно для снижения экспрессии эндогенного белка. В некоторых вариантах осуществления однократное введение направляющей РНК *SERPINA1*, описанной в настоящем документе, достаточно для нокдауна или нокаута экспрессии эндогенного белка. В других вариантах осуществления более чем одно введение направляющей РНК *SERPINA1*, описанной в настоящем документе, может быть полезным для максимизации редактирования за счет кумулятивных эффектов.

В некоторых вариантах осуществления экспрессия эндогенного белка ААТ снижается путем введения терапевтического нуклеинового кислоты, отличной от направляющей РНК. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой агент РНКи. Типичные агенты иРНК, нацеленные на *SERPINA1*, представлены, например, в WO2018098117, WO2015003113 и WO2015195628A2. Описаны эффективные агенты РНКи, нацеленные на нуклеотиды 957-977, 1418-1424 и 1423-1435. Способы получения агентов РНКи и их применения для снижения экспрессии эндогенного белка ААТ у субъекта и лечения ААТД представлены в цитируемых публикациях и известны в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления введение инсерционных направляющих РНК, описанных в настоящем документе, увеличивает уровни альфа-1-антитрипсина (ААТ) в кровотоке, продуцируемого субъектом, и, следовательно, предотвращает повреждение, связанное с высокой активностью эластазы нейтрофилов.

В некоторых вариантах осуществления однократное или многократное введение инсерционной направляющей РНК, описанной в настоящем документе, достаточно для увеличения экспрессии функционального белка ААТ. В некоторых вариантах осуществления однократное или многократное введение инсерционной направляющей РНК, описанной в настоящем документе, достаточно для дополнения или восстановления экспрессии активности белка ААТ. В некоторых вариантах осуществления инсерционная направляющая РНК приводит к увеличению уровней ААТ в сыворотке, например, до

защитных уровней (*например*, на уровне 80 мг/дл или выше при измерении с помощью иммунодиффузии, на уровне 50 мг/дл или выше при измерении с помощью нефелометрии или иммунотурбидиметрии и очищенного стандарта). В некоторых вариантах осуществления инсерционная направляющая РНК приводит к увеличению уровней ААТ в сыворотке, *например*, до нормальных уровней (*например*, на уровне 150-350 мг/дл при измерении с помощью иммунодиффузии, на уровне 90-200 мг/дл при измерении с помощью нефелометрии или иммунотурбидиметрии и очищенного стандарта). В некоторых вариантах осуществления инсерционная направляющая РНК приводит к улучшению гистологической оценки заболевания печени, связанного с ААТД, *например*, на 1, 2, 3 или более баллов по сравнению с контролем, *например*, до и после лечения. В некоторых вариантах осуществления инсерционная направляющая РНК приводит к улучшению показателя фиброза по шкале Исхака по сравнению с контролем, *например*, до и после лечения. В некоторых вариантах осуществления однократное введение улучшает показатели заболевания легких, *например*, по данным тестирования функции легких (PFT), функциональной остаточной емкости (RFC) или потери плотности легких при общей емкости легких (TLC). В других вариантах осуществления более чем одно введение инсерционной направляющей РНК, описанной в настоящем документе, может быть полезным для максимизации редактирования за счет кумулятивных эффектов.

В некоторых вариантах осуществления эффективность лечения композициями, представленными в настоящем документе, проявляется через 1 год, 2 года, 3 года, 4 года, 5 лет или 10 лет после доставки.

В некоторых вариантах осуществления лечение замедляет или останавливает прогрессирование заболевания легких, связанного с ААТД. В некоторых вариантах осуществления заболевание легких измеряют по изменениям в структуре легких, функции легких или симптомам у субъекта. В некоторых вариантах осуществления эффективность лечения измеряется увеличением времени выживания субъекта.

В некоторых вариантах осуществления эффективность лечения измеряют по замедлению развития легочных заболеваний. В некоторых вариантах осуществления эффективность лечения измеряют по замедлению развития легочных заболеваний. В некоторых вариантах осуществления эффективность лечения измеряют по замедлению прогрессирования любой одной или более COPD, эмфиземы или одышки. В некоторых вариантах осуществления эффективность лечения измеряется улучшением или стабилизацией любого одного или нескольких показателей кашля, выделения мокроты или свистящего дыхания.

В некоторых вариантах осуществления лечение замедляет или останавливает прогрессирование заболевания печени. В некоторых вариантах осуществления лечение улучшает показатели заболевания печени. В некоторых вариантах осуществления заболевание печени оценивают по изменениям в структуре печени, функции печени или симптомам у субъекта.

В некоторых вариантах осуществления эффективность лечения измеряется

способностью отсрочить или избежать трансплантации печени субъекту. В некоторых вариантах осуществления эффективность лечения измеряется увеличением времени выживания субъекта.

В некоторых вариантах осуществления эффективность лечения измеряют по снижению уровня печеночных ферментов в крови. В некоторых вариантах осуществления ферменты печени представляют собой аланинтрансаминазу (ALT) или аспартаттрансаминазу (AST).

В некоторых вариантах осуществления эффективность лечения измеряют по замедлению развития рубцовой ткани или уменьшению рубцовой ткани в печени на основании результатов биопсии.

В некоторых вариантах осуществления эффективность лечения измеряют с использованием результатов, сообщаемых пациентом, таких как утомляемость, слабость, зуд, потеря аппетита, потеря веса, тошнота или вздутие живота. В некоторых вариантах осуществления эффективность лечения измеряют по уменьшению отеков, асцита или желтухи. В некоторых вариантах осуществления эффективность лечения измеряют по снижению портальной гипертензии. В некоторых вариантах осуществления эффективность лечения измеряют по снижению заболеваемости раком печени.

В некоторых вариантах осуществления эффективность лечения измеряют с использованием методов визуализации. В некоторых вариантах осуществления способами визуализации являются ультразвук, компьютерная томография, магнитно-резонансная томография или эластография.

В некоторых вариантах осуществления уровни ААТ в сыворотке или печени (*например*, мутантного нефункционального ААТ) снижаются на 70-95%, 80-95%, 85-95%, 80-99% или 85-99% по сравнению с уровнями ААТ в сыворотке или печени (*например*, мутантного нефункционального ААТ) до введения композиции.

В некоторых вариантах осуществления процент редактирования гена *SERPINA1* составляет 70-99%. В некоторых вариантах осуществления процент редактирования составляет 70-95%, 80-95%, 85-95%, 80-99% или 85-99%.

В некоторых вариантах осуществления использование любой одной или более направляющих РНК (нРНК альбумина; или нРНК *SERPINA1*), содержащих любую одну или более направляющих последовательностей в Таблице 1, Таблице 2 или Таблице 3 (*например*, в композиции, представленной в настоящем документе), предложено для приготовления лекарственного средства для лечения человека, страдающего ААТД.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает комбинированную терапию, включающую любую одну или более нРНК, содержащих любую одну или более направляющих последовательностей, описанных в Таблице 1 или Таблице 2, вместе с аугментационной терапией, подходящей для облегчения симптомов ААТД со стороны легких. В некоторых вариантах осуществления аугментационная терапия заболеваний легких представляет собой внутривенную терапию ААТ,

очищенного из плазмы человека, как описано в Turner, *BioDrugs 2013 Dec;27(6):547-58*. В некоторых вариантах осуществления аугментационная терапия проводится с Prolastin<sup>®</sup>, Zemaira<sup>®</sup>, Aralast<sup>®</sup> или Kamada<sup>®</sup>.

В некоторых вариантах осуществления комбинированная терапия включает любую одну или более нРНК, содержащих любую одну или более направляющих последовательностей, описанных в Таблице 1, с двунаправленной конструкцией, содержащей первую последовательность, кодирующую полипептид альфа-1-антитрипсина (ААТ), и вторую последовательность, кодирующую полипептид альфа-1-антитрипсина (ААТ), вместе с киРНК, которая нацелена на последовательность АТТ дикого типа. В некоторых вариантах осуществления киРНК представляет собой любую киРНК, способную дополнительно снижать или устранять экспрессию ААТ дикого типа или мутантного ААТ. В некоторых вариантах осуществления киРНК вводят после любой одной или более нРНК, содержащих любую одну или более направляющих последовательностей, описанных в Таблице 1, и двунаправленной конструкции. В некоторых вариантах осуществления киРНК вводят регулярно после лечения любой из композиций нРНК из Таблицы 1 и двунаправленных конструкций, представленных в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления комбинированная терапия включает любую одну или более нРНК, содержащих любую одну или более направляющих последовательностей, описанных в Таблице 1, с двунаправленной конструкцией, содержащей первую последовательность, кодирующую полипептид альфа-1-антитрипсина (ААТ), и вторую последовательность, кодирующую полипептид альфа-1-антитрипсина (ААТ), вместе с одним или более курсами лечения для прекращения курения, профилактическими вакцинациями, бронхолитиками, дополнительным кислородом при наличии показаний и физической реабилитацией в программе, аналогичной той, которая разработана для пациентов с COPD, связанным с курением.

Это описание и иллюстративные варианты осуществления не следует рассматривать как ограничивающие. Для целей настоящего описания и прилагаемых вариантов осуществления, если не указано иное, все числа, выражающие количества, проценты или пропорции, а также другие числовые значения, используемые в описании и вариантах осуществления, следует понимать как модифицированные во всех случаях термином «около», в той степени, в которой они еще не модифицированы. Соответственно, если не указано иное, числовые параметры, изложенные в следующем описании и прилагаемых вариантах осуществления, являются приближениями, которые могут варьироваться в зависимости от желаемых свойств, которые необходимо получить. Как минимум, что не стоит трактовать как попытку ограничить применение доктрины эквивалентов объемом вариантов осуществления, каждый числовой параметр необходимо, по меньшей мере, толковать с учетом числа приведенных значимых цифр и путем применения обычных методов округления.

Последовательность белка ААТ человека (SEQ ID NO: 700) номер NCBI №

NP\_000286:

MPSSVSWGILLLAGLCLVPVSLAEDPQGDAAQKTDTSHHDDQDHPTFNKITPNL  
AEFAFSLYRQLAHQSNSTNIFFSPVSIATAFAMLSLGTKADTHDEILEGLNFNLTEIPEAQI  
HEGFQELLRTLNPDSQLQLTTGNGLFLSEGLKLVDFLEDVKKLYHSEAFVNFVGDTE  
EAKKQINDYVEKGTQGKIVDLVKELDRDTVFAVNYIFFKKGKWERPFVVKDTEEDDFH  
VDQVTTVKVPMMKRLGMFNIQHCKKLSSWVLLMKYLGNATAIFFLPDEGKLQHLENE  
LTHDIITKFLNEDRRSASLHLPKLSITGTYDLKSVLGQLGITKVFSNGADLSGVTEEAPL  
KLSKAVHKAVLTIDEKGTAAAGAMFLEAIPMSIPPEVKFNKPFVFLMIEQNTKSPLFMGK  
VVNPTQK

Нуклеотидная последовательность ААТ человека (SEQ ID NO: 701) номер NCBI №  
NM\_000295):

ACAATGACTCCTTTCGGTAAGTGCAGTGGAAGCTGTACACTGCCCAGGCAAA  
GCGTCCGGGCAGCGTAGGCGGGCGACTCAGATCCCAGCCAGTGGACTTAGCCCCTG  
TTTGCTCCTCCGATAACTGGGGTGACCTTGGTTAATATTCACCAGCAGCCTCCCCCGT  
TGCCCCTCTGGATCCACTGCTTAAATACGGACGAGGACAGGGCCCTGTCTCCTCAGC  
TTCAGGCACCACCACTGACCTGGGACAGTGAATCGACAATGCCGTCTTCTGTCTCGT  
GGGGCATCCTCCTGCTGGCAGGCCTGTGCTGCCTGGTCCCTGTCTCCCTGGCTGAGG  
ATCCCCAGGGAGATGCTGCCCAGAAGACAGATACATCCCACCATGATCAGGATCAC  
CCAACCTTCAACAAGATCACCCCCAACCTGGCTGAGTTCGCCTTCAGCCTATACCGC  
CAGCTGGCACACCAGTCCAACAGCACCAATATCTTCTTCTCCCCAGTGAGCATCGCT  
ACAGCCTTTGCAATGCTCTCCCTGGGGACCAAGGCTGACACTCACGATGAAATCCTG  
GAGGGCCTGAATTTCAACCTCACGGAGATTCCGGAGGCTCAGATCCATGAAGGCTT  
CCAGGAACTCCTCCGTACCCTCAACCAGCCAGACAGCCAGCTCCAGCTGACCACCG  
GCAATGGCCTGTTCTCAGCGAGGGCCTGAAGCTAGTGGATAAGTTTTTGGAGGATG  
TAAAAAAGTTGTACCACTCAGAAGCCTTCACTGTCAACTTCGGGGACACCGAAGAG  
GCCAAGAAACAGATCAACGATTACGTGGAGAAGGGTACTCAAGGGAAAATTGTGG  
ATTTGGTCAAGGAGCTTGACAGAGACACAGTTTTTGTCTCTGGTGAATTACATCTTCT  
TTAAAGGCAAATGGGAGAGACCCTTTGAAGTCAAGGACACCGAGGAAGAGGACTTC  
CACGTGGACCAGGTGACCACCGTGAAGGTGCCTATGATGAAGCGTTTAGGCATGTTT  
AACATCCAGCACTGTAAGAAGCTGTCCAGCTGGGTGCTGCTGATGAAATACCTGGG  
CAATGCCACCGCCATCTTCTTCCCTGCCTGATGAGGGGAAACTACAGCACCTGGAAAA  
TGAACTCACCCACGATATCATCACCAAGTTCCTGGAAAATGAAGACAGAAGGTCTG  
CCAGCTTACATTTACCCAAACTGTCCATTACTGGAACCTATGATCTGAAGAGCGTCC  
TGGGTCAACTGGGCATCACTAAGGTCTTCAGCAATGGGGCTGACCTCTCCGGGGTCA  
CAGAGGAGGCACCCCTGAAGCTCTCCAAGGCCGTGCATAAGGCTGTGCTGACCATC  
GACGAGAAAGGGACTGAAGCTGCTGGGGCCATGTTTTTAGAGGCCATAACCCATGTC  
TATCCCCCCCCGAGGTCAAGTTCAACAAACCCTTTGTCTTCTTAATGATTGAACAAAA  
TACCAAGTCTCCCCTCTTCATGGGAAAAGTGGTGAATCCCACCCAAAAATAACTGCC  
TCTCGCTCCTCAACCCCTCCCCTCCATCCCTGGCCCCCTCCCTGGATGACATTAAAGA  
AGGGTTGAGCTGGTCCCTGCCTGCATGTGACTGTAAATCCCTCCCATGTTTTCTCTGA

GTCTCCCTTTGCCTGCTGAGGCTGTATGTGGGCTCCAGGTAACAGTGCTGTCTTCGG  
 GCCCCCTGAACTGTGTTTCATGGAGCATCTGGCTGGGTAGGCACATGCTGGGCTTGAA  
 TCCAGGGGGGACTGAATCCTCAGCTTACGGACCTGGGCCCATCTGTTTCTGGAGGGC  
 TCCAGTCTTCCTTGTCTGTCTTGGAGTCCCCAAGAAGGAATCACAGGGGAGGAACC  
 AGATAACAGCCATGACCCCAGGCTCCACCAAGCATCTTCATGTCCCCCTGCTCATCC  
 CCCACTCCCCCCCACCCAGAGTTGCTCATCCTGCCAGGGCTGGCTGTGCCACCCCA  
 AGGCTGCCCTCCTGGGGGGCCCCAGAAGTGCCTGATCGTGCCGTGGCCAGTTTTGTG  
 GCATCTGCAGCAACACAAGAGAGAGGACAATGTCCTCCTCTTGACCCGCTGTCACCT  
 AACCAGACTCGGGCCCTGCACCTCTCAGGCACTTCTGGAAAATGACTGAGGCAGAT  
 TCTTCCTGAAGCCCATTCTCCATGGGGCAACAAGGACACCTATTCTGTCCTTGTCTT  
 CCATCGCTGCCCCAGAAAGCCTCACATATCTCCGTTTAGAATCAGGTCCCTTCTCCC  
 CAGATGAAGAGGAGGGTCTCTGCTTTGTTTTCTCTATCTCCTCCTCAGACTTGACCAG  
 GCCCAGCAGGCCCCAGAAGACCATTACCCTATATCCCTTCTCCTCCCTAGTCACATG  
 GCCATAGGCCTGCTGATGGCTCAGGAAGGCCATTGCAAGGACTCCTCAGCTATGGG  
 AGAGGAAGCACATCACCCATTGACCCCCGCAACCCCTCCCTTTCCTCCTCTGAGTCC  
 CGACTGGGGCCACATGCAGCCTGACTTCTTTGTGCCTGTTGCTGTCCCTGCAGTCTTC  
 AGAGGGCCACCGCAGCTCCAGTGCCACGGCAGGAGGCTGTTTCTGAATAGCCCCTG  
 TGGTAAGGGCCAGGAGAGTCCTTCCATCCTCCAAGGCCCTGCTAAAGGACACAGCA  
 GCCAGGAAGTCCCCTGGGCCCCTAGCTGAAGGACAGCCTGCTCCCTCCGTCTCTACC  
 AGGAATGGCCTTGTCTATGGAAGGCACTGCCCCATCCCAAATAATCTAGGAATCA  
 CTGTCTAACCCTCACTGTCATGAATGTGTACTTAAAGGATGAGGTTGAGTCATAACC  
 AAATAGTGATTTTCGATAGTTCAAAATGGTGAAATTAGCAATTCTACATGATTCAGTC  
 TAATCAATGGATACCGACTGTTTCCCACACAAGTCTCCTGTTCTCTTAAGCTTACTCA  
 CTGACAGCCTTTCCTCTCCACAAATACATTAAGATATGGCCATCACCAAGCCCC  
 TAGGATGACACCAGACCTGAGAGTCTGAAGACCTGGATCCAAGTTCTGACTTTTCCC  
 CCTGACAGCTGTGTGACCTTCGTGAAGTCGCCAAACCTCTCTGAGCCCCAGTCATTG  
 CTAGTAAGACCTGCCTTTGAGTTGGTATGATGTTCAAGTTAGATAACAAAATGTTTA  
 TACCCATTAGAACAGAGAATAAATAGAACTACATTTCTTGCA

Полипептид альфа-1-антитрипсина, кодируемый P00450 (SEQ ID NO: 702):

EDPQGDAAQKTDTSHHHDQDHPTFNKITPNLAEFASFSLYRQLAHQSNSTNIFFSPV  
 SIATAFAMLSLGTKADTHDEILEGLNFNLTEIPEAQIHEGFQELLRTLNPDSQLQLTTGN  
 GLFLSEGLKLVDFLEDVKKLYHSEAFTVNFVDTEEAKKQINDYVEKGTQGKIVDLVKE  
 LDRDVFALVNYIFFKKGKWERPFVVDTEEDFHVDQVTTVKVPMKRLGMFNIQHCK  
 KLSSWVLLMKYLGNATAIFFLPDEGKLQHLENELTHDIITKFLNEDRRSASLHLPKLSIT  
 GTYDLKSVLGLGITKVFNSGADLSGVTEEAPLKLSKAVHKAVLTIDEKGTAAAGAMFL  
 EAIPMSIPPEVKFNKPFVFLMIEQNTKSPLFMGKVVNPTQK

Нуклеотидная последовательность ААТ человека (SEQ ID NO: 703) номер NCBI №  
 NM\_001127700.2):

AGAGTCCTGAGCTGAACCAAGAAGGAGGAGGGGGTCCGGGCCTCCGAGGAAG  
 GCCTAGCCGCTGCTGCTGCCAGGAATTCCAGGTTGGAGGGGGCGGCAACCTCCTGCC

AGCCTTCAGGCCACTCTCCTGTGCCTGCCAGAAGAGACAGAGCTTGAGGAGAGCTT  
GAGGAGAGCAGGAAAGGTGGGACATTGCTGCTGCTGCTCACTCAGTTCCACAGGAC  
AATGCCGTCTTCTGTCTCGTGGGGCATCCTCCTGCTGGCAGGCCTGTGCTGCCTGGTC  
CCTGTCTCCCTGGCTGAGGATCCCCAGGGAGATGCTGCCCAGAAGACAGATACATC  
CCACCATGATCAGGATCACCCAACCTTCAACAAGATCACCCCCAACCTGGCTGAGTT  
CGCCTTCAGCCTATAACGCCAGCTGGCACACCAGTCCAACAGCACCAATATCTTCTT  
CTCCCCAGTGAGCATCGCTACAGCCTTTGCAATGCTCTCCCTGGGGACCAAGGCTGA  
CACTCACGATGAAATCCTGGAGGGCCTGAATTTCAACCTCACGGAGATTCCGGAGG  
CTCAGATCCATGAAGGCTTCCAGGAACTCCTCCGTACCCTCAACCAGCCAGACAGCC  
AGCTCCAGCTGACCACCGGCAATGGCCTGTTCTCAGCGAGGGCCTGAAGCTAGTG  
GATAAGTTTTTGGAGGATGTTAAAAAGTTGTACCACTCAGAAGCCTTCACTGTCAAC  
TTCGGGGACACCGAAGAGGCCAAGAAACAGATCAACGATTACGTGGAGAAGGGTA  
CTCAAGGGAAAATTGTGGATTTGGTCAAGGAGCTTGACAGAGACACAGTTTTTGTCTC  
TGGTGAATTACATCTTCTTTAAAGGCAAATGGGAGAGACCCTTTGAAGTCAAGGAC  
ACCGAGGAAGAGGACTTCCACGTGGACCAGGTGACCACCGTGAAGGTGCCTATGAT  
GAAGCGTTTAGGCATGTTTAAACATCCAGCACTGTAAGAAGCTGTCCAGCTGGGTGCT  
GCTGATGAAATACCTGGGCAATGCCACCGCCATCTTCTTCCCTGCCTGATGAGGGGAA  
ACTACAGCACCTGGAAAATGAACTCACCCACGATATCATCACCAAGTTCCTGGAAA  
ATGAAGACAGAAGGTCTGCCAGCTTACATTTACCCAAACTGTCCATTACTGGAACCT  
ATGATCTGAAGAGCGTCCTGGGTCAACTGGGCATCACTAAGGTCTTCAGCAATGGG  
GCTGACCTCTCCGGGGTACAGAGGAGGCACCCCTGAAGCTCTCCAAGGCCGTGCA  
TAAGGCTGTGCTGACCATCGACGAGAAAGGGACTGAAGCTGCTGGGGCCATGTTTT  
TAGAGGCCATACCCATGTCTATCCCCCGAGGTCAAGTTCAACAAACCCTTTGTCT  
TCTTAATGATTGAACAAAATACCAAGTCTCCCCTCTTCATGGGAAAAGTGGTGAATC  
CCACCCAAAATAACTGCCTCTCGCTCCTCAACCCCTCCCCTCCATCCCTGGCCCCCT  
CCCTGGATGACATTAAAGAAGGGTTGAGCTGGTCCCTGCCTGCATGTGACTGTAAT  
CCCTCCCATGTTTTCTCTGAGTCTCCCTTTGCCTGCTGAGGCTGTATGTGGGCTCCAG  
GTAACAGTGCTGTCTTCGGGCCCCCTGAACTGTGTTTCATGGAGCATCTGGCTGGGTA  
GGCACATGCTGGGCTTGAATCCAGGGGGGACTGAATCCTCAGCTTACGGACCTGGG  
CCCATCTGTTTCTGGAGGGCTCCAGTCTTCTTGTCTGTCTTGGAGTCCCCAAGAAG  
GAATCACAGGGGAGGAACCAGATACCAGCCATGACCCCAGGCTCCACCAAGCATCT  
TCATGTCCCCCTGCTCATCCCCACTCCCCCCCACCCAGAGTTGCTCATCCTGCCAGG  
GCTGGCTGTGCCACCCCAAGGCTGCCCTCCTGGGGGGCCCCAGAAGTGCCTGATCGT  
GCCGTGGCCCAGTTTTGTGGCATCTGCAGCAACACAAGAGAGAGGACAATGTCTCTC  
CTCTTGACCCGCTGTCACCTAACCAGACTCGGGCCCTGCACCTCTCAGGCACTTCTG  
GAAAATGACTGAGGCAGATTCTTCTGAAGCCCATTCTCCATGGGGCAACAAGGAC  
ACCTATTCTGTCCTTGTCTTCCATCGCTGCCCCAGAAAGCCTCACATATCTCCGTTT  
AGAATCAGGTCCCTTCTCCCCAGATGAAGAGGAGGGTCTCTGCTTTGTTTTCTCTATC  
TCCTCCTCAGACTTGACCAGGCCAGCAGGCCCCAGAAGACCATTACCCTATATCCC  
TTCTCCTCCCTAGTCACATGGCCATAGGCCTGCTGATGGCTCAGGAAGGCCATTGCA

AGGACTCCTCAGCTATGGGAGAGGAAGCACATCACCCATTGACCCCCGCAACCCCT  
 CCCTTTCCTCCTCTGAGTCCCGACTGGGGCCACATGCAGCCTGACTTCTTTGTGCCTG  
 TTGCTGTCCCTGCAGTCTTCAGAGGGCCACCGCAGCTCCAGTGCCACGGCAGGAGGC  
 TGTTCCCTGAATAGCCCCCTGTGGTAAGGGCCAGGAGAGTCCTTCCATCCTCCAAGGCC  
 CTGCTAAAGGACACAGCAGCCAGGAAGTCCCCTGGGCCCTAGCTGAAGGACAGCC  
 TGCTCCCTCCGTCTCTACCAGGAATGGCCTTGTCTTATGGAAGGCACTGCCCCATCC  
 CAAACTAATCTAGGAATCACTGTCTAACCCTCACTGTCATGAATGTGTACTTAAAG  
 GATGAGGTTGAGTCATACCAAATAGTGATTTTCGATAGTTCAAAATGGTGAAATTAGC  
 AATTCTACATGATTCAGTCTAATCAATGGATACCGACTGTTTCCCACACAAGTCTCC  
 TGTTCTCTTAAGCTTACTCACTGACAGCCTTTCCTCTCCACAAATACATTAAGATA  
 TGGCCATACCAAGCCCCCTAGGATGACACCAGACCTGAGAGTCTGAAGACCTGGA  
 TCCAAGTTCTGACTTTTCCCCCTGACAGCTGTGTGACCTTCGTGAAGTCGCCAAACCT  
 CTCTGAGCCCCAGTCATTGCTAGTAAGACCTGCCTTTGAGTTGGTATGATGTTCAAG  
 TTAGATAACAAAATGTTTATACCCATTAGAACAGAGAATAAATAGAACTACATTTCT  
 TGCA

Сигнальная последовательность белка ААТ человека (SEQ ID NO: 705)

MPSSVSWGILLLAGLCLVPVSLA

**Таблица 9А**

Конструкция	Описание	Примечание	Последовательность
1	Полная последовательность	SEQ ID NO: 710	aagtggtggcctaactacggctacactagaag aacagtatttggtatctgcgctctgctgaagcca gtfaccttcggaaaaagagttgtagctcttgat ccggcaaaacaaccaccgctgtagcgggtgg ttttttgttgcaagcagcagattacgcgcaga aaaaaaggatctcaagaagatccttgatctttt ctacggggtctgacgctcagtggaacgaaaa ctcacgttaagggattttggtcatgagattatca aaaaggatcttcacntagatccttttaataaaa atgaagtttaaatcaagcccaatctgaataatg ttacaaccaattaaccaattctgattagaaaaac tcatcgagcatcaaatgaaactgcaatttattca tatcaggattatcaataccatattttgaaaaagc cgtttctgtaatgaaggagaaaaactcaccgag gcagttccataggatggcaagatcctggtatcg gtctgcgattccgactcgtccaacatcaataca acctattaatttcccctcgtaaaaaataaggttat caagtgagaaatccatgagtgacgactgaa

		<p> tccggtgagaatggcaaaagttatgcatttcttt  ccagacttgtcaacaggccagccattacgctc  gtcatcaaaatcactcgcacatcaacaaaccgtt  atfcattcgtgattgcgcctgagcgagacgaaa  tacgcgatcgtgtfaaaaggacaattacaaac  aggaatcgaatgcaaccggcgcaggaacact  gccagcgcacatcaacaatattttcacctgaatca  ggatattcttctaataacctggaatgctgttttccg  gggatcgcagtggtagtaacctgcatcacc  aggagtacggataaaatgcttgatggtcggaa  gaggcataaattccgtcagccagtttagtctga  ccatctcatctgtaacatcattggcaacgctacc  tttgccatgtttcagaacaactctggcgcacg  ggcttccatacaagegatagattgtcgcacct  gattgcccgacattatcgcgagccatttatac  ccatataaatcagcatccatgttgaatttaac  gcggcctcgacgttcccgttgaatatggctca  taacacccttgtattactgtttatgtaagcagac  agttttattgttcatgatgatataattttatcttgc  aatgtaacatcagagattttgagacacgggcc  agagctgcacgcgcgttccggtgatgacggg  gaaaacctctgacacatgcagctcccggaga  cggtcacagcttgtctgtaagcggatgccggg  agcagacaagcccgtcagggcgcgtcagcg  ggtgttggcgggtgtcggggctggcttaactat  gcggcatcagagcagattgtactgagagtgca  ccatagcgggtgtaaataccgcacagatgcg  taaggagaaaataccgcatcagggccattcg  ccattcaggctgcgcaactgttgggaagggcg  atcgggtcgggcctcttcgctattacgccagct  ggcgaaagggggatgtgctgcaaggcgatta  agttgggtaacgccaggggtttccagtcacga  cgttgtaaacgacggccagagaattcTTG  GCCACTCCCTCTCTGCGCGC  TCGCTCGCTCACTGAGGCCG </p>
--	--	---

		<p>GGCGACCAAAGGTCGCCCC ACGCCCCGGGCTTTGCCCGGG CGGCCTCAGTGAGCGAGCG AGCGCGCAGAGAGGGAGTG GCCAACTCCATCACTAGGGG TTCCTAGATCTACTAGTtaggtc agtgaagagaagaacaaaaagcagcatatta cagttagttgtcttcatcaatctttaaatagttgt gtggttttctctccctgtttcacagttGAGG ACCCCCAGGGCGACGCCGCC CAGAAGACCGACACCAGCC ACCACGACCAGGACCACCCC ACCTTCAACAAGATCACCCC CAACCTGGCCGAGTTCGCCT TCAGCCTGTACAGGCAGCTG GCCCACCAGAGCAACAGCA CCAACATCTTCTTCAGCCCC GTGAGCATCGCCACCGCCTT CGCCATGCTGAGCCTGGGCA CCAAGGCCGACACCCACGA CGAGATCCTGGAGGGCCTGA ACTTCAACCTGACCGAGATC CCCGAGGCCCAGATCCACGA GGGCTTCCAGGAGCTGCTGA GGACCCTGAACCAGCCCGAC AGCCAGCTGCAGCTGACCAC CGGCAACGGCCTGTTCTGA GCGAGGGCCTGAAGCTGGT GGACAAGTTCCTGGAGGAC GTGAAGAAGCTGTACCACA GCGAGGCCTTCACCGTGAAC TTCGGCGACACCGAGGAGG CCAAGAAGCAGATCAACGA CTACGTGGAGAAGGGCACC CAGGGCAAGATCGTGGACCT</p>
--	--	---

		<p>GGTGAAGGAGCTGGACAGG GACACCGTGTTTCGCCCTGGT GAACTACATCTTCTTCAAGG GCAAGTGGGAGAGGCCCTTC GAGGTGAAGGACACCGAGG AGGAGGACTTCCACGTGGAC CAGGTGACCACCGTGAAGGT GCCCATGATGAAGAGGCTG GGCATGTTCAACATCCAGCA CTGCAAGAAGCTGAGCAGCT GGGTGCTGCTGATGAAGTAC CTGGGCAACGCCACCGCCAT CTTCTTCTGCCCCGACGAGG GCAAGCTGCAGCACCTGGA GAACGAGCTGACCCACGAC ATCATCACCAAGTTCCTGGA GAACGAGGACAGGAGGAGC GCCAGCCTGCACCTGCCCAA GCTGAGCATCACCGGCACCT ACGACCTGAAGAGCGTGCTG GGCCAGCTGGGCATCACCAA GGTGTTTCAGCAACGGCGCCG ACCTGAGCGGCGTGACCGA GGAGGCCCCCTGAAGCTGA GCAAGGCCGTGCACAAGGC CGTGCTGACCATCGACGAGA AGGGCACCGAGGCCGCCGG CGCCATGTTCTTGGAGGCCA TCCCCATGAGCATCCCCCCC GAGGTGAAGTTCAACAAGC CCTTCGTGTTCTTCTGATGATC GAGCAGAACACCAAGAGCC CCCTGTTCATGGGCAAGGTG GTGAACCCACCCAGAAGTA ACAGACATGATAAGATACAT</p>
--	--	--

		<p>TGATGAGTTTGGACAAACCA CAACTAGAATGCAGTGAAA AAAATGCTTTATTTGTGAAA TTTGTGATGCTATTGCTTTAT TTGTAACCATTATAAGCTGC AATAACAAGTTAACAACA ACAATTGCATTCATTTTATG TTTCAGG TTCAGGGGAGGT GTGGGAGGTTTTTTggggataccc cctagagccccagctggttctttccgcctcaga agCCATAGAGCCCACCGCAT CCCCAGCATGCCTGCTATTG TCTTCCAATCCTCCCCCTTG CTGTCCTGCCCCACCCACC CCCCAGAATAGAATGACACC TACTCAGACAATGCGATGCA ATTCCTCATTTTATTAGGA AAGGACAGTGGGAGTGGCA CCTTCCAGGGTCAAGGAAGG CACGGGGGAGGGGCAAACA ACAGATGGCTGGCAACTAG AAGGCACAGTCGaggttaTTTT TGGGTGGGATTACCACTTT TCCCATGAAGAGGGGAGAC TTGGTATTTTGTTCAATCATT AAGAAGACAAAGGGTTTGTT GAACTTGACCTCGGGGGGG ATAGACATGGGTATGGCCTC TAAAAACATGGCCCCAGCA GCTTCAGTCCCTTTCTCGTCG ATGGTCAGCACAGCCTTATG CACGGCCTTGGAGAGCTTCA GGGGTGCCTCCTCTGTGACC CCGGAGAGGTCAGCCCCATT GCTGAAGACCTTAGTGATGC</p>
--	--	---

		CCAGTTGACCCAGGACGCTC TTCAGATCATAGGTTCCAGT AATGGACAGTTTGGGTAAAT GTAAGCTGGCAGACCTTCTG TCTTCATTTTCCAGGAACTT GGTGATGATATCGTGGGTGA GTTTCATTTTCCAGGTGCTGT AGTTTCCCCTCATCAGGCAG GAAGAAGATGGCGGTGGCA TTGCCCAGGTATTTTCATCAG CAGCACCCAGCTGGACAGCT TCTTACAGTGCTGGATGTTA AACATGCCTAAACGCTTCAT CATAGGCACCTTCACGGTGG TCACCTGGTCCACGTGGAAG TCCTCTTCCTCGGTGTCCTTG ACTTCAAAGGGTCTCTCCCA TTTGCCTTTAAAGAAGATGT AATTCACCAGAGCAAAA GTGTCTCTGTCAAGCTCCTT GACCAAATCCACAATTTTCC CTTGAGTACCCTTCTCCACG TAATCGTTGATCTGTTTCTTG GCCTCTTCGGTGTCCCGAA GTTGACAGTGAAGGCTTCTG AGTGGTACAACTTTTTAACA TCCTCCAAAACTTATCCAC TAGCTTCAGGCCCTCGCTGA GGAACAGGCCATTGCCGGTG GTCAGCTGGAGCTGGCTGTC TGGCTGGTTGAGGGTACGGA GGAGTTCCTGGAAGCCTTCA TGGATCTGAGCCTCCGGAAT CTCCGTGAGGTTGAAATTCA GGCCCTCCAGGATTTTCATCG
--	--	---

		<p> TGAGTGTCAGCCTTGGTCCC  CAGGGAGAGCATTGCAAAG  GCTGTAGCGATGCTCACTGG  GGAGAAGAAGATATTGGTG  CTGTTGGACTGGTGTGCCAG  CTGGCGGTATAGGCTGAAGG  CGAACTCAGCCAGGTTGGGG  GTGATCTTGTTGAAGGTTGG  GTGATCCTGATCATGGTGGG  ATGTATCTGTCTTCTGGGCA  GCATCTCCCTGGGGATCCTC  aactgtggaacaggagagaaaaaccacac  aacatattaaagattgatgaagacaactaactg  taatatgctgcttttgttcttcttctactgaccta  ACTAGTAGATCTAGGAACCC  CTAGTGATGGAGTTGGCCAC  TCCCTCTCTGCGCGCTCGCT  CGCTCACTGAGGCCGCCCGG  GCAAAGCCCGGGCGTCGGG  CGACCTTTGGTCGCCCCGGCC  TCAGTGAGCGAGCGAGCGC  GCAGAGAGGGAGTGGCCAA  acgcgtggtgtaatcatggcatagctgtttcct  gtgtgaaattgtatccgctcacaattccacaca  acatacagaccggaagcataaagtgtaaagc  ctggggtgcctaatgagtgagtaactcacatt  aattgcgttgcgctcactgcccgtttccagtcg  ggaaacctgtcgtgccagctgcattaatgaatc  ggccaacgcgcggggagagggcgtttgcgt  attgggcgctcttccgcttctcgtcactgact  cgctgcgctcggcgttcggctcggcgagc  ggtatcagctcactcaaaggcgtaatacggtt  atccacagaatcaggggataacgcaggaag  aacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggcca  ggaaccgtaaaaaggcccgcttgcgtgctgctt </p>
--	--	--

			<p>ttccataggctccgccccctgacgagcatca  caaaaatcgacgctcaagtcagaggtggcga  aaccgacaggactataaagataaccaggcgtt  tccccctggaagctccctcgtgcgctcctctgtt  ccgaccctgccgcttaccggataacctgtccgc  ctttctccctcgggaagcgtggcgctttctcat  agctcacgctgtaggtatctcagttcgggtgtag  gtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacga  acccccggtcageccgaccgctgcgccttat  ccggtaactatcgtcttgagtccaaccggtaa  gacacgacttatcgccactggcagcagccact  ggtaacaggattagcagagcgaggtagtag  gcggtgctacagagttcttg</p>
Копия 1 SERPINA1		<p>A1AT без SP  (альтернативн  ая частота  использования  кодонов 1)  (SEQ ID NO:  711)</p>	<p>GAGGACCCCCAGGGCGACG  CCGCCAGAAGACCGACAC  CAGCCACCACGACCAGGAC  CACCCCACCTTCAACAAGAT  CACCCCCAACCTGGCCGAGT  TCGCCTTCAGCCTGTACAGG  CAGCTGGCCCACCAGAGCA  ACAGCACCAACATCTTCTTC  AGCCCCGTGAGCATCGCCAC  CGCCTTCGCCATGCTGAGCC  TGGGCACCAAGGCCGACAC  CCACGACGAGATCCTGGAG  GGCCTGAACTTCAACCTGAC  CGAGATCCCCGAGGCCAG  ATCCACGAGGGCTTCCAGGA  GCTGCTGAGGACCCTGAACC  AGCCCGACAGCCAGCTGCA  GCTGACCACCGGCAACGGCC  TGTTCCCTGAGCGAGGGCCTG  AAGCTGGTGGACAAGTTCCT  GGAGGACGTGAAGAAGCTG  TACCACAGCGAGGCCTTCAC</p>

		CGTGAACTTCGGCGACACCG AGGAGGCCAAGAAGCAGAT CAACGACTACGTGGAGAAG GGCACCCAGGGCAAGATCG TGGACCTGGTGAAGGAGCTG GACAGGGACACCGTGTTTCGC CCTGGTGA ACTACATCTTCT TCAAGGGCAAGTGGGAGAG GCCCTTCGAGGTGAAGGACA CCGAGGAGGAGGACTTCCA CGTGGACCAGGTGACCACCG TGAAGGTGCCCATGATGAAG AGGCTGGGCATGTTCAACAT CCAGCACTGCAAGAAGCTG AGCAGCTGGGTGCTGCTGAT GAAGTACCTGGGCAACGCC ACCGCCATCTTCTTCCTGCC CGACGAGGGCAAGCTGCAG CACCTGGAGAACGAGCTGA CCCACGACATCATCACCAAG TTCCTGGAGAACGAGGACA GGAGGAGCGCCAGCCTGCA CCTGCCCAAGCTGAGCATCA CCGGCACCTACGACCTGAAG AGCGTGCTGGGCCAGCTGGG CATCACCAAGGTGTTTCAGCA ACGGCGCCGACCTGAGCGG CGTGACCGAGGAGGCCCCCC TGAAGCTGAGCAAGGCCGT GCACAAGGCCGTGCTGACCA TCGACGAGAAGGGCACCGA GGCCGCCGGCGCCATGTTCC TGGAGGCCATCCCCATGAGC ATCCCCCCGAGGTGAAGTT CAACAAGCCCTTCGTGTTCC
--	--	--

			TGATGATCGAGCAGAACACC AAGAGCCCCCTGTTTCATGGG CAAGGTGGTGAACCCACCC AGAAGTAA
	Копия 2 SERPINA1 (обр. комп.)	A1AT без SP (SEQ ID NO: 712)	GAGGATCCCCAGGGAGATG CTGCCAGAAGACAGATAC ATCCCACCATGATCAGGATC ACCCAACCTTCAACAAGATC ACCCCAACCTGGCTGAGTT CGCCTTCAGCCTATAACCGCC AGCTGGCACACCAGTCCAAC AGCACCAATATCTTCTTCTC CCCAGTGAGCATCGCTACAG CCTTTGCAATGCTCTCCCTG GGGACCAAGGCTGACACTC ACGATGAAATCCTGGAGGG CCTGAATTTCAACCTCACGG AGATTCCGGAGGCTCAGATC CATGAAGGCTTCCAGGAACT CCTCCGTACCCTCAACCAGC CAGACAGCCAGCTCCAGCTG ACCACCGGCAATGGCCTGTT CCTCAGCGAGGGCCTGAAGC TAGTGGATAAGTTTTTGGAG GATGTTAAAAAGTTGTACCA CTCAGAAGCCTTCACTGTCA ACTTCGGGGACACCGAAGA GGCCAAGAAACAGATCAAC GATTACGTGGAGAAGGGTA CTCAAGGGAAAATTGTGGAT TTGGTCAAGGAGCTTGACAG AGACACAGTTTTTGGCTCTGG TGAATTACATCTTCTTTAAA GGCAAATGGGAGAGACCCT TTGAAGTCAAGGACACCGA

			GGAAGAGGACTTCCACGTG GACCAGGTGACCACCGTGA AGGTGCCTATGATGAAGCGT TTAGGCATGTTTAACATCCA GCACTGTAAGAAGCTGTCCA GCTGGGTGCTGCTGATGAAA TACCTGGGCAATGCCACCGC CATCTTCTTCCCTGCCTGATG AGGGGAAACTACAGCACCT GGAAAATGAACTCACCCAC GATATCATCACCAAGTTCCT GGAAAATGAAGACAGAAGG TCTGCCAGCTTACATTTACC CAAAGTGTCCATTACTGGAA CCTATGATCTGAAGAGCGTC CTGGGTCAACTGGGCATCAC TAAGGTCTTCAGCAATGGGG CTGACCTCTCCGGGGTCACA GAGGAGGCACCCCTGAAGC TCTCCAAGGCCGTGCATAAG GCTGTGCTGACCATCGACGA GAAAGGGACTGAAGCTGCT GGGGCCATGTTTTTAGAGGC CATACCCATGTCTATCCCCC CCGAGGTCAAGTTCAACAAA CCCTTTGTCTTCTTAATGATT GAACAAAATACCAAGTCTCC CCTCTTCATGGGAAAAGTGG TGAATCCCACCCAAAAAtaa
7	Полная последовательность	SEQ ID NO: 770	TTGGCCACTCCCTCTCTGCG CGCTCGCTCGCTCACTGAGG CCGGGCGACCAAGGTCGC CCGACGCCCCGGGCTTTGCC GGGCGGCCTCAGTGAGCGA

		<p>GCGAGCGCGCAGAGAGGGA GTGGCCAACTCCATCACTAG GGGTTCTAGATCTACTAGTt aggtcagtgaagagaagaacaaaaagcagc atattacagtagttgtcttcatcaatctttaatat gttgtgtggttttctctccctgtttccacagttG AGGACCCCCAGGGAGATGC AGCCCAGAAGACAGACACC AGCCACCATGACCAGGACC ACCCACCTTCAACAAGATC ACCCCAACCTGGCAGAGTT TGCCTTCAGCCTGTACAGGC AGCTGGCCCACCAGAGCAA CAGCACCAACATCTTCTTCA GCCCAGTGAGCATAGCCACA GCCTTTGCCATGCTGAGCCT GGGCACCAAGGCAGACACC CATGATGAGATCCTGGAGGG CCTGAACTTCAACCTGACAG AGATCCCAGAGGCCCAGATC CATGAGGGCTTCCAGGAGCT GCTGAGGACCCTGAACCAGC CAGACAGCCAGCTGCAGCTG ACCACAGGCAATGGCCTGTT CCTGTCTGAGGGCCTGAAGC TGGTGGACAAGTTCCTGGAG GATGTGAAGAAGCTGTACCA CTCTGAGGCCTTCACAGTGA ACTTTGGAGACACAGAGGA GGCCAAGAAGCAGATCAAT GACTATGTGGAGAAGGGCA CCCAGGGCAAGATAGTGGA CCTGGTGAAGGAGCTGGAC AGGGACACAGTGTTTGCCCT GGTGA ACTACATCTTCTTCA</p>
--	--	--

		AGGGCAAGTGGGAGAGGCC CTTTGAGGTGAAGGACACAG AGGAGGAGGACTTCCATGTG GACCAGGTGACCACAGTGA AGGTGCCCATGATGAAGAG GCTGGGCATGTTCAATATCC AGCACTGCAAGAAGCTGAG CAGCTGGGTGCTGCTGATGA AGTACCTGGGCAATGCCACA GCCATCTTCTTCCTGCCAGA TGAGGGCAAGCTGCAGCAC CTGGAGAATGAGCTGACCCA TGACATCATCACCAAGTTCC TGGAGAATGAGGACAGGAG GTCTGCCAGCCTGCACCTGC CCAAGCTGAGCATCACAGGC ACCTATGACCTGAAGTCTGT GCTGGGCCAGCTGGGCATCA CCAAGGTGTTTCAGCAATGGA GCAGACCTGTCTGGAGTGAC AGAGGAGGCCCCCCTGAAG CTGAGCAAGGCAGTGCACA AGGCAGTGCTGACCATAGAT GAGAAGGGCACAGAGGCAG CAGGAGCCATGTTTCCTGGAG GCCATCCCCATGAGCATCCC CCCAGAGGTGAAGTTCAACA AGCCTTTTGTGTTCCCTGATG ATAGAGCAGAACACCAAGA GCCCCCTGTTTCATGGGCAAG GTGGTGAACCCACCCAGAA GTAACAGACATGATAAGAT ACATTGATGAGTTTGGACAA ACCACA ACTAGAATGCAGTG AAAAAATGCTTTATTTGTG
--	--	--

		AAATTTGTGATGCTATTGCT TTATTTGTAACCATTATAAG CTGCAATAAACAAGTTAACA ACAACAATTGCATTCATTTT ATGTTTCAGGTTTCAGGGGGA GGTGTGGGAGGTTTTTTgggga taccctagagccccagctggttctttctct cagaagCCATAGAGCCCATCTC ATCCCAGCATGCCTGCTAT TGTCTTCCCAATCCTCCCCCT TGCTGTCCTGCCCCACCCCA CCCCCAGAATAGAATGACA CCTACTCAGACAATTCTATG CAATTCCTCATTTTATTAGG AAAGGACAGTGGGAGTGGC ACCTTCCAGGGTCAAGGAAG GCATGGGGGAGGGGCAAAC AACAGATGGCTGGCAACTA GAAGGCACAGTCTaggttaTTT TTGGGTGGGATTCACTT TCCCATGAAGAGGGGTGAT TTAGTGTTCTGCTCTATCATG AGAAATACAAAAGGTTTGTT GAACTTGACCTCTGGGGGGA TAGACATGGGTATGGCCTCT AAAACATGGCCCCAGCAG CCTCTGTGCCCTTCTCATCTA TGGTCAGCACAGCCTTATGC ACTGCCTTGGAGAGCTTCAG GGGTGCCTCCTCTGTGACCC CAGAGAGGTCAGCCCCATTG CTGAAGACCTTAGTGATGCC CAGTTGACCCAGGACAGACT TCAGATCATAGGTTCCAGTA ATGGACAGTTTGGGTAAATG
--	--	---

		TAAGCTGGCAGACCTTCTGT CTTCATTTTCCAGGAACTTG GTGATGATATCATGGGTGAG TTCATTTTCCAGGTGCTGTA GTTTCCCCTCATCAGGCAGG AAGAAGATGGCTGTGGCATT GCCCAGGTATTTTCATCAGCA GCACCCAGCTGGACAGCTTC TTACAGTGCTGGATATTGAA CATACCAAGCCTTTTCATCA TAGGCACCTTCACTGTGGTC ACCTGGTCCACATGGAAGTC CTCTTCCTCTGTGTCCTTGAC TTCAAAGGGTCTCTCCCATT TGCCTTTAAAGAAGATGTAA TTCACCAGAGCAAAAAGTGT GTCTCTGTCAAGCTCCTTGA CCAAATCCACAATTTCCCT TGAGTACCCTTCTCCACATA ATCATTGATCTGTTTCTTGGC CTCTTCTGTGTCCCCAAAGT TGACAGTGAAGGCTTCTGAG TGGTACAACCTTTTAAACATC CTCCAAAACTTATCCACTA GCTTCAGGCCCTCAGAGAGG AACAGGCCATTGCCTGTGGT CAGCTGGAGCTGGCTGTCTG GCTGGTTGAGGGTTCTGAGG AGTTCCTGGAAGCCTTCATG GATCTGAGCCTCTGGAATCT CTGTGAGGTTGAAATTCAGG CCCTCCAGGATTTTCATCATG AGTGTCAGCCTTGGTCCCCA GGGAGAGCATTGCAAAGGC TGTAGCTATGCTCACTGGGG
--	--	--

		<p> AGAAGAAGATATTGGTGCTG  TTGGACTGGTGTGCCAGCTG  TCTGTATAGGCTGAAGGCAA  ACTCAGCCAGGTTGGGGGTG  ATCTTGTTGAAGGTTGGGTG  ATCCTGATCATGGTGGGATG  TATCTGTCTTCTGGGCAGCA  TCTCCCTGGGGATCCTCaactgt  gaaacaggagagaaaaaccacacaacat  atftaaagattgatgaagacaactaactgaata  tgctgcttttgttcttcttctactgacctaAG  AGATCTAGGAACCCCTAGTG  ATGGAGTTGGCCACTCCCTC  TCTGCGCGCTCGCTCGCTCA  CTGAGGCCGCCCGGGCAA  GCCCGGGCGTCGGGCGACCT  TTGGTCGCCCGGCCTCAGTG  AGCGAGCGAGCGCGCAGAG  AGGGAGTGGCCAAacgcgtggtgt  aatcatggtcatagctgttctctgtgaaattgt  tatccgctcacaattccacacaacatacagacc  ggaagcataaagtgtaaagcctggggtgccta  atgagtgagctaactcacattaattgcgttgcgc  tactgcccgtttccagtcgggaaacctgtcg  tgccagctgattaatgaatcggccaacgcgc  ggggagaggcggtttgcgtattgggcgctctt  ccgcttctcgetcactgactcgetgcgctcgg  tcgttcggctcggcgagcggatcagctcac  tcaaaggcggtaatacggttatccacagaatca  ggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaa  aaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaa  aggccgcgttgcgttgcgttttccataggtcc  gccccctgacgagcatcacaataatcgacg  ctcaagtcagaggtggcgaaacccgacagga  ctataaagataccaggcgttccccctggaagc </p>
--	--	---

		<p>tcctcgtgcgtctctctgttccgacctgccg cttaccggatacctgtccgcctttctcccttgg gaagcgtggcgtttctcatagctcacgctgta ggtatctcagttcgggtgtaggtcgttcgctcaa gctgggctgtgtgcacgaacccccgttcagc ccgaccgctgcgccttatccggttaactatcgc ttgagtccaaccggtaagacacgacttatcgc cactggcagcagccactggtaacaggattagc agagcgaggatgtaggcgggtctacagagtt cttgaagtggcctaactacggctacactag aagaacagtatttggtatctgcgctctgctgaa gccagttacctcggaaaaagagttggtagctc ttgatccggcaacaaccaccgctggtagcg gtggtttttgtttgcaagcagcagattacgcg cagaaaaaaggatctcaagaagatcctttgat ctttctacggggtctgacgctcagtggaacga aaactcacgtaagggattttggtcatgagatta tcaaaaaggatcttcactagatccttttaatta aaaatgaagtttaaatcaagccaatctgaata atgttacaaccaattaaccaattctgattagaaa aactcatcagcatcaaatgaaactgcaattat tcatatcaggattatcaataccatattttgaaaa agccgtttctgtaatgaaggagaaaactcacc gaggcagttccataggatggcaagatcctggt atcggctcgcgattccgactcgtccaacatcaa tacaacctattaattcccctcgtcaaaaataag gttatcaagtgagaaatcaccatgagtgacga ctgaatccggtgagaatggcaaaagtttatgca tttcttccagactgttcaacaggccagccatta cgctcgtcatcaaaatcactcgcatacaacaaa ccgttattcattcgtgattgcgcctgagcgaga cgaaatacgcgatcgtgtttaaaggacaatta caaacaggaatcgaatgaaccggcgcagg aacactgccagcgcatacaaatattttcacct gaatcaggatattcttctaataacctggaatgctg</p>
--	--	---

			<p> t t t t c c g g g g a t c g c a g t g g t g a g t a a c c a t g  c a t c a t c a g g a g t a c g g a t a a a a t g c t t g a t g g  t c g g a a g a g g c a t a a a t t c c g t c a g c c a g t t t a  g t c t g a c c a t c t c a t c t g t a a c a t c a t t g g c a a c  g c t a c c t t t g c c a t g t t c a g a a a c a a c t c t g g c  g c a t c g g g c t t c c c a t a c a a g c g a t a g a t t g t c  g c a c c t g a t t g c c c g a c a t t a t c g c g a g c c c a t  t t a t a c c a t a t a a a t c a g c a t c c a t g t t g g a a t t  t a a t c g c g g c c t c g a c g t t c c c g t t g a a t a t g  g c t c a t a a c a c c c c t t g t a t t a c t g t t a t g t a a g  c a g a c a g t t t a t t g t t c a t g a t g a t a t a t t t t a t c  t t g t g c a a t g t a a c a t c a g a g a t t t t g a g a c a c g  g g c c a g a g c t g c a t c g c g c g t t c g g t g a t g a  c g g t g a a a c c t c t g a c a c a t g c a g c t c c c g g  a g a c g g t c a c a g c t t g t c t g t a a g c g g a t g c c  g g g a g c a g a c a a g c c c g t c a g g g c g c g t c a  g c g g g t g t t g g c g g g t g t c g g g g c t g g c t t a a  c t a t g c g g c a t c a g a g c a g a t t g t a c t g a g a g t  g c a c c a t a t g c g g t g t g a a a t a c c g c a c a g a t  g c g t a a g g a g a a a a t a c c g c a t c a g g c g c c a  t t c g c a t t c a g g c t g c g c a a c t g t t g g g a a g  g g c g a t c g g t g c g g g c c t c t t c g t a t t a c g c  c a g c t g g c g a a a g g g g a t g t g c t g c a a g g c  g a t t a a g t t g g g t a a c g c c a g g g t t t c c c a g t  c a c g a c g t t g t a a a a c g a c g g c c a g a g a a t t c </p>
Копия 1 SERPINA1		<p> A1AT без SP  (альтернативн  ая частота  использования  кодонов 1),  истощенный  по CpG  (SEQ ID NO:  771) </p>	<p> GAGGACCCCCAGGGAGATG  CAGCCCAGAAGACAGACAC  CAGCCACCATGACCAGGACC  ACCCACCTTCAACAAGATC  ACCCCAACCTGGCAGAGTT  TGCCTTCAGCCTGTACAGGC  AGCTGGCCCACCAGAGCAA  CAGCACCAACATCTTCTTCA  GCCCAGTGAGCATAGCCACA  GCCTTTGCCATGCTGAGCCT </p>

		<p>GGGCACCAAGGCAGACACC CATGATGAGATCCTGGAGGG CCTGAACTTCAACCTGACAG AGATCCCAGAGGCCAGATC CATGAGGGCTTCCAGGAGCT GCTGAGGACCCTGAACCAGC CAGACAGCCAGCTGCAGCTG ACCACAGGCAATGGCCTGTT CCTGTCTGAGGGCCTGAAGC TGGTGGACAAGTTCCTGGAG GATGTGAAGAAGCTGTACCA CTCTGAGGCCTTCACAGTGA ACTTTGGAGACACAGAGGA GGCCAAGAAGCAGATCAAT GACTATGTGGAGAAGGGCA CCCAGGGCAAGATAGTGGA CCTGGTGAAGGAGCTGGAC AGGGACACAGTGTTTGCCCT GGTGA ACTACATCTTCTTCA AGGGCAAGTGGGAGAGGCC CTTTGAGGTGAAGGACACAG AGGAGGAGGACTTCCATGTG GACCAGGTGACCACAGTGA AGGTGCCCATGATGAAGAG GCTGGGCATGTTCAATATCC AGCACTGCAAGAAGCTGAG CAGCTGGGTGCTGCTGATGA AGTACCTGGGCAATGCCACA GCCATCTTCTTCCTGCCAGA TGAGGGCAAGCTGCAGCAC CTGGAGAATGAGCTGACCCA TGACATCATCACCAAGTTCC TGGAGAATGAGGACAGGAG GTCTGCCAGCCTGCACCTGC CCAAGCTGAGCATCACAGGC</p>
--	--	---

			ACCTATGACCTGAAGTCTGT GCTGGGCCAGCTGGGCATCA CCAAGGTGTTTCAGCAATGGA GCAGACCTGTCTGGAGTGAC AGAGGAGGCCCCCTGAAG CTGAGCAAGGCAGTGCACA AGGCAGTGCTGACCATAGAT GAGAAGGGCACAGAGGCAG CAGGAGCCATGTTCTGGAG GCCATCCCCATGAGCATCCC CCCAGAGGTGAAGTTCAACA AGCCTTTTGTGTTCTGATG ATAGAGCAGAACAACAAGA GCCCCCTGTTTCATGGGCAAG GTGGTGAACCCACCCAGAA GTAA
	Копия 2 SERPINA1 (обр. комп.)	A1AT без SP, истощенный по CpG (SEQ ID NO: 772)	GAGGATCCCCAGGGAGATG CTGCCAGAAGACAGATAC ATCCCACCATGATCAGGATC ACCCAACCTTCAACAAGATC ACCCCAACCTGGCTGAGTT TGCCTTCAGCCTATACAGAC AGCTGGCACACCAGTCCAAC AGCACCAATATCTTCTTCTC CCCAGTGAGCATAGCTACAG CCTTTGCAATGCTCTCCCTG GGGACCAAGGCTGACACTC ATGATGAAATCCTGGAGGGC CTGAATTTCAACCTCACAGA GATTCCAGAGGCTCAGATCC ATGAAGGCTTCCAGGAACTC CTCAGAACCCTCAACCAGCC AGACAGCCAGCTCCAGCTGA CCACAGGCAATGGCCTGTTC CTCTCTGAGGGCCTGAAGCT

		AGTGGATAAGTTTTTGGAGG ATGTTAAAAAGTTGTACCAC TCAGAAGCCTTCACTGTCAA CTTTGGGGACACAGAAGAG GCCAAGAAACAGATCAATG ATTATGTGGAGAAGGGTACT CAAGGGAAAATTGTGGATTT GGTCAAGGAGCTTGACAGA GACACAGTTTTTGTCTGGT GAATTACATCTTCTTTAAAG GCAAATGGGAGAGACCCTTT GAAGTCAAGGACACAGAGG AAGAGGACTTCCATGTGGAC CAGGTGACCACAGTGAAGG TGCCTATGATGAAAAGGCTT GGTATGTTCAATATCCAGCA CTGTAAGAAGCTGTCCAGCT GGGTGCTGCTGATGAAATAC CTGGGCAATGCCACAGCCAT CTTCTTCTGCCTGATGAGG GGAAACTACAGCACCTGGA AAATGAACTCACCCATGATA TCATCACCAAGTTCCTGGAA AATGAAGACAGAAGGTCTG CCAGCTTACATTTACCCAAA CTGTCCATTACTGGAACCTA TGATCTGAAGTCTGTCCTGG GTCAACTGGGCATCACTAAG GTCTTCAGCAATGGGGCTGA CCTCTCTGGGGTCACAGAGG AGGCACCCCTGAAGCTCTCC AAGGCAGTGCATAAGGCTGT GCTGACCATAGATGAGAAG GGCACAGAGGCTGCTGGGG CCATGTTTTTAGAGGCCATA
--	--	---

			<p>CCCATGTCTATCCCCCAGA  GGTCAAGTTCAACAAACCTT  TTGTATTTCTCATGATAGAG  CAGAACACTAAATCACCCCT  CTTCATGGGAAAAGTGGTGA  ATCCCACCCAAAAAataa</p>
8	Полная последовательность	(SEQ ID NO: 780)	<p>tgtaacatcagagattttgagacacgggccag  agctgcatcgcgcgttcggtgatgacggtga  aaacctctgacacatgcagctcccggagacg  gtcacagcttgctgtaagcggatccgggag  cagacaagcccgtcagggcgcgtcagcggg  tgttggcgggtgctggggctggcttaactatgc  ggcatcagagcagattgtactgagagtgcacc  atatcgggtgtgaataccgcacagatcgtga  aggagaaaataccgcatcagcgcattcgc  cattcaggctgcgcaactgttgggaagggcga  tcggtgcgggcctcttcgctattacgccagctg  gcgaaagggggatgtgctgcaaggcgattaa  gttgggtaacgccagggttttcccagtcacgac  gttgtaaaacgacggccagagaattcTTGG  CCACTCCCTCTCTGCGCGCT  CGCTCGCTCACTGAGGCCGG  GCGACCAAAGGTCGCCCGA  CGCCCGGGCTTTGCCCGGGC  GGCCTCAGTGAGCGAGCGA  GCGCGCAGAGAGGGAGTGG  CCA ACTCCATCACTAGGGGT  TCCTAGATCTACTAGTtaggtca  gtgaagagaagaacaaaaagcagcatattac  agttagttgtcttcatcaatctttaaataatgttgtgt  ggttttctctccctgttccacagttGAGGA  CCCCAGGGAGATGCTGCCC  AGAAGACAGACACATCTCA  CCATGACCAGGACCACCCCA</p>

		CCTTCAACAAGATCACTCCC AATCTTGCAGAGTTTGCATT CTCTCTCTACAGACAGCTTG CACACCAGAGCAACTCTACT AACATCTTCTTCTCTCCAGTC AGCATAGCAACAGCATTTCG AATGCTCAGCCTTGGCACAA AGGCAGACACACATGATGA GATCCTTGAGGGCCTCAACT TCAATCTCACAGAGATCCCA GAAGCCCAGATCCATGAGG GCTTCCAGGAGCTGCTGAGA ACACTCAACCAGCCTGACTC TCAGCTCCAGCTCACAAACAG GCAATGGGCTCTTCCTCTCT GAGGGCCTCAAGCTTGTAGA CAAGTTCCTGGAGGATGTCA AGAAGCTCTACCACTCTGAA GCCTTCACAGTCAACTTTGG AGACACAGAGGAAGCCAAG AAGCAGATCAATGACTATGT AGAGAAGGGGACTCAGGGC AAGATAGTAGACCTTGTCAA GGAGCTGGACAGAGACACA GTCTTTGCACTGGTCAACTA CATCTTCTTCAAGGGGAAGT GGGAGAGACCCTTTGAAGTC AAGGACACAGAGGAGGAGG ACTTCATGTAGACCAGGTG ACAACAGTCAAGGTTCCCAT GATGAAGAGACTTGGCATGT TCAATATCCAGCACTGCAAG AAGCTCAGCTCTTGGGTCCT CCTCATGAAGTACCTTGGCA ATGCAACAGCAATCTTCTTC
--	--	---

		<p> CTTCCTGATGAGGGCAAGCT  CCAGCACCTTGAGAATGAGC  TGACACATGACATCATCACA  AAGTTCCTGGAGAATGAGG  ACAGAAGGTCTGCATCTCTC  CACCTTCCAAAGCTCAGCAT  CACAGGCACCTATGACCTCA  AGTCTGTCCTTGGCCAGCTT  GGCATCACAAAGGTCTTCTC  TAATGGTGCAGACCTCTCTG  GAGTCACAGAGGAAGCCCC  CCTCAAGCTCAGCAAGGCTG  TGCACAAGGCTGTGCTCACA  ATAGATGAGAAGGGGACAG  AGGCTGCAGGTGCCATGTTC  CTGGAAGCCATCCCCATGAG  CATCCCACCAGAAGTCAAGT  TCAACAAGCCTTTTGTCTTC  CTGATGATAGAGCAGAACA  CAAAGTCTCCCCTCTTCATG  GGCAAGGTAGTCAACCCAC  TCAAAAGTAACAGACATGAT  AAGATACATTGATGAGTTTG  GACAAACCACA ACTAGAAT  GCAGTGAAAAAATGCTTTA  TTTGTGAAATTTGTGATGCT  ATTGCTTTATTTGTAACCATT  ATAAGCTGCAATAAACAAGT  TAACAACAACAATTGCATTC  ATTTTATGTTTCAGGTTTCAG  GGGGAGGTGTGGGAGGTTTT  TTggggataccccctagagccccagctggtt  ctttctcctcagaagCCATAGAGCCC  ATCTCATCCCCAGCATGCCT  GCTATTGTCTTCCCAATCCTC </p>
--	--	---

		CCCCTTGCTGTCCTGCCCA CCCCACCCCCAGAATAGAA TGACACCTACTCAGACAATT CTATGCAATTCCTCATTTTA TTAGGAAAGGACAGTGGGA GTGGCACCTTCCAGGGTCAA GGAAGGCATGGGGGAGGGG CAAACAACAGATGGCTGGC AACTAGAAGGCACAGTCTag gTTACTTCTGGGTGGGGTTC ACCACCTTGCCCATGAACAG GGGGCTCTTGGTGTCTGCT CTATCATCAGGAACACAAAA GGCTTGTTGAACTTCACCTC TGGGGGGATGCTCATGGGG ATGGCCTCCAGGAACATGGC TCCTGCTGCCTCTGTGCCCTT CTCATCTATGGTCAGCACTG CCTTGTGCACTGCCTTGCTC AGCTTCAGGGGGGCCTCCTC TGTCACTCCAGACAGGTCTG CTCCATTGCTGAACACCTTG GTGATGCCCAGCTGGCCCAG CACAGACTTCAGGTCATAGG TGCCTGTGATGCTCAGCTTG GGCAGGTGCAGGCTGGCAG ACCTCCTGTCCTCATTCTCCA GGAACTTGGTGATGATGTCA TGGGTCAGCTCATTCTCCAG GTGCTGCAGCTTGCCCTCAT CTGGCAGGAAGAAGATGGC TGTGGCATTGCCCAGGTACT TCATCAGCAGCACCCAGCTG CTCAGCTTCTTGCAGTGCTG GATATTGAACATGCCCAGCC
--	--	---

		<p>TCTTCATCATGGGCACCTTC ACTGTGGTCACCTGGTCCAC ATGGAAGTCCTCCTCCTCTG TGCCTTCACCTCAAAGGGC CTCTCCCCTTGGCCCTTGAA GAAGATGTAGTTCACCAGGG CAAACACTGTGTCCCTGTCC AGCTCCTTCACCAGGTCCAC TATCTTGCCCTGGGTGCCCT TCTCCACATAGTCATTGATC TGCTTCTTGGCCTCCTCTGTG TCTCCAAAGTTCACTGTGAA GGCCTCAGAGTGGTACAGCT TCTTCACATCCTCCAGGAAC TTGTCCACCAGCTTCAGGCC CTCAGACAGGAACAGGCCA TTGCCTGTGGTCAGCTGCAG CTGGCTGTCTGGCTGGTTCA GGGTCCTCAGCAGCTCCTGG AAGCCCTCATGGATCTGGGC CTCTGGGATCTCTGTCAGGT TGAAGTTCAGGCCCTCCAGG ATCTCATCATGGGTGTCTGC CTTGGTGCCCAGGCTCAGCA TGGCAAAGGCTGTGGCTATG CTCACTGGGCTGAAGAAGAT GTTGGTGCTGTTGCTCTGGT GGGCCAGCTGCCTGTACAGG CTGAAGGCAAACCTCTGCCAG GTTGGGGGTGATCTTGTTGA AGGTGGGGTGGTCCTGGTCA TGGTGGCTGGTGTCTGTCTT CTGGGCTGCATCTCCCTGGG GGTCCTCaactgtggaacaggagag aaaaaccacacaacatatttaaagattgatgaa</p>
--	--	---

		<p> gacaactaactgtaatatgctgctttttgttctct  cttcaactgacctaACTAGTAGATCT  AGGAACCCCTAGTGATGGA  GTTGGCCACTCCCTCTCTGC  GCGCTCGCTCGCTCACTGAG  GCCGCCCGGGCAAAGCCCG  GGCGTCGGGCGACCTTTGGT  CGCCCGGCCTCAGTGAGCGA  GCGAGCGCGCAGAGAGGGA  GTGGCCA Aacgcgtggtgtaatcatggt  catagctgttctgtgtgaaattgttatccgctc  acaattccacacaacatacagaccggaagcat  aaagtgtaaagcctgggggtgcctaatgagtga  gctaactcacattaattgcgttgcgctcactgcc  cgctttccagtcgggaaacctgtcgtgccagct  gcattaatgaatcggccaacgcgcggggaga  ggcggtttgcgtattgggcgcttccgcttct  cgctcaactgactcgtgcgctcggtcgttcggc  tgcggcgagcgggtatcagctcactcaaaggc  ggtatacggttatccacagaatcaggggata  acgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggcc  agcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccg  cgttgctggcgttttccataggctccgcccc  tgacgagcatcacaaaaatcgacgctcaagtc  agaggtggcgaaacccgacaggactataaag  ataccaggcgttccccctggaagctccctcgt  gcgctctcctgttccgaccctgccgcttaccgg  atacctgtccgcctttctcccttcgggaagcgtg  gcgctttctcatagctcacgctgtaggatctca  gttcgggtgtaggtcgttcgctccaagctgggct  gtgtgcacgaacccccgttcagcccaccg  ctgcgccttatccggtaactatcgtcttgagtc  aaccggtaagacacgacttatgccactggc  agcagccactggtaacaggattagcagagcg  aggtatgtaggcggtgctacagagttcttgaag </p>
--	--	---

		<p>         tggcgcctaactacggctacactagaagaac          agtatttggatctgcgctctgctgaagccagt          acctcggaaaaagagttggtagctctgatcc          ggcaacaaccaccgctggtagcgggtggtt          tttgttgcaagcagcagattacgcgcagaaa          aaaaggatctcaagaagatccttgatctttcta          cggggtctgacgctcagtggaacgaaaactc          acgttaagggattttggatcagattatcaaaa          aggatcttcactagatccttttaattaaaaatg          aagttttaatcaagcccaatctgaataatgta          caaccaattaaccaattctgattagaaaaactca          tcgagcatcaaatgaaactgcaatttattcatat          caggattatcaataccatattttgaaaaagccg          ttctgtaatgaaggagaaaactcaccgaggc          agttcataggatggcaagatcctggtatcgg          ctgcgattccgactcgtccaacatcaatacaac          ctattaattcccctcgtcaaaaataaggttatca          agtgagaaatcaccatgagtgacgactgaatc          cggtgagaatggcaaaagttatgcatttcttc          cagacttgtcaacaggccagccattacgctcg          tcatcaaatcactcgcacaaacaaaccgttat          tcattcgtgattgcgctgagcgagacgaaata          cgcgatcgtgttaaaaggacaattacaaaca          ggaatcgaatgcaaccggcgcaggaactg          ccagcgcacaaacaatatttcacctgaatcag          gatattcttctaataacctggaatgctgtttccgg          ggatcgcagtggtgagtaacctgcatcatca          ggagtacggataaaatgcttgatggtcggag          aggcataaattccgtcagccagtttagtctgac          catctcatctgtaacatcattggcaacgetacct          ttgcatgtttcagaaacaactctggcgcacg          ggcttccatacaagegatagattgctgcacct          gattgccgacattatcgcgagccatttatac          ccatataaatcagcatccatgttgaatttaac          gcggcctcgcggttccggtgaatatggctca       </p>
--	--	--

			<p>taacacccttgattactgtttatgtaagcagac  agttttattgttcatgatgatatattttatcttgtgc  aa</p>
Копия 1 SERPINA1		<p>A1AT без SP  (альтернативн  ая частота  использования  кодонов 2),  истощенный  по CpG  (SEQ ID NO:  781)</p>	<p>GAGGACCCCCAGGGAGATG  CTGCCCAGAAGACAGACAC  ATCTCACCATGACCAGGACC  ACCCACCTTCAACAAGATC  ACTCCAATCTTGCAGAGTT  TGCATTCTCTCTACAGAC  AGCTTGCACACCAGAGCAAC  TCTACTAACATCTTCTTCTCT  CCAGTCAGCATAGCAACAGC  ATTTGCAATGCTCAGCCTTG  GCACAAAGGCAGACACACA  TGATGAGATCCTTGAGGGCC  TCAACTTCAATCTCACAGAG  ATCCCAGAAGCCCAGATCCA  TGAGGGCTTCCAGGAGCTGC  TGAGAACACTCAACCAGCCT  GACTCTCAGCTCCAGCTCAC  AACAGGCAATGGGCTCTTCC  TCTCTGAGGGCCTCAAGCTT  GTAGACAAGTTCCTGGAGGA  TGTCAAGAAGCTCTACCACT  CTGAAGCCTTACAGTCAAC  TTTGGAGACACAGAGGAAG  CCAAGAAGCAGATCAATGA  CTATGTAGAGAAGGGGACTC  AGGGCAAGATAGTAGACCTT  GTCAAGGAGCTGGACAGAG  ACACAGTCTTTGCACTGGTC  AACTACATCTTCTTCAAGGG  GAAGTGGGAGAGACCCTTG  AAGTCAAGGACACAGAGGA  GGAGGACTTCCATGTAGACC</p>

			AGGTGACAACAGTCAAGGTT CCCATGATGAAGAGACTTGG CATGTTCAATATCCAGCACT GCAAGAAGCTCAGCTCTTGG GTCCTCCTCATGAAGTACCT TGGCAATGCAACAGCAATCT TCTTCCTTCCTGATGAGGGC AAGCTCCAGCACCTTGAGAA TGAGCTGACACATGACATCA TCACAAAGTTCCTGGAGAAT GAGGACAGAAGGTCTGCAT CTCTCCACCTTCCAAAGCTC AGCATCACAGGCACCTATGA CCTCAAGTCTGTCCTTGGCC AGCTTGGCATCACAAAGGTC TTCTCTAATGGTGCAGACCT CTCTGGAGTCACAGAGGAA GCCCCCTCAAGCTCAGCAA GGCTGTGCACAAGGCTGTGC TCACAATAGATGAGAAGGG GACAGAGGCTGCAGGTGCC ATGTTCTGGAAGCCATCCC CATGAGCATCCCACCAGAAG TCAAGTTCAACAAGCCTTTT GTCTTCCTGATGATAGAGCA GAACACAAAGTCTCCCCTCT TCATGGGCAAGGTAGTCAAC CCCACTCAAAG
	Копия 2 SERPINA1 (обр. комп.)	A1AT без SP, истощенный по CpG (SEQ ID NO: 782)	GAGGACCCCCAGGGAGATG CAGCCCAGAAGACAGACAC CAGCCACCATGACCAGGACC ACCCACCTTCAACAAGATC ACCCCAACCTGGCAGAGTT TGCCTTCAGCCTGTACAGGC AGCTGGCCCACCAGAGCAA

		CAGCACCAACATCTTCTTCA GCCCAGTGAGCATAGCCACA GCCTTTGCCATGCTGAGCCT GGGCACCAAGGCAGACACC CATGATGAGATCCTGGAGGG CCTGAACTTCAACCTGACAG AGATCCCAGAGGCCCAGATC CATGAGGGCTTCCAGGAGCT GCTGAGGACCCTGAACCAGC CAGACAGCCAGCTGCAGCTG ACCACAGGCAATGGCCTGTT CCTGTCTGAGGGCCTGAAGC TGGTGGACAAGTTCCTGGAG GATGTGAAGAAGCTGTACCA CTCTGAGGCCTTCACAGTGA ACTTTGGAGACACAGAGGA GGCCAAGAAGCAGATCAAT GACTATGTGGAGAAGGGCA CCCAGGGCAAGATAGTGGA CCTGGTGAAGGAGCTGGAC AGGGACACAGTGTTTGCCCT GGTGA ACTACATCTTCTTCA AGGGCAAGTGGGAGAGGCC CTTTGAGGTGAAGGACACAG AGGAGGAGGACTTCCATGTG GACCAGGTGACCACAGTGA AGGTGCCCATGATGAAGAG GCTGGGCATGTTCAATATCC AGCACTGCAAGAAGCTGAG CAGCTGGGTGCTGCTGATGA AGTACCTGGGCAATGCCACA GCCATCTTCTTCCCTGCCAGA TGAGGGCAAGCTGCAGCAC CTGGAGAATGAGCTGACCCA TGACATCATCACCAAGTTCC
--	--	---

			<p>TGGAGAATGAGGACAGGAG  GTCTGCCAGCCTGCACCTGC  CCAAGCTGAGCATCACAGGC  ACCTATGACCTGAAGTCTGT  GCTGGGCCAGCTGGGCATCA  CCAAGGTGTTTCAGCAATGGA  GCAGACCTGTCTGGAGTGAC  AGAGGAGGCCCCCCTGAAG  CTGAGCAAGGCAGTGCACA  AGGCAGTGCTGACCATAGAT  GAGAAGGGCACAGAGGCAG  CAGGAGCCATGTTCCCTGGAG  GCCATCCCCATGAGCATCCC  CCCAGAGGTGAAGTTCAACA  AGCCTTTTGTGTTCCCTGATG  ATAGAGCAGAACACCAAGA  GCCCCCTGTTTCATGGGCAAG  GTGGTGAACCCACCCAGAA  GTAA</p>
2	Полная последовательность	(SEQ ID NO: 720)	<p>TTGGCCACTCCCTCTCTGCG  CGCTCGCTCGCTCACTGAGG  CCGGGCGACCAAAGGTCGC  CCGACGCCCGGGCTTTGCCC  GGGCGGCCTCAGTGAGCGA  GCGAGCGCGCAGAGAGGGA  GTGGCCAACTCCATCACTAG  GGGTTCCCTAGATCTACTAGTt  aggtcagtgaagagaagaacaaaaagcagc  atattacagttagttgtcttcatcaatctttaatat  gttgtgtggtttttctctccctgtttccacagttG  AGGACCCCCAGGGCGACGC  CGCCAGAAGACCGACACC  AGCCACCACGACCAGGACC  ACCCACCTTCAACAAGATC</p>

		ACCCCAACCTGGCCGAGTT CGCCTTCAGCCTGTACAGGC AGCTGGCCCACCAGAGCAA CAGCACCAACATCTTCTTCA GCCCCGTGAGCATCGCCACC GCCTTCGCCATGCTGAGCCT GGGCACCAAGGCCGACACC CACGACGAGATCCTGGAGG GCCTGAACTTCAACCTGACC GAGATCCCCGAGGCCAGAT CCACGAGGGCTTCCAGGAGC TGCTGAGGACCCTGAACCAG CCCGACAGCCAGCTGCAGCT GACCACCGGCAACGGCCTGT TCCTGAGCGAGGGCCTGAAG CTGGTGGACAAGTTCCTGGA GGACGTGAAGAAGCTGTAC CACAGCGAGGCCTTCACCGT GAACTTCGGCGACACCGAG GAGGCCAAGAAGCAGATCA ACGACTACGTGGAGAAGGG CACCCAGGGCAAGATCGTG GACCTGGTGAAGGAGCTGG ACAGGGACACCGTGTTCCGCC CTGGTGAACTACATCTTCTT CAAGGGCAAGTGGGAGAGG CCCTTCGAGGTGAAGGACAC CGAGGAGGAGGACTTCCAC GTGGACCAGGTGACCACCGT GAAGGTGCCCATGATGAAG AGGCTGGGCATGTTCAACAT CCAGCACTGCAAGAAGCTG AGCAGCTGGGTGCTGCTGAT GAAGTACCTGGGCAACGCC ACCGCCATCTTCTTCCTGCC
--	--	---

		<p> CGACGAGGGCAAGCTGCAG  CACCTGGAGAACGAGCTGA  CCCACGACATCATCACCAAG  TTCCTGGAGAACGAGGACA  GGAGGAGCGCCAGCCTGCA  CCTGCCCAAGCTGAGCATCA  CCGGCACCTACGACCTGAAG  AGCGTGCTGGGCCAGCTGGG  CATCACCAAGGTGTTTCAGCA  ACGGCGCCGACCTGAGCGG  CGTGACCGAGGAGGCCCCCC  TGAAGCTGAGCAAGGCCGT  GCACAAGGCCGTGCTGACCA  TCGACGAGAAGGGCACCGA  GGCCGCCGGCGCCATGTTCC  TGGAGGCCATCCCCATGAGC  ATCCCCCCGAGGTGAAGTT  CAACAAGCCTTTCGTGTTCC  TGATGATCGAGCAGAACACC  AAGAGCCCCCTGTTTCATGGG  CAAGGTGGTGAACCCACCC  AGAAGTAACAGACATGATA  AGATACATTGATGAGTTTGG  ACAAACCACA ACTAGAATG  CAGTGAAAAAATGCTTTAT  TTGTGAAATTTGTGATGCTA  TTGCTTTATTTGTAACCATTA  TAAGCTGCAATAACAAGTT  ACAACAACAATTGCATTCA  TTTTATGTTTCAGGTTTCAGG  GGGAGGTGTGGGAGGTTTTT  Tggggataccccctagagccccagctggttct  ttccgcctcagaagCCATAGAGCCC  ACCGCATCCCCAGCATGCCT  GCTATTGTCTTCCCAATCCTC </p>
--	--	--

		<p>         CCCCTTGCTGTCCTGCCCA          CCCACCCCCCAGAATAGAA          TGACACCTACTCAGACAATG          CGATGCAATTCCTCATTTT          ATTAGGAAAGGACAGTGGG          AGTGGCACCTTCCAGGGTCA          AGGAAGGCACGGGGGAGGG          GCAAACAACAGATGGCTGG          CAACTAGAAGGCACAGTCGa          ggtaTTTTTGGGTGGGATTCA          CCACTTTTCCCATGAAGAGG          GGTGATTTAGTGTTCTGCTC          GATCATGAGAAATACAAA          GGTTTGTTGAACTTGACCTC          GGGGGGGATAGACATGGGT          ATGGCCTCTAAAAACATGGC          CCCAGCAGCCTCGGTGCCCT          TCTCGTCGATGGTCAGCACA          GCCTTATGCACGGCCTTGGA          GAGCTTCAGGGGTGCCTCCT          CTGTGACCCCGGAGAGGTCA          GCCCATTGCTGAAGACCTT          AGTGATGCCCAGTTGACCCA          GGACGCTCTTCAGATCATAG          GTTCCAGTAATGGACAGTTT          GGGTAAATGTAAGCTGGCA          GACCTTCTGTCTTCATTTTCC          AGGAACTTGGTGATGATATC          GTGGGTGAGTTCATTTTCCA          GGTGCTGTAGTTTCCCCTCA          TCAGGCAGGAAGAAGATGG          CGGTGGCATTGCCCAGGTAT          TTCATCAGCAGCACCCAGCT          GGACAGCTTCTTACAGTGCT          GGATATTGAACATAACCAAGC       </p>
--	--	--

		<p>CTTTTCATCATAGGCACCTT CACGGTGGTCACCTGGTCCA CGTGGAAGTCCTCTTCCTCG GTGTCCTTGACTTCAAAGGG TCTCTCCCATTTGCCTTTAAA GAAGATGTAATTCACCAGAG CAAAAACGTGTCTCTGTCA AGCTCCTTGACCAAATCCAC AATTTCCCTTGAGTACCCTT CTCCACGTAATCGTTGATCT GTTTCTTGGCCTCTTCGGTGT CCCCGAAGTTGACAGTGAAG GCTTCTGAGTGGTACAACCTT TTAACATCCTCCAAAAACT TATCCACTAGCTTCAGGCC TCGCTGAGGAACAGGCCATT GCCGGTGGTCAGCTGGAGCT GGCTGTCTGGCTGGTTGAGG GTACGGAGGAGTTCCTGGAA GCCTTCATGGATCTGAGCCT CCGGAATCTCCGTGAGGTTG AAATTCAGGCCCTCCAGGAT TTCATCGTGAGTGTGAGCCT TGGTCCCCAGGGAGAGCATT GCAAAGGCTGTAGCGATGCT CACTGGGGAGAAGAAGATA TTGGTGCTGTTGGACTGGTG TGCCAGCTGGCCGGTATAGGC TGAAGGCGAACTCAGCCAG GTTGGGGGTGATCTTGTTGA AGGTTGGGTGATCCTGATCA TGGTGGGATGTATCTGTCTT CTGGGCAGCATCTCCCTGGG GATCCTCaactgtggaacagggagag aaaaaccacacaacatatttaaagattgatgaa</p>
--	--	---

		<p> gacaactaactgtaatatgctgctttttgttctct  cttcaactgacctaACTAGTAGATCT  AGGAACCCCTAGTGATGGA  GTTGGCCACTCCCTCTCTGC  GCGCTCGCTCGCTCACTGAG  GCCGCCCGGGCAAAGCCCG  GGCGTCGGGCGACCTTTGGT  CGCCCGGCCTCAGTGAGCGA  GCGAGCGCGCAGAGAGGGA  GTGGCCA Aacgcgtggtgtaatcatggt  catagctgttctgtgtgaaattgttatccgctc  acaattccacacaacatacagaccggaagcat  aaagtgtaaagcctgggggtgcctaatgagtga  gctaactcacattaattgcgttgcgctcactgcc  cgctttccagtcgggaaacctgtcgtgccagct  gcattaatgaatcggccaacgcgcggggaga  ggcggtttgcgtattgggcgctcttccgcttct  cgctcaactgactcgtgcgctcggtcgttcggc  tgcggcgagcggatcagctcactcaaaggc  gtaatacggttatccacagaatcaggggata  acgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggcc  agcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccg  cgttgctggcgttttccataggctccgcccc  tgacgagcatcacaaaaatcgacgctcaagtc  agaggtggcgaaacccgacaggactataaag  ataccaggcgttccccctggaagtcctcctgt  gcgctctcctgttccgaccctgccgcttaccgg  atacctgtccgcctttctccctcgggaagcgtg  gcgctttctcatagctcacgctgtaggatctca  gttcgggtgtaggtcgttcgctccaagctgggct  gtgtgcacgaacccccgttcagcccaccg  ctgcgccttatccggtaactatcgtcttgatcc  aaccggtaagacacgacttatgccactggc  agcagccactggtaacaggattagcagagcg  aggtatgtaggcggtgctacagagttcttgaag </p>
--	--	--

		<p>tggtggcctaactacggctacactagaagaac agtatttggatctgcgctctgctgaagccagt acctcggaaaaagagttggtagctctgatcc ggcaacaaccaccgctggtagcgggtggtt tttgttgcaagcagcagattacgcgcagaaa aaaaggatctcaagaagatccttgatctttcta cggggtctgacgctcagtggaacgaaaactc acgttaagggattttggtcatgagattatcaaaa aggatcttcactagatccttttaattaaaaatg aagtttfaatcaagcccaatctgaataatgta caaccaattaaccaattctgattagaaaaactca tcgagcatcaaatgaaactgcaatttattcatat caggattatcaataccatattttgaaaaagccg ttctgtaatgaaggagaaaactcaccgaggc agttcataggatggcaagatcctggtatcgg ctgcgattccgactcgtccaacatcaatacaac ctattaattcccctcgtcaaaaataaggttatca agtgagaaatcaccatgagtgacgactgaatc cggtgagaatggcaaaagttatgcatttcttc cagacttgtcaacaggccagccattacgctcg tcatcaaatcactcgcataaccaaacggttat tcattcgtgattgcgctgagcgagacgaaata cgcgatcgtgttaaaaggacaattacaaaca ggaatcgaatgcaaccggcgcaggaactg ccagcgcatacaaatatttcacctgaatcag gatattcttctaataacctggaatgctgtttccgg ggatcgcagtggtgagtaacctgcatcatca ggagtacggataaaatgcttgatggtcggag aggcataaattccgtcagccagtttagtctgac catctcatctgtaacatcattggcaacgetacct ttgcatgttccagaaacaactctggcgcacg ggcttccatacaagegatagattgtcgcacct gattgccgacattatcgcgagccatttatac ccatataaatcagcatccatgttgaatttaac gcggcctcgacgttcccgttgaatatggctca</p>
--	--	---

			<p> taacacccttgattactgtttatgtaagcagac  agttttattgttcatgatgatatattttatcttgtgc  aatgtaacatcagagattttgagacacgggcc  agagctgcatcgcgcttcgggtgatgacggt  gaaaacctctgacacatgcagctcccggaga  cggtcacagcttgtctgtaagcggatgccggg  agcagacaagcccgtcagggcgcgtcagcg  ggtgttggcgggtgtcggggctggcttaactat  gcggcatcagagcagattgtactgagagtgca  ccatatgcggtgtgaaataccgcacagatgcg  taaggagaaaataaccgcatcagggcgcattcg  ccattcaggctgcgcaactgttgggaagggcg  atcgggtcgggcctcttcgctattacgccagct  ggcgaaaggggggatgtgctgcaaggcgatta  agttgggtaacgccagggtttcccagtcacga  cgttgtaaacgacggccagagaattc </p>
Копия 1 SERPINA1		<p> A1AT без SP  (альтернативн  ая частота  использования  кодонов 1)  (SEQ ID NO:  721) </p>	<p> GAGGACCCCCAGGGCGACG  CCGCCAGAAGACCGACAC  CAGCCACCACGACCAGGAC  CACCCACCTTCAACAAGAT  CACCCCAACCTGGCCGAGT  TCGCCTTCAGCCTGTACAGG  CAGCTGGCCCACCAGAGCA  ACAGCACCAACATCTTCTTC  AGCCCCGTGAGCATCGCCAC  CGCCTTCGCCATGCTGAGCC  TGGGCACCAAGGCCGACAC  CCACGACGAGATCCTGGAG  GGCCTGAACTTCAACCTGAC  CGAGATCCCCGAGGCCAG  ATCCACGAGGGCTTCCAGGA  GCTGCTGAGGACCCTGAACC  AGCCCGACAGCCAGCTGCA  GCTGACCACGGCAACGGCC  TGTTCTGAGCGAGGGCCTG </p>

			AAGCTGGTGGACAAGTTCCT GGAGGACGTGAAGAAGCTG TACCACAGCGAGGCCTTCAC CGTGAACTTCGGCGACACCG AGGAGGCCAAGAAGCAGAT CAACGACTACGTGGAGAAG GGCACCCAGGGCAAGATCG TGGACCTGGTGAAGGAGCTG GACAGGGACACCGTGTTTCGC CCTGGTGAACTACATCTTCT TCAAGGGCAAGTGGGAGAG GCCCTTCGAGGTGAAGGACA CCGAGGAGGAGGACTTCCA CGTGGACCAGGTGACCACCG TGAAGGTGCCCATGATGAAG AGGCTGGGCATGTTCAACAT CCAGCACTGCAAGAAGCTG AGCAGCTGGGTGCTGCTGAT GAAGTACCTGGGCAACGCC ACCGCCATCTTCTTCCTGCC CGACGAGGGCAAGCTGCAG CACCTGGAGAACGAGCTGA CCCACGACATCATCACCAAG TTCCTGGAGAACGAGGACA GGAGGAGCGCCAGCCTGCA CCTGCCCAAGCTGAGCATCA CCGGCACCTACGACCTGAAG AGCGTGCTGGGCCAGCTGGG CATCACCAAGGTGTTTCAGCA ACGGCGCCGACCTGAGCGG CGTGACCGAGGAGGCCCCCC TGAAGCTGAGCAAGGCCGT GCACAAGGCCGTGCTGACCA TCGACGAGAAGGGCACCGA GGCCGCCGGCGCCATGTTCC
--	--	--	---

			<p>TGGAGGCCATCCCCATGAGC  ATCCCCCCGAGGTGAAGTT  CAACAAGCCTTTCGTGTTCC  TGATGATCGAGCAGAACACC  AAGAGCCCCCTGTTCATGGG  CAAGGTGGTGAACCCACCC  AGAAGTAA</p>
	<p>Копия 2 SERPINA1  (обр. комп.)</p>	<p>A1AT без SP  (SEQ ID NO:  722)</p>	<p>GAGGATCCCCAGGGAGATG  CTGCCAGAAGACAGATAC  ATCCCACCATGATCAGGATC  ACCCAACCTTCAACAAGATC  ACCCCAACCTGGCTGAGTT  CGCCTTCAGCCTATAACGCC  AGCTGGCACACCAGTCCAAC  AGCACCAATATCTTCTTCTC  CCCAGTGAGCATCGCTACAG  CCTTTGCAATGCTCTCCCTG  GGGACCAAGGCTGACACTC  ACGATGAAATCCTGGAGGG  CCTGAATTTCAACCTCACGG  AGATTCCGGAGGCTCAGATC  CATGAAGGCTTCCAGGAACT  CCTCCGTACCCTCAACCAGC  CAGACAGCCAGCTCCAGCTG  ACCACCGGCAATGGCCTGTT  CCTCAGCGAGGGCCTGAAGC  TAGTGGATAAGTTTTTGGAG  GATGTTAAAAAGTTGTACCA  CTCAGAAGCCTTCACTGTCA  ACTTCGGGGACACCGAAGA  GGCCAAGAAACAGATCAAC  GATTACGTGGAGAAGGGTA  CTCAAGGGAAAATTGTGGAT  TTGGTCAAGGAGCTTGACAG  AGACACAGTTTTTGGCTCTGG</p>

			<p>TGAATTACATCTTCTTTAAA  GGCAAATGGGAGAGACCCT  TTGAAGTCAAGGACACCGA  GGAAGAGGACTTCCACGTG  GACCAGGTGACCACCGTGA  AGGTGCCTATGATGAAAAG  GCTTGGTATGTTCAATATCC  AGCACTGTAAGAAGCTGTCC  AGCTGGGTGCTGCTGATGAA  ATACCTGGGCAATGCCACCG  CCATCTTCTTCCTGCCTGATG  AGGGGAAACTACAGCACCT  GGAAAATGAACTCACCCAC  GATATCATCACCAAGTTCCT  GGAAAATGAAGACAGAAGG  TCTGCCAGCTTACATTTACC  CAAAGTGTCCATTACTGGAA  CCTATGATCTGAAGAGCGTC  CTGGGTCAACTGGGCATCAC  TAAGGTCTTCAGCAATGGGG  CTGACCTCTCCGGGGTCACA  GAGGAGGCACCCCTGAAGC  TCTCCAAGGCCGTGCATAAG  GCTGTGCTGACCATCGACGA  GAAGGGCACCGAGGCTGCT  GGGGCCATGTTTTTAGAGGC  CATACCCATGTCTATCCCCC  CCGAGGTCAAGTTCAACAAA  CCTTTTGTATTTCTCATGATC  GAGCAGAACACTAAATCAC  CCCTCTTCATGGGAAAAGTG  GTGAATCCCACCCAAAAAataa</p>
3	Полная последовательность	(SEQ ID NO: 730)	<p>TTGGCCACTCCCTCTCTGCG  CGCTCGCTCGCTCACTGAGG</p>

		<p>CCGGGCGACCAAAGGTCGC CCGACGCCCCGGGCTTTGCCC GGGCGGCCTCAGTGAGCGA GCGAGCGCGCAGAGAGGGA GTGGCCAACCTCCATCACTAG GGGTTCCCTAGATCTACTAGT ATAACTTCGTATAGCATAACA TTATACGAAGTTATATGTAT GCtaggtcagtggaagagaagaacaaaaagc agcatattacagttagttgtcttcatcaatctttaa atatgttgtgtggtttttctctccctgtttccacagt tGAGGACCCCCAGGGCGACG CCGCCAGAAGACCGACAC CAGCCACCACGACCAGGAC CACCCACCTTCAACAAGAT CACCCCCAACCTGGCCGAGT TCGCCTTCAGCCTGTACAGG CAGCTGGCCCACCAGAGCA ACAGCACCAACATCTTCTTC AGCCCCGTGAGCATCGCCAC CGCCTTCGCCATGCTGAGCC TGGGCACCAAGGCCGACAC CCACGACGAGATCCTGGAG GGCCTGAACTTCAACCTGAC CGAGATCCCCGAGGCCAG ATCCACGAGGGCTTCCAGGA GCTGCTGAGGACCCTGAACC AGCCCGACAGCCAGCTGCA GCTGACCACCGGCAACGGCC TGTTCCCTGAGCGAGGGCCTG AAGCTGGTGGACAAGTTCCT GGAGGACGTGAAGAAGCTG TACCACAGCGAGGCCTTCAC CGTGAACTTCGGCGACACCG AGGAGGCCAAGAAGCAGAT</p>
--	--	---

		CAACGACTACGTGGAGAAG GGCACCCAGGGCAAGATCG TGGACCTGGTGAAGGAGCTG GACAGGGACACCGTGTTTCGC CCTGGTGA ACTACATCTTCT TCAAGGGCAAGTGGGAGAG GCCCTTCGAGGTGAAGGACA CCGAGGAGGAGGACTTCCA CGTGGACCAGGTGACCACCG TGAAGGTGCCCATGATGAAG AGGCTGGGCATGTTCAACAT CCAGCACTGCAAGAAGCTG AGCAGCTGGGTGCTGCTGAT GAAGTACCTGGGCAACGCC ACCGCCATCTTCTTCCTGCC CGACGAGGGCAAGCTGCAG CACCTGGAGAACGAGCTGA CCCACGACATCATACCAAG TTCCTGGAGAACGAGGACA GGAGGAGCGCCAGCCTGCA CCTGCCCAAGCTGAGCATCA CCGGCACCTACGACCTGAAG AGCGTGCTGGGCCAGCTGGG CATCACCAAGGTGTTTCAGCA ACGGCGCCGACCTGAGCGG CGTGACCGAGGAGGCCCCCC TGAAGCTGAGCAAGGCCGT GCACAAGGCCGTGCTGACCA TCGACGAGAAGGGCACCGA GGCCGCCGGCGCCATGTTCC TGGAGGCCATCCCCATGAGC ATCCCCCCGAGGTGAAGTT CAACAAGCCTTTCGTGTTCC TGATGATCGAGCAGAACACC AAGAGCCCCCTGTTTCATGGG
--	--	---

		<p> CAAGGTGGTGAACCCACCC  AGAAGTAACAGACATGATA  AGATACATTGATGAGTTTGG  ACAAACCACAACCTAGAATG  CAGTGAAAAAATGCTTTAT  TTGTGAAATTTGTGATGCTA  TTGCTTTATTTGTAACCATTA  TAAGCTGCAATAACAAGTT  ACAACAACAATTGCATTCA  TTTTATGTTTCAGGTTTCAGG  GGGAGGTGTGGGAGGTTTTT  Tggggataccccctagagccccagctggttct  ttccgcctcagaagCCATAGAGCCC  ACCGCATCCCCAGCATGCCT  GCTATTGTCTTCCCAATCCTC  CCCCTTGCTGTCCTGCCCA  CCCCACCCCCAGAATAGAA  TGACACCTACTCAGACAATG  CGATGCAATTCCTCATT  ATTAGGAAAGGACAGTGGG  AGTGGCACCTTCCAGGGTCA  AGGAAGGCACGGGGGAGGG  GCAAACAACAGATGGCTGG  CAACTAGAAGGCACAGTCGa  ggttaTTTTTGGGTGGGATTCA  CCACTTTTCCCATGAAGAGG  GGTGATTTAGTGTTCTGCTC  GATCATGAGAAATACAAA  GGTTTGTTGAACTTGACCTC  GGGGGGGATAGACATGGGT  ATGGCCTCTAAAAACATGGC  CCCAGCAGCCTCGGTGCCCT  TCTCGTCGATGGTCAGCACA  GCCTTATGCACGGCCTTGGA  GAGCTTCAGGGGTGCCTCCT </p>
--	--	---

		CTGTGACCCCGGAGAGGTCA GCCCCATTGCTGAAGACCTT AGTGATGCCCAGTTGACCCA GGACGCTCTTCAGATCATAG GTTCCAGTAATGGACAGTTT GGGTAAATGTAAGCTGGCA GACCTTCTGTCTTCATTTTCC AGGAACTTGGTGATGATATC GTGGGTGAGTTCATTTTCCA GGTGCTGTAGTTTCCCCTCA TCAGGCAGGAAGAAGATGG CGGTGGCATTGCCCAGGTAT TTCATCAGCAGCACCCAGCT GGACAGCTTCTTACAGTGCT GGATATTGAACATACCAAGC CTTTTCATCATAGGCACCTT CACGGTGGTCACCTGGTCCA CGTGGAAGTCCTCTTCCTCG GTGTCCTTGACTTCAAAGGG TCTCTCCCATTTCCTTTAAA GAAGATGTAATTCACCAGAG CAAAAACGTGTCTCTGTCA AGCTCCTTGACCAAATCCAC AATTTCCCTTGAGTACCCTT CTCCACGTAATCGTTGATCT GTTTCTTGGCCTCTTCGGTGT CCCCGAAGTTGACAGTGAAG GCTTCTGAGTGGTACAACCTT TTAACATCCTCCAAAAACT TATCCACTAGCTTCAGGCC TCGCTGAGGAACAGGCCATT GCCGGTGGTCAGCTGGAGCT GGCTGTCTGGCTGGTTGAGG GTACGGAGGAGTTCCTGGAA GCCTTCATGGATCTGAGCCT
--	--	--

		<p>           CCGGAATCTCCGTGAGGTTG            AAATTCAGGCCCTCCAGGAT            TTCATCGTGAGTGTGAGCCT            TGGTCCCCAGGGAGAGCATT            GCAAAGGCTGTAGCGATGCT            CACTGGGGAGAAGAAGATA            TTGGTGCTGTTGGACTGGTG            TGCCAGCTGGCGGTATAGGC            TGAAGGCGAACTCAGCCAG            GTTGGGGGTGATCTTGTGTA            AGGTTGGGTGATCCTGATCA            TGGTGGGATGTATCTGTCTT            CTGGGCAGCATCTCCCTGGG            GATCCTCaactgtgaaacaggagag            aaaaaccacacaacatattaaagattgatgaa            gacaactaactgtaatatgctgctttttgttctct            cttcactgacctAATGTATGCATAA            CTTCGTATAGCATAACATTAT            ACGAAGTTATACTAGTAGAT            CTAGGAACCCCTAGTGATGG            AGTTGGCCACTCCCTCTCTG            CGCGCTCGCTCGCTCACTGA            GGCCGCCC GGGCAAAGCCC            GGGCGTCGGGCGACCTTTGG            TCGCCCGGCCTCAGTGAGCG            AGCGAGCGCGCAGAGAGGG            AGTGGCCAAacgcgtggtgtaatcatg            gtcatactgctgtgtaaattgtatccgc            tcacaattccacacaacatacagagccggaagc            ataaagtgtaaagcctggggtgcctaatgagt            gagctaactcacattaattgcgtgcgctcactg            cccgcttccagtcgggaaacctgtcgtgcca            gctgcattaatgaatcggccaacgcgcgggg            agaggcggttgcgtattggcgctcttccgct            tctcgtcactgactcgtgcgctcggtcgttc         </p>
--	--	---

		<p> ggctgcggcgagcggatcagctcactcaaa  ggcggtaatacggffatccacagaatcagggg  ataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaagg  ccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggc  cgcggtgctggcggtttccataggctccgccc  ccctgacgagcatcacaaaaatcgacgctcaa  gtcagaggtggcgaaaccgacaggactata  aagataccaggcggtttcccctggaagtcct  cgtgcgctctctgttccgacctgccgcttac  cggatacctgtccgcctttccctcgggaag  cgtggcgctttctcatagctcacgctgtaggtat  ctcagttcgggtgtaggtcgttcgctcaagctg  ggctgtgtgcacgaacccccgttcagcccga  ccgctgcgccttatccgtaactatcgtcttgag  tccaaccggtaagacacgacttatgccact  ggcagcagccactggtaacaggattagcaga  gcgaggtatgtaggcggtgctacagagttcttg  aagtgggtgcctaactacggctacactagaag  aacagtattggtatctgcgctctgctgaagcca  gtfaccttcgaaaaagagttgtagctcttgat  ccggcaaacaccaccgctggtagcgggtgg  ttttttgttgcaagcagcagattacgcgcaga  aaaaaaggatctcaagaagatccttgatcttt  ctacggggtctgacgctcagtggaacgaaaa  ctcacgtaagggattttggtcatgagattatca  aaaaggatctcacctagatcctttaaattaaaa  atgaagttttaatcaagcccaatctgaataatg  ttacaaccaattaaccaattctgattagaaaaac  tcatcgagcatcaaatgaaactgcaatttattca  tatcaggattatcaataccatattttgaaaaagc  cgtttctgtaatgaaggagaaaactcaccgag  gcagttccataggatggcaagatcctggtatcg  gtctgcgattccgactcgtccaacatcaataca  acctattaatttcccctcgtcaaaaataaggttat  caagtgagaaatccatgagtgacgactgaa </p>
--	--	---

			<p>tccggtgagaatggcaaaagtttatgcatttcttt  ccagacttgtcaacaggccagccattacgctc  gtcatcaaaatcactcgcacatcaaccaaaccgtt  attcattcgtgattgcgcctgagcgagacgaaa  tacgcgatcgtgtfaaaaggacaattacaaac  aggaatcgaatgcaaccggcgcaggaacact  gccagcgcacatcaacaatattttcacctgaatca  ggatattcttctaataacctggaatgctgttttccg  gggatcgcagtggtgagtaacctgcatcatc  aggagtacggataaaatgcttgatggtcggaa  gaggcataaattccgtcagccagtttagtctga  ccatctcatctgtaacatcattggcaacgctacc  tttgccatgtttcagaacaactctggcgcacg  ggcttccatacaagegatagattgtcgcacct  gattgcccgacattatcgcgagccatttatac  ccatataaatcagcatccatgttgaatttaac  gcggcctcgacgttcccgttgaatatggtca  taacacccttgattactgtttatgtaagcagac  agttttattgttcatgatgatattttatcttgtc  aatgtaacatcagagattttgagacacgggcc  agagctgcacgcgcgttccggtgatgacggt  gaaaacctctgacacatgcagctcccggaga  cggtcacagcttgtctgtaagcggatgccggg  agcagacaagcccgtcagggcgcgtcagcg  ggtgttggcgggtgtcggggctggcttaactat  gcggcatcagagcagattgtactgagagtgca  ccatatcgggtgtgaaataccgcacagatgcg  taaggagaaaataccgcatcagggccattcg  ccattcaggctgcgcaactgttgggaagggcg  atcgggtcgggcctcttcgctattacgccagct  ggcgaaaggggggatgtgctgcaaggcgatta  agttgggtaacgccaggggtttccagtcacga  cgttgtaaaacgacggccagagaattc</p>
	Копия 1 SERPINA1	A1AT без SP (альтернативн	GAGGACCCCCAGGGCGACG CCGCCAGAAGACCGACAC

		<p>ая частота использования кодонов 1) (SEQ ID NO: 731)</p>	<p>CAGCCACCACGACCAGGAC CACCCACCTTCAACAAGAT CACCCCAACCTGGCCGAGT TCGCCTTCAGCCTGTACAGG CAGCTGGCCCACCAGAGCA ACAGCACCAACATCTTCTTC AGCCCCGTGAGCATCGCCAC CGCCTTCGCCATGCTGAGCC TGGGCACCAAGGCCGACAC CCACGACGAGATCCTGGAG GGCCTGAACTTCAACCTGAC CGAGATCCCCGAGGCCAG ATCCACGAGGGCTTCCAGGA GCTGCTGAGGACCCTGAACC AGCCCGACAGCCAGCTGCA GCTGACCACCGGCAACGGCC TGTTCTGAGCGAGGGCCTG AAGCTGGTGGACAAGTTCCT GGAGGACGTGAAGAAGCTG TACCACAGCGAGGCCTTAC CGTGAACTTCGGCGACACCG AGGAGGCCAAGAAGCAGAT CAACGACTACGTGGAGAAG GGCACCCAGGGCAAGATCG TGGACCTGGTGAAGGAGCTG GACAGGGACACCGTGTTTCGC CCTGGTGAACTACATCTTCT TCAAGGGCAAGTGGGAGAG GCCCTTCGAGGTGAAGGACA CCGAGGAGGAGGACTTCCA CGTGGACCAGGTGACCACCG TGAAGGTGCCCATGATGAAG AGGCTGGGCATGTTCAACAT CCAGCACTGCAAGAAGCTG AGCAGCTGGGTGCTGCTGAT</p>
--	--	---	--

			GAAGTACCTGGGCAACGCC ACCGCCATCTTCTTCCTGCC CGACGAGGGCAAGCTGCAG CACCTGGAGAACGAGCTGA CCCACGACATCATCACCAAG TTCCTGGAGAACGAGGACA GGAGGAGCGCCAGCCTGCA CCTGCCCAAGCTGAGCATCA CCGGCACCTACGACCTGAAG AGCGTGCTGGGCCAGCTGGG CATCACCAAGGTGTTTCAGCA ACGGCGCCGACCTGAGCGG CGTGACCGAGGAGGCCCCCC TGAAGCTGAGCAAGGCCGT GCACAAGGCCGTGCTGACCA TCGACGAGAAGGGCACCGA GGCCGCCGGCGCCATGTTCC TGGAGGCCATCCCCATGAGC ATCCCCCCCCGAGGTGAAGTT CAACAAGCCTTTCGTGTTCC TGATGATCGAGCAGAACACC AAGAGCCCCCTGTTCATGGG CAAGGTGGTGAACCCACCC AGAAGTAA
	Копия 2 SERPINA1 (обр. комп.)	A1AT без SP (SEQ ID NO: 732)	GAGGATCCCCAGGGAGATG CTGCCCAGAAGACAGATAC ATCCCACCATGATCAGGATC ACCCAACCTTCAACAAGATC ACCCCAACCTGGCTGAGTT CGCCTTCAGCCTATAACCGCC AGCTGGCACACCAGTCCAAC AGCACCAATATCTTCTTCTC CCCAGTGAGCATCGCTACAG CCTTTGCAATGCTCTCCCTG GGGACCAAGGCTGACACTC

		ACGATGAAATCCTGGAGGG CCTGAATTTCAACCTCACGG AGATTCCGGAGGCTCAGATC CATGAAGGCTTCCAGGA CCTCCGTACCCTCAACCAGC CAGACAGCCAGCTCCAGCTG ACCACCGGCAATGGCCTGTT CCTCAGCGAGGGCCTGAAGC TAGTGGATAAGTTTTTGGAG GATGTTAAAAAGTTGTACCA CTCAGAAGCCTTCACTGTCA ACTTCGGGGACACCGAAGA GGCCAAGAAACAGATCAAC GATTACGTGGAGAAGGGTA CTCAAGGGAAAATTGTGGAT TTGGTCAAGGAGCTTGACAG AGACACAGTTTTTGCTCTGG TGAATTACATCTTCTTTAAA GGCAAATGGGAGAGACCCT TTGAAGTCAAGGACACCGA GGAAGAGGACTTCCACGTG GACCAGGTGACCACCGTGA AGGTGCCTATGATGAAAAG GCTTGGTATGTTCAATATCC AGCACTGTAAGAAGCTGTCC AGCTGGGTGCTGCTGATGAA ATACCTGGGCAATGCCACCG CCATCTTCTTCCCTGCCTGATG AGGGGAAACTACAGCACCT GGAAAATGAACTCACCCAC GATATCATCACCAAGTTCCT GGAAAATGAAGACAGAAGG TCTGCCAGCTTACATTTACC CAAAGTGTCCATTACTGGAA CCTATGATCTGAAGAGCGTC
--	--	---

			<p>CTGGGTCAACTGGGCATCAC  TAAGGTCTTCAGCAATGGGG  CTGACCTCTCCGGGGTCACA  GAGGAGGCACCCCTGAAGC  TCTCCAAGGCCGTGCATAAG  GCTGTGCTGACCATCGACGA  GAAGGGCACCGAGGCTGCT  GGGGCCATGTTTTTAGAGGC  CATACCCATGTCTATCCCCC  CCGAGGTCAAGTTCAACAAA  CCTTTTGTATTTCTCATGATC  GAGCAGAACACTAAATCAC  CCCTCTTCATGGGAAAAGTG  GTGAATCCCACCCAAAAAataa</p>
4	Полная последовательность	(SEQ ID NO: 740)	<p>ctcaaaggcggtaatacggttatccacagaatc  aggggataacgcaggaaagaacatgtgagca  aaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaa  aaggccgcgttgctggcgttttccataggctc  cgccccctgacgagcatcacaaaaatcgac  gctcaagtcagaggtggcgaaccgacagg  actataaagataaccaggcgtttccccctggaag  ctccctcgtgcgtctcctgttccgacctgcc  gcttaccggatacctgtccgctttctccctcg  ggaagcgtggcgtttctcatagctcacgctgt  aggtatctcagttcggtgtaggtcgttcgctcca  agctgggctgtgtgcacgaacccccgttcag  cccgaccgctgcgcttatccggtaactatcgt  cttgagtccaacccggtaagacacgacttatcg  ccactggcagcagccactgtaacaggattag  cagagcgaggtatgtaggcggtgctacagag  ttcttgaagtggcctaactacggctacacta  gaagaacagtatttggtatctgcgctctgctga  agccagttaccttcgaaaaagagttggtagct  cttgatccggcaaacaaaccaccgctggtagc</p>

		<p>ggagggtttttggtgcaagcagcagattacgc gcagaaaaaaggatctcaagaagatccttg atctttctacgggtctgacgctcagtggaac gaaaactcacgtaagggttttgatgaga ttatcaaaaaggatctcacctagatcctttaa tfaaaatgaagtttfaatcaagccaatctga ataatgtfacaaccaattaaccaattctgattaga aaaactcatcgagcatcaaatgaaactgcaatt tattcatatcaggattatcaataccatattttgaa aaagccgtttctgtaatgaaggagaaaactcac cgaggcagttccataggatggcaagatcctgg tatcggctcgcgattccgactcgtccaacatca atacaacctattaatttcccctcgtcaaaaataa gggtatcaagtgagaaatcaccatgagtgacg actgaatccggtgagaatggcaaaagttatgc atttcttccagactgttcaacaggccagccatt acgctcgtcatcaaaatcactcgcataaccaa accgttattcattcgtgattgcgctgagcgag acgaaatacgcgacgctgtfaaaaggacaatt acaaacaggaatcgaatgcaaccggcgcag gaacactgccagegcatcaacaatatttacc tgaatcaggatattcttaataacctggaatgct gttttccgggatcgcagtggtgagtaacat gcatcatcaggagtacggataaaatgcttgatg gtcgggaagaggcataaattccgtcagccagttt agtctgaccatctcatctgtaacatcattggcaa cgctaccttggcatgttcagaaacaactctgg cgcatcgggcttccatacaagcgatagattgt cgcacctgattgcccacattatcgcgagccc attfataccatataaatcagcatccatgttggga attfaatcgcggcctcgcggttcccgttgaata tggctcataaacacctgttactgtttatgta agcagacagttttattgtcatgatgatattttt atcttgtgcaatgtaacatcagagattttgagac acgggccagagctgcacgcgcgttccggtga</p>
--	--	---

		<p>         tgacggtgaaaacctctgacacatgcagctcc          cggagacggtcacagcttgtctgtaagcggat          gccgggagcagacaagcccgtcagggcgcg          tcagcgggtgttgccgggtgtcggggctggct          taactatgcggcatcagagcagattgtactgag          agtgcacatatcgggtgtgaaataccgcaca          gatgcgtaaggagaaaataccgcatcaggcg          ccattcgccattcaggctgcgcaactgttggga          agggcgatcgggtcgggcctcttcgctattac          gccagctggcgaaagggggatgtgctgcaag          gcgattaagttgggtaacgccagggtttccca          gtcacgacgttgtaaaacgacggccagagaat          tcTTGGCCACTCCCTCTCTGC          GCGCTCGCTCGCTCACTGAG          GCCGGGCGACCAAAGGTCG          CCCGACGCCCGGGCTTTGCC          CGGGCGGCCTCAGTGAGCG          AGCGAGCGCGCAGAGAGGG          AGTGGCCA ACTCCATCACTA          GGGGTTCTAGATCTACTAG          Ttaggtcagtgaagagaagaacaaaaagca          gcatattacagttagttgtcttcatcaatctttaa          tatgttgtgtggttttctctccctgtttccacagtt          GAGGACCCCCAGGGCGACG          CTGCCAGAAGACGGACAC          GTCGCACCACGACCAGGACC          ACCCCACCTTCAACAAGATC          ACTCCAATCTCGCGGAGTT          CGCGTTCTCGCTCTACCGCC          AGCTCGCGCACCAGAGCAA          CTCGACTAACATCTTCTTCTC          GCCCGTCAGCATCGCGACGG          CGTTCGCGATGCTCAGCCTC          GGCACGAAGGCGGACACGC          ACGACGAGATCCTCGAGGG       </p>
--	--	---

		<p>CCTCAACTTCAATCTCACAG AGATCCCAGAAGCCCAGATC CACGAGGGCTTCCAGGAGCT GCTGCGGACGCTCAACCAGC CTGACTCGCAGCTCCAGCTC ACGACGGGCAATGGGCTCTT CCTCAGCGAGGGCCTCAAGC TCGTCGACAAGTTCCTGGAG GACGTCAAGAAGCTCTACCA CTCGGAAGCCTTCACGGTCA ACTTCGGCGACACAGAGGA AGCCAAGAAGCAGATCAAC GACTACGTGAGAAGGGGA CTCAGGGCAAGATCGTCGAC CTCGTCAAGGAGCTGGACCG AGACACGGTCTTCGCACTGG TCAACTACATCTTCTTCAAG GGGAAGTGGGAGCGCCCCTT CGAAGTCAAGGACACAGAG GAGGAGGACTTCCACGTCGA CCAGGTGACGACGGTCAAG GTTCCCATGATGAAGCGCCT CGGCATGTTCAACATCCAGC ACTGCAAGAAGCTCAGCTCG TGGGTCCTCCTCATGAAGTA CCTCGGCAACGCGACGGCG ATCTTCTTCTTCTGACGA GGGCAAGCTCCAGCACCTCG AGAACGAGCTGACGCACGA CATCATCACGAAGTTCCTGG AGAACGAGGACCGCCGATC GGCGTCGCTCCACCTTCCAA AGCTCAGCATCACGGGCACC TACGACCTCAAGTCGGTCCT CGGCCAGCTCGGCATCACGA</p>
--	--	--

		AGGTCTTCTCGAATGGTGCC GACCTCAGCGGCGTCACAGA GGAAGCCCCCTCAAGCTCA GCAAGGCTGTGCACAAGGCT GTGCTCACGATCGACGAGAA GGGGACAGAGGCTGCCGGT GCCATGTTCTGGAAGCCAT CCCCATGAGCATCCCACCAG AAGTCAAGTTCAACAAGCCT TTCGTCTTCTGATGATAGA GCAGAACACGAAGTCGCCC CTCTTCATGGGCAAGGTCGT CAACCCCACTCAAAGTAAC AGACATGATAAGATACATTG ATGAGTTTGGACAAACCACA ACTAGAATGCAGTGAAAAA AATGCTTTATTTGTGAAATT TGTGATGCTATTGCTTTATTT GTAACCATTATAAGCTGCAA TAAACAAGTTAACAACAAC AATTGCATTCATTTTATGTTT CAGG TTCAGGGGGAGGTGT GGGAGGTTTTTTggggataccct agagccccagctggttcttccgctcagaag CCATAGAGCCCACCGCATCC CCAGCATGCCTGCTATTGTC TTCCAATCCTCCCCCTTGCT GTCCTGCCCCACCCACCCC CCAGAATAGAATGACACCTA CTCAGACAATGCGATGCAAT TTCCTCATTTTATTAGGAAA GGACAGTGGGAGTGGCACC TTCCAGGGTCAAGGAAGGC ACGGGGGAGGGGCAAACAA CAGATGGCTGGCAACTAGA
--	--	--

			AGGCACAGTCGaggTTACTTC TGGGTGGGGTTCACCACCTT GCCCATGAACAGGGGGCTCT TGGTGTTCGCTCGATCATC AGGAACACGAAAGGCTTGTT GAACTTCACCTCGGGGGGA TGCTCATGGGGATGGCCTCC AGGAACATGGCGCCGGCGG CCTCGGTGCCCTTCTCGTCG ATGGTCAGCACGGCCTTGTTG CACGGCCTTGCTCAGCTTCA GGGGGGCCTCCTCGGTCACG CCGCTCAGGTCGGCGCCGTT GCTGAACACCTTGGTGATGC CCAGCTGGCCCAGCACGCTC TTCAGGTCGTAGGTGCCGGT GATGCTCAGCTTGGGCAGGT GCAGGCTGGCGCTCCTCCTG TCCTCGTTCTCCAGGAACTT GGTGATGATGTCGTGGGTCA GCTCGTTCTCCAGGTGCTGC AGCTTGCCCTCGTCGGGCAG GAAGAAGATGGCGGTGGCG TTGCCAGGTACTIONCATCAG CAGCACCCAGCTGCTCAGCT TCTTGCAGTGCTGGATATTG AACATGCCCAGCCTCTTCAT CATGGGCACCTTCACGGTGG TCACCTGGTCCACGTGGAAG TCCTCCTCCTCGGTGTCCTTC ACCTCGAAGGGCCTCTCCCA CTTGCCCTTGAAGAAGATGT AGTTCACCAGGGCGAACAC GGTGTCCTGTCCAGCTCCT TCACCAGGTCCACGATCTTG
--	--	--	--

		<p>CCCTGGGTGCCCTTCTCCAC GTAGTCGTTGATCTGCTTCTT GGCCTCCTCGGTGTCGCCGA AGTTCACGGTGAAGGCCTCG CTGTGGTACAGCTTCTTCAC GTCCTCCAGGAACTTGTCCA CCAGCTTCAGGCCCTCGCTC AGGAACAGGCCGTTGCCGGT GGTCAGCTGCAGCTGGCTGT CGGGCTGGTTCAGGGTCCTC AGCAGCTCCTGGAAGCCCTC GTGGATCTGGGCCTCGGGGA TCTCGGTCAGGTTGAAGTTC AGGCCCTCCAGGATCTCGTC GTGGGTGTCGGCCTTGGTGC CCAGGCTCAGCATGGCGAA GGCGGTGGCGATGCTCACGG GGCTGAAGAAGATGTTGGTG CTGTTGCTCTGGTGGGCCAG CTGCCTGTACAGGCTGAAGG CGAACTCGGCCAGGTTGGGG GTGATCTTGTGTAAGGTGGG GTGGTCCTGGTCGTGGTGGC TGGTGTCCGTCTTCTGGGCG GCGTCGCCCTGGGGGTCCTC aactgtgaaacaggagagaaaaaccac aacatattaaagattgatgaagacaactaactg taatatgctgcttttgttcttcttactgaccta ACTAGTAGATCTAGGAACCC CTAGTGATGGAGTTGGCCAC TCCCTCTCTGCGCGCTCGCT CGCTCACTGAGGCCGCCCGG GCAAAGCCCCGGGCGTCGGG CGACCTTTGGTCGCCCGGCC TCAGTGAGCGAGCGAGCGC</p>
--	--	---

			<p>GCAGAGAGGGAGTGGCCAA  acgcgtggtgtaatcatggtcatagctgtttcct  gtgtgaaattgttatccgctcacaattccacaca  acatacagaccggaagcataaagtgtaaagc  ctggggtgcctaatgagtgagctaactcacatt  aattgcgttgctcactgcccgtttccagtcg  ggaaacctgtcgtgccagctgcatfaatgaatc  ggccaacgcgcggggagaggcggtttgcgt  attgggcgctcttccgcttctcgcctcactgact  cgctgcgctcggtcgttcggctcggcgagc  ggtatcagctca</p>
	<p>Копия 1 SERPINA1</p>	<p>A1AT без SP  (альтернативн  ая частота  использования  кодонов 2)  (SEQ ID NO:  741)</p>	<p>GAGGACCCCCAGGGCGACG  CTGCCAGAAGACGGACAC  GTCGCACCACGACCAGGACC  ACCCACCTTCAACAAGATC  ACTCCAATCTCGCGGAGTT  CGCGTTCTCGCTCTACCGCC  AGCTCGCGCACCAGAGCAA  CTCGACTAACATCTTCTTCTC  GCCCGTCAGCATCGCGACGG  CGTTCGCGATGCTCAGCCTC  GGCACGAAGGCGGACACGC  ACGACGAGATCCTCGAGGG  CCTCAACTTCAATCTCACAG  AGATCCCAGAAGCCCAGATC  CACGAGGGCTTCCAGGAGCT  GCTGCGGACGCTCAACCAGC  CTGACTCGCAGCTCCAGCTC  ACGACGGGCAATGGGCTCTT  CCTCAGCGAGGGCCTCAAGC  TCGTCGACAAGTTCCTGGAG  GACGTCAAGAAGCTCTACCA  CTCGGAAGCCTTCACGGTCA  ACTTCGGCGACACAGAGGA  AGCCAAGAAGCAGATCAAC</p>

		GACTACGTTCGAGAAGGGGA CTCAGGGCAAGATCGTCGAC CTCGTCAAGGAGCTGGACCG AGACACGGTCTTCGCACTGG TCAACTACATCTTCTTCAAG GGGAAGTGGGAGCGCCCCTT CGAAGTCAAGGACACAGAG GAGGAGGACTTCCACGTCGA CCAGGTGACGACGGTCAAG GTTCCCATGATGAAGCGCCT CGGCATGTTCAACATCCAGC ACTGCAAGAAGCTCAGCTCG TGGGTCCTCCTCATGAAGTA CCTCGGCAACGCGACGGCG ATCTTCTTCCTTCCTGACGA GGGCAAGCTCCAGCACCTCG AGAACGAGCTGACGCACGA CATCATCACGAAGTTCCTGG AGAACGAGGACCGCCGATC GGCGTCGCTCCACCTTCAA AGCTCAGCATCACGGGCACC TACGACCTCAAGTCGGTCCT CGGCCAGCTCGGCATCACGA AGGTCTTCTCGAATGGTGCC GACCTCAGCGGCGTCACAGA GGAAGCCCCCTCAAGCTCA GCAAGGCTGTGCACAAGGCT GTGCTCACGATCGACGAGAA GGGGACAGAGGCTGCCGGT GCCATGTTTCCTGGAAGCCAT CCCCATGAGCATCCCACCAG AAGTCAAGTTCAACAAGCCT TTCGTCTTCCTGATGATAGA GCAGAACACGAAGTCGCCC CTCTTCATGGGCAAGGTCGT
--	--	--

			<p>CAACCCCACTCAAAG</p> <p>GAGGACCCCCAGGGCGACG  CCGCCAGAAGACCGACAC  CAGCCACCACGACCAGGAC  CACCCACCTTCAACAAGAT  CACCCCAACCTGGCCGAGT  TCGCCTTCAGCCTGTACAGG  CAGCTGGCCCACCAGAGCA  ACAGCACCAACATCTTCTTC  AGCCCCGTGAGCATCGCCAC  CGCCTTCGCCATGCTGAGCC  TGGGCACCAAGGCCGACAC  CCACGACGAGATCCTGGAG  GGCCTGAACTTCAACCTGAC  CGAGATCCCCGAGGCCAG  ATCCACGAGGGCTTCCAGGA  GCTGCTGAGGACCCTGAACC  AGCCCGACAGCCAGCTGCA  GCTGACCACCGGCAACGGCC  TGTTCTGAGCGAGGGCCTG  AAGCTGGTGGACAAGTTCCT  GGAGGACGTGAAGAAGCTG  TACCACAGCGAGGCCTTCAC  CGTGAACTTCGGCGACACCG  AGGAGGCCAAGAAGCAGAT  CAACGACTACGTGGAGAAG  GGCACCCAGGGCAAGATCG  TGGACCTGGTGAAGGAGCTG  GACAGGGACACCGTGTTCGC  CCTGGTGAACTACATCTTCT  TCAAGGGCAAGTGGGAGAG  GCCCTTCGAGGTGAAGGACA  CCGAGGAGGAGGACTTCCA  CGTGGACCAGGTGACCACCG  TGAAGGTGCCCATGATGAAG</p>
	Копия 2 SERPINA1 (обр. комп.)	A1AT без SP (альтернативн ая частота использования кодонов 1) (SEQ ID NO: 742)	

			AGGCTGGGCATGTTCAATAT CCAGCACTGCAAGAAGCTG AGCAGCTGGGTGCTGCTGAT GAAGTACCTGGGCAACGCC ACCGCCATCTTCTTCCTGCC CGACGAGGGCAAGCTGCAG CACCTGGAGAACGAGCTGA CCCACGACATCATCACCAAG TTCCTGGAGAACGAGGACA GGAGGAGCGCCAGCCTGCA CCTGCCCAAGCTGAGCATCA CCGGCACCTACGACCTGAAG AGCGTGCTGGGCCAGCTGGG CATCACCAAGGTGTTTCAGCA ACGGCGCCGACCTGAGCGG CGTGACCGAGGAGGCCCCCC TGAAGCTGAGCAAGGCCGT GCACAAGGCCGTGCTGACCA TCGACGAGAAGGGCACCGA GGCCGCCGGCGCCATGTTCC TGGAGGCCATCCCCATGAGC ATCCCCCCGAGGTGAAGTT CAACAAGCCTTTCGTGTTCC TGATGATCGAGCAGAACACC AAGAGCCCCCTGTTTCATGGG CAAGGTGGTGAACCCACCC AGAAGTAA
5	Полная последовательность	(SEQ ID NO: 750)	TTGGCCACTCCCTCTCTGCG CGCTCGCTCGCTCACTGAGG CCGGGCGACCAAAGGTCGC CCGACGCCCCGGGCTTTGCC GGGCGGCCTCAGTGAGCGA GCGAGCGCGCAGAGAGGGA GTGGCCAACCTCCATCACTAG

		<p>GGGTTCCCTAGATCTACTAGT ATAACTTCGTATAGCATAACA TTATACGAAGTTATATGTAT GCtaggtcagtggaagagaagaacaaaaagc agcatattacagttagttgtcttcatcaatctttaa atatgttgtgtggttttctctccctgtttccacagt tGAGGACCCCCAGGGCGACG CTGCCCAGAAGACGGACAC GTCGCACCACGACCAGGACC ACCCACCTTCAACAAGATC ACTCCAATCTCGCGGAGTT CGCGTTCTCGCTCTACCGCC AGCTCGCGCACCAGAGCAA CTCGACTAACATCTTCTTCTC GCCCGTCAGCATCGCGACGG CGTTCGCGATGCTCAGCCTC GGCACGAAGGCGGACACGC ACGACGAGATCCTCGAGGG CCTCAACTTCAATCTCACAG AGATCCCAGAAGCCCAGATC CACGAGGGCTTCCAGGAGCT GCTGCGGACGCTCAACCAGC CTGACTCGCAGCTCCAGCTC ACGACGGGCAATGGGCTCTT CCTCAGCGAGGGCCTCAAGC TCGTCGACAAGTTCCTGGAG GACGTCAAGAAGCTCTACCA CTCGGAAGCCTTCACGGTCA ACTTCGGCGACACAGAGGA AGCCAAGAAGCAGATCAAC GACTACGTGCGAGAAGGGGA CTCAGGGCAAGATCGTCGAC CTCGTCAAGGAGCTGGACCG AGACACGGTCTTCGCACTGG TCAACTACATCTTCTTCAAG</p>
--	--	---

		<p>GGGAAGTGGGAGCGCCCCTT CGAAGTCAAGGACACAGAG GAGGAGGACTTCCACGTCGA CCAGGTGACGACGGTCAAG GTTCCCATGATGAAGCGCCT CGGCATGTTCAACATCCAGC ACTGCAAGAAGCTCAGCTCG TGGGTCCTCCTCATGAAGTA CCTCGGCAACGCGACGGCG ATCTTCTTCCTTCCTGACGA GGGCAAGCTCCAGCACCTCG AGAACGAGCTGACGCACGA CATCATCACGAAGTTCCTGG AGAACGAGGACCGCCGATC GGCGTCGCTCCACCTTCAA AGCTCAGCATCACGGGCACC TACGACCTCAAGTCGGTCCT CGGCCAGCTCGGCATCACGA AGGTCTTCTCGAATGGTGCC GACCTCAGCGGCGTCACAGA GGAAGCCCCCTCAAGCTCA GCAAGGCTGTGCACAAGGCT GTGCTCACGATCGACGAGAA GGGGACAGAGGCTGCCGGT GCCATGTTCTGGAAGCCAT CCCCATGAGCATCCCACCAG AAGTCAAGTTCAACAAGCCT TTCGTCTTCCTGATGATAGA GCAGAACACGAAGTCGCC CTCTTCATGGGCAAGGTCGT CAACCCCACTCAAAAGTAAC AGACATGATAAGATACATTG ATGAGTTTGGACAAACCACA ACTAGAATGCAGTGAAAAA AATGCTTTATTTGTGAAATT</p>
--	--	---

		TGTGATGCTATTGCTTTATTT GTAACCATTATAAGCTGCAA TAAACAAGTTAACAACAAC AATTGCATTCATTTTATGTTT CAGGTTTCAGGGGGAGGTGT GGGAGGTTTTTTggggatacccct agagccccagctggttcttccgctcagaag CCATAGAGCCCACCGCATCC CCAGCATGCCTGCTATTGTC TCCCAATCCTCCCCCTTGCT GTCCTGCCCCACCCACCCC CCAGAATAGAATGACACCTA CTCAGACAATGCGATGCAAT TTCCTCATTTTATTAGGAAA GGACAGTGGGAGTGGCACC TCCAGGGTCAAGGAAGGC ACGGGGGAGGGGCAAACAA CAGATGGCTGGCAACTAGA AGGCACAGTCgaggTACTTC TGGGTGGGGTTCACCACCTT GCCCATGAACAGGGGGCTCT TGGTGTTCTGCTCGATCATC AGGAACACGAAAGGCTTGTT GAACTTCACCTCGGGGGGA TGCTCATGGGGATGGCCTCC AGGAACATGGCGCCGGCGG CCTCGGTGCCCTTCTCGTCG ATGGTCAGCACGGCCTTGTC CACGGCCTTGCTCAGCTTCA GGGGGGCCTCCTCGGTCACG CCGCTCAGGTCGGCGCCGTT GCTGAACACCTTGGTGATGC CCAGCTGGCCCAGCACGCTC TTCAGGTCGTAGGTGCCGGT GATGCTCAGCTTGGGCAGGT
--	--	---

		GCAGGCTGGCGCTCCTCCTG TCCTCGTTCTCCAGGAACTT GGTGATGATGTCGTGGGTCA GCTCGTTCTCCAGGTGCTGC AGCTTGCCCTCGTCGGGCAG GAAGAAGATGGCGGTGGCG TTGCCCAGGTA CTTCATCAG CAGCACCCAGCTGCTCAGCT TCTTGCAGTGCTGGATATTG AACATGCCCAGCCTCTTCAT CATGGGCACCTTCACGGTGG TCACCTGGTCCACGTGGAAG TCCTCCTCCTCGGTGTCCTTC ACCTCGAAGGGCCTCTCCA CTTGCCCTTGAAGAAGATGT AGTTCACCAGGGCGAACAC GGTGTCCCTGTCCAGCTCCT TCACCAGGTCCACGATCTTG CCCTGGGTGCCCTTCTCCAC GTAGTCGTTGATCTGCTTCTT GGCCTCCTCGGTGTCGCCGA AGTTCACGGTGAAGGCCTCG CTGTGGTACAGCTTCTTCAC GTCCTCCAGGAACTTGTCCA CCAGCTTCAGGCCCTCGCTC AGGAACAGGCCGTTGCCGGT GGTCAGCTGCAGCTGGCTGT CGGGCTGGTTCAGGGTCCTC AGCAGCTCCTGGAAGCCCTC GTGGATCTGGGCCTCGGGGA TCTCGGT CAGGTTGAAGTTC AGGCCCTCCAGGATCTCGTC GTGGGTGTCGGCCTTGGTGC CCAGGCTCAGCATGGCGAA GGCGGTGGCGATGCTCACGG
--	--	--

		<p> GGCTGAAGAAGATGTTGGTG  CTGTTGCTCTGGTGGGCCAG  CTGCCTGTACAGGCTGAAGG  CGAACTCGGCCAGGTTGGGG  GTGATCTTGTTGAAGGTGGG  GTGGTCCTGGTCGTGGTGGC  TGGTGTCGGTCTTCTGGGCG  GCGTCGCCCTGGGGGTCTC  aactgtgaaacagggagagaaaaaccacac  aacatattaaagattgatgaagacaactaactg  taatatgctgctttttgtctctcttactgaceta  ATGTATGCATAACTTCGTAT  AGCATAATTATACGAAGTT  ATACTAGTAGATCTAGGAAC  CCCTAGTGATGGAGTTGGCC  ACTCCCTCTCTGCGCGCTCG  CTCGCTCACTGAGGCCGCCC  GGGCAAAGCCCGGGCGTCG  GGCGACCTTTGGTCGCCCGG  CCTCAGTGAGCGAGCGAGC  GCGCAGAGAGGGAGTGGCC  AAacgcgtggttaatcatggtcatagctgtt  cctgtgtgaaattgttatccgctcacaattccac  acaacatacagagccggaagcataaagttaa  agcctggggtgcctaagtagtgagctaactca  cattaattgcgttgcgctcactgcccgtttcca  gtcgggaaacctgtcgtgccagctgcattaatg  aatcggccaacgcgcggggagaggcggttg  cgtattgggcgctcttccgcttctcgtcactg  actcgtgcgctcggcgttcggctcggcga  gcggtatcagctcactcaaaggcggtaatac  gttatccacagaatcaggggataacgcaggaa  agaacatgtgagcaaaaggccagcaaaagg  ccaggaaccgtaaaaaggccgcttgcgtggc  gttttccataggctccgccccctgacgagca </p>
--	--	---

		<p> tcacaaaaatcgacgctcaagtcagaggtggc  gaaacccgacaggactataaagataaccaggc  gttccccctggaagctccctcgtgcgctcct  gtfccgacctgccgttacggatacctgtcc  gcctttctccctfcgggaagcgtggcgcttttc  atagctcacgctgtaggtatctcagttcgggtga  ggcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacg  aacccccgttcagcccaccgctgcgcctta  tccgtaactatcgtcttgagccaaccggta  agacacgacttatgccactggcagcagcca  ctggtaacaggattagcagagcgaggtatgta  ggcgggtgctacagagttctgaagtggggcct  aactacggctacactagaagaacagtatttgg  atctgcgctctgctgaagccagttacctcggga  aaaagagttggtagctcttgatccggcaaca  aaccaccgctggtagcgggtggtttttgttgc  aagcagcagattacgcgcagaaaaaaggat  ctcaagaagatcctttgatctttctacggggct  gacgctcagtggaacgaaaactcacgtaagg  gattttggtcatgagattatcaaaaaggatctc  acctagatcctttaaatfaaaatgaagtttaa  atcaagccaatctgaataatgttacaaccaatt  aaccaattctgattagaaaaactcatcgagcat  caaatgaaactgcaatttattcatatcaggattat  caataccatattttgaaaaagccgtttctgtaat  gaaggagaaaaactaccgaggcagttccata  ggatggcaagatcctggatcggctcgcgattc  cgactcgtccaacatcaatacaacctattaatt  cccctcgtcaaaaataaggttatcaagtgagaa  atcacatgagtgacgactgaatccggtgaga  atggcaaaaagttatgcatttcttccagacttgt  caacaggccagccattacgctcgtcatcaaaa  tcactcgcatacaaaaaccgttattcattcgtg  attgcgcctgagcgagacgaaatacgcgac  gctgttaaaaggacaattacaacaggaatcg </p>
--	--	--

			<p>aatgcaaccggcgcaggaacactgccagcg  catcaacaatattttcacctgaatcaggatattct  tctaataacctggaatgctgttttccggggatcg  cagtggtagtaacatgcatcatcaggagta  cggataaaatgcttgatggcgggaagaggcat  aaattccgtcagccagtttagctgaccatctca  tctgtaacatcattggcaacgctacctttgccat  gtttcagaaacaactctggcgcacgggcttcc  catacaagcgatagattgtcgcacctgattgcc  cgacattatcgcgagcccatttataccatataa  atcagcatccatgttggaattaatcgggcctc  gacgtttcccgttgaatatggctcataacacc  cttgattactgtttatgtaagcagacagtttatt  gttcatgatgatataattttatcttgcaatgtaa  catcagagattttgagacacgggccagagctg  catcgcgcgtttcgggtgatgacggtgaaaacct  ctgacacatgcagctcccggagacggtcaca  gcttgctgtaagcggatgccgggagcagaca  agcccgtcagggcgcgtcagcgggtgttggc  gggtgtcggggctggcttaactatcgggcatc  agagcagattgtactgagagtgcacatgc  gggtgtgaaataccgcacagatgcgtaaggag  aaaataccgcatcagggccattcgcattca  ggctgcgcaactgttgggaagggcgatcggg  gcgggcctcttcgctattacgccagctggcga  aagggggatgtgctgcaaggcgattaagttgg  gtaacgccagggtttcccagtcacgacgttgt  aaaacgacggccagagaatc</p>
	Копия 1 SERPINA1	<p>ААТ без SP  (альтернативн  ая частота  использования  кодонов 2)  (SEQ ID NO:  751)</p>	<p>GAGGACCCCCAGGGCGACG  CTGCCCAGAAGACGGACAC  GTCGCACCACGACCAGGACC  ACCCACCTTCAACAAGATC  ACTCCAATCTCGCGGAGTT  CGCGTTCTCGCTCTACCGCC  AGCTCGCGCACCAGAGCAA</p>

		CTCGACTAACATCTTCTTCTC GCCCGTCAGCATCGCGACGG CGTTCGCGATGCTCAGCCTC GGCACGAAGGCGGACACGC ACGACGAGATCCTCGAGGG CCTCAACTTCAATCTCACAG AGATCCCAGAAGCCCAGATC CACGAGGGCTTCCAGGAGCT GCTGCGGACGCTCAACCAGC CTGACTCGCAGCTCCAGCTC ACGACGGGCAATGGGCTCTT CCTCAGCGAGGGCCTCAAGC TCGTCGACAAGTTCCTGGAG GACGTCAAGAAGCTCTACCA CTCGGAAGCCTTCACGGTCA ACTTCGGCGACACAGAGGA AGCCAAGAAGCAGATCAAC GACTACGTTCGAGAAGGGGA CTCAGGGCAAGATCGTCGAC CTCGTCAAGGAGCTGGACCG AGACACGGTCTTCGCACTGG TCAACTACATCTTCTTCAAG GGGAAGTGGGAGCGCCCCTT CGAAGTCAAGGACACAGAG GAGGAGGACTTCCACGTCTGA CCAGGTGACGACGGTCAAG GTTCCCATGATGAAGCGCCT CGGCATGTTCAACATCCAGC ACTGCAAGAAGCTCAGCTCG TGGGTCCTCCTCATGAAGTA CCTCGGCAACGCGACGGCG ATCTTCTTCTTCTGACGA GGGCAAGCTCCAGCACCTCG AGAACGAGCTGACGCACGA CATCATCACGAAGTTCCTGG
--	--	--

			<p>AGAACGAGGACCGCCGATC  GGCGTCGCTCCACCTTCCAA  AGCTCAGCATCACGGGCACC  TACGACCTCAAGTCGGTCCT  CGGCCAGCTCGGCATCACGA  AGGTCTTCTCGAATGGTGCC  GACCTCAGCGGCGTCACAGA  GGAAGCCCCCTCAAGCTCA  GCAAGGCTGTGCACAAGGCT  GTGCTCACGATCGACGAGAA  GGGGACAGAGGCTGCCGGT  GCCATGTTCTGGAAGCCAT  CCCCATGAGCATCCCACCAG  AAGTCAAGTTCAACAAGCCT  TTCGTCTTCTGATGATAGA  GCAGAACACGAAGTCGCCC  CTCTTCATGGGCAAGGTCGT  CAACCCCACTCAAAAAG</p>
	<p>Копия 2 SERPINA1 (обр. комп.)</p>	<p>A1AT без SP (альтернативн ая частота использования кодонов 1) (SEQ ID NO: 752)</p>	<p>GAGGACCCCCAGGGCGACG  CCGCCCAGAAGACCGACAC  CAGCCACCACGACCAGGAC  CACCCACCTTCAACAAGAT  CACCCCAACCTGGCCGAGT  TCGCCTTCAGCCTGTACAGG  CAGCTGGCCCACCAGAGCA  ACAGCACCAACATCTTCTTC  AGCCCCGTGAGCATCGCCAC  CGCCTTCGCCATGCTGAGCC  TGGGCACCAAGGCCGACAC  CCACGACGAGATCCTGGAG  GGCCTGAACTTCAACCTGAC  CGAGATCCCCGAGGCCAG  ATCCACGAGGGCTTCCAGGA  GCTGCTGAGGACCCTGAACC  AGCCCGACAGCCAGCTGCA</p>

		GCTGACCACCGGCAACGGCC TGTCCTGAGCGAGGGCCTG AAGCTGGTGGACAAGTTCCT GGAGGACGTGAAGAAGCTG TACCACAGCGAGGCCTTCAC CGTGAACTTCGGCGACACCG AGGAGGCCAAGAAGCAGAT CAACGACTACGTGGAGAAG GGCACCCAGGGCAAGATCG TGGACCTGGTGAAGGAGCTG GACAGGGACACCGTGTTTCG CCTGGTGA ACTACATCTTCT TCAAGGGCAAGTGGGAGAG GCCCTTCGAGGTGAAGGACA CCGAGGAGGAGGACTTCCA CGTGGACCAGGTGACCACCG TGAAGGTGCCCATGATGAAG AGGCTGGGCATGTTCAATAT CCAGCACTGCAAGAAGCTG AGCAGCTGGGTGCTGCTGAT GAAGTACCTGGGCAACGCC ACCGCCATCTTCTTCCTGCC CGACGAGGGCAAGCTGCAG CACCTGGAGAACGAGCTGA CCCACGACATCATACCAAG TTCCTGGAGAACGAGGACA GGAGGAGCGCCAGCCTGCA CCTGCCCAAGCTGAGCATCA CCGGCACCTACGACCTGAAG AGCGTGCTGGGCCAGCTGGG CATCACCAAGGTGTTTCAGCA ACGGCGCCGACCTGAGCGG CGTGACCGAGGAGGCCCCCC TGAAGCTGAGCAAGGCCGT GCACAAGGCCGTGCTGACCA
--	--	--

			TCGACGAGAAGGGCACCGA GGCCGCCGGCGCCATGTTCC TGGAGGCCATCCCCATGAGC ATCCCCCGAGGTGAAGTT CAACAAGCCTTTCGTGTTCC TGATGATCGAGCAGAACACC AAGAGCCCCCTGTTTCATGGG CAAGGTGGTGAACCCACCC AGAAGTAA
6	Полная последовательность	(SEQ ID NO: 760)	TTGGCCACTCCCTCTCTGCG CGCTCGCTCGCTCACTGAGG CCGGGCGACCAAAGGTCGC CCGACGCCCCGGGCTTTGCCC GGGCGGCCTCAGTGAGCGA GCGAGCGCGCAGAGAGGGA GTGGCCAACTCCATCACTAG GGGTTCCCTAGATCTACTAGTt aggtcagtgaagagaagaacaaaagcagc atattacagttagttgtcttcatcaatctttaaatat gttgtgtggttttctctccctgtttccacagttG AGGACCCCCAGGGAGATGC AGCCCAGAAGACAGACACC AGCCACCATGACCAGGACC ACCCACCTTCAACAAGATC ACCCCAACCTGGCAGAGTT TGCCTTCAGCCTGTACAGGC AGCTGGCCCACCAGAGCAA CAGCACCAACATCTTCTTCA GCCCAGTGAGCATAGCCACA GCCTTTGCCATGCTGAGCCT GGGCACCAAGGCAGACACC CATGATGAGATCCTGGAGGG CCTGAACTTCAACCTGACAG AGATCCCAGAGGCCCAGATC

		CATGAGGGCTTCCAGGAGCT GCTGAGGACCCTGAACCAGC CAGACAGCCAGCTGCAGCTG ACCACAGGCAATGGCCTGTT CCTGTCTGAGGGCCTGAAGC TGGTGGACAAGTTCCTGGAG GATGTGAAGAAGCTGTACCA CTCTGAGGCCTTCACAGTGA ACTTTGGAGACACAGAGGA GGCCAAGAAGCAGATCAAT GACTATGTGGAGAAGGGCA CCCAGGGCAAGATAGTGGA CCTGGTGAAGGAGCTGGAC AGGGACACAGTGTTTGCCCT GGTGA ACTACATCTTCTTCA AGGGCAAGTGGGAGAGGCC CTTTGAGGTGAAGGACACAG AGGAGGAGGACTTCCATGTG GACCAGGTGACCACAGTGA AGGTGCCCATGATGAAGAG GCTGGGCATGTTCAACATCC AGCACTGCAAGAAGCTGAG CAGCTGGGTGCTGCTGATGA AGTACCTGGGCAATGCCACA GCCATCTTCTTCCCTGCCAGA TGAGGGCAAGCTGCAGCAC CTGGAGAATGAGCTGACCCA TGACATCATCACCAAGTTCC TGGAGAATGAGGACAGGAG GTCTGCCAGCCTGCACCTGC CCAAGCTGAGCATCACAGGC ACCTATGACCTGAAGTCTGT GCTGGGCCAGCTGGGCATCA CCAAGGTGTTTCAGCAATGGA GCAGACCTGTCTGGAGTGAC
--	--	--

		<p> AGAGGAGGCCCCCCCTGAAG  CTGAGCAAGGCAGTGCACA  AGGCAGTGCTGACCATAGAT  GAGAAGGGCACAGAGGCAG  CAGGAGCCATGTTTCCTGGAG  GCCATCCCCATGAGCATCCC  CCCAGAGGTGAAGTTCAACA  AGCCCTTTGTGTTTCCTGATG  ATAGAGCAGAACACCAAGA  GCCCCCTGTTTCATGGGCAAG  GTGGTGAACCCACCCAGAA  GTAACAGACATGATAAGAT  ACATTGATGAGTTTGGACAA  ACCACA ACTAGAATGCAGTG  AAAAAATGCTTTATTTGTG  AAATTTGTGATGCTATTGCT  TTATTTGTAACCATTATAAG  CTGCAATAAACAAGTTAACA  ACAACAATTGCATTCATTTT  ATGTTTCAGGTTTCAGGGGGA  GGTGTGGGAGGTTTTTTgggga  tacccttagagccccagctggttctttctct  cagaagCCATAGAGCCCATCTC  ATCCCAGCATGCCTGCTAT  TGTCTTCCAATCCTCCCCCT  TGCTGTCCTGCCCCACCCCA  CCCCCAGAATAGAATGACA  CCTACTCAGACAATTCTATG  CAATTCCTCATTTTATTAGG  AAAGGACAGTGGGAGTGGC  ACCTTCCAGGGTCAAGGAAG  GCATGGGGGAGGGGCAAAC  AACAGATGGCTGGCAACTA  GAAGGCACAGTCTaggttaTTT  TTGGGTGGGATTCACCACTT </p>
--	--	--

		TTCCCATGAAGAGGGGAGA CTTGGTATTTTGTTC AATCAT TAAGAAGACAAAGGGTTTGT TGA ACTTGACCTCTGGGGGG ATAGACATGGGTATGGCCTC TAAAAACATGGCCCCAGCA GCTTCAGTCCCTTTCTCATCT ATGGTCAGCACAGCCTTATG CACTGCCTTGGAGAGCTTCA GGGGTGCCTCCTCTGTGACC CCAGAGAGGTCAGCCCCATT GCTGAAGACCTTAGTGATGC CCAGTTGACCCAGGACAGAC TTCAGATCATAGGTTCCAGT AATGGACAGTTTGGGTAAAT GTAAGCTGGCAGACCTTCTG TCTTCATTTTCCAGGAACTT GGTGATGATATCATGGGTGA GTTTCATTTTCCAGGTGCTGT AGTTTCCCCTCATCAGGCAG GAAGAAGATGGCTGTGGCA TTGCCCAGGTATTTTCATCAG CAGCACCCAGCTGGACAGCT TCTTACAGTGCTGGATGTTA AACATGCCTAATCTCTTCAT CATAGGCACCTTCACTGTGG TCACCTGGTCCACATGGAAG TCCTCTTCCTCTGTGTCCTTG ACTTCAAAGGGTCTCTCCA TTGCCTTTAAAGAAGATGT AATTCACCAGAGCAAAA ACT GTGTCTCTGTCAAGCTCCTT GACCAAATCCACAATTTTCC CTTGAGTACCCTTCTCCACA TAATCATTGATCTGTTTCTTG
--	--	--

		<p> GCCTCTTCTGTGTCCCCAAA  GTTGACAGTGAAGGCTTCTG  AGTGGTACAACCTTTTAAACA  TCCTCCAAAACTTATCCAC  TAGCTTCAGGCCCTCAGAGA  GGAACAGGCCATTGCCTGTG  GTCAGCTGGAGCTGGCTGTC  TGGCTGGTTGAGGGTTCTGA  GGAGTTCCTGGAAGCCTTCA  TGGATCTGAGCCTCTGGAAT  CTCTGTGAGGTTGAAATTCA  GGCCCTCCAGGATTCATCA  TGAGTGTCAGCCTTGGTCCC  CAGGGAGAGCATTGCAAAG  GCTGTAGCTATGCTCACTGG  GGAGAAGAAGATATTGGTG  CTGTTGGACTGGTGTGCCAG  CTGTCTGTATAGGCTGAAGG  CAAACCTCAGCCAGGTTGGGG  GTGATCTTGTTGAAGGTTGG  GTGATCCTGATCATGGTGGG  ATGTATCTGTCTTCTGGGCA  GCATCTCCCTGGGGATCCTC  aactgtggaacaggagagaaaaaccacac  aacatatttaaagattgatgaagacaactaactg  taatatgctgctttttgtctctcttactgaccta  ACTAGTAGATCTAGGAACCC  CTAGTGATGGAGTTGGCCAC  TCCCTCTCTGCGCGCTCGCT  CGCTCACTGAGGCCGCCCCGG  GCAAAGCCCCGGGCGTCGGG  CGACCTTTGGTCGCCCCGGCC  TCAGTGAGCGAGCGAGCGC  GCAGAGAGGGAGTGGCCAA  acgcgtggtgtaatcatgcatagctgttctct </p>
--	--	--

		<p>gtgtgaaattgtatccgctcacaattccacaca acatacagaccggaagcataaagtgtaaagc ctgggggtgcctaatagtgagctaactcacatt aattgcgttgcgctcactgcccgtttccagtcg ggaaacctgtcgtgccagctgcatfaatgaatc ggccaacgcgcggggagaggcggttgctg attgggcgctcttccgcttctcgcctcactgact cgctgcgctcggcgttcggctgcccgcgagc ggtatcagctcactcaaaggcggtaatacggtt atccacagaatcaggggataacgcaggaaag aacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggcca ggaaccgtaaaaaggccgcgttgctggcgttt ttccataggctccgccccctgacgagcatca caaaaatcgcgctcaagtcagaggtggcga aaccgacaggactataagataccaggcgtt tccccctggaagctccctcgtgcgctctctgtt ccgacctgccgcttaccggatacctgtccgc ctttctcccttcgggaagcgtggcgtttctcat agctcacgctgtaggtatctcagttcggtag gtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacga acccccgttcagcccaccgctgcgccttat ccgtaactatcgtttgagccaaccggtaa gacacgacttaccgactggcagcagccact ggtaacaggattagcagagcgaggtatgtag gcggtgctacagagttcttgaagtggggccta actacggctacactagaagaacagtatttgta tctgcgctctgctgaagccagttaccttcggaa aaagagttgtagctcttgatccggcaaaaa accaccgctgtagcgggtgtttttgtttgca agcagcagattaccgcgcaaaaaaaggatc tcaagaagatccttgatctttctacggggtctg acgctcagtggaacgaaaactcacgttaagg atfttggtcatgagattatcaaaaaggatcttcac ctagatccttttaattaaaaatgaagttttaa aagcccaatctgaataatgtacaaccaattaa</p>
--	--	---

		<p>ccaattctgattagaaaaactcatcgagcatca aatgaaactgcaatttattcatatcaggattatca ataccatattttgaaaaagccgttctgtaatga aggagaaaactcaccgaggcagttccatagg atggcaagatcctggatcggctctgcgattccg actcgtccaacatcaatacaacctattaattcc cctcgtcaaaaataaggttatcaagtgagaaat caccatgagtgacgactgaatccgggagaaat ggcaaaagtttatgcatttcttccagacttgtc aacaggccagccattacgctcgtcatcaaat cactcgcataaccaaacggttattcattcgtga ttgcgcctgagcgagacgaaatacgcgatcg ctgtfaaaaggacaattacaaacaggaatcga atgcaaccggcgcaggaacactgccagcgc atcaacaatatttccactgaatcaggatattctt ctaafacctggaatgctgttttccgggcatcgc agtggtagtaacctgcatcatcaggagtac ggataaaatgcttgatggcggagaggcata aattccgtcagccagtttagtctgacatctcat ctgtaacatcattggcaacgctaccttgccatg ttcagaaacaactctggcgcacgggcttccc atacaagc gatagattgtcgcacctgattgcc gacattatcgcgagcccattataccatataaa tcagcatccatgttggaattaatcgcggcctcg acgttcccgtgaaatggtcataaacaccct tgtattactgtttatgtaagcagacagtttattgtt catgatgataattttatcttgcaatgtaacat cagagatttgagacacgggccagagctgcat cgcgcgttccggtgatgacggtgaaaacctct gacacatgcagctcccggagacggtcacagc ttgtctgtaagcggatgccgggagcagacaag cccgtcagggcgcgtagcgggtgttgccgg gtgtcggggctggcttaactatcggcatcag agcagattgtactgagagtgaccatagcgggt gtgaaataccgcacagatgcgtaaggagaaa</p>
--	--	--

			<p>ataccgcatcagggccattgccattcaggct  gcgcaactgtgggaagggcgatcggtgagg  gcctcttcgctattacgccagctggcgaaagg  gggatgtgctgcaaggcgattaagttgggtaa  cgccagggtttcccagtcacgacgttgtaaaa  cgacggccagagaattc</p>
Копия 1 SERPINA1		<p>A1AT без SP  (альтернативн  ая частота  использования  кодонов 1),  истощенный  по CpG  (SEQ ID NO:  761)</p>	<p>GAGGACCCCCAGGGAGATG  CAGCCCAGAAGACAGACAC  CAGCCACCATGACCAGGACC  ACCCACCTTCAACAAGATC  ACCCCAACCTGGCAGAGTT  TGCCTTCAGCCTGTACAGGC  AGCTGGCCCACCAGAGCAA  CAGCACCAACATCTTCTTCA  GCCCAGTGAGCATAGCCACA  GCCTTTGCCATGCTGAGCCT  GGGCACCAAGGCAGACACC  CATGATGAGATCCTGGAGGG  CCTGAACTTCAACCTGACAG  AGATCCCAGAGGCCCAGATC  CATGAGGGCTTCCAGGAGCT  GCTGAGGACCCTGAACCAGC  CAGACAGCCAGCTGCAGCTG  ACCACAGGCAATGGCCTGTT  CCTGTCTGAGGGCCTGAAGC  TGGTGGACAAGTTCCTGGAG  GATGTGAAGAAGCTGTACCA  CTCTGAGGCCTTCACAGTGA  ACTTTGGAGACACAGAGGA  GGCCAAGAAGCAGATCAAT  GACTATGTGGAGAAGGGCA  CCCAGGGCAAGATAGTGGA  CCTGGTGAAGGAGCTGGAC  AGGGACACAGTGTTTGCCCT  GGTGAACCTACATCTTCTTCA</p>

			AGGGCAAGTGGGAGAGGCC CTTTGAGGTGAAGGACACAG AGGAGGAGGACTTCCATGTG GACCAGGTGACCACAGTGA AGGTGCCCATGATGAAGAG GCTGGGCATGTTCAACATCC AGCACTGCAAGAAGCTGAG CAGCTGGGTGCTGCTGATGA AGTACCTGGGCAATGCCACA GCCATCTTCTTCCTGCCAGA TGAGGGCAAGCTGCAGCAC CTGGAGAATGAGCTGACCCA TGACATCATCACCAAGTTCC TGGAGAATGAGGACAGGAG GTCTGCCAGCCTGCACCTGC CCAAGCTGAGCATCACAGGC ACCTATGACCTGAAGTCTGT GCTGGGCCAGCTGGGCATCA CCAAGGTGTTTCAGCAATGGA GCAGACCTGTCTGGAGTGAC AGAGGAGGGCCCCCTGAAG CTGAGCAAGGCAGTGCACA AGGCAGTGCTGACCATAGAT GAGAAGGGCACAGAGGCAG CAGGAGCCATGTTTCCTGGAG GCCATCCCCATGAGCATCCC CCCAGAGGTGAAGTTCAACA AGCCCTTTGTGTTTCCTGATG ATAGAGCAGAACACCAAGA GCCCCCTGTTTCATGGGCAAG GTGGTGAACCCACCCAGAA GTAA
	Копия 2 SERPINA1 (обр. комп.)	A1AT без SP, истощенный по CpG	GAGGATCCCCAGGGAGATG CTGCCAGAAGACAGATAC ATCCCACCATGATCAGGATC

		(SEQ ID NO: 762)	ACCCAACCTTCAACAAGATC ACCCCAACCTGGCTGAGTT TGCCTTCAGCCTATACAGAC AGCTGGCACACCAGTCCAAC AGCACCAATATCTTCTTCTC CCCAGTGAGCATAGCTACAG CCTTTGCAATGCTCTCCCTG GGGACCAAGGCTGACACTC ATGATGAAATCCTGGAGGGC CTGAATTTCAACCTCACAGA GATTCCAGAGGCTCAGATCC ATGAAGGCTTCCAGGAACTC CTCAGAACCCTCAACCAGCC AGACAGCCAGCTCCAGCTGA CCACAGGCAATGGCCTGTTC CTCTCTGAGGGCCTGAAGCT AGTGGATAAGTTTTTGGAGG ATGTTAAAAGTTGTACCAC TCAGAAGCCTTCACTGTCAA CTTTGGGGACACAGAAGAG GCCAAGAAACAGATCAATG ATTATGTGGAGAAGGGTACT CAAGGGAAAATTGTGGATTT GGTCAAGGAGCTTGACAGA GACACAGTTTTTGTCTGGT GAATTACATCTTCTTTAAAG GCAAATGGGAGAGACCCTTT GAAGTCAAGGACACAGAGG AAGAGGACTTCCATGTGGAC CAGGTGACCACAGTGAAGG TGCCTATGATGAAGAGATTA GGCATGTTTAAACATCCAGCA CTGTAAGAAGCTGTCCAGCT GGGTGCTGCTGATGAAATAC CTGGGCAATGCCACAGCCAT
--	--	---------------------	--

			<p>CTTCTTCCTGCCTGATGAGG  GGAAACTACAGCACCTGGA  AAATGAACTCACCCATGATA  TCATCACCAAGTTCCTGGAA  AATGAAGACAGAAGGTCTG  CCAGCTTACATTTACCCAAA  CTGTCCATTACTGGAACCTA  TGATCTGAAGTCTGTCCTGG  GTCAACTGGGCATCACTAAG  GTCTTCAGCAATGGGGCTGA  CCTCTCTGGGGTCACAGAGG  AGGCACCCCTGAAGCTCTCC  AAGGCAGTGCATAAGGCTGT  GCTGACCATAGATGAGAAA  GGGACTGAAGCTGCTGGGG  CCATGTTTTTAGAGGCCATA  CCCATGTCTATCCCCCAGA  GGTCAAGTTCAACAAACCCT  TTGTCTTCTTAATGATTGAA  CAAATACCAAGTCTCCCCT  CTTCATGGGAAAAGTGGTGA  ATCCCACCCAAAAAtaa</p>
9	Полная последовательность	(SEQ ID NO: 790)	<p>TTGGCCACTCCCTCTCTGCG  CGCTCGCTCGCTCACTGAGG  CCGGGCGACCAAAGGTCGC  CCGACGCCC GGGCTTTGCCC  GGGCGGCCTCAGTGAGCGA  GCGAGCGCGCAGAGAGGGA  GTGGCCA ACTCCATCACTAG  GGGTTCC TAGATCTACTAGT  ATAACTTCGTATAGCATA  TTATACGAAGTTATATGTAT  GCtaggtcagtgaaagagaagaacaaaaagc  agcatattacagttagttgcttcatcaatctttaa</p>

		<p>atatggtgtggttttctctccctgttccacagt tGAGGACCCCCAGGGAGATG CTGCCCAGAAGACAGACAC ATCTCACCATGACCAGGACC ACCCACCTTCAACAAGATC ACTCCCAATCTTGCAGAGTT TGCATTCTCTCTTACAGAC AGCTTGCACACCAGAGCAAC TCTACTAACATCTTCTTCTCT CCAGTCAGCATAGCAACAGC ATTTGCAATGCTCAGCCTTG GCACAAAGGCAGACACACA TGATGAGATCCTTGAGGGCC TCAACTTCAATCTCACAGAG ATCCCAGAAGCCCAGATCCA TGAGGGCTTCCAGGAGCTGC TGAGAACACTCAACCAGCCT GACTCTCAGCTCCAGCTCAC AACAGGCAATGGGCTCTTCC TCTCTGAGGGCCTCAAGCTT GTAGACAAGTTCCTGGAGGA TGTCAAGAAGCTCTACCACT CTGAAGCCTTACAGTCAAC TTTGGAGACACAGAGGAAG CCAAGAAGCAGATCAATGA CTATGTAGAGAAGGGGACTC AGGGCAAGATAGTAGACCTT GTCAAGGAGCTGGACAGAG ACACAGTCTTTGCACTGGTC AACTACATCTTCTTCAAGGG GAAGTGGGAGAGACCCTTTG AAGTCAAGGACACAGAGGA GGAGGACTTCCATGTAGACC AGGTGACAACAGTCAAGGTT CCCATGATGAAGAGACTTGG</p>
--	--	--

		CATGTTCAATATCCAGCACT GCAAGAAGCTCAGCTCTTGG GTCCTCCTCATGAAGTACCT TGGCAATGCAACAGCAATCT TCTTCCTTCCTGATGAGGGC AAGCTCCAGCACCTTGAGAA TGAGCTGACACATGACATCA TCACAAAGTTCCTGGAGAAT GAGGACAGAAGGTCTGCAT CTCTCCACCTTCCAAGCTC AGCATCACAGGCACCTATGA CCTCAAGTCTGTCCTTGGCC AGCTTGGCATCACAAAGGTC TTCTCTAATGGTGCAGACCT CTCTGGAGTCACAGAGGAA GCCCCCTCAAGCTCAGCAA GGCTGTGCACAAGGCTGTGC TCACAATAGATGAGAAGGG GACAGAGGCTGCAGGTGCC ATGTTCTGGAAGCCATCCC CATGAGCATCCCACCAGAAG TCAAGTTCAACAAGCCTTTT GTCTTCCTGATGATAGAGCA GAACACAAAGTCTCCCCTCT TCATGGGCAAGGTAGTCAAC CCCCTCAAAGTAACAGAC ATGATAAGATACATTGATGA GTTTGGACAAACCACAATA GAATGCAGTGAAAAAATG CTTTATTTGTGAAATTTGTG ATGCTATTGCTTTATTTGTAA CCATTATAAGCTGCAATAAA CAAGTTAACAACAACAATTG CATTCAATTTATGTTTCAGGT TCAGGGGGAGGTGTGGGAG
--	--	---

		GTTTTTggggataccccctagagccc agctggttctttctcctcagaagCCATAG AGCCCATCTCATCCCCAGCA TGCCTGCTATTGTCTTCCCA ATCCTCCCCCTTGCTGTCCTG CCCCACCCACCCCCAGAA TAGAATGACACCTACTCAGA CAATTCTATGCAATTCCTC ATTTTATTAGGAAAGGACAG TGGGAGTGGCACCTTCCAGG GTCAAGGAAGGCATGGGGG AGGGGCAAACAACAGATGG CTGGCAACTAGAAGGCACA GTCTaggTTACTTCTGGGTGG GGTTCACCACCTTGCCCATG AACAGGGGGCTCTTGGTGTT CTGCTCTATCATCAGGAACA CAAAGGCTTGTTGAACTTC ACCTCTGGGGGGATGCTCAT GGGGATGGCCTCCAGGAAC ATGGCTCCTGCTGCCTCTGT GCCCTTCTCATCTATGGTCA GCACTGCCTTGTCAGCTGCC TTGCTCAGCTTCAGGGGGGC CTCCTCTGTCAGCTCCAGACA GGTCTGCTCCATTGCTGAAC ACCTTGGTGATGCCAGCTG GCCAGCACAGACTTCAGGT CATAGGTGCCTGTGATGCTC AGCTTGGGCAGGTGCAGGCT GGCAGACCTCCTGTCCTCAT TCTCCAGGAACTTGGTGATG ATGTCATGGGTGAGCTCATT CTCCAGGTGCTGCAGCTTGC CCTCATCTGGCAGGAAGAAG
--	--	--

		ATGGCTGTGGCATTGCCAG GTAATTCATCAGCAGCACCC AGCTGCTCAGCTTCTTGCAG TGCTGGATATTGAACATGCC CAGCCTCTTCATCATGGGCA CCTTCACTGTGGTCACCTGG TCCACATGGAAGTCCTCCTC CTCTGTGTCCTTACCTCAA AGGGCCTCTCCACTTGCCC TTGAAGAAGATGTAGTTCAC CAGGGCAAACACTGTGTCCC TGTCCAGCTCCTTACCAGG TCCACTATCTTGCCCTGGGT GCCCTTCTCCACATAGTCAT TGATCTGCTTCTTGGCCTCCT CTGTGTCTCCAAAGTTCACT GTGAAGGCCTCAGAGTGGTA CAGCTTCTTACATCCTCCA GGAACTTGTCCACCAGCTTC AGGCCCTCAGACAGGAACA GGCCATTGCCTGTGGTCAGC TGCAGCTGGCTGTCTGGCTG GTTCAGGGTCTCAGCAGCT CCTGGAAGCCCTCATGGATC TGGGCCTCTGGGATCTCTGT CAGGTTGAAGTTCAGGCCCT CCAGGATCTCATCATGGGTG TCTGCCTTGGTGCCCAGGCT CAGCATGGCAAAGGCTGTG GCTATGCTCACTGGGCTGAA GAAGATGTTGGTGCTGTTGC TCTGGTGGGCCAGCTGCCTG TACAGGCTGAAGGCAAATC TGCCAGGTTGGGGGTGATCT TGTTGAAGGTGGGGTGGTCC
--	--	--

		<p>TGGTCATGGTGGCTGGTGTGTC TGTCTTCTGGGCTGCATCTC CCTGGGGGTCCCTCaactgtgaaa caggagagaaaaaccacacaacatattfaaa gattgatgaagacaactaactgtaatatgctgct tttgttcttcttctcactgacctaATGTATG CATAACTTCGTATAGCATAAC ATTATACGAAGTTATACTAG TAGATCTAGGAACCCCTAGT GATGGAGTTGGCCACTCCCT CTCTGCGCGCTCGCTCGCTC ACTGAGGCCGCCCCGGGCAA AGCCCCGGGCGTCCGGGCGAC CTTTGGTCGCCCGGCCTCAG TGAGCGAGCGAGCGCGCAG AGAGGGAGTGGCCAacgcgtg gtgtaatcatggcatagctgttctctgtgtgaaa ttgttatccgctcacaattccacacaacatacga gccggaagcataaaagtgtaaagcctgggggtg cctaatgagtgagetaactcacattaattgcgtt gcgctcactgcccgttccagtcgggaaacc tgcgtgccagctgcattaatgaatcgccaac gcgcggggagagggggttgcgtattgggcg ctcttccgcttctcgtcactgactcgtcgc tcggtcgttcggctcggcgagcgggtatcagc tactcaaagggcgttaatacggttatccacaga atcaggggataacgcaggaaagaacatgtga gcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgt aaaaaggccgctgctggcggttttccatagg ctccgccccctgacgagcatcaaaaaatcg acgtcaagtcagaggtggcgaaacccgaca ggactataaagataaccaggcggttccccctgg aagctccctcgtgcgtctcctgttccgacct gccgctfaceggatacctgtccgcctttctcct tcgggaagcgtggcgctttctcatagctcacgc</p>
--	--	--

		<p> tftaggtatctcagttcgggttaggtcgttcgct  ccaagctgggctgtgtgcacgaacccccgft  cagcccgaccgctgcgccttatccggtaactat  cgtcttgagtccaacccggtaagacacgactta  tcgccactggcagcagccactggtaacaggat  tagcagagc gaggtatgtaggcgggtctaca  gagttcttgaagtgggtgcctaactacggctac  actagaagaacagtatfttggatctgcgctctgc  tgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtta  gctcttgatccggcaaacaccaccgctggt  agcgggtggtttttgtttgcaagcagcagatta  cgcgcagaaaaaaggatctcaagaagatec  tttgatctttctacggggctgacgctcagtgg  aacgaaaactcacgftaagggattttggtcatg  agattatcaaaaaggatctcacctagatccttt  aaatfaaaaatgaagtttaaatcaagcccaatc  tgaataatgttacaaccaattaaccaattctgatt  agaaaaactcatcgagcatcaaatgaaactgc  aatftatcatatcaggattatcaataccatatttt  gaaaaagccgtttctgtaatgaaggagaaaac  tcaccgaggcagttccataggatggcaagatec  ctggtatcggctcgcgattccgactcgtccaac  atcaatacaacctattaatttccctcgtcaaaa  ataaggttatcaagtgagaaatcaccatgagtg  acgactgaaatccgggtgagaatggcaaaaagttt  atgcatttctttccagactgttcaacaggccag  ccattacgctcgtcatcaaatcactcgcacatca  accaaaccgttattcattcgtgattgcgcctgag  cgagacgaaatacgcgacgctgtttaaagga  caaffacaaacaggaatcgaatgaaccggc  gcaggaacactgccagcgcacatcaacaatatttt  cacctgaaatcaggatattcttctaataacctggaa  tgctgttttccggggatcgcagtggtgagtaa  ccatgcacatcaggagtacggataaaatgctt  gatggtcggaaaggcataaattccgtcagcc </p>
--	--	--

			<p>agtttagtctgaccatctcatctgtaacatcattg  gcaacgctacctttgccatgtttcagaacaact  ctggcgcatcgggctccatacaagcgatag  attgtcgacactgattgcccacattatcgga  gcccattataccatataaaatcagcatccatgtt  ggaatttaatcgggctcgaactttccggtg  aatatggctcataaacaccttgattactgtttat  gtaagcagacagttttattgtcatgatgatatt  tttatcttgcaatgtaacatcagagatttgag  acacgggcccagagctgcatcgcgcttcggt  gatgacggtgaaaacctctgacacatgcagct  cccggagacggtcacagctgtctgtaagcgg  atgccgggagcagacaagcccgtcagggcg  cgtcagcgggtgttggcgggtgtcggggctg  gcttaactatgcggcatcagagcagattgtact  gagagtgcaccatatacggtgtgaaataccgc  acagatgcgtaaggagaaaataccgcatcag  gcgccattgccattcaggetgcgcaactgttg  ggaagggcgatcgggtcgggctcttcgctat  tacgccagctggcgaaaggggatgtgetgc  aaggcgattaagttgggtaaccaggggtttc  ccagtcacgacgttgtaaaacgacggccaga  gaattc</p>
Копия 1 SERPINA1		<p>A1AT без SP  (альтернативн  ая частота  использования  кодонов 2),  истощенный  по CpG  (SEQ ID NO:  791)</p>	<p>GAGGACCCCCAGGGAGATG  CTGCCCAGAAGACAGACAC  ATCTCACCATGACCAGGACC  ACCCACCTTCAACAAGATC  ACTCCCAATCTTGCAGAGTT  TGCATTCTCTCTACAGAC  AGCTTGCACACCAGAGCAAC  TCTACTAACATCTTCTTCTCT  CCAGTCAGCATAGCAACAGC  ATTTGCAATGCTCAGCCTTG  GCACAAAGGCAGACACACA  TGATGAGATCCTTGAGGGCC</p>

		TCAACTTCAATCTCACAGAG ATCCCAGAAGCCCAGATCCA TGAGGGCTTCCAGGAGCTGC TGAGAACACTCAACCAGCCT GACTCTCAGCTCCAGCTCAC AACAGGCAATGGGCTCTTCC TCTCTGAGGGCCTCAAGCTT GTAGACAAGTTCCTGGAGGA TGTCAAGAAGCTCTACCACT CTGAAGCCTTCACAGTCAAC TTTGGAGACACAGAGGAAG CCAAGAAGCAGATCAATGA CTATGTAGAGAAGGGGACTC AGGGCAAGATAGTAGACCTT GTCAAGGAGCTGGACAGAG ACACAGTCTTTGCACTGGTC AACTACATCTTCTTCAAGGG GAAGTGGGAGAGACCCTTGG AAGTCAAGGACACAGAGGA GGAGGACTTCCATGTAGACC AGGTGACAACAGTCAAGGTT CCCATGATGAAGAGACTTGG CATGTTCAATATCCAGCACT GCAAGAAGCTCAGCTCTTGG GTCCTCCTCATGAAGTACCT TGGCAATGCAACAGCAATCT TCTTCCTCCTGATGAGGGC AAGCTCCAGCACCTTGAGAA TGAGCTGACACATGACATCA TCACAAAGTTCCTGGAGAAT GAGGACAGAAGGTCTGCAT CTCTCCACCTTCCAAAGCTC AGCATCACAGGCACCTATGA CCTCAAGTCTGTCCTTGGCC AGCTTGGCATCACAAAGGTC
--	--	--

			<p>TTCTCTAATGGTGCAGACCT  CTCTGGAGTCACAGAGGAA  GCCCCCTCAAGCTCAGCAA  GGCTGTGCACAAGGCTGTGC  TCACAATAGATGAGAAGGG  GACAGAGGCTGCAGGTGCC  ATGTTCTTGGGAAGCCATCCC  CATGAGCATCCCACCAGAAG  TCAAGTTCAACAAGCCTTTT  GTCTTCCTGATGATAGAGCA  GAACACAAAGTCTCCCCTCT  TCATGGGCAAGGTAGTCAAC  CCCACTCAAAAG</p>
<p>Копия 2 SERPINA1  (обр. комп.)</p>		<p>A1AT без SP  (альтернативн  ая частота  использования  кодонов 1),  истощенный  по CpG  (SEQ ID NO:  792)</p>	<p>GAGGACCCCCAGGGAGATG  CAGCCAGAAGACAGACAC  CAGCCACCATGACCAGGACC  ACCCACCTTCAACAAGATC  ACCCCAACCTGGCAGAGTT  TGCCTTCAGCCTGTACAGGC  AGCTGGCCCACCAGAGCAA  CAGCACCAACATCTTCTTCA  GCCAGTGAGCATAGCCACA  GCCTTTGCCATGCTGAGCCT  GGGCACCAAGGCAGACACC  CATGATGAGATCCTGGAGGG  CCTGAACTTCAACCTGACAG  AGATCCCAGAGGCCAGATC  CATGAGGGCTTCCAGGAGCT  GCTGAGGACCCTGAACCAGC  CAGACAGCCAGCTGCAGCTG  ACCACAGGCAATGGCCTGTT  CCTGTCTGAGGGCCTGAAGC  TGGTGGACAAGTTCCTGGAG  GATGTGAAGAAGCTGTACCA  CTCTGAGGCCTTCACAGTGA</p>

		ACTTTGGAGACACAGAGGA GGCCAAGAAGCAGATCAAT GACTATGTGGAGAAGGGCA CCCAGGGCAAGATAGTGGA CCTGGTGAAGGAGCTGGAC AGGGACACAGTGTTTGCCCT GGTGA ACTACATCTTCTTCA AGGGCAAGTGGGAGAGGCC CTTTGAGGTGAAGGACACAG AGGAGGAGGACTTCCATGTG GACCAGGTGACCACAGTGA AGGTGCCCATGATGAAGAG GCTGGGCATGTTCAATATCC AGCACTGCAAGAAGCTGAG CAGCTGGGTGCTGCTGATGA AGTACCTGGGCAATGCCACA GCCATCTTCTTCTGCCAGA TGAGGGCAAGCTGCAGCAC CTGGAGAATGAGCTGACCCA TGACATCATCACCAAGTTCC TGGAGAATGAGGACAGGAG GTCTGCCAGCCTGCACCTGC CCAAGCTGAGCATCACAGGC ACCTATGACCTGAAGTCTGT GCTGGGCCAGCTGGGCATCA CCAAGGTGTTTCAGCAATGGA GCAGACCTGTCTGGAGTGAC AGAGGAGGCCCCCCTGAAG CTGAGCAAGGCAGTGCACA AGGCAGTGCTGACCATAGAT GAGAAGGGCACAGAGGCAG CAGGAGCCATGTTTCTGGAG GCCATCCCCATGAGCATCCC CCCAGAGGTGAAGTTCAACA AGCCTTTTGTGTTTCTGATG
--	--	---

			<p>ATAGAGCAGAACACCAAGA  GCCCCCTGTTTCATGGGCAAG  GTGGTGAACCCACCCAGAA  GTAA</p>
10	Полная последовательность	(SEQ ID NO: 795	<p>TTGGCCACTCCCTCTCTGCG  CGCTCGCTCGCTCACTGAGG  CCGGGCGACCAAAGGTCGC  CCGACGCCCGGGCTTTGCCC  GGGCGGCCTCAGTGAGCGA  GCGAGCGCGCAGAGAGGGA  GTGGCCAACTCCATCACTAG  GGGTTCCCTAGATCTACTAGT  ATAACTTCGTATAGCATAACA  TTATACGAAGTTATATGTAT  GCtaggtcagtgaaagagaagaacaaaaagc  agcatattacagttagttgtcttcatcaatctttaa  atatgttgtgtggttttctctccctgtttccacagt  tGAGGACCCCCAGGGAGATG  CAGCCCAGAAGACAGACAC  CAGCCACCATGACCAGGACC  ACCCACCTTCAACAAGATC  ACCCCAACCTGGCAGAGTT  TGCCTTCAGCCTGTACAGGC  AGCTGGCCCACCAGAGCAA  CAGCACCAACATCTTCTTCA  GCCCAGTGAGCATAGCCACA  GCCTTTGCCATGCTGAGCCT  GGGCACCAAGGCAGACACC  CATGATGAGATCCTGGAGGG  CCTGAACTTCAACCTGACAG  AGATCCCAGAGGCCCAGATC  CATGAGGGCTTCCAGGAGCT  GCTGAGGACCCTGAACCAGC  CAGACAGCCAGCTGCAGCTG</p>

		ACCACAGGCAATGGCCTGTT CCTGTCTGAGGGCCTGAAGC TGGTGGACAAGTTCCTGGAG GATGTGAAGAAGCTGTACCA CTCTGAGGCCTTCACAGTGA ACTTTGGAGACACAGAGGA GGCCAAGAAGCAGATCAAT GACTATGTGGAGAAGGGCA CCCAGGGCAAGATAGTGGA CCTGGTGAAGGAGCTGGAC AGGGACACAGTGTTTGCCCT GGTGA ACTACATCTTCTTCA AGGGCAAGTGGGAGAGGCC CTTTGAGGTGAAGGACACAG AGGAGGAGGACTTCCATGTG GACCAGGTGACCACAGTGA AGGTGCCCATGATGAAGAG GCTGGGCATGTTCAATATCC AGCACTGCAAGAAGCTGAG CAGCTGGGTGCTGCTGATGA AGTACCTGGGCAATGCCACA GCCATCTTCTTCCTGCCAGA TGAGGGCAAGCTGCAGCAC CTGGAGAATGAGCTGACCCA TGACATCATCACCAAGTTCC TGGAGAATGAGGACAGGAG GTCTGCCAGCCTGCACCTGC CCAAGCTGAGCATCACAGGC ACCTATGACCTGAAGTCTGT GCTGGGCCAGCTGGGCATCA CCAAGGTGTTTCAGCAATGGA GCAGACCTGTCTGGAGTGAC AGAGGAGGCCCCCTGAAG CTGAGCAAGGCAGTGCACA AGGCAGTGCTGACCATAGAT
--	--	--

		<p> GAGAAGGGCACAGAGGCAG  CAGGAGCCATGTTTCCTGGAG  GCCATCCCCATGAGCATCCC  CCCAGAGGTGAAGTTCAACA  AGCCTTTTGTGTTTCCTGATG  ATAGAGCAGAACAACCAAGA  GCCCCCTGTTTCATGGGCAAG  GTGGTGAACCCACCCAGAA  GTAACAGACATGATAAGAT  ACATTGATGAGTTTGGACAA  ACCACA ACTAGAATGCAGTG  AAAAAATGCTTTATTTGTG  AAATTTGTGATGCTATTGCT  TTATTTGTAACCATTATAAG  CTGCAATAAACAAGTTAACA  ACAACAATTGCATTCATTTT  ATGTTTCAGGTTTCAGGGGA  GGTGTGGGAGGTTTTTTgggga  tacccectagagccccagctggttctttctct  cagaagCCATAGAGCCCATCTC  ATCCCCAGCATGCCTGCTAT  TGTCTTCCCAATCCTCCCCCT  TGCTGTCCTGCCCCACCCCA  CCCCCAGAATAGAATGACA  CCTACTCAGACAATTCTATG  CAATTCCTCATTATTATTAGG  AAAGGACAGTGGGAGTGGC  ACCTTCCAGGGTCAAGGAAG  GCATGGGGGAGGGGCAAAC  AACAGATGGCTGGCAACTA  GAAGGCACAGTCTaggttaTTT  TTGGGTGGGATTCACTT  TTCCCATGAAGAGGGGTGAT  TTAGTGTTCTGCTCTATCATG  AGAAATACAAAAGGTTTGTT </p>
--	--	---

		<p>GAACTTGACCTCTGGGGGGA TAGACATGGGTATGGCCTCT AAAAACATGGCCCCAGCAG CCTCTGTGCCCTTCTCATCTA TGGTCAGCACAGCCTTATGC ACTGCCTTGGAGAGCTTCAG GGGTGCCTCCTCTGTGACCC CAGAGAGGTCAGCCCCATTG CTGAAGACCTTAGTGATGCC CAGTTGACCCAGGACAGACT TCAGATCATAGGTTCCAGTA ATGGACAGTTTGGGTAAATG TAAGCTGGCAGACCTTCTGT CTTCATTTTCCAGGA ACTTG GTGATGATATCATGGGTGAG TTCATTTTCCAGGTGCTGTA GTTTCCCCTCATCAGGCAGG AAGAAGATGGCTGTGGCATT GCCCAGGTATTTATCAGCA GCACCCAGCTGGACAGCTTC TTACAGTGCTGGATATTGAA CATACCAAGCCTTTTCATCA TAGGCACCTTCACTGTGGTC ACCTGGTCCACATGGAAGTC CTCTTCTCTGTGTCCTTGAC TTCAAAGGGTCTCTCCCAT TGCCTTTAAAGAAGATGTAA TTCACCAGAGCAAAA ACTGT GTCTCTGTCAAGCTCCTTGA CCAAATCCACAATTTTCCCT TGAGTACCCTTCTCCACATA ATCATTGATCTGTTTCTTGGC CTCTTCTGTGTCCCAAAGT TGACAGTGAAGGCTTCTGAG TGGTACA ACTTTTAAACATC</p>
--	--	--

		<p> CTCCAAAACTTATCCACTA  GCTTCAGGCCCTCAGAGAGG  AACAGGCCATTGCCTGTGGT  CAGCTGGAGCTGGCTGTCTG  GCTGGTTGAGGGTTCTGAGG  AGTTCCTGGAAGCCTTCATG  GATCTGAGCCTCTGGAATCT  CTGTGAGGTTGAAATTCAGG  CCCTCCAGGATTCATCATG  AGTGTCAGCCTTGGTCCCCA  GGGAGAGCATTGCAAAGGC  TGTAGCTATGCTCACTGGGG  AGAAGAAGATATTGGTGCTG  TTGGACTGGTGTGCCAGCTG  TCTGTATAGGCTGAAGGCAA  ACTCAGCCAGGTTGGGGGTG  ATCTTGTTGAAGGTTGGGTG  ATCCTGATCATGGTGGGATG  TATCTGTCTTCTGGGCAGCA  TCTCCCTGGGGATCCTCaactgt  ggaacaggagagaaaaaccacacaacat  atftaaagattgatgaagacaactaactgtaata  tgctgetttttgttcttcttcaactgacctaATG  TATGCATAACTTCGTATAGC  ATACATTATACGAAGTTATA  CTAGTAGATCTAGGAACCCC  TAGTGATGGAGTTGGCCACT  CCCTCTCTGCGCGCTCGCTC  GCTCACTGAGGCCGCCCGGG  CAAAGCCCCGGGCGTCGGGC  GACCTTTGGTCGCCCGGCCT  CAGTGAGCGAGCGAGCGCG  CAGAGAGGGAGTGGCCAAac  gcgtggtgtaatcatggtcatagctgttctgt  gtgaaattgttatccgctcacaattccacacaac </p>
--	--	--

		<p> atagagccggaagcataaagtgtaaagcctg  gggtgcctaatgagtgagctaactcacattaatt  gcgftgcgctcactgcccgtttccagtcggga  aacctgtcgtgccagctgcattaatgaatcggc  caacgcgcggggagagggcggtttgcgtattg  ggcgtcttccgcttctcctcgtcactgactcgt  gcgctcggctgctcggctgcggcgagcggat  cagctcactcaaaggcggtaatacggttatcca  cagaatcaggggataacgcaggaaagaacat  gtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaa  ccgtaaaaaggccgcgttgcggcgttttcca  taggctccgccccctgacgagcatcacaaaa  atcgacgctcaagtcagaggtggcgaacc  gacaggactataagataaccaggcgtttcccc  ctggaagtcctcgtgcgctcctcgttccga  ccctgccgcttaccggatacctgtccgctttct  ccctcgggaagcgtggcgtttctcatagctc  acgctgtaggtatctcagttcgggtgtaggtcgtt  cgtccaagctgggctgtgtgcacgaaccccc  cgttcagcccaccgctgcgccttatccggta  actatcgtcttgagtccaaccggtaagacacg  acttatcgccactggcagcagccactggtaac  aggattagcagagcggatgtaggcgggtg  ctacagagttctgaagtggcctaactacg  gtacactagaagaacagtatttggatctgcg  ctctgctgaagccagttacctcggaaaaaga  gttggtagctcttgatcggcaacaaaccacc  gctggtagcgggtggtttttgcaagcagc  agattacgcgagaaaaaaggatctcaaga  agatcctttgatctttctacggggtctgacgctc  agtggaacgaaaactcacgttaagggatttgg  tcatgagattatcaaaaaggatctcacctagat  ccttttaattaaaaatgaagtttaaatcaagcc  caatctgaataatgtfacaaccaatfaaccaatt  ctgattagaaaaactcatcgagcatcaaatgaa </p>
--	--	---

		<p>actgcaatttattcatatcaggattatcaatacca tattttgaaaaagccgtttctgtaatgaaggag aaaactcaccgaggcagttccataggatggca agatcctggtatcggctcgcgattccgactcgt ccaacatcaatacaacctattaattcccctcgt caaaaataaggttatcaagtgagaaatcaccat gagtgacgactgaatccggtgagaatggcaa aagtttatgatttcttccagacttgtcaacag gccagccattacgctcgtcatcaaaatcactcg catcaaccaaacggtattcattcgtgattgcgc ctgagcgagacgaaatacgcgatcgtgttaa aaggacaattacaacaggaatcgaatgcaac cggcgcaggaacactgccagcgcacaca tatttcacctgaatcaggatattcttaatacct ggaatgctgtttccggggatcgcagtgggga gtaacctgcatcatcaggagtacggataaaat gcttgatggtcggagaggcataaattccgtca gccagtttagtctgaccatctcatctgtaacatc attggcaacgctacctttgcatgttcagaaac aactctggcgcacgggctccatacaagcg atagattgtcgcacctgattgcccacattatcg cgagcccatttataccatataaatcagcatcc atgttggaaatfaatcgcggcctcgcggttccc gttgaatatggctcataaacacccttgtattactg tttatgtaagcagacagttttattgttcatgatgat atattttatcttgtgcaatgtaacatcagagattt gagacacgggccagagctgcatcgcgcggtt cggatgatgacggtgaaaacctctgacacatgc agctcccggagacggtcacagcttgtctgtaa gcggatgccgggagcagacaagcccgtcag ggcgcgtcagcgggtgttggcgggtgtcggg gctggcttaactatgcggcatcagagcagattg tactgagagtgcaccatatgcggtgtgaaatac cgcacagatgcgtaaggagaaaataccgat caggcgcattcgcattcaggctgcgcaact</p>
--	--	---

			<p>gttgggaagggcgatcggtgcgggcctcttcg  ctattacgccagctggcgaaaggggatgtgc  tgcaaggcgattaagttgggtaacgccagggt  tttccagtcacgacgttgtaaacgacggcca  gagaattc</p>
Копия 1 SERPINA1		<p>A1AT без SP  (альтернативн  ая частота  использования  кодонов 1),  истощенный  по CpG  (SEQ ID NO:  796)</p>	<p>GAGGACCCCCAGGGAGATG  CAGCCCAGAAGACAGACAC  CAGCCACCATGACCAGGACC  ACCCACCTTCAACAAGATC  ACCCCAACCTGGCAGAGTT  TGCCTTCAGCCTGTACAGGC  AGCTGGCCCACCAGAGCAA  CAGCACCAACATCTTCTTCA  GCCCAGTGAGCATAGCCACA  GCCTTTGCCATGCTGAGCCT  GGGCACCAAGGCAGACACC  CATGATGAGATCCTGGAGGG  CCTGAACTTCAACCTGACAG  AGATCCCAGAGGCCCAGATC  CATGAGGGCTTCCAGGAGCT  GCTGAGGACCCTGAACCAGC  CAGACAGCCAGCTGCAGCTG  ACCACAGGCAATGGCCTGTT  CCTGTCTGAGGGCCTGAAGC  TGGTGGACAAGTTCCTGGAG  GATGTGAAGAAGCTGTACCA  CTCTGAGGCCTTCACAGTGA  ACTTTGGAGACACAGAGGA  GGCCAAGAAGCAGATCAAT  GACTATGTGGAGAAGGGCA  CCCAGGGCAAGATAGTGGA  CCTGGTGAAGGAGCTGGAC  AGGGACACAGTGTTTGCCT  GGTGAACACTACATCTTCTTCA  AGGGCAAGTGGGAGAGGCC</p>

			<p>CTTTGAGGTGAAGGACACAG  AGGAGGAGGACTTCCATGTG  GACCAGGTGACCACAGTGA  AGGTGCCCATGATGAAGAG  GCTGGGCATGTTCAATATCC  AGCACTGCAAGAAGCTGAG  CAGCTGGGTGCTGCTGATGA  AGTACCTGGGCAATGCCACA  GCCATCTTCTTCCTGCCAGA  TGAGGGCAAGCTGCAGCAC  CTGGAGAATGAGCTGACCCA  TGACATCATCACCAAGTTCC  TGGAGAATGAGGACAGGAG  GTCTGCCAGCCTGCACCTGC  CCAAGCTGAGCATCACAGGC  ACCTATGACCTGAAGTCTGT  GCTGGGCCAGCTGGGCATCA  CCAAGGTGTTTCAGCAATGGA  GCAGACCTGTCTGGAGTGAC  AGAGGAGGCCCCCTGAAG  CTGAGCAAGGCAGTGCACA  AGGCAGTGCTGACCATAGAT  GAGAAGGGCACAGAGGCAG  CAGGAGCCATGTTTCCTGGAG  GCCATCCCCATGAGCATCCC  CCCAGAGGTGAAGTTCAACA  AGCCTTTTGTGTTTCCTGATG  ATAGAGCAGAACACCAAGA  GCCCCCTGTTTCATGGGCAAG  GTGGTGAACCCACCCAGAA  GTAA</p>
	<p>Копия 2 SERPINA1  (обр. комп.)</p>	<p>A1AT без SP,  истощенный  по CpG  (SEQ ID NO:</p>	<p>GAGGATCCCCAGGGAGATG  CTGCCAGAAGACAGATAC  ATCCCACCATGATCAGGATC  ACCCAACCTTCAACAAGATC</p>

	797)	ACCCCAACCTGGCTGAGTT TGCCTTCAGCCTATACAGAC AGCTGGCACACCAGTCCAAC AGCACCAATATCTTCTTCTC CCCAGTGAGCATAGCTACAG CCTTTGCAATGCTCTCCCTG GGGACCAAGGCTGACACTC ATGATGAAATCCTGGAGGGC CTGAATTTCAACCTCACAGA GATTCCAGAGGCTCAGATCC ATGAAGGCTTCCAGGAACTC CTCAGAACCCTCAACCAGCC AGACAGCCAGCTCCAGCTGA CCACAGGCAATGGCCTGTTC CTCTCTGAGGGCCTGAAGCT AGTGGATAAGTTTTTGGAGG ATGTTAAAAGTTGTACCAC TCAGAAGCCTTCACTGTCAA CTTTGGGGACACAGAAGAG GCCAAGAAACAGATCAATG ATTATGTGGAGAAGGGTACT CAAGGGAAAATTGTGGATTT GGTCAAGGAGCTTGACAGA GACACAGTTTTTGCTCTGGT GAATTACATCTTCTTTAAAG GCAAATGGGAGAGACCCTTT GAAGTCAAGGACACAGAGG AAGAGGACTTCCATGTGGAC CAGGTGACCACAGTGAAGG TGCCTATGATGAAAAGGCTT GGTATGTTCAATATCCAGCA CTGTAAGAAGCTGTCCAGCT GGGTGCTGCTGATGAAATAC CTGGGCAATGCCACAGCCAT CTTCTTCCTGCCTGATGAGG
--	------	--

			GGAAACTACAGCACCTGGA AAATGAACTCACCCATGATA TCATCACCAAGTTCCTGGAA AATGAAGACAGAAGGTCTG CCAGCTTACATTTACCCAAA CTGTCCATTACTGGAACCTA TGATCTGAAGTCTGTCCTGG GTCAACTGGGCATCACTAAG GTCTTCAGCAATGGGGCTGA CCTCTCTGGGGTCACAGAGG AGGCACCCCTGAAGCTCTCC AAGGCAGTGCATAAGGCTGT GCTGACCATAGATGAGAAG GGCACAGAGGCTGCTGGGG CCATGTTTTTAGAGGCCATA CCCATGTCTATCCCCCAGA GGTCAAGTTCAACAAACCTT TTGTATTTCTCATGATAGAG CAGAACACTAAATCACCCCT CTTCATGGGAAAAGTGGTGA ATCCCACCCAAAAAtaa
11	Полная последовательность	(SEQ ID NO: 1564)	tgtaacatcagagattttgacacacgggccag agctgcatcgcgcgtttcggatgacggtga aaacctctgacacatgcagctcccggagacg gtcacagcttgtctgtaagcggatgccgggag cagacaagcccgtcagggcgcgtcagcggg tgttggcgggtgtcggggctggcttaactatgc ggcatcagagcagattgtactgagagtgcacc atatcggtgtgaaataccgcacagatgcgta aggagaaaataccgcacagcgcattcgc cattcaggctgcgcaactgttgggaagggcga tcggtcgggcctcttcgctattacgccagctg gcgaaaggggatgtgctgcaaggcgattaa gttgggtaacgccagggtttcccagtcacgac

		<p>gttgtaaaacgacggccagagaattcTTGG C C A C T C C C T C T C T G C G C G C T C G C T C G C T C A C T G A G G C C G G G C G A C C A A A G G T C G C C C G A C G C C C G G G C T T T G C C C G G G C G G C C T C A G T G A G C G A G C G A G C G C G C A G A G A G G G A G T G G C C A A C T C C A T C A C T A G G G G T T C C T A G A T C T A C T A G T T G C A T A A T C T A A G T C A A A T G G A A A G A A A T A T A A A A A G T A A C A T T A T T A C T T C T T G T T T T C T T C A G T A T T T A A C A A T C C t t t t t t t C T T C C C T T G C C C A G t t G A G G A C C C C C A G G G A G A T G C T G C C C A G A A G A C A G A C A C A T C T C A C C A T G A C C A G G A C C A C C C C A C C T T C A A C A A G A T C A C T C C C A A T C T T G C A G A G T T T G C A T T C T C T C T C T A C A G A C A G C T T G C A C A C C A G A G C A A C T C T A C T A A C A T C T T C T T C T C T C C A G T C A G C A T A G C A A C A G C A T T T G C A A T G C T C A G C C T T G G C A C A A A G G C A G A C A C A C A T G A T G A G A T C C T T G A G G G C C T C A A C T T C A A T C T C A C A G A G A T C C C A G A A G C C C A G A T C C A T G A G G G C T T C C A G G A G C T G C T G A G A A C A C T C A A C C A G C C T G A C T C T C A G C T C C A G C T C A C A A C A G G C A A T G G G C T C T T C C T C T C T G A G G G C C T C A A G C T T G T A G A C A A G T T C C T G G A G G A T G T C A A G A A G C T C T A C C A C T C T G A A G C C T T</p>
--	--	---

		CACAGTCAACTTTGGAGACA CAGAGGAAGCCAAGAAGCA GATCAATGACTATGTAGAGA AGGGGACTCAGGGCAAGAT AGTAGACCTTGTCAAGGAGC TGGACAGAGACACAGTCTTT GCACTGGTCAACTACATCTT CTTCAAGGGGAAGTGGGAG AGACCCTTTGAAGTCAAGGA CACAGAGGAGGAGGACTTC CATGTAGACCAGGTGACAAC AGTCAAGGTTCCCATGATGA AGAGACTTGGCATGTTCAAT ATCCAGCACTGCAAGAAGCT CAGCTCTTGGGTCTCCTCA TGAAGTACCTTGGCAATGCA ACAGCAATCTTCTTCCTCCT GATGAGGGCAAGCTCCAGC ACCTTGAGAATGAGCTGACA CATGACATCATCACAAAGTT CCTGGAGAATGAGGACAGA AGGTCTGCATCTCTCCACCT TCCAAAGCTCAGCATCACAG GCACCTATGACCTCAAGTCT GTCCTTGGCCAGCTTGGCAT CACAAAGGTCTTCTCTAATG GTGCAGACCTCTCTGGAGTC ACAGAGGAAGCCCCCTCA AGCTCAGCAAGGCTGTGCAC AAGGCTGTGCTCACAATAGA TGAGAAGGGGACAGAGGCT GCAGGTGCCATGTTCTGGA AGCCATCCCCATGAGCATCC CACCAGAAGTCAAGTTCAAC AAGCCTTTTGTCTTCCTGAT
--	--	---

		<p> GATAGAGCAGAACACAAAG  TCTCCCCTCTTCATGGGCAA  GGTAGTCAACCCCACTCAA  AGTAACAGACATGATAAGA  TACATTGATGAGTTTGGACA  AACCACA ACTAGAATGCAGT  GAAAAAATGCTTTATTTGT  GAAATTTGTGATGCTATTGC  TTTATTTGTAACCATTATAA  GCTGCAATAACAAGTTAAC  ACAACAATTGCATTCATTT  TATGTTTCAGGTT CAGGGGG  AGGTGTGGGAGGTTTTTTggg  gataccctagagccccagctggttctttctc  ctcagaagCCATAGAGCCCATCT  CATCCCAGCATGCCTGCTA  TTGTCTTCCCAATCCTCCCC  TTGCTGTCCTGCCCCACCCC  ACCCCCAGAATAGAATGAC  ACCTACTCAGACAATTCTAT  GCAATTTCTCATT TTTATTAG  GAAAGGACAGTGGGAGTGG  CACCTTCCAGGGTCAAGGAA  GGCATGGGGGAGGGGCAA  CAACAGATGGCTGGCAACTA  GAAGGCACAGTCTaggTTACT  TCTGGGTGGGGTTCACCACC  TTGCCCATGAACAGGGGGCT  CTTGGTGTTCTGCTCTATCAT  CAGGAACACAAAAGGCTTG  TTGAACTTCACCTCTGGGGG  GATGCTCATGGGGATGGCCT  CCAGGAACATGGCTCCTGCT  GCCTCTGTGCCCTTCTCATCT  ATGGTCAGCACTGCCTTGTG </p>
--	--	---

		CACTGCCTTGCTCAGCTTCA GGGGGGCCTCCTCTGTCACT CCAGACAGGTCTGCTCCATT GCTGAACACCTTGGTGATGC CCAGCTGGCCCAGCACAGAC TTCAGGTCATAGGTGCCTGT GATGCTCAGCTTGGGCAGGT GCAGGCTGGCAGACCTCCTG TCCTCATTCTCCAGGAACTT GGTGATGATGTCATGGGTCA GCTCATTCTCCAGGTGCTGC AGCTTGCCCTCATCTGGCAG GAAGAAGATGGCTGTGGCA TTGCCCAGGTA CTTCATCAG CAGCACCCAGCTGCTCAGCT TCTTGCAGTGCTGGATATTG AACATGCCCAGCCTCTTCAT CATGGGCACCTTCACTGTGG TCACCTGGTCCACATGGAAG TCCTCCTCCTCTGTGTCCTTC ACCTCAAAGGGCCTCTCCCA CTTGCCCTTGAAGAAGATGT AGTTCACCAGGGCAAACACT GTGTCCCTGTCCAGCTCCTT CACCAGGTCCACTATCTTGC CCTGGGTGCCCTTCTCCACA TAGTCATTGATCTGCTTCTTG GCCTCCTCTGTGTCTCCAAA GTTCACTGTGAAGGCCTCAG AGTGGTACAGCTTCTTCACA TCCTCCAGGAACTTGTCCAC CAGCTTCAGGCCCTCAGACA GGAACAGGCCATTGCCTGTG GTCAGCTGCAGCTGGCTGTC TGGCTGGTTCAGGGTCCTCA
--	--	--

		<p>GCAGCTCCTGGAAGCCCTCA  TGGATCTGGGCCTCTGGGAT  CTCTGTCAGGTTGAAGTTCA  GGCCCTCCAGGATCTCATCA  TGGGTGTCTGCCTTGGTGCC  CAGGCTCAGCATGGCAAAG  GCTGTGGCTATGCTCACTGG  GCTGAAGAAGATGTTGGTGC  TGTTGCTCTGGTGGGCCAGC  TGCCTGTACAGGCTGAAGGC  AAACTCTGCCAGGTTGGGGG  TGATCTTGTTGAAGGTGGGG  TGGTCCTGGTCATGGTGGCT  GGTGTCTGTCTTCTGGGCTG  CATCTCCCTGGGGGTCTCaa  CTGGGCAAGGGAAGaaaaaaaa  GGATTGTTAAATACTGAAGA  AAACAAGAAGTAATAATGTT  ACTTTTATATTTCTTTCCAT  TTGACTTAGATTATGCAACT  AGTAGATCTAGGAACCCCTA  GTGATGGAGTTGGCCACTCC  CTCTCTGCGCGCTCGCTCGC  TCACTGAGGCCGCCCGGGCA  AAGCCCGGGCGTCGGGCGA  CCTTTGGTCGCCCGGCCTCA  GTGAGCGAGCGAGCGCGCA  GAGAGGGAGTGGCCAAacgcg  tgggtaatcatggcatagctgttctgtgtga  aattgttatccgctcacaattccacacaacatac  gagccggaagcataaagtgtaaagcctgggg  tgcctaatgagtgagetaactcacattaattgcg  ttgcgctcactgcccgttccagtcgggaaac  ctgtcgtgccagctgcattaatgaatcggccaa  cgcgcggggagagggcggttgcgtattgggc</p>
--	--	--

		<p>gctcttccgcttctcctgctcactgactcgtcgcg ctcggtcggtcggctgcggcgagcggatcag ctcactcaaaggcggtaatacggttatccacag aatcaggggataacgcaggaaagaacatgtg agcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccg taaaaaggccgcgttgctggcgttttccatag gctccgccccctgacgagcatcacaaaaatc gacgctcaagtcagaggtggcgaaccggac aggactataaagataccaggcgtttccccctg gaagctccctcgtgcgctcctcgttccgacce tgccgcttaccggatacctgcccgtttctccc ttcgggaagcgtggcgtttctcatagctcacg ctgtaggtatctcagttcgggttaggtcgttgc tccaagctgggctgtgtgcacgaacccccgt tcagcccaccgctgcgccttatccggtaacta tcgtcttgagtccaaccggtaagacacgactt atcgccactggcagcagccactggtaacagg attagcagagcgaggtatgtaggcgggtgctac agagttctgaagtggcctaactacggcta cactagaagaacagtatttggatctgcgctctg ctgaagccagttacctcggaaaaagattggt agctcttgatccggcaaaacaaccaccgctgg tagcgggtggtttttgttgcaagcagcagatta cgcgcagaaaaaaggatctcaagaagatcc tttgatctttctacggggtctgacgctcagtg aacgaaaactcacgttaagggattttggtcatg agattatcaaaaaggatcttcactagatccttt aaattaaaaatgaagtttaaatcaagcccaatc tgaataatgttacaaccaattaaccaattctgatt agaaaaactcatcgagcatcaaatgaaactgc aatttattcatatcaggattatcaatacatatttt gaaaaagccgttctgtaatgaaggagaaaac tcaccgaggcagttccataggatggcaagatc ctggtatcggctcgcgattccgactcgtccaac atcaatacaacctattaatttccccctcgtcaaaa</p>
--	--	--

			<p>ataaggttatcaagtgagaaatccatgagtg  acgactgaatccggtgagaatggcaaaagttt  atgcatttctttccagacttgtcaacaggccag  ccattacgctcgtcatcaaaatcactcgcac  accaaaccgttattcattcgtgattgctgag  cgagacgaaatacgcgatcgtgttaaaggga  caattacaacaggaatcgaatgaaccggc  gcaggaacactgccagcgcacacaatattt  cacctgaatcaggatatttcttaatacctgaa  tgctgttttccggggatcgcagtggtagtaa  ccatgcatcatcaggagtacggataaaatgctt  gatggcggagaggcataaattccgtagcc  agtttagtctgaccatctcatctgaacatcattg  gcaacgctaccttgccatgttcagaacaact  ctggcgcacgggctccatacaagcgatag  attgtgcacctgattgcccacattatcgcga  gcccattataccatataaatcagcatccatgtt  ggaatttaatcgggctcgcggttcccggtg  aatatggctcataacacccttgattactgtttat  gtaagcagacagtttattgttcatgatgatatt  tttatcttgtgcaa</p>
Копия 1 SERPINA1		<p>A1AT без SP  (альтернативн  ая частота  использования  кодонов 2),  истощенный  по CpG  SEQ ID NO:  781</p>	<p>GAGGACCCCCAGGGAGATG  CTGCCCAGAAGACAGACAC  ATCTCACCATGACCAGGACC  ACCCACCTTCAACAAGATC  ACTCCCAATCTTGCAGAGTT  TGCATTCTCTCTACAGAC  AGCTTGCACACCAGAGCAAC  TCTACTAACATCTTCTTCTCT  CCAGTCAGCATAGCAACAGC  ATTTGCAATGCTCAGCCTTG  GCACAAAGGCAGACACACA  TGATGAGATCCTTGAGGGCC  TCAACTTCAATCTCACAGAG  ATCCCAGAAGCCCAGATCCA</p>

		TGAGGGCTTCCAGGAGCTGC TGAGAACACTCAACCAGCCT GACTCTCAGCTCCAGCTCAC AACAGGCAATGGGCTCTTCC TCTCTGAGGGCCTCAAGCTT GTAGACAAGTTCCTGGAGGA TGTC AAGAAGCTCTACCACT CTGAAGCCTTCACAGTCAAC TTTGGAGACACAGAGGAAG CCAAGAAGCAGATCAATGA CTATGTAGAGAAGGGGACTC AGGGCAAGATAGTAGACCTT GTCAAGGAGCTGGACAGAG ACACAGTCTTTGCACTGGTC AACTACATCTTCTTCAAGGG GAAGTGGGAGAGACCCTTGG AAGTCAAGGACACAGAGGA GGAGGACTTCCATGTAGACC AGGTGACAACAGTCAAGGTT CCCATGATGAAGAGACTTGG CATGTTCAATATCCAGCACT GCAAGAAGCTCAGCTCTTGG GTCCTCCTCATGAAGTACCT TGGCAATGCAACAGCAATCT TCTTCCTTCTGATGAGGGC AAGCTCCAGCACCTTGAGAA TGAGCTGACACATGACATCA TCACAAAGTTCCTGGAGAAT GAGGACAGAAGGTCTGCAT CTCTCCACCTTCCAAAGCTC AGCATCACAGGCACCTATGA CCTCAAGTCTGTCCTTGGCC AGCTTGGCATCACAAAGGTC TTCTCTAATGGTGCAGACCT CTCTGGAGTCACAGAGGAA
--	--	--

			GCCCCCTCAAGCTCAGCAA GGCTGTGCACAAGGCTGTGC TCACAATAGATGAGAAGGG GACAGAGGCTGCAGGTGCC ATGTTCTTGGGAAGCCATCCC CATGAGCATCCCACCAGAAG TCAAGTTCAACAAGCCTTTT GTCTTCTTGTATGATAGAGCA GAACACAAAGTCTCCCCTCT TCATGGGCAAGGTAGTCAAC CCCACTCAAAAAG
	Копия 2 SERPINA1 (обр. комп.)	A1AT без SP, истощенный по CpG SEQ ID NO: 782	GAGGACCCCCAGGGAGATG CAGCCCAGAAGACAGACAC CAGCCACCATGACCAGGACC ACCCACCTTCAACAAGATC ACCCCAACCTGGCAGAGTT TGCCTTCAGCCTGTACAGGC AGCTGGCCCACCAGAGCAA CAGCACCAACATCTTCTTCA GCCCAGTGAGCATAGCCACA GCCTTTGCCATGCTGAGCCT GGGCACCAAGGCAGACACC CATGATGAGATCCTGGAGGG CCTGAACTTCAACCTGACAG AGATCCCAGAGGCCCAGATC CATGAGGGCTTCCAGGAGCT GCTGAGGACCCTGAACCAGC CAGACAGCCAGCTGCAGCTG ACCACAGGCAATGGCCTGTT CCTGTCTGAGGGCCTGAAGC TGGTGGACAAGTTCCTGGAG GATGTGAAGAAGCTGTACCA CTCTGAGGCCTTCACAGTGA ACTTTGGAGACACAGAGGA GGCCAAGAAGCAGATCAAT

		<p>GACTATGTGGAGAAGGGCA CCCAGGGCAAGATAGTGGA CCTGGTGAAGGAGCTGGAC AGGGACACAGTGTTCGCCCT GGTGA ACTACATCTTCTTCA AGGGCAAGTGGGAGAGGCC CTTTGAGGTGAAGGACACAG AGGAGGAGGACTTCCATGTG GACCAGGTGACCACAGTGA AGGTGCCCATGATGAAGAG GCTGGGCATGTTCAATATCC AGCACTGCAAGAAGCTGAG CAGCTGGGTGCTGCTGATGA AGTACCTGGGCAATGCCACA GCCATCTTCTTCCTGCCAGA TGAGGGCAAGCTGCAGCAC CTGGAGAATGAGCTGACCCA TGACATCATCACCAAGTTCC TGGAGAATGAGGACAGGAG GTCTGCCAGCCTGCACCTGC CCAAGCTGAGCATCACAGGC ACCTATGACCTGAAGTCTGT GCTGGGCCAGCTGGGCATCA CCAAGGTGTTCAAGCAATGGA GCAGACCTGTCTGGAGTGAC AGAGGAGGCCCCCTGAAG CTGAGCAAGGCAGTGCACA AGGCAGTGCTGACCATAGAT GAGAAGGGCACAGAGGCAG CAGGAGCCATGTTTCCTGGAG GCCATCCCCATGAGCATCCC CCCAGAGGTGAAGTTCAACA AGCCTTTTGTGTTTCCTGATG ATAGAGCAGAACCAAGA GCCCCCTGTTTCATGGGCAAG</p>
--	--	--

			GTGGTGAACCCACCCAGAA GTAA
20	A1AT c SP	1380	ATGCCGTCTTCTGTCTCGTG GGGCATCCTCCTGCTGGCAG GCCTGTGCTGCCTGGTCCCT GTCTCCCTGGCTGAGGATCC CCAGGGAGATGCTGCCCAG AAGACAGATACATCCCACCA TGATCAGGATCACCCAACCT TCAACAAGATCACCCCAAC CTGGCTGAGTTCGCCTTCAG CCTATACCGCCAGCTGGCAC ACCAGTCCAACAGCACCAAT ATCTTCTTCTCCCCAGTGAG CATCGCTACAGCCTTTGCAA TGCTCTCCCTGGGGACCAAG GCTGACACTCACGATGAAAT CCTGGAGGGCCTGAATTTCA ACCTCACGGAGATTCCGGAG GCTCAGATCCATGAAGGCTT CCAGGAACTCCTCCGTACCC TCAACCAGCCAGACAGCCA GCTCCAGCTGACCACCGGCA ATGGCCTGTTCCCTCAGCGAG GGCCTGAAGCTAGTGGATAA GTTTTTGGAGGATGTTAAAA AGTTGTACCACTCAGAAGCC TTCAGTGTCAACTTCGGGGA CACCGAAGAGGCCAAGAAA CAGATCAACGATTACGTGGA GAAGGGTACTCAAGGGAAA ATTGTGGATTTGGTCAAGGA GCTTGACAGAGACACAGTTT TTGCTCTGGTGAATTACATC

			<p> TTCTTTAAAGGCAAATGGGA  GAGACCCTTTGAAGTCAAGG  ACACCGAGGAAGAGGACTT  CCACGTGGACCAGGTGACCA  CCGTGAAGGTGCCTATGATG  AAGCGTTTAGGCATGTTTAA  CATCCAGCACTGTAAGAAGC  TGTCCAGCTGGGTGCTGCTG  ATGAAATACCTGGGCAATGC  CACCGCCATCTTCTTCCTGC  CTGATGAGGGGAAACTACA  GCACCTGGAAAATGAACTCA  CCCACGATATCATCACCAAG  TTCCTGGAAAATGAAGACAG  AAGGTCTGCCAGCTTACATT  TACCCAAACTGTCCATTACT  GGAACCTATGATCTGAAGAG  CGTCCTGGGTCAACTGGGCA  TACTAAGGTCTTCAGCAAT  GGGGCTGACCTCTCCGGGGT  CACAGAGGAGGCACCCCTG  AAGCTCTCCAAGGCCGTGCA  TAAGGCTGTGCTGACCATCG  ACGAGAAAGGGACTGAAGC  TGCTGGGGCCATGTTTTTAG  AGGCCATACCCATGTCTATC  CCCCCGAGGTCAAGTTCAA  CAAACCCTTTGTCTTCTTAAT  GATTGAACAAAATACCAAGT  CTCCCTCTTCATGGGAAAA  GTGGTGAATCCCACCCAAAA  ATAA </p>
21	A1AT без SP	1382	<p> ATGAAGTGGGTAACCTTTAT  TTCCCTTCTTTTTCTCTTTAG  CTCGGCTTATTCCAGGGGTG </p>

		TGTTTCGTCGAGATGCACttG AGGATCCCCAGGGAGATGCT GCCCAGAAGACAGATACAT CCCACCATGATCAGGATCAC CCAACCTTCAACAAGATCAC CCCCAACCTGGCTGAGTTCG CCTTCAGCCTATAACCGCCAG CTGGCACACCAGTCCAACAG CACCAATATCTTCTTCTCCCC AGTGAGCATCGCTACAGCCT TTGCAATGCTCTCCCTGGGG ACCAAGGCTGACACTCACGA TGAAATCCTGGAGGGCCTGA ATTTCAACCTCACGGAGATT CCGGAGGCTCAGATCCATGA AGGCTTCCAGGAACCTCCTCC GTACCCTCAACCAGCCAGAC AGCCAGCTCCAGCTGACCAC CGGCAATGGCCTGTTCTCA GCGAGGGCCTGAAGCTAGT GGATAAGTTTTTGGAGGATG TTAAAAAGTTGTACCACTCA GAAGCCTTCACTGTCAACTT CGGGGACACCGAAGAGGCC AAGAAACAGATCAACGATT ACGTGGAGAAGGGTACTCA AGGGAAAATTGTGGATTTGG TCAAGGAGCTTGACAGAGA CACAGTTTTTGCTCTGGTGA ATTACATCTTCTTTAAAGGC AAATGGGAGAGACCCTTTGA AGTCAAGGACACCGAGGAA GAGGACTTCCACGTGGACCA GGTGACCACCGTGAAGGTGC CTATGATGAAGCGTTTAGGC
--	--	--

			<p> ATGTTTAAACATCCAGCACTG  TAAGAAGCTGTCCAGCTGGG  TGCTGCTGATGAAATACCTG  GGCAATGCCACCGCCATCTT  CTTCCTGCCTGATGAGGGGA  AACTACAGCACCTGGAAAAT  GAACTCACCCACGATATCAT  CACCAAGTTCCTGGAAAATG  AAGACAGAAGGTCTGCCAG  CTTACATTTACCCAAACTGT  CCATTACTGGAACCTATGAT  CTGAAGAGCGTCCTGGGTCA  ACTGGGCATCACTAAGGTCT  TCAGCAATGGGGCTGACCTC  TCCGGGGTCACAGAGGAGG  CACCCCTGAAGCTCTCCAAG  GCCGTGCATAAGGCTGTGCT  GACCATCGACGAGAAAGGG  ACTGAAGCTGCTGGGGCCAT  GTTTTTAGAGGCCATACCCA  TGTCTATCCCCCCCCGAGGTC  AAGTTCAACAAACCCTTTGT  CTTCTTAATGATTGAACAAA  ATACCAAGTCTCCCCTCTC  ATGGGAAAAGTGGTGAATC  CCACCCAAAAAtaa </p>
22	A1AT без SP, истощенный по CpG	1384	<p> ATGAAGTGGGTAACCTTTAT  TTCCCTTCTTTTTCTTTAG  CTCGGCTTATTCCAGGGGTG  TGTTTCGTCGAGATGCACttG  AGGACCCCCAGGGAGATGC  AGCCCAGAAGACAGACACC  AGCCACCATGACCAGGACC  ACCCACCTTCAACAAGATC  ACCCCAACCTGGCAGAGTT </p>

		TGCCTTCAGCCTGTACAGGC AGCTGGCCCACCAGAGCAA CAGCACCAACATCTTCTTCA GCCCAGTGAGCATAGCCACA GCCTTTGCCATGCTGAGCCT GGGCACCAAGGCAGACACC CATGATGAGATCCTGGAGGG CCTGAACTTCAACCTGACAG AGATCCCAGAGGCCAGATC CATGAGGGCTTCCAGGAGCT GCTGAGGACCCTGAACCAGC CAGACAGCCAGCTGCAGCTG ACCACAGGCAATGGCCTGTT CCTGTCTGAGGGCCTGAAGC TGGTGGACAAGTTCCTGGAG GATGTGAAGAAGCTGTACCA CTCTGAGGCCTTCACAGTGA ACTTTGGAGACACAGAGGA GGCCAAGAAGCAGATCAAT GACTATGTGGAGAAGGGCA CCCAGGGCAAGATAGTGGA CCTGGTGAAGGAGCTGGAC AGGGACACAGTGTTTGCCCT GGTGAACTACATCTTCTTCA AGGGCAAGTGGGAGAGGCC CTTTGAGGTGAAGGACACAG AGGAGGAGGACTTCCATGTG GACCAGGTGACCACAGTGA AGGTGCCCATGATGAAGAG GCTGGGCATGTTCAATATCC AGCACTGCAAGAAGCTGAG CAGCTGGGTGCTGCTGATGA AGTACCTGGGCAATGCCACA GCCATCTTCTTCCCTGCCAGA TGAGGGCAAGCTGCAGCAC
--	--	--

			<p>CTGGAGAATGAGCTGACCCA  TGACATCATCACCAAGTTCC  TGGAGAATGAGGACAGGAG  GTCTGCCAGCCTGCACCTGC  CCAAGCTGAGCATCACAGGC  ACCTATGACCTGAAGTCTGT  GCTGGGCCAGCTGGGCATCA  CCAAGGTGTTTCAGCAATGGA  GCAGACCTGTCTGGAGTGAC  AGAGGAGGCCCCCCTGAAG  CTGAGCAAGGCAGTGCACA  AGGCAGTGCTGACCATAGAT  GAGAAGGGCACAGAGGCAG  CAGGAGCCATGTTTCCTGGAG  GCCATCCCCATGAGCATCCC  CCCAGAGGTGAAGTTCAACA  AGCCTTTTGTGTTCTGATG  ATAGAGCAGAACACCAAGA  GCCCCCTGTTTCATGGGCAAG  GTGGTGAACCCACCCAGAA  GTAA</p>
23	<p>A1AT без SP  (альтернативная  частота  использования  кодонов 1),  истощенный по CpG</p>	1386	<p>ATGAAGTGGGTAACCTTTAT  TTCCCTTCTTTTTCTCTTTAG  CTCGGCTTATTCCAGGGGTG  TGTTTCGTCGAGATGCACttG  AGGATCCCCAGGGAGATGCT  GCCCAGAAGACAGATACAT  CCCACCATGATCAGGATCAC  CCAACCTTCAACAAGATCAC  CCCCAACCTGGCTGAGTTTG  CCTTCAGCCTATACAGACAG  CTGGCACACCAGTCCAACAG  CACCAATATCTTCTTCTCCCC  AGTGAGCATAGCTACAGCCT  TTGCAATGCTCTCCCTGGGG</p>

		ACCAAGGCTGACACTCATGA TGAAATCCTGGAGGGCCTGA ATTTCAACCTCACAGAGATT CCAGAGGCTCAGATCCATGA AGGCTTCCAGGAACTCCTCA GAACCCTCAACCAGCCAGAC AGCCAGCTCCAGCTGACCAC AGGCAATGGCCTGTTCTCT CTGAGGGCCTGAAGCTAGTG GATAAGTTTTTGGAGGATGT TAAAAAGTTGTACCACTCAG AAGCCTTCACTGTCAACTTT GGGGACACAGAAGAGGCCA AGAAACAGATCAATGATTAT GTGGAGAAGGGTACTCAAG GGAAAATTGTGGATTTGGTC AAGGAGCTTGACAGAGACA CAGTTTTTGCTCTGGTGAAT TACATCTTCTTTAAAGGCAA ATGGGAGAGACCCTTTGAAG TCAAGGACACAGAGGAAGA GGACTTCCATGTGGACCAGG TGACCACAGTGAAGGTGCCT ATGATGAAAAGGCTTGGTAT GTTCAATATCCAGCACTGTA AGAAGCTGTCCAGCTGGGTG CTGCTGATGAAATACCTGGG CAATGCCACAGCCATCTTCT TCCTGCCTGATGAGGGGAAA CTACAGCACCTGGAAAATGA ACTCACCCATGATATCATCA CCAAGTTCCTGGAAAATGAA GACAGAAGGTCTGCCAGCTT ACATTTACCCAACTGTCCA TACTGGAACCTATGATCTG
--	--	---

		<p>AAGTCTGTCCTGGGTCAACT  GGGCATCACTAAGGTCTTCA  GCAATGGGGCTGACCTCTCT  GGGGTCACAGAGGAGGCAC  CCCTGAAGCTCTCCAAGGCA  GTGCATAAGGCTGTGCTGAC  CATAGATGAGAAGGGCACA  GAGGCTGCTGGGGCCATGTT  TTTAGAGGCCATACCCATGT  CTATCCCCCAGAGGTCAAG  TTCAACAAACCTTTTGTATTT  CTCATGATAGAGCAGAACAC  TAAATCACCCCTCTTCATGG  GAAAAGTGGTGAATCCCACC  CAAAAAtaa</p>
24	<p>A1AT без SP  (альтернативная  частота  использования  кодонов 2),  истощенный по CpG</p>	<p>1388</p> <p>ATGAAGTGGGTAACCTTTAT  TTCCCTTCTTTTCTCTTTAG  CTCGGCTTATTCCAGGGGTG  TGTTTCGTCGAGATGCACttG  AGGACCCCCAGGGAGATGC  TGCCCAGAAGACAGACACA  TCTCACCATGACCAGGACCA  CCCCACCTTCAACAAGATCA  CTCCCAATCTTGCAGAGTTT  GCATTCTCTCTACAGACA  GCTTGCACACCAGAGCAACT  CTACTAACATCTTCTTCTCTC  CAGTCAGCATAGCAACAGC  ATTTGCAATGCTCAGCCTTG  GCACAAAGGCAGACACACA  TGATGAGATCCTTGAGGGCC  TCAACTTCAATCTCACAGAG  ATCCCAGAAGCCCAGATCCA  TGAGGGCTTCCAGGAGCTGC  TGAGAACACTCAACCAGCCT</p>

		GACTCTCAGCTCCAGCTCAC AACAGGCAATGGGCTCTTCC TCTCTGAGGGCCTCAAGCTT GTAGACAAGTTCCTGGAGGA TGTCAAGAAGCTCTACCACT CTGAAGCCTTCACAGTCAAC TTTGGAGACACAGAGGAAG CCAAGAAGCAGATCAATGA CTATGTAGAGAAGGGGACTC AGGGCAAGATAGTAGACCTT GTCAAGGAGCTGGACAGAG ACACAGTCTTTGCACTGGTC AACTACATCTTCTTCAAGGG GAAGTGGGAGAGACCCTTTG AAGTCAAGGACACAGAGGA GGAGGACTTCCATGTAGACC AGGTGACAACAGTCAAGGTT CCCATGATGAAGAGACTTGG CATGTTCAATATCCAGCACT GCAAGAAGCTCAGCTCTTGG GTCCTCCTCATGAAGTACCT TGGCAATGCAACAGCAATCT TCTTCCTTCTGATGAGGGC AAGCTCCAGCACCTTGAGAA TGAGCTGACACATGACATCA TCACAAAGTTCCTGGAGAAT GAGGACAGAAGGTCTGCAT CTCTCCACCTTCCAAAGCTC AGCATCACAGGCACCTATGA CCTCAAGTCTGTCCTTGGCC AGCTTGGCATCACAAAGGTC TTCTCTAATGGTGCAGACCT CTCTGGAGTCACAGAGGAA GCCCCCTCAAGCTCAGCAA GGCTGTGCACAAGGCTGTGC
--	--	--

			<p>TCACAATAGATGAGAAGGG  GACAGAGGCTGCAGGTGCC  ATGTTCCCTGGAAGCCATCCC  CATGAGCATCCCACCAGAAG  TCAAGTTCAACAAGCCTTTT  GTCTTCCTGATGATAGAGCA  GAACACAAAGTCTCCCCTCT  TCATGGGCAAGGTAGTCAAC  CCCACTCAAAAG</p>
<p>Схема  конструкции  23</p>	<p>A1AT без SP  (альтернативная  частота  использования  кодонов 1),  истощенный по CpG</p>	1390	<p>ATGAAGTGGGTAACCTTTAT  TTCCCTTCTTTTCTCTTTAG  CTCGGCTTATTCCAGGGGTG  TGTTTCGTCGAGATGCACttG  AGGACCCCCAGGGAGATGC  AGCCCAGAAGACAGACACC  AGCCACCATGACCAGGACC  ACCCACCTTCAACAAGATC  ACCCCAACCTGGCAGAGTT  TGCCTTCAGCCTGTACAGGC  AGCTGGCCCACCAGAGCAA  CAGCACCAACATCTTCTTCA  GCCCAGTGAGCATAGCCACA  GCCTTTGCCATGCTGAGCCT  GGGCACCAAGGCAGACACC  CATGATGAGATCCTGGAGGG  CCTGAACTTCAACCTGACAG  AGATCCCAGAGGCCAGATC  CATGAGGGCTTCCAGGAGCT  GCTGAGGACCCTGAACCAGC  CAGACAGCCAGCTGCAGCTG  ACCACAGGCAATGGCCTGTT  CCTGTCTGAGGGCCTGAAGC  TGGTGGACAAGTTCCTGGAG  GATGTGAAGAAGCTGTACCA  CTCTGAGGCCTTCACAGTGA</p>

		ACTTTGGAGACACAGAGGA GGCCAAGAAGCAGATCAAT GACTATGTGGAGAAGGGCA CCCAGGGCAAGATAGTGGA CCTGGTGAAGGAGCTGGAC AGGGACACAGTGTTTGCCCT GGTGA ACTACATCTTCTTCA AGGGCAAGTGGGAGAGGCC CTTTGAGGTGAAGGACACAG AGGAGGAGGACTTCCATGTG GACCAGGTGACCACAGTGA AGGTGCCCATGATGAAGAG GCTGGGCATGTTCAATATCC AGCACTGCAAGAAGCTGAG CAGCTGGGTGCTGCTGATGA AGTACCTGGGCAATGCCACA GCCATCTTCTTCTGCCAGA TGAGGGCAAGCTGCAGCAC CTGGAGAATGAGCTGACCCA TGACATCATCACCAAGTTCC TGGAGAATGAGGACAGGAG GTCTGCCAGCCTGCACCTGC CCAAGCTGAGCATCACAGGC ACCTATGACCTGAAGTCTGT GCTGGGCCAGCTGGGCATCA CCAAGGTGTTTCAGCAATGGA GCAGACCTGTCTGGAGTGAC AGAGGAGGCCCCCCTGAAG CTGAGCAAGGCAGTGCACA AGGCAGTGCTGACCATAGAT GAGAAGGGCACAGAGGCAG CAGGAGCCATGTTTCTGGAG GCCATCCCCATGAGCATCCC CCCAGAGGTGAAGTTCAACA AGCCTTTTGTGTTTCTGATG
--	--	---

			ATAGAGCAGAACACCAAGA GCCCCCTGTTTCATGGGCAAG GTGGTGAACCCACCCAGAA GTAA
--	--	--	---

Универсальными для матриц, представленных в SEQ ID NO: 770, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 780, 790, 795 и 1564, являются следующие последовательности:

Акцептор сплайсинга, прямой:  
taggtcagtgaagagaagaacaaaaagcagcatattacagttagttgtcttcatcaatctttaaataatgttgtgtggttttctctccctgtttccacag (SEQ ID NO: 1301)

Акцептор сплайсинга, обратный:  
ctgtggaacagggagagaaaaaccasacaacatattaaagattgatgaagacaactaactgtaatatgctgtttttgttcttcttctactgacctga (SEQ ID NO: 1302)

Акцептор сплайсинга, прямой, для SEQ ID NO: 1564  
TGCATAATCTAAGTCAAATGGAAAGAAATATAAAAAGTAACATTATTA CTCTTGT  
TTCTTCAGTATTTAACAATCCtttttttCTTCCCTTGCCCAG (SEQ ID NO: 1554)

Акцептор сплайсинга, обратный, для SEQ ID NO: 1564  
CTGGGCAAGGGAAGaaaaaaaGGATTGTAAATACTGAAGAAAACAAGAAGTAATAA  
TGTTACTTTTTATATTTCTTTCCATTTGACTTAGATTATGCA (SEQ ID NO: 1555)

Универсальными для всех матриц являются следующие последовательности терминатора, прямая:

CAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAAC TAGAATGCAGTGA  
AAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAA  
GCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTCATTTTATGTTTCAGGTTTCAGG  
GGGAGGTGTGGGAGGTTTTTT (SEQ ID NO: 1304)

Терминатор, обратная:  
ggggataccccctagagccccagctggttctttctcctcagaagCCATAGAGCCCATCTCATCCCCAGCATGC  
CTGCTATTGTCTTCCCAATCCTCCCCCTTGCTGTCTTGCCTGCCCCACCCACCCCCAGAA  
TAGAATGACACCTACTCAGACAATTCTATGCAATTTCTCATTTTATTAGGAAAGGA  
CAGTGGGAGTGGCACCTTCCAGGGTCAAGGAAGGCATGGGGGAGGGGCAAACAAC  
AGATGGCTGGCAACTAGAAGGCACAGTCTagg (SEQ ID NO: 1305)

**Таблица 9В**

SEQ ID NO:	Название	Последовательность
1400	SERPINA1 дт из Конструкции 1	GAGGACCCCCAGGGCGACGCCGCCAGAA GACCGACACCAGCCACCACGACCAGGACC ACCCCACCTTCAACAAGATCACCCCAACC TGGCCGAGTTCGCCTTCAGCCTGTACAGGC AGCTGGCCCACCAGAGCAACAGCACCAAC ATCTTCTTCAGCCCCGTGAGCATCGCCACC

GCCTTCGCCATGCTGAGCCTGGGCACCAA  
GGCCGACACCCACGACGAGATCCTGGAGG  
GCCTGAACTTCAACCTGACCGAGATCCCCG  
AGGCCAGATCCACGAGGGCTTCCAGGAG  
CTGCTGAGGACCCTGAACCAGCCCGACAG  
CCAGCTGCAGCTGACCACCGGCAACGGCC  
TGTTCTGAGCGAGGGCCTGAAGCTGGTG  
GACAAGTTCCTGGAGGACGTGAAGAAGCT  
GTACCACAGCGAGGCCTTCACCGTGAACCT  
CGGCGACACCGAGGAGGCCAAGAAGCAG  
ATCAACGACTACGTGGAGAAGGGCACCCA  
GGGCAAGATCGTGGACCTGGTGAAGGAGC  
TGGACAGGGACACCGTGTTCCGCCCTGGTG  
AACTACATCTTCTTCAAGGGCAAGTGGGA  
GAGGCCCTTCGAGGTGAAGGACACCGAGG  
AGGAGGACTTCCACGTGGACCAGGTGACC  
ACCGTGAAGGTGCCCATGATGAAGAGGCT  
GGGCATGTTCAACATCCAGCACTGCAAGA  
AGCTGAGCAGCTGGGTGCTGCTGATGAAG  
TACCTGGGCAACGCCACCGCCATCTTCTTC  
CTGCCCCGACGAGGGCAAGCTGCAGCACCT  
GGAGAACGAGCTGACCCACGACATCATCA  
CCAAGTTCCTGGAGAACGAGGACAGGAGG  
AGCGCCAGCCTGCACCTGCCCAAGCTGAG  
CATCACCGGCACCTACGACCTGAAGAGCG  
TGCTGGGCCAGCTGGGCATACCAAGGTG  
TTCAGCAACGGCGCCGACCTGAGCGGCGT  
GACCGAGGAGGCCCCCCTGAAGCTGAGCA  
AGGCCGTGCACAAGGCCGTGCTGACCATC  
GACGAGAAGGGCACCGAGGCCGCGGCGC  
CATGTTCTGAGGGCCATCCCCATGAGCAT  
CCCCCCCAGGTGAAGTTCAACAAGCCTTT  
CGTGTTCTGATGATCGAGCAGAACACCA  
AGAGCCCCCTGTTTCATGGGCAAGGTGGTG  
AACCCACCCAGAAGTAA

<p><b>1401</b></p>	<p>SERPINA1      дт      - альтернативная частота использования кодонов      1      -      из Конструкции 1</p>	<p>ttaTTTTTGGGTGGGATTCACCACTTTTCCCA TGAAGAGGGGTGATTTAGTGTTCTGCTCGA TCATGAGAAATACAAAAGGTTTGTGAAC TTGACCTCGGGGGGATAGACATGGGTAT GGCCTCTAAAACATGGCCCCAGCAGCCT CGGTGCCCTTCTCGTCGATGGTCAGCACAG CCTTATGCACGGCCTTGGAGAGCTTCAGGG GTGCCTCCTCTGTGACCCCGGAGAGGTCAG CCCCATTGCTGAAGACCTTAGTGATGCCCA GTTGACCCAGGACGCTCTTCAGATCATAGG TTCCAGTAATGGACAGTTTGGGTAAATGTA AGCTGGCAGACCTTCTGTCTTCATTTCCA GGA ACTTGGTGATGATATCGTGGGTGAGTT CATTTTCCAGGTGCTGTAGTTTCCCCTCAT CAGGCAGGAAGAAGATGGCGGTGGCATTG CCCAGGTATTTATCAGCAGCACCCAGCTG GACAGCTTCTTACAGTGCTGGATATTGAAC ATACCAAGCCTTTTCATCATAGGCACCTTC ACGGTGGTCACCTGGTCCACGTGGAAGTC CTCTTCCTCGGTGTCCTTGACTTCAAAGGG TCTCTCCCATTGCTTTAAAGAAGATGTA ATTCACCAGAGCAAAA ACTGTGTCTCTGTC AAGCTCCTTGACCAAATCCACAATTTTCCC TTGAGTACCCTTCTCCACGTAATCGTTGAT CTGTTTCTTGGCCTCTTCGGTGTCCCCGAA GTTGACAGTGAAGGCTTCTGAGTGGTACA ACTTTTAAACATCCTCCAAA ACTTATCCA CTAGCTTCAGGCCCTCGCTGAGGAACAGG CCATTGCCGGTGGTCAGCTGGAGCTGGCTG TCTGGCTGGTTGAGGGTACGGAGGAGTTC CTGGAAGCCTTCATGGATCTGAGCCTCCGG AATCTCCGTGAGGTTGAAATTCAGGCCCTC CAGGATTTATCGTGAGTGTCAGCCTTGGT CCCCAGGGAGAGCATTGCAAAGGCTGTAG</p>
--------------------	---	---

		<p>CGATGCTCACTGGGGAGAAGAAGATATTG  GTGCTGTTGGACTGGTGTGCCAGCTGGCGG  TATAGGCTGAAGGCCAACTCAGCCAGGTT  GGGGGTGATCTTGTTGAAGGTTGGGTGATC  CTGATCATGGTGGGATGTATCTGTCTTCTG  GGCAGCATCTCCCTGGGGATCCTC</p>
<p><b>1402</b></p>	<p>SERPINA1     дт     с  истощением по CpG из  Конструкции 7</p>	<p>GAGGACCCCCAGGGAGATGCAGCCCAGAA  GACAGACACCAGCCACCATGACCAGGACC  ACCCACCTTCAACAAGATCACCCCAACC  TGGCAGAGTTTGCCTTCAGCCTGTACAGGC  AGCTGGCCCACCAGAGCAACAGCACCAAC  ATCTTCTTCAGCCCAGTGAGCATAGCCACA  GCCTTTGCCATGCTGAGCCTGGGCACCAAG  GCAGACACCCATGATGAGATCCTGGAGGG  CCTGAACTTCAACCTGACAGAGATCCCAG  AGGCCCAGATCCATGAGGGCTTCCAGGAG  CTGCTGAGGACCCTGAACCAGCCAGACAG  CCAGCTGCAGCTGACCACAGGCAATGGCC  TGTTCCCTGTCTGAGGGCCTGAAGCTGGTGG  ACAAGTTCCTGGAGGATGTGAAGAAGCTG  TACCACTCTGAGGCCTTACAGTGAACCTT  GGAGACACAGAGGAGGCCAAGAAGCAGA  TCAATGACTATGTGGAGAAGGGCACCCAG  GGCAAGATAGTGGACCTGGTGAAGGAGCT  GGACAGGGACACAGTGTTTGCCTGGTGA  ACTACATCTTCTTCAAGGGCAAGTGGGAG  AGGCCCTTTGAGGTGAAGGACACAGAGGA  GGAGGACTTCCATGTGGACCAGGTGACCA  CAGTGAAGGTGCCATGATGAAGAGGCTG  GGCATGTTCAATATCCAGCACTGCAAGAA  GCTGAGCAGCTGGGTGCTGCTGATGAAGT  ACCTGGGCAATGCCACAGCCATCTTCTTCC  TGCCAGATGAGGGCAAGCTGCAGCACCTG  GAGAATGAGCTGACCCATGACATCATCAC  CAAGTTCCTGGAGAATGAGGACAGGAGGT</p>

		<p>CTGCCAGCCTGCACCTGCCCAAGCTGAGC  ATCACAGGCACCTATGACCTGAAGTCTGTG  CTGGGCCAGCTGGGCATCACCAAGGTGTT  CAGCAATGGAGCAGACCTGTCTGGAGTGA  CAGAGGAGGCCCCCCTGAAGCTGAGCAAG  GCAGTGCACAAGGCAGTGCTGACCATAGA  TGAGAAGGGCACAGAGGCAGCAGGAGCC  ATGTTCCCTGGAGGCCATCCCCATGAGCATC  CCCCAGAGGTGAAGTTCAACAAGCCTTTT  GTGTTCCCTGATGATAGAGCAGAACACCAA  GAGCCCCCTGTTTCATGGGCAAGGTGGTGA  ACCCACCCAGAAGTAA</p>
1403	<p>SERPINA1 дт -  альтернативная  частота использования  кодонов 1 - истощение  по CpG из  Конструкции 7/8</p>	<p>ttaTTTTTGGGTGGGATTCACCACTTTTCCCA  TGAAGAGGGGTGATTTAGTGTTCTGCTCTA  TCATGAGAAATACAAAAGGTTTGTGTAAC  TTGACCTCTGGGGGGATAGACATGGGTAT  GGCCTCTAAAAACATGGCCCCAGCAGCCT  CTGTGCCCTTCTCATCTATGGTCAGCACAG  CCTTATGCACTGCCTTGGAGAGCTTCAGGG  GTGCCTCCTCTGTGACCCCAGAGAGGTCAG  CCCCATTGCTGAAGACCTTAGTGATGCCCA  GTTGACCCAGGACAGACTTCAGATCATAG  GTTCCAGTAATGGACAGTTTGGGTAAATGT  AAGCTGGCAGACCTTCTGTCTTCATTTTCC  AGGAACCTGGTGATGATATCATGGGTGAG  TTCATTTTCCAGGTGCTGTAGTTTCCCCTCA  TCAGGCAGGAAGAAGATGGCTGTGGCATT  GCCCAGGTATTTTCATCAGCAGCACCCAGCT  GGACAGCTTCTTACAGTGCTGGATATTGAA  CATACCAAGCCTTTTCATCATAGGCACCTT  CACTGTGGTCACCTGGTCCACATGGAAGTC  CTCTTCCTCTGTGTCCTTGACTIONCAAAGGG  TCTCTCCCATTTCCTTTAAAGAAGATGTA  ATTCACCAGAGCAAAAACCTGTGTCTCTGTC  AAGCTCCTTGACCAAATCCACAATTTTCCC</p>

		<p>TTGAGTACCCTTCTCCACATAATCATTGAT  CTGTTTCTTGGCCTCTTCTGTGTCCCCAAA  GTTGACAGTGAAGGCTTCTGAGTGGTACA  ACTTTTTAACATCCTCCAAAACTTATCCA  CTAGCTTCAGGCCCTCAGAGAGGAACAGG  CCATTGCCTGTGGTCAGCTGGAGCTGGCTG  TCTGGCTGGTTGAGGGTTCTGAGGAGTTCC  TGGAAGCCTTCATGGATCTGAGCCTCTGGA  ATCTCTGTGAGGTTGAAATTCAGGCCCTCC  AGGATTTTCATCATGAGTGTCAGCCTTGGTC  CCCAGGGAGAGCATTGCAAAGGCTGTAGC  TATGCTCACTGGGGAGAAGAAGATATTGG  TGCTGTTGGACTGGTGTGCCAGCTGTCTGT  ATAGGCTGAAGGCAAACCTCAGCCAGGTTG  GGGGTGATCTTGTTGAAGGTTGGGTGATCC  TGATCATGGTGGGATGTATCTGTCTTCTGG  GCAGCATCTCCCTGGGGATCCTC</p>
1404	<p>SERPINA1 дт -  альтернативная  частота использования  кодонов 2 - истощение  по CpG из  Конструкции 8</p>	<p>GAGGACCCCCAGGGAGATGCTGCCCAGAA  GACAGACACATCTACCATGACCAGGACC  ACCCACCTTCAACAAGATCACTCCCAATC  TTGCAGAGTTTGCATTCTCTCTACAGAC  AGCTTGCACACCAGAGCAACTCTACTAAC  ATCTTCTTCTCTCCAGTCAGCATAGCAACA  GCATTTGCAATGCTCAGCCTTGGCACAAAG  GCAGACACACATGATGAGATCCTTGAGGG  CCTCAACTTCAATCTCACAGAGATCCCAGA  AGCCCAGATCCATGAGGGCTTCCAGGAGC  TGCTGAGAACAACCTCAACCAGCCTGACTCTC  AGCTCCAGCTCACAACAGGCAATGGGCTC  TTCTCTCTGAGGGCCTCAAGCTTGTAGAC  AAGTTCCTGGAGGATGTCAAGAAGCTCTA  CCACTCTGAAGCCTTCACAGTCAACTTTGG  AGACACAGAGGAAGCCAAGAAGCAGATC  AATGACTATGTAGAGAAGGGGACTCAGGG  CAAGATAGTAGACCTTGTCAAGGAGCTGG</p>

		ACAGAGACACAGTCTTTGCACTGGTCAACT ACATCTTCTTCAAGGGGAAGTGGGAGAGA CCCTTTGAAGTCAAGGACACAGAGGAGGA GGACTTCCATGTAGACCAGGTGACAACAG TCAAGGTTCCCATGATGAAGAGACTTGGC ATGTTCAATATCCAGCACTGCAAGAAGCTC AGCTCTTGGGTCCTCCTCATGAAGTACCTT GGCAATGCAACAGCAATCTTCTTCTCCTT GATGAGGGCAAGCTCCAGCACCTTGAGAA TGAGCTGACACATGACATCATCACAAGT TCCTGGAGAATGAGGACAGAAGGTCTGCA TCTCTCCACCTTCCAAAGCTCAGCATCACA GGCACCTATGACCTCAAGTCTGTCCTTGGC CAGCTTGGCATCACAAGGTCTTCTCTAAT GGTGCAGACCTCTCTGGAGTCACAGAGGA AGCCCCCTCAAGCTCAGCAAGGCTGTGC ACAAGGCTGTGCTCACAATAGATGAGAAG GGGACAGAGGCTGCAGGTGCCATGTTCTT GGAAGCCATCCCCATGAGCATCCCACCAG AAGTCAAGTTCAACAAGCCTTTTGTCTTCC TGATGATAGAGCAGAACACAAAGTCTCCC CTCTTCATGGGCAAGGTAGTCAACCCCACT CAAAAG
1405	ORF SERPINA1 ДТ	ATGCCGTCTTCTGTCTCGTGGGGCATCCTC CTGCTGGCAGGCCTGTGCTGCCTGGTCCCT GTCTCCCTGGCTGAGGATCCCCAGGGAGA TGCTGCCCAGAAGACAGATACATCCCACC ATGATCAGGATCACCCAACCTTCAACAAG ATCACCCCCAACCTGGCTGAGTTCGCCTTC AGCCTATACCGCCAGCTGGCACACCAGTC CAACAGCACCAATATCTTCTTCTCCCCAGT GAGCATCGCTACAGCCTTTGCAATGCTCTC CCTGGGGACCAAGGCTGACACTCACGATG AAATCCTGGAGGGCCTGAATTTCAACCTCA CGGAGATTCCGGAGGCTCAGATCCATGAA

		<p>GGCTTCCAGGAACTCCTCCGTACCCTCAAC  CAGCCAGACAGCCAGCTCCAGCTGACCAC  CGGCAATGGCCTGTTCCCTCAGCGAGGGCCT  GAAGCTAGTGGATAAGTTTTTTGGAGGATG  TTAAAAAGTTGTACCACTCAGAAGCCTTCA  CTGTCAACTTCGGGGACACCGAAGAGGCC  AAGAAACAGATCAACGATTACGTGGAGAA  GGTACTCAAGGGAAAATTGTGGATTTGG  TCAAGGAGCTTGACAGAGACACAGTTTTT  GCTCTGGTGAATTACATCTTCTTTAAAGGC  AAATGGGAGAGACCCTTTGAAGTCAAGGA  CACCGAGGAAGAGGACTTCCACGTGGACC  AGGTGACCACCGTGAAGGTGCCTATGATG  AAGCGTTTAGGCATGTTTAAACATCCAGCAC  TGTAAGAAGCTGTCCAGCTGGGTGCTGCTG  ATGAAATACCTGGGCAATGCCACCGCCAT  CTTCTTCCTGCCTGATGAGGGGAAACTACA  GCACCTGGAAAATGAACTCACCCACGATA  TCATCACCAAGTTCCTGGAAAATGAAGAC  AGAAGGTCTGCCAGCTTACATTTACCCAAA  CTGTCCATTACTGGAACCTATGATCTGAAG  AGCGTCCTGGGTCAACTGGGCATCACTAA  GGTCTTCAGCAATGGGGCTGACCTCTCCGG  GGTCACAGAGGAGGCACCCCTGAAGCTCT  CCAAGGCCGTGCATAAGGCTGTGCTGACC  ATCGACGAGAAAGGGACTGAAGCTGCTGG  GGCCATGTTTTTAGAGGCCATACCCATGTC  TATCCCCCCCAGGTCAAGTTCAACAAACC  CTTTGTCTTCTTAATGATTGAACAAAATAC  CAAGTCTCCCCTCTTCATGGGAAAAGTGGT  GAATCCCACCCAAAAATAA</p>
1406	<p>Аминокислотная  последовательность  SERPINA1 ДТ</p>	<p>MPSSVSWGILLLAGLCLVPVSLAEDPQGDA  AQKTDTSHHDQDHPTFNKITPNLAEFAFSLY  RQLAHQSNSTNIFFSPVSIATAFAMLSLGTKA  DTHDEILEGLNFNLTEIPEAQIHEGFQELLRTL</p>

		<p>NQPDSQLQLTTGNGLFLSEGLKLVDFLEDV  KKLYHSEAFTVNFGDTEEAKKQINDYVEKG  TQGKIVDLVKELDRDTVFALVNYIFFKGKW  ERPFEVKDTEEEDFHVDQVTTVKVPMMKRL  GMFNIQHCKKLSSWVLLMKYLGNAIAIFFLP  DEGKLQHLENELTHDIITKFLNEDRRSASLH  LPKLSITGTYDLKSVLGQLGITKVFNSGADLS  GVTEEAPLKLSKAVHKAVLTIDEKGTEAAG  AMFLEAIPMSIPPEVKFNKPFVFLMIEQNTKS  PLFMGKVVNPTQK</p>
1407	<p>hSERPINA1 с  продуктом вставки,  кодируемым  сигнальным пептидом  чАльбумина</p>	<p>MKWVTFISLLFLFSSAYSRGVFRDALEDPQ  GDAAQKTDTSHHDQDHPTFNKITPNLAFAF  SLYRQLAHQSNSTNIFFSPVSIATAFAMLSLG  TKADTHDEILEGLNFNLTEIPEAQIHEGFQEL  LRTLNPDSQLQLTTGNGLFLSEGLKLVDF  LEDVKKLYHSEAFTVNFGDTEEAKKQINDY  VEKGTQGKIVDLVKELDRDTVFALVNYIFFK  GKWERPFEVKDTEEEDFHVDQVTTVKVPM  MKRLGMFNIQHCKKLSSWVLLMKYLGNAI  AIFFLPDEGKLQHLENELTHDIITKFLNEDR  RSASLHLPKLSITGTYDLKSVLGQLGITKVF  NSGADLSGVTEEAPLKLSKAVHKAVLTIDEK  GTEAAGAMFLEAIPMSIPPEVKFNKPFVFLMI  EQNTKSPLFMGKVVNPTQK</p>
1408	<p>hSERPINA1 с  продуктом вставки,  кодируемым  сигнальным пептидом  чАльбумина, после  расщепления  сигнального пептида</p>	<p>DALEDPQGDAAQKTDTSHHDQDHPTFNKIT  PNLAFAFSLYRQLAHQSNSTNIFFSPVSIAT  AFAMLSLGTKADTHDEILEGLNFNLTEIPEA  QIHEGFQELLRTLNPDSQLQLTTGNGLFLSE  GLKLVDFLEDVKKLYHSEAFTVNFGDTEE  AKKQINDYVEKGTQGKIVDLVKELDRDTVF  ALVNYIFFKGKWERPFEVKDTEEEDFHVDQ  VTTVKVPMMKRLGMFNIQHCKKLSSWVLL  MKYLGNAIAIFFLPDEGKLQHLENELTHDIIT  KFLNEDRRSASLHLPKLSITGTYDLKSVLG  QLGITKVFNSGADLSGVTEEAPLKLSKAVHK</p>

		AVLTIDEKGTAAAGAMFLEAIPMSIPPEVKFN KPFVFLMIEQNTKSPLFMGKVVNPTQK
1409	нативная последовательность hSERPINA1 с сигнальным пептидом SERPINA1	MPSSVSWGILLLAGLCCCLVPVSLAEDPQGDA AQKTDTSHHQDHPTFNKITPNLAFAFSLY RQLAHQSNSTNIFFSPVSIATAFAMLSLGTKA DTHDEILEGLNFNLTEIPEAQIHEGFQELLRTL NQPDSQLQLTTGNGLFLSEGLKLVDFLEDV KKLYHSEAFTVNFQDTEEAKKQINDYVEKG TQGKIVDLVKELDRDTVFALVNYIFFKGKW ERPFEVKDTEEEDFHVDQVTTVKVPMMKRL GMFNIQHCKKLSSWVLLMKYLGNAIAIFFLP DEGKLQHLENELTHDIITKFLNEDRRSASLH LPKLSITGTDLKSVLGQLGITKVFNSGADLS GVTEEAPLKLSKAVHKAFLTIDEKGTAAAG AMFLEAIPMSIPPEVKFNKPFVFLMIEQNTKS PLFMGKVVNPTQK
1410	нативная последовательность hSERPINA1 с сигнальным пептидом SERPINA1 после расщепления сигнального пептида	EDPQGDAAQKTDTSHHQDHPTFNKITPNL AEFAFSLYRQLAHQSNSTNIFFSPVSIATAFA MLSLGTKADTHDEILEGLNFNLTEIPEAQIHE GFQELLRTL NQPDSQLQLTTGNGLFLSEGLK LVDFLEDVKKLYHSEAFTVNFQDTEEAKK QINDYVEKGTQGKIVDLVKELDRDTVFALV NYIFFKGKWERPFEVKDTEEEDFHVDQVTTV KVPMMKRLGMFNIQHCKKLSSWVLLMKYL GNATAIAIFFLPDEGKLQHLENELTHDIITKFL NEDRRSASLHLPKLSITGTDLKSVLGQLGIT KVFSNGADLSGVTEEAPLKLSKAVHKAFLTI DEKGTAAAGAMFLEAIPMSIPPEVKFNKPFV FLMIEQNTKSPLFMGKVVNPTQK
857	Аминокислотная последовательность рекомбинантного Cas9-NLS	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSK KFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEA TRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAK VDDSFHRLLEESFLVEEDKKHERHPHIFGNIVD EVAYHEKYPTIYHLRKKLV DSTDKADLR LIY

LALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFQ  
 LVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSK  
 SRRENLIQPLGEEKKNGLFGNLIASLGLTP  
 NFKSNFDLAEDAKLQLSKDXYDDDLNLLA  
 QIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEI  
 TKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQ  
 LPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFY  
 KFIKPILEKMDGTEELLVKNLREDLLRKQRT  
 FDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDN  
 REKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTR  
 KSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNF  
 DKNLPNEKVLPHSLLYEYFTVYNELTKVK  
 YVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRK  
 VTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNA  
 SLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVL  
 TLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQL  
 KRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDF  
 LKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQV  
 SGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVV  
 DELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQ  
 KNSRERMKRIIEGIKELGSQILKEHPVENTQL  
 QNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDY  
 DVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKS  
 DNVPSSEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKF  
 DNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQIT  
 KHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLK  
 SKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYL  
 NAVVGTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVR  
 KMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEIT  
 LANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFAT  
 VRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPK  
 RNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSV  
 LVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSE  
 EKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLEL  
 ENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFL

		<p>YLASHYEKLGKSPEDNEQKQLFVEQHKHYL  DEIIEQISEFSKRVLADANLDKVLSAYNKHR  DKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKEYFDTTI  DRKRYTSTKEVLDATLIHQSI TGLYETRIDL S  QLGGDGGGSPKKRKV</p>
858	ORF, кодирующая Sp. Cas9	<p>ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGA  CATCGGAACAAACAGCGTCGGATGGGCAG  TCATCACAGACGAATACAAGGTCCCGAGC  AAGAAGTTCAAGGTCCTGGGAAACACAGA  CAGACACAGCATCAAGAAGAACCTGATCG  GAGCACTGCTGTTTCGACAGCGGAGAAACA  GCAGAAGCAACAAGACTGAAGAGAACAG  CAAGAAGAAGATACACAAGAAGAAAGAA  CAGAATCTGCTACCTGCAGGAAATCTTCAG  CAACGAAATGGCAAAGGTCGACGACAGCT  TCTTCCACAGACTGGAAGAAAGCTTCCTGG  TCGAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACA  CCCGATCTTCGGAAACATCGTCGACGAAG  TCGCATACCACGAAAAGTACCCGACAATC  TACCACCTGAGAAAGAAGCTGGTTCGACAG  CACAGACAAGGCAGACCTGAGACTGATCT  ACCTGGCACTGGCACACATGATCAAGTTC  AGAGGACACTTCCTGATCGAAGGAGACCT  GAACCCGGACAACAGCGACGTCGACAAGC  TGTTTCATCCAGCTGGTCCAGACATAACAACC  AGCTGTTCGAAGAAAACCCGATCAACGCA  AGCGGAGTCGACGCAAAGGCAATCCTGAG  CGCAAGACTGAGCAAGAGCAGAAGACTGG  AAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGGAGAA  AAGAAGAACGGACTGTTTCGGAAACCTGAT  CGCACTGAGCCTGGGACTGACACCGAACT  TCAAGAGCAACTTCGACCTGGCAGAAGAC  GCAAAGCTGCAGCTGAGCAAGGACACATA  CGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCAC  AGATCGGAGACCAGTACGCAGACCTGTTC</p>

		CTGGCAGCAAAGAACCTGAGCGACGCAAT CCTGCTGAGCGACATCCTGAGAGTCAACA CAGAAATCACAAAGGCACCGCTGAGCGCA AGCATGATCAAGAGATACGACGAACACCA CCAGGACCTGACACTGCTGAAGGCACTGG TCAGACAGCAGCTGCCGGAAAAGTACAAG GAAATCTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGG ATACGCAGGATACATCGACGGAGGAGCAA GCCAGGAAGAATTCTACAAGTTCATCAAG CCGATCCTGGAAAAGATGGACGGAACAGA AGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGAAG ACCTGCTGAGAAAGCAGAGAACATTCGAC AACGGAAGCATCCCGCACCAGATCCACCT GGGAGAACTGCACGCAATCCTGAGAAGAC AGGAAGACTTCTACCCGTTCTGAAGGAC AACAGAGAAAAGATCGAAAAGATCCTGAC ATTCAGAATCCCGTACTACGTTCGGACCGCT GGCAAGAGGAAACAGCAGATTCGCATGGA TGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAATCACA CCGTGGAACTTCGAAGAAGTCGTTCGACAA GGGAGCAAGCGCACAGAGCTTCATCGAAA GAATGACAAACTTCGACAAGAACCTGCCG AACGAAAAGGTCCTGCCGAAGCACAGCCT GCTGTACGAATACTTCACAGTCTACAACGA ACTGACAAAGGTCAAGTACGTTCACAGAAG GAATGAGAAAGCCGGCATTCTGAGCGGA GAACAGAAGAAGGCAATCGTCGACCTGCT GTTCAAGACAAACAGAAAGGTCACAGTCA AGCAGCTGAAGGAAGACTACTTCAAGAAG ATCGAATGCTTCGACAGCGTCGAAATCAG CGGAGTCGAAGACAGATTCAACGCAAGCC TGGAACATAACCACGACCTGCTGAAGATC ATCAAGGACAAGGACTTCCTGGACAACGA AGAAAACGAAGACATCCTGGAAGACATCG TCCTGACACTGACACTGTTCTGAAGACAGA
--	--	---

		GAAATGATCGAAGAAAGACTGAAGACATA CGCACACCTGTTCGACGACAAGGTCATGA AGCAGCTGAAGAGAAGAAGATACACAGG ATGGGGAAGACTGAGCAGAAAGCTGATCA ACGGAATCAGAGACAAGCAGAGCGGAAA GACAATCCTGGACTTCCTGAAGAGCGACG GATTCGCAAACAGAACTTCATGCAGCTG ATCCACGACGACAGCCTGACATTCAAGGA AGACATCCAGAAGGCACAGGTCAGCGGAC AGGGAGACAGCCTGCACGAACACATCGCA AACCTGGCAGGAAGCCCGGCAATCAAGAA GGGAATCCTGCAGACAGTCAAGGTCGTCG ACGAACTGGTCAAGGTCATGGGAAGACAC AAGCCGGAAAACATCGTCATCGAAATGGC AAGAGAAAACCAGACAACACAGAAGGGA CAGAAGAACAGCAGAGAAAGAATGAAGA GAATCGAAGAAGGAATCAAGGAACTGGGA AGCCAGATCCTGAAGGAACACCCGGTTCGA AAACACACAGCTGCAGAACGAAAAGCTGT ACCTGTACTACCTGCAGAACGGAAGAGAC ATGTACGTCGACCAGGAACTGGACATCAA CAGACTGAGCGACTACGACGTCGACCACA TCGTCCCGCAGAGCTTCCTGAAGGACGAC AGCATCGACAACAAGGTCCTGACAAGAAG CGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAAC GTCCCGAGCGAAGAAGTCGTCAAGAAGAT GAAGAACTACTGGAGACAGCTGCTGAACG CAAAGCTGATCACACAGAGAAAGTTCGAC AACCTGACAAAGGCAGAGAGAGGAGGACT GAGCGAACTGGACAAGGCAGGATTCATCA AGAGACAGCTGGTCGAAACAAGACAGATC ACAAAGCACGTCGCACAGATCCTGGACAG CAGAATGAACACAAAGTACGACGAAAACG ACAAGCTGATCAGAGAAGTCAAGGTCATC ACACTGAAGAGCAAGCTGGTCAGCGACTT
--	--	--

	CAGAAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGTCA GAGAAATCAACAACACTACCACCACGCACAC GACGCATACCTGAACGCAGTCGTCGGAAC AGCACTGATCAAGAAGTACCCGAAGCTGG AAAGCGAATTCGTCTACGGAGACTACAAG GTCTACGACGTCAGAAAGATGATCGCAA GAGCGAACAGGAAATCGGAAAGGCAACA GCAAAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATG AACTTCTTCAAGACAGAAATCACACTGGC AAACGGAGAAATCAGAAAGAGACCGCTGA TCGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAATC GTCTGGGACAAGGGAAGAGACTTCGCAAC AGTCAGAAAGGTCCTGAGCATGCCGCAGG TCAACATCGTCAAGAAGACAGAAGTCCAG ACAGGAGGATTCAGCAAGGAAAGCATCCT GCCGAAGAGAAACAGCGACAAGCTGATCG CAAGAAAGAAGGACTGGGACCCGAAGAA GTACGGAGGATTCGACAGCCCGACAGTCG CATACAGCGTCCTGGTCGTCGCAAAGGTC GAAAAGGGAAAGAGCAAGAAGCTGAAGA GCGTCAAGGAACTGCTGGGAATCACAATC ATGGAAAGAAGCAGCTTCGAAAAGAACCC GATCGACTTCCTGGAAGCAAAGGGATACA AGGAAGTCAAGAAGGACCTGATCATCAAG CTGCCGAAGTACAGCCTGTTCGAACTGGA AAACGGAAGAAAGAGAATGCTGGCAAGC GCAGGAGAAGTGCAGAAGGGAAACGAACT GGCACTGCCGAGCAAGTACGTCAACTTCT GTACCTGGCAAGCCACTACGAAAAGCTGA AGGGAAGCCCGGAAGACAACGAACAGAA GCAGCTGTTCGTGCAACAGCACAAGCACT ACCTGGACGAAATCATCGAACAGATCAGC GAATTCAGCAAGAGAGTCATCCTGGCAGA CGCAAACCTGGACAAGGTCCTGAGCGCAT ACAACAAGCACAGAGACAAGCCGATCAGA
--	--

		<p>GAACAGGCAGAAAACATCATCCACCTGTT  CACACTGACAAACCTGGGAGCACCGGCAG  CATTCAAGTACTTCGACACAACAATCGAC  AGAAAGAGATACACAAGCACAAAGGAAG  TCCTGGACGCAACACTGATCCACCAGAGC  ATCACAGGACTGTACGAAACAAGAATCGA  CCTGAGCCAGCTGGGAGGAGACGGAGGAG  GAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGTCTA  G</p>
859	ORF, кодирующая Sp. Cas9	<p>ATGGACAAGAAGTACTCCATCGGCCTGGA  CATCGGCACCAACTCCGTGGGCTGGGCCG  TGATCACCGACGAGTACAAGGTGCCCTCC  AAGAAGTTCAAGGTGCTGGGCAACACCGA  CCGGCACTCCATCAAGAAGAACCTGATCG  GCGCCCTGCTGTTCGACTCCGGCGAGACCG  CCGAGGCCACCCGGCTGAAGCGGACCGCC  CGGCGGCGGTACACCCGGCGGAAGAACCG  GATCTGCTACCTGCAGGAGATCTTCTCAA  CGAGATGGCCAAGGTGGACGACTCCTTCTT  CCACCGGCTGGAGGAGTCCTTCTGGTGG  AGGAGGACAAGAAGCACGAGCGGCACCCC  ATCTTCGGCAACATCGTGGACGAGGTGGC  CTACCACGAGAAGTACCCACCATCTACC  ACCTGCGGAAGAAGCTGGTGGACTCCACC  GACAAGGCCGACCTGCGGCTGATCTACCT  GGCCCTGGCCCACATGATCAAGTTCGGG  GCCACTTCTGATCGAGGGCGACCTGAAC  CCCGACAACCTCCGACGTGGACAAGCTGTT  CATCCAGCTGGTGCAGACCTACAACCAGC  TGTTTCGAGGAGAACCCCATCAACGCCTCC  GGCGTGGACGCCAAGGCCATCCTGTCCGC  CCGGCTGTCCAAGTCCCGGCGGCTGGAGA  ACCTGATCGCCCAGCTGCCCGGCGAGAAG  AAGAACGGCCTGTTCGGCAACCTGATCGC  CCTGTCCCTGGGCCTGACCCCAACTCAA</p>

		GTCCAACCTTCGACCTGGCCGAGGACGCCA AGCTGCAGCTGTCCAAGGACACCTACGAC GACGACCTGGACAACCTGCTGGCCCAGAT CGGCGACCAGTACGCCGACCTGTTCCCTGGC CGCCAAGAACCTGTCCGACGCCATCCTGCT GTCCGACATCCTGCGGGTGAACACCGAGA TCACCAAGGCCCCCTGTCCGCCTCCATGA TCAAGCGGTACGACGAGCACCACCAGGAC CTGACCCTGCTGAAGGCCCTGGTGCGGCA GCAGCTGCCCCGAGAAGTACAAGGAGATCT TCTTCGACCAGTCCAAGAACGGCTACGCC GGCTACATCGACGGCGGCCTCCCAGGA GGAGTTCTACAAGTTCATCAAGCCCATCCT GGAGAAGATGGACGGCACCGAGGAGCTGC TGGTGAAGCTGAACCGGGAGGACCTGCTG CGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCTC CATCCCCACCAGATCCACCTGGGCGAGCT GCACGCCATCCTGCGGGCGGCAGGAGGACT TCTACCCCTTCCTGAAGGACAACCGGGAG AAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCCGGAT CCCCTACTACGTGGGCCCCCTGGCCCGGGG CAACTCCCGGTTTCGCCTGGATGACCCGGA AGTCCGAGGAGACCATCACCCCTGGAAC TTCGAGGAGGTGGTGGACAAGGGCGCCTC CGCCCAGTCCTTCATCGAGCGGATGACCA ACTTCGACAAGAACCTGCCCAACGAGAAG GTGCTGCCCAAGCACTCCCTGCTGTACGAG TACTTCACCGTGTACAACGAGCTGACCAA GGTGAAGTACGTGACCGAGGGCATGCGGA AGCCCGCCTTCCTGTCCGGCGAGCAGAAG AAGGCCATCGTGGACCTGCTGTTCAAGAC CAACCGGAAGGTGACCGTGAAGCAGCTGA AGGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAGTGC TTCGACTCCGTGGAGATCTCCGGCGTGGAG GACCGGTTCAACGCCTCCCTGGGCACCTAC
--	--	--

CACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAA  
GGACTTCCTGGACAACGAGGAGAACGAGG  
ACATCCTGGAGGACATCGTGCTGACCCTG  
ACCCTGTTTCGAGGACCGGGAGATGATCGA  
GGAGCGGCTGAAGACCTACGCCACCTGT  
TCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCTGAAG  
CGGCGGCGGTACACCGGCTGGGGCCGGCT  
GTCCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGG  
ACAAGCAGTCCGGCAAGACCATCCTGGAC  
TTCCTGAAGTCCGACGGCTTCGCCAACCGG  
AACTTCATGCAGCTGATCCACGACGACTCC  
CTGACCTTCAAGGAGGACATCCAGAAGGC  
CCAGGTGTCCGGCCAGGGCGACTCCCTGC  
ACGAGCACATCGCCAACCTGGCCGGCTCC  
CCCGCCATCAAGAAGGGCATCCTGCAGAC  
CGTGAAGGTGGTGGACGAGCTGGTGAAGG  
TGATGGGCCGGCACAAGCCCGAGAACATC  
GTGATCGAGATGGCCCGGGAGAACCAGAC  
CACCCAGAAGGGCCAGAAGAACTCCCGGG  
AGCGGATGAAGCGGATCGAGGAGGGCATC  
AAGGAGCTGGGCTCCCAGATCCTGAAGGA  
GCACCCCGTGGAGAACACCCAGCTGCAGA  
ACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAG  
AACGGCCGGGACATGTACGTGGACCAGGA  
GCTGGACATCAACCGGCTGTCCGACTACG  
ACGTGGACCACATCGTGCCCCAGTCCTTCC  
TGAAGGACGACTCCATCGACAACAAGGTG  
CTGACCCGGTCCGACAAGAACCAGGGGCAA  
GTCCGACAACGTGCCCTCCGAGGAGGTGG  
TGAAGAAGATGAAGA ACTACTGGCGGCAG  
CTGCTGAACGCCAAGCTGATCACCCAGCG  
GAAGTTCGACAACCTGACCAAGGCCGAGC  
GGGGCGGCCTGTCCGAGCTGGACAAGGCC  
GGCTTCATCAAGCGGCAGCTGGTGGAGAC  
CCGGCAGATCACCAAGCACGTGGCCCAAGA

	TCCTGGACTCCCGGATGAACACCAAGTAC GACGAGAACGACAAGCTGATCCGGGAGGT GAAGGTGATCACCTGAAGTCCAAGCTGG TGTCCGACTTCCGGAAGGACTTCCAGTTCT ACAAGGTGCGGGAGATCAACAACCTACCAC CACGCCACGACGCCTACCTGAACGCCGT GGTGGGCACCGCCCTGATCAAGAAGTACC CCAAGCTGGAGTCCGAGTTCGTGTACGGC GACTACAAGGTGTACGACGTGCGGAAGAT GATCGCCAAGTCCGAGCAGGAGATCGGCA AGGCCACCGCCAAGTACTTCTTCTACTCCA ACATCATGAACTTCTTCAAGACCGAGATCA CCCTGGCCAACGGCGAGATCCGGAAGCGG CCCCTGATCGAGACCAACGGCGAGACCGG CGAGATCGTGTGGGACAAGGGCCGGGACT TCGCCACCGTGCGGAAGGTGCTGTCCATGC CCCAGGTGAACATCGTGAAGAAGACCGAG GTGCAGACCGGCGGCTTCTCCAAGGAGTC CATCCTGCCCAAGCGGAACTCCGACAAGC TGATCGCCCGGAAGAAGGACTGGGACCCC AAGAAGTACGGCGGCTTCGACTCCCCAC CGTGGCCTACTCCGTGCTGGTGGTGGCCAA GGTGGAGAAGGGCAAGTCCAAGAAGCTGA AGTCCGTGAAGGAGCTGCTGGGCATCACC ATCATGGAGCGGTCCTCCTTCGAGAAGAA CCCCATCGACTTCCTGGAGGCCAAGGGCT ACAAGGAGGTGAAGAAGGACCTGATCATC AAGCTGCCCAAGTACTCCCTGTTCGAGCTG GAGAACGGCCGGAAGCGGATGCTGGCCTC CGCCGGCGAGCTGCAGAAGGGCAACGAGC TGGCCCTGCCCTCCAAGTACGTGAACTTCC TGTACCTGGCCTCCCACTACGAGAAGCTGA AGGGCTCCCCGAGGACAACGAGCAGAAG CAGCTGTTCGTGGAGCAGCACAAGCACTA CCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCTCCG
--	--

		<p>AGTTCTCCAAGCGGGTGATCCTGGCCGAC  GCCAACCTGGACAAGGTGCTGTCCGCCTA  CAACAAGCACCGGGACAAGCCCATCCGGG  AGCAGGCCGAGAACATCATCCACCTGTTC  ACCCTGACCAACCTGGGCGCCCCGCCGC  CTTCAAGTACTTCGACACCACCATCGACCG  GAAGCGGTACACCTCCACCAAGGAGGTGC  TGGACGCCACCCTGATCCACCAGTCCATCA  CCGGCCTGTACGAGACCCGGATCGACCTG  TCCCAGCTGGGCGGGGACGGCGGGCGGCTC  CCCCAAGAAGAAGCGGAAGGTGTGA</p>
860	ORF, кодирующая Sp. Cas9	<p>AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGCCUGG  ACAUCGGCACGAACAGCGUUGGCUGGGC  UGUGAUCACGGACGAGUACAAGGUUCCC  UCAAAGAAGUUCAAGGUGCUGGGCAACA  CGGACCGGCACAGCAUCAAGAAGAAUCUC  AUCGGUGCACUGCUGUUCGACAGCGGUG  AGACGGCCGAAGCCACGCGGCUGAAGCGG  ACGGCCCGCCGGCGGUACACGCGGCGGAA  GAACCGGAUCUGCUACCUGCAGGAGAUC  UUCAGCAACGAGAUGGCCAAGGUGGACG  ACAGCUUCUCCACCGGCUGGAGGAGAGC  UUCUGGUGGAGGAGGACAAGAAGCACG  AGCGGCACCCCAUCUUCGGCAACAUCGUG  GACGAAGUCGCCUACCACGAGAAGUACCC  CACCAUCUACCACCGCGGAAGAAGCUGG  UGGACUCGACUGACAAGGCCGACCUGCGG  CUGAUCUACCUGGCACUGGCCCAUGAU  AAAGUUCGGGGCCACUUCUGAUCGAG  GGCGACCUGAACCCUGACAACAGCGACGU  GGACAAGCUGUUCAUCCAGCUGGUGCAG  ACCUACAACCAGCUGUUCGAGGAGAACCC  CAUCAACGCCAGCGGGCGUGGACGCCAAGG  CCAUCCUCAGCGCCCGCCUCAGCAAGAGC  CGGCGGCUGGAGAAUCUCAUCGCCAGCU</p>

UCCAGGUGAGAAGAAGAAUGGGCUGUUC  
GGCAAUCUCAUCGCACUCAGCCUGGGCCU  
GACUCCCAACUUCAAGAGCAACUUCGACC  
UGGCCGAGGACGCCAAGCUGCAGCUCAGC  
AAGGACACCUACGACGACGACCUGGACAA  
UCUCCUGGCCCAGAUCGGCGACCAGUACG  
CCGACCUGUUCCUGGCUGCCAAGAAUCUC  
AGCGACGCCAUCCUGCUCAGCGACAUCU  
GCGGGUGAACACAGAGAUCACGAAGGCC  
CCCCUCAGCGCCAGCAUGAUAAAGCGGUA  
CGACGAGCACCACCAGGACCUGACGCUGC  
UGAAGGCACUGGUGCGGCAGCAGCUUCC  
AGAGAAGUACAAGGAGAUCUUCUUCGAC  
CAGAGCAAGAAUGGGUACGCCGGGUACA  
UCGACGGUGGUGCCAGCCAGGAGGAGUU  
CUACAAGUUCAUCAAGCCCAUCCUGGAGA  
AGAUGGACGGCACAGAGGAGCUGCUGGU  
GAAGCUGAACAGGGAGGACCUGCUGC GG  
AAGCAGCGGACGUUCGACAAUGGGAGCA  
UCCCCACCAGAUCACCUGGGUGAGCUG  
CACGCCAUCCUGCGGGCGGCAGGAGGACUU  
CUACCCCUUCCUGAAGGACAACAGGGAGA  
AGAUCGAGAAGAUCUGACGUUCCGGAU  
CCCUACUACGUUGGCCCCUGGCCCGCG  
GCAACAGCCGGUUCGCCUGGAUGACGCGG  
AAGAGCGAGGAGACGAUCACUCCUGGA  
ACUUCGAGGAAGUCGUGGACAAGGGUGC  
CAGCGCCCAGAGCUUCAUCGAGCGGAUGA  
CGAACUUCGACAAGAAUCUCCAAACGA  
GAAGGUGCUUCCAAAGCACAGCCUGCUG  
UACGAGUACUUCACGGUGUACAACGAGC  
UGACGAAGGUGAAGUACGUGACAGAGGG  
CAUGC GGAAGCCCGCCUCCUCAGCGGUG  
AGCAGAAGAAGGCCAUCGUGGACCUGCU  
GUUCAAGACGAACCGGAAGGUGACGGUG

AAGCAGCUGAAGGAGGACUACUUCAAGA  
AGAUCGAGUGCUUCGACAGCGUGGAGAU  
CAGCGGCGUGGAGGACCGGUUCAACGCCA  
GCCUGGGCACCUACCACGACCUGCUGAAG  
AUCAUCAAGGACAAGGACUUCCUGGACA  
ACGAGGAGAACGAGGACAUCCUGGAGGA  
CAUCGUGCUGACGCUGACGCUGUUCGAG  
GACAGGGAGAUGAUAGAGGAGCGGCUGA  
AGACCUACGCCACCUGUUCGACGACAAG  
GUGAUGAAGCAGCUGAAGCGGCGGCGGU  
ACACGGGCUGGGGCGGCUCAGCCGGAAG  
CUGAUCAAUGGGAUCCGAGACAAGCAGA  
GCGGCAAGACGAUCCUGGACUUCUGAA  
GAGCGACGGCUUCGCCAACCGGAACUUCA  
UGCAGCUGAUCCACGACGACAGCCUGACG  
UUCAAGGAGGACAUCCAGAAGGCCAGG  
UCAGCGGCCAGGGCGACAGCCUGCACGAG  
CACAUCCGCAAUUCUCGCCGGGAGCCCCGC  
CAUCAAGAAGGGGAUCCUGCAGACGGUG  
AAGGUGGUGGACGAGCUGGUGAAGGUGA  
UGGGCCGGCACAAGCCAGAGAACAUUCGU  
GAUCGAGAUGGCCAGGGAGAACCAGACG  
ACUCAAAAGGGGCAGAAGAACAGCAGGG  
AGCGGAUGAAGCGGAUCGAGGAGGGCAU  
CAAGGAGCUGGGCAGCCAGAUCUGAAG  
GAGCACCCCGUGGAGAACACUCAACUGCA  
GAACGAGAAGCUGUACCUGUACUACCUG  
CAGAAUGGGCGAGACAUGUACGUGGACC  
AGGAGCUGGACAUCAACCGGCUCAGCGAC  
UACGACGUGGACCACAUCGUUCCCCAGAG  
CUUCCUGAAGGACGACAGCAUCGACAACA  
AGGUGCUGACGCGGAGCGACAAGAACCG  
GGGCAAGAGCGACAACGUUCCUCAGAG  
GAAGUCGUGAAGAAGAUGAAGAACUACU  
GGCGGCAGCUGCUGAACGCCAAGCUGAUC

	ACUCAACGGAAGUUCGACAAUCUCACGA AGGCCGAGCGGGGUGGCCUCAGCGAGCU GGACAAGGCCGGGUUCAUCAAGCGGCAG CUGGUGGAGACGCGGCAGAUACGAAGC ACGUGGCCCAGAUCCUGGACAGCCGGAUG AACACGAAGUACGACGAGAACGACAAGC UGAUCAGGGAAGUCAAGGUGAUCACGCU GAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUCGG AAGGACUUCAGUUCUACAAGGUGAGGG AGAUCAACAACUACCACCACGCCACGAC GCCUACCUGAACGCUGUGGUUGGCACGGC ACUGAUCAAGAAGUACCCCAAGCUGGAG AGCGAGUUCGUGUACGGCGACUACAAGG UGUACGACGUGCGGAAGAUGAUAGCCAA GAGCGAGCAGGAGAUCCGGCAAGGCCACG GCCAAGUACUUCUUCUACAGCAACAUCAU GAACUUCUUCAAGACAGAGAUCACGCUG GCCAAUGGUGAGAUCGGGAAGCGGCCCU GAUCGAGACGAAUGGUGAGACGGGUGAG AUCGUGUGGGACAAGGGGCGAGACUUCG CCACGGUGCGGAAGGUGCUCAGCAUGCCC CAGGUGAACAUCGUGAAGAAGACAGAAG UCCAGACGGGUGGCUUCAGCAAGGAGAG CAUCCUCCAAAGCGGAACAGCGACAAGC UGAUCGCCCGCAAGAAGGACUGGGACCCC AAGAAGUACGGUGGCUUCGACAGCCCCAC CGUGGCCUACAGCGUGCUGGUGGUGGCC AAGGUGGAGAAGGGGAAGAGCAAGAAGC UGAAGAGCGUGAAGGAGCUGCUGGGCAU CACGAUCAUGGAGCGGAGCAGCUUCGAG AAGAACCCCAUCGACUUCUGGAAGCCAA GGGGUACAAGGAAGUCAAGAAGGACCUG AUCAUCAAGCUUCCAAAGUACAGCCUGU UCGAGCUGGAGAAUGGGCGGAAGCGGAU GCUGGCCAGCGCCGGUGAGCUGCAGAAG
--	--

		<p>GGGAACGAGCUGGCACUUCCCUCAAAGU  ACGUGAACUUCCUGUACCUGGCCAGCCAC  UACGAGAAGCUGAAGGGGAGCCCAGAGG  ACAACGAGCAGAAGCAGCUGUUCGUGGA  GCAGCACAAGCACUACCUGGACGAGAUCA  UCGAGCAGAUCAGCGAGUUCAGCAAGCG  GGUGAUCCUGGCCGACGCCAAUCUCGACA  AGGUGCUCAGCGCCUACAACAAGCACCGA  GACAAGCCCAUCAGGGAGCAGGCCGAGA  ACAUCAUCCACCUGUUCACGCUGACGAAU  CUCGGUGCCCCCGCUGCCUUCAAGUACU  CGACACGACGAUCGACCGGAAGCGGUACA  CGUCGACUAAGGAAGUCCUGGACGCCACG  CUGAUCCACCAGAGCAUCACGGGCCUGUA  CGAGACGCGGAUCGACCUCAGCCAGCUGG  GUGGCGACGGUGGUGGCAGCCCCAAGAA  GAAGCGGAAGGUGUAG</p>
861	ORF, кодирующая Sp. Cas9	<p>AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGCCUCG  ACAUCGGCACCAACAGCGUCGGCUGGGCC  GUCAUCACCGACGAGUACAAGGUCCCCAG  CAAGAAGUUCAAGGUCCUCGGCAACACCG  ACCGCCACAGCAUCAAGAAGAACCUCAUC  GGCGCCCUCCUCUUCGACAGCGGCGAGAC  CGCCGAGGCCACCCGCCUCAAGCGCACCG  CCCGCCGCCGCUACACCCGCCGCAAGAAC  CGCAUCUGCUACCUCAGGAGAUUCUUCAG  CAACGAGAUGGCCAAGGUCGACGACAGC  UUCUUCACCGCCUCGAGGAGAGCUUCCU  CGUCGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGC  CACCCCAUCUUCGGCAACAUCGUCGACGA  GGUCGCCUACCACGAGAAGUACCCACCA  UCUACCACCUCCGCAAGAAGCUCGUCGAC  AGCACCGACAAGGCCGACCUCCGCCUCAU  CUACCUCGCCCUCGCCACAUGAUCAAGU  UCCGCGGCCACUCCUCAUCGAGGGCGAC</p>

CUCAACCCCGACAACAGCGACGUCGACAA  
GCUCUUCAUCCAGCUCGUCCAGACCUACA  
ACCAGCUCUUCGAGGAGAACCCCAUCAAC  
GCCAGCGGCGUCGACGCCAAGGCCAUCCU  
CAGCGCCCGCCUCAGCAAGAGCCGCCGCC  
UCGAGAACCUCAUCGCCAGCUCGCCGGC  
GAGAAGAAGAACGGCCUCUUCGGCAACC  
UCAUCGCCUCAGCCUCGGCCUCACCCCC  
AAUCUUAAGAGCAACUUCGACCUCGCCGA  
GGACGCCAAGCUCAGCUCAGCAAGGACA  
CCUACGACGACGACCUCGACAACCUCUC  
GCCAGAUCCGGCGACCAGUACGCCGACCU  
CUUCCUCGCCGCCAAGAACCUCAGCGACG  
CCAUCCUCCUCAGCGACAUCUCCGCGUC  
AACACCGAGAUACCAAGGCCCCCUUCAG  
CGCCAGCAUGAUAAGCGCUACGACGAGC  
ACCACCAGGACCUCACCCUCCUCAAGGCC  
CUCGUCCGCCAGCAGCUCGCCGAGAAGUA  
CAAGGAGAUCUUCUUCGACCAGAGCAAG  
AACGGCUACGCCGGCUACAUCGACGGCGG  
CGCCAGCCAGGAGGAGUUCUACAAGUUC  
AUCAAGCCAUCCUCGAGAAGAUGGACG  
GCACCGAGGAGCUCUUCGUAAGCUCAAC  
CGCGAGGACCUCUCCGCAAGCAGCGCAC  
CUUCGACAACGGCAGCAUCCCCACCAGA  
UCCACCUCGGCGAGCUCACGCCAUCCUC  
CGCCGCCAGGAGGACUUCUACCCCUUCCU  
CAAGGACAACCGCGAGAAGAUCGAGAAG  
AUCCUCACCUUCCGCAUCCCCUACUACGU  
CGGCCCCUCGCCCGCGGCAACAGCCGCU  
UCGCCUGGAUGACCCGCAAGAGCGAGGA  
GACCAUCACCCCUUGGAACUUCGAGGAGG  
UCGUCGACAAGGGCGCCAGCGCCAGAGC  
UUCAUCGAGCGCAUGACCAACUUCGACAA  
GAACCUCCCCAACGAGAAGGUCCUCCCCA

AGCACAGCCUCCUCUACGAGUACUUCACC  
GUCUACAACGAGCUCACCAAGGUCAAGU  
ACGUCACCGAGGGCAUGCGCAAGCCCGCC  
UCCUCAGCGGGGAGCAGAAGAAGGCCA  
UCGUCGACCUCUCUUAAGACCAACCGC  
AAGGUCACCGUCAAGCAGCUCAAGGAGG  
ACUACUUAAGAAGAUCGAGUGCUUCGA  
CAGCGUCGAGAUCAGCGGGCUCGAGGACC  
GCUUCAACGCCAGCCUCGGCACCUACCAC  
GACCUCUCUAAGAUCAUCAAGGACAAGG  
ACUUCCUCGACAACGAGGAGAACGAGGA  
CAUCCUCGAGGACAUCGUCCUCACCCUCA  
CCCUCUUCGAGGACCGCGAGAUGAUCGAG  
GAGCGCCUCAAGACCUACGCCACCUCUU  
CGACGACAAGGUCAUGAAGCAGCUCAAG  
CGCCGCCGCUACACCGGCUGGGGCCGCCU  
CAGCCGCAAGCUCAUCAACGGCAUCCGCG  
ACAAGCAGAGCGGCAAGACCAUCCUCGAC  
UCCUCAAGAGCGACGGCUUCGCCAACCG  
CAACUUAUGCAGCUCAUCCACGACGACA  
GCCUCACCUUCAAGGAGGACAUCCAGAAG  
GCCAGGUCAGCGGCCAGGGCGACAGCCU  
CCACGAGCACAUCGCCAACCUCCGCCGCA  
GCCCCGCAUCAAGAAGGGCAUCCUCCAG  
ACCGUCAAGGUCGUCGACGAGCUCGUCAA  
GGUCAUGGGCCGCCACAAGCCCGAGAACA  
UCGUCAUCGAGAUGGCCCGCGAGAACCAG  
ACCACCCAGAAGGGCCAGAAGAACAGCCG  
CGAGCGCAUGAAGCGCAUCGAGGAGGGC  
AUCAAGGAGCUCGGCAGCCAGAUCCUCAA  
GGAGCACCCCGUCGAGAACACCCAGCUCC  
AGAACGAGAAGCUCUACCUCUACUACCUC  
CAGAACGGCCGCGACAUGUACGUCGACCA  
GGAGCUCGACAUCAACCGCCUCAGCGACU  
ACGACGUCGACCACAUCGUCCCCCAGAGC

UCCUCAAGGACGACAGCAUCGACAACAA  
GGUCCUCACCCGCAGCGACAAGAACCGCG  
GCAAGAGCGACAACGUCCCCAGCGAGGAG  
GUCGUCAAGAAGAUGAAGAACUACUGGC  
GCCAGCUCCUCAACGCCAAGCUCAUACCC  
CAGCGCAAGUUCGACAACCUCACCAAGGC  
CGAGCGCGGCGGCCUCAGCGAGCUCGACA  
AGGCCGGCUUCAUCAAGCGCCAGCUCGUC  
GAGACCCGCCAGAUACCAAGCACGUCGC  
CCAGAUCCUCGACAGCCGCAUGAACACCA  
AGUACGACGAGAACGACAAGCUCAUCCGC  
GAGGUCAAGGUCAUCACCCUCAAGAGCA  
AGCUCGUCAGCGACUUCGCAAGGACUUC  
CAGUUCUACAAGGUCCGCGAGAUAACA  
ACUACCACCACGCCACGACGCCUACCUC  
AACGCCGUCGUCGGCACCGCCCUCAUCAA  
GAAGUACCCCAAGCUCGAGAGCGAGUUC  
GUCUACGGCGACUACAAGGUUCACGACG  
UCCGCAAGAUGAUCGCCAAGAGCGAGCA  
GGAGAUCCGCAAGGCCACCGCCAAGUACU  
UCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUCUUC  
AAGACCGAGAUACCCUCGCCAACGGCGA  
GAUCCGCAAGCGCCCCUCAUCGAGACCA  
ACGGCGAGACCGGCGAGAUCGUCUGGGA  
CAAGGGCCGCGACUUCGCCACCGUCCGCA  
AGGUCCUCAGCAUGCCCCAGGUCAACAUC  
GUCAAGAAGACCGAGGUCCAGACCGGCG  
GCUUCAGCAAGGAGAGCAUCCUCCCAAG  
CGCAACAGCGACAAGCUCAUCCCGCAA  
GAAGGACUGGGACCCCAAGAAGUACGGC  
GGCUUCGACAGCCCCACCGUCGCCUACAG  
CGUCCUCGUCGUCGCCAAGGUUCGAGAAGG  
GCAAGAGCAAGAAGCUCUAGAGCGUCAA  
GGAGCUCCUCGGCAUCACCAUCAUGGAGC  
GCAGCAGCUUCGAGAAGAACCCCAUCGAC

		<p>UCCUCGAGGCCAAGGGCUACAAGGAGG  UCAAGAAGGACCUCAUCAUCAAGCUCCCC  AAGUACAGCCUCUUCGAGCUCGAGAACG  GCCGCAAGCGCAUGCUCGCCAGCGCCGGC  GAGCUCCAGAAGGGCAACGAGCUCGCCCU  CCCCAGCAAGUACGUCAACUCCUCUACC  UCGCCAGCCACUACGAGAAGCUCAAGGGC  AGCCCCGAGGACAACGAGCAGAAGCAGCU  CUUCGUCGAGCAGCACAAGCACUACCUCG  ACGAGAUCAUCGAGCAGAUCAGCGAGUU  CAGCAAGCGCGUCAUCCUCGCCGACGCCA  ACCUCGACAAGGUCCUCAGCGCCUACAAC  AAGCACCGCGACAAGCCAUCCGCGAGCA  GGCCGAGAACAUCAUCCACCUCUUCACCC  UCACCAACCUCGGCGCCCCCGCCGCCUUC  AAGUACUUCGACACCACCAUCGACCGCAA  GCGCUACACCAGCACCAAGGAGGUCCUCG  ACGCCACCCUCAUCCACCAGAGCAUACC  GGCCUCUACGAGACCCGCAUCGACCUCAG  CCAGCUCGGCGGCGACGGCGGCGGCAGCC  CCAAGAAGAAGCGCAAGGUCUAG</p>
862	Открытая рамка считывания Cas9 с меткой Hibit	<p>AUGGACAAGAAGUACUCCAUCGGCCUGG  ACAUCGGCACCAACUCCGUGGGCUGGGCC  GUGAUCACCGACGAGUACAAGGUGCCCUC  CAAGAAGUUCAAGGUGCUGGGCAACACC  GACCGGCACUCCAUCAAGAAGAACCUGAU  CGGCGCCCUGCUGUUCGACUCCGGCGAGA  CCGCCGAGGCCACCCGGCUGAAGCGGACC  GCCCGGCGGCGGUACACCCGGCGGAAGAA  CCGGAUCUGCUACCUGCAGGAGAUCUUCU  CCAACGAGAUGGCCAAGGUGGACGACUCC  UUCUUCACCGGCUGGAGGAGUCCUUCU  GGUGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGG  CACCCCAUCUUCGGCAACAUCGUGGACGA  GGUGGCCUACCACGAGAAGUACCCACCA</p>

UCUACCACCUGCGGAAGAAGCUGGUGGA  
CUCCACCGACAAGGCCGACCUGCGGCUGA  
UCUACCUGGCCCUUGGCCACAUGAUC AAG  
UCCGGGGCCACU UCCUGAUCGAGGGCGA  
CCUGAACCCCGACAACUCCGACGUGGACA  
AGCUGUUCAUCCAGCUGGUGCAGACCUAC  
AACCAGCUGUUCGAGGAGAACCCCAUCAA  
CGCCUCCGGCGUGGACGCCAAGGCCAUCC  
UGUCCGCCC GGCUGUCCAAGUCCCGGCGG  
CUGGAGAACCUGAUCGCCCAGCUGCCCGG  
CGAGAAGAAGAACGGCCUGUUCGGCAAC  
CUGAUCGCCCUUGUCCCUUGGGCCUGACCCC  
CAACUUCAAGUCCAACUUCGACCUGGCCG  
AGGACGCCAAGCUGCAGCUGUCCAAGGAC  
ACCUACGACGACGACCUGGACAACCUGCU  
GGCCCAGAUCGGCGACCAGUACGCCGACC  
UGU UCCUGGCCGCCAAGAACCUGUCCGAC  
GCCAUCCUGCUGUCCGACA UCCUGCGGGU  
GAACACCGAGAUCACCAAGGCCCCCCUGU  
CCGCCUCCAUGAUCAAGCGGUACGACGAG  
CACCACCAGGACCUGACCCUGCUGAAGGC  
CCUGGUGCGGCAGCAGCUGCCCGAGAAGU  
ACAAGGAGAUUCUUCUUCGACCAGUCCAA  
GAACGGCUACGCCGGCUACAUCGACGGCG  
GCGCCUCCAGGAGGAGUUCUACAAGUUC  
AUCAAGCCCAUCCUGGAGAAGAUGGACG  
GCACCGAGGAGCUGCUGGUGAAGCUGAA  
CCGGGAGGACCUGCUGCGGAAGCAGCGG  
ACCUUCGACAACGGCUCCA UCCCCACCA  
GAUCCACCUGGGCGAGCUGCACGCCAUCC  
UGC GGCGGCAGGAGGACUUCUACCCCUUC  
CUGAAGGACAACCGGGAGAAGAUCGAGA  
AGA UCCUGACCUCCGGAUCCCUACUAC  
GUGGGCCCCUGGCCCGGGGCAACUCCCG  
GUUCGCCUGGAUGACCCGGAAGUCCGAG

GAGACCAUCACCCCCUGGAACUUCGAGGA  
GGUGGUGGACAAGGGCGCCUCCGCCAGU  
CCUUCAUCGAGCGGAUGACCAACUUCGAC  
AAGAACCUGCCCAACGAGAAGGUGCUGCC  
CAAGCACUCCCUGCUGUACGAGUACUUCA  
CCGUGUACAACGAGCUGACCAAGGUGAA  
GUACGUGACCGAGGGCAUGC GGAAGCCC  
GCCUUCCUGUCCGGCGAGCAGAAGAAGGC  
CAUCGUGGACCUGCUGUUCAAGACCAACC  
GGAAGGUGACCGUGAAGCAGCUGAAGGA  
GGACUACUUCAAGAAGAUCGAGUGCUUC  
GACUCCGUGGAGAUCUCCGGCGUGGAGG  
ACCGGUUCAACGCCUCCCUGGGCACCUAC  
CACGACCUGCUGAAGAUCAUCAAGGACA  
AGGACUUCCUGGACAACGAGGAGAACGA  
GGACAUCCUGGAGGACAUCGUGCUGACCC  
UGACCCUGUUCGAGGACCGGGAGAUGAU  
CGAGGAGCGGCUGAAGACCUACGCCACC  
UGUUCGACGACAAGGUGAUGAAGCAGCU  
GAAGCGGCGGC GGUACACCGGCUGGGGCC  
GGCUGUCCC GGAAGCUGAUAACGGCAUC  
CGGGACAAGCAGUCCGGCAAGACCAUCCU  
GGACUUCCUGAAGUCCGACGGCUUCGCCA  
ACCGGAACUUCAUGCAGCUGAUCCACGAC  
GACUCCCUGACCUUCAAGGAGGACAUCCA  
GAAGGCCCAGGUGUCCGGCCAGGGCGACU  
CCCUGCACGAGCACAU CGCCAACCUGGCC  
GGCUCCCCCGCCAUCAAGAAGGGCAUCCU  
GCAGACCGUGAAGGUGGUGGACGAGCUG  
GUGAAGGUGAUGGGCCGGCACAAGCCCG  
AGAACAUCGUGAUCGAGAUGGCCCGGGA  
GAACCAGACCACCAGAAGGGCCAGAAGA  
ACUCCC GGGAGCGGAUGAAGCGGAUCGA  
GGAGGGCAUCAAGGAGCUGGGCUCCCAG  
AUCCUGAAGGAGCACCCCGUGGAGAACAC

CCAGCUGCAGAACGAGAAGCUGUACCUG  
UACUACCUGCAGAACGGCCGGGACAUGU  
ACGUGGACCAGGAGCUGGACAUCAACCG  
GCUGUCCGACUACGACGUGGACCACAUCG  
UGCCCCAGUCCUUCCUGAAGGACGACUCC  
AUCGACAACAAGGUGCUGACCCGGUCCGA  
CAAGAACCGGGGCAAGUCCGACAACGUGC  
CCUCCGAGGAGGUGGUGAAGAAGAUGAA  
GAACUACUGGCGGCAGCUGCUGAACGCCA  
AGCUGAUCACCCAGCGGAAGUUCGACAAC  
CUGACCAAGGCCGAGCGGGGCGGCCUGUC  
CGAGCUGGACAAGGCCGGCUUCAUCAAGC  
GGCAGCUGGUGGAGACCCGGCAGAUACC  
AAGCACGUGGCCAGAUCCUGGACUCCCG  
GAUGAACACCAAGUACGACGAGAACGAC  
AAGCUGAUCCGGGAGGUGAAGGUGAUCA  
CCCUGAAGUCCAAGCUGGUGUCCGACUUC  
CGGAAGGACUUCCAGUUCUACAAGGUGC  
GGGAGAUCAACAACUACCACCACGCCAC  
GACGCCUACCUGAACGCCGUGGUGGGCAC  
CGCCUGAUCAAGAAGUACCCCAAGCUGG  
AGUCCGAGUUCGUGUACGGCGACUACAA  
GGUGUACGACGUGCGGAAGAUGAUCGCC  
AAGUCCGAGCAGGAGAUCCGCAAGGCCA  
CCGCCAAGUACUUCUUCUACUCCAACAUC  
AUGAACUUCUUCAAGACCGAGAUCACCCU  
GGCCAACGGCGAGAUCCGGAAGCGGCCCC  
UGAUCGAGACCAACGGCGAGACCGGCGA  
GAUCGUGUGGGACAAGGGCCGGGACUUC  
GCCACCGUGCGGAAGGUGCUGUCCAUGCC  
CCAGGUGAACAUCGUGAAGAAGACCGAG  
GUGCAGACCGGGCGGCUUCUCCAAGGAGUC  
CAUCCUGCCCAAGCGGAACUCCGACAAGC  
UGAUCGCCCAGGAAGAAGGACUGGGACCCC  
AAGAAGUACGGCGGCUUCGACUCCCCAC

		<p>CGUGGCCUACUCCGUGCUGGUGGUGGCCA  AGGUGGAGAAGGGCAAGUCCAAGAAGCU  GAAGUCCGUGAAGGAGCUGCUGGGCAUC  ACCAUCAUGGAGCGGUCCUCCUUCGAGAA  GAACCCCAUCGACUUCCUGGAGGCCAAGG  GCUACAAGGAGGUGAAGAAGGACCUGAU  CAUCAAGCUGCCCAAGUACUCCCUGUUCG  AGCUGGAGAACGGCCGAAGCGGAUGCU  GGCCUCCGCCGGCGAGCUGCAGAAGGGCA  ACGAGCUGGCCCUGCCUCCAAGUACGUG  AACUUCCUGUACCUGGCCUCCACUACGA  GAAGCUGAAGGGCUCCCCGAGGACAACG  AGCAGAAGCAGCUGUUCGUGGAGCAGCA  CAAGCACUACCUGGACGAGAUCAUCGAGC  AGAUCUCCGAGUUCUCCAAGCGGGUGAU  CCUGGCCGACGCCAACCUGGACAAGGUGC  UGUCCGCCUACAACAAGCACCGGGACAAG  CCCAUCCGGGAGCAGGCCGAGAACAUCAU  CCACCUGUUCACCCUGACCAACCUGGGCG  CCCCCGCCGCCUUCAAGUACUUCGACACC  ACCAUCGACCGGAAGCGGUACACCUCCAC  CAAGGAGGUGCUGGACGCCACCCUGAUCC  ACCAGUCCAUCACCGGCCUGUACGAGACC  CGGAUCGACCUGUCCCAGCUGGGCGGCGA  CGGCGGCGGCUCCCCAAGAAGAAGCGGA  AGGUGUCCGAGUCCGCCACCCCGAGUCC  GUGUCCGGCUGGCGGCUGUUCAAGAAGA  UCUCCUGA</p>
863	<p>Аминокислотная  последовательность  Cas9, кодируемая SEQ  ID No. 858-862</p>	<p>MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSK  KFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEA  TRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAK  VDDSFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVD  EVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIY  LALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFI  QLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLS</p>

		KSRRENLI AQLPGEKKNGLFGNLI ALSGLT PNFKSNFDLAEDAKLQLSKD TYDDDLDNLL AQIGDQYADLFLAAKNLS DAILLSDILRVNT EITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQ QLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEF YKFIKPILEKMDGTEELLV KLNREDLLRKQR TFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFY PFLKD NREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMT RKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTN FDKNLPNEKVL PKHSLLEYFTVYNELTKVK YVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRK VTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNA SLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVL TLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQL KRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDF LKSDGFANRNF MQLIHDDSLTFKEDIQKAQV SGQGDSLHEHIANLAGSPA IKKGILQTVKV V DELVKVMGRHKPENIV IEMARENQTTQKGGQ KNSRERMKRIEEGIKELGSQILKEHPVENTQL QNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDY DVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKS DNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKF DNLTKAERGGLSEL DKAGFIKRQLVETRQIT KHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLK SKLVSDFRKDFQFYKVREINNYHHAHDAYL NAVVG TALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVR KMIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEIT LANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFAT VRKVLSMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPK RNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSV LVVAKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERS SF EKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFEL ENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFL YLASHYEKLGSPEDNEQKQLFVEQHKHYL DEIIEQISEFSKR VILADANLDKVLSA YNKHR
--	--	--

		DKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTI DRKRYTSTKEVLDATLIHQSI TGLYETRIDL S QLGGDGGGSPKKKRKV
864	Последовательность аминокислот Cas9 с меткой Hibit	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVP SK KFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEA TRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFS NEMAK VDDSFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVD EVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLR LIY LALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFI QLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLS KSRRENLIAQLPGEKKNGLFGNLI ALSLGLT PNFKSNFDLAEDA KLQLSKD TYDDDLDNLL AQIGDQYADFLAAKNLS DAILLS DILRVNT EITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQ QLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEF YKFIKPILEKMDGTEELLV KLNREDLLRKQR TFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFY PFLKD NREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMT RKSEETTPWNFEEVVDKGAS AQSFIERMTN FDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVK YVTEGMRKPAFLS GEQKKAIVDLLFKTNRK VTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNA SLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVL TLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQL KRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDF LKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQV SGQGDSLHEHIANLAGSPA IKKGILQTVKV V DELVKVMGRHKPENIV IEMARENQTTQKGQ KNSRERMKRIE EGIKELGSQILKEHPVENTQL QNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDY DVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKS DNVPSEEVVKMKKNYWRQLLNAKLITQRKF DNLTKAERGGLSELDKAGFIKRQLVETRQIT KHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLK SKLVSDFRKDFQFYK VREINNYHHAHDAYL

		NAVVG TALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVR KMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEIT LANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFAT VRKVL SMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPK RNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSV LVVAKVEKGKSKKLSVKELLGITIMERS SF EKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIKLPKYSLFEL ENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFL YLASHYEKLGSPEDNEQKQLFVEQHKHYL DEIEQISEFSKRVILADANLDKVL SAYNKHR DKPIREQAENPIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTI DRKRYTSTKEVLDATLIHQ SITGLYETRIDL S QLGGDGGGSPKKKRKVSE SATPESVSGWRL FKKIS
--	--	---

В некоторых вариантах осуществления инсерционная матрица содержит последовательность SERPINA1 SEQ ID NO: 717 (Конструкция 7) или 719 (Конструкция 8). В некоторых вариантах осуществления инсерционная матрица содержит последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере 95, 96, 97, 98, 99% идентичности с SEQ ID NO: 717 (Конструкция 7) или 719 (Конструкция 8). В некоторых вариантах осуществления инсерционная матрица включает использование кодонов не дикого типа, в области (или одной или более областях) последовательности, соответствующей основаниям 409-431, 409-410, 412-431, 415-418, 506-528, 506-525, 519-522, 527-528, 538-560, 538-557, 551-554, 559-560, 957-977, 970-976, 1403-1436, 1403-1425, 1410-1436, 1418-1424, 1423-1435 или любой их комбинации.

#### ПРИМЕРЫ

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

#### **Пример 1. Материалы и способы**

**Секвенирование нового поколения («NGS») и анализ эффективности целевого расщепления.**

Геномную ДНК экстрагировали с использованием коммерческого набора, например Набор для экстракции ДНК Zymo Research (кат. № D3012) в соответствии с протоколом производителя.

Чтобы количественно определить эффективность редактирования в целевом месте генома, было использовано глубокое секвенирование для выявления наличия вставок и делеций, введенных при редактировании генов. Праймеры для ПЦР конструировали вокруг целевого сайта внутри интересующего гена (*например, SERPINA1*) и

амплифицировали интересующую область генома. Схема последовательности праймера была выполнена в соответствии со стандартом в данной области техники.

Дополнительную ПЦР проводили в соответствии с протоколами производителя (Illumina) для добавления химических компонентов для секвенирования. Ампликоны секвенировали на приборе Illumina MiSeq. Считывания выравнивали в отношении эталонного генома человека (например, hg38) после исключения тех, которые имели низкие баллы качества. Полученные файлы, содержащие считывания, сопоставляли с эталонным геномом (файлы BAM), в котором были выбраны считывания, перекрывающие представляющую интерес целевую область, и рассчитывали число считываний дикого типа по сравнению с числом считываний, содержащих вставку или делецию («indel»).

Процент редактирования (например, «эффективность редактирования» или «процент инделов»), используемый в примерах, определяется как общее количество считываний последовательностей со вставками или делециями («инделлы») по отношению к общему количеству считываний последовательностей, включая дикий тип.

#### *Получение липидных наночастиц*

Липидные компоненты растворяли в 100% этаноле в различных молярных соотношениях. Нагрузку РНК (например, мРНК Cas9 и онРНК) растворяли в 25 мМ цитратном буфере, 100 мМ NaCl, pH 5,0, в результате чего концентрация нагрузки РНК составляла приблизительно 0,45 мг/мл.

Сборные композиции липид-нуклеиновых кислот содержали ионизируемый липид А ((9Z,12Z)-3-((4,4-бис(октилокси)бутаноил)окси)-2-(((3-(диэтиламино)пропокси)карбонил)окси) метил)пропилоктадека-9,12-диеноат, также называемый 3-((4,4-бис(октилокси)бутаноил)окси)-2-(((3-(диэтиламино)пропокси)карбонил)окси)метил)пропил (9Z,12Z)-октадека-9,12-диеноат), холестерин, 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DSPC) и 1,2-димиристоил-рац-глицеро-3-метилполиоксиэтиленгликоль 2000 (PEG2k-DMG) в молярном соотношении 50:38:9:3, соответственно. Сборные композиции липид-нуклеиновая кислота были составлены с молярным соотношением амина липида к фосфату РНК (N:P) около 6 и соотношением нРНК к мРНК 1:2 по массе, если не указано иное.

Липидные наночастицы (ЛНЧ) получали с использованием метода перекрестного потока с использованием ударно-струйного смешивания липида в этаноле с двумя объемами растворов РНК и одним объемом воды. Липиды в этаноле смешивали перекрестным смешиванием с двумя объемами раствора РНК. Четвертый поток воды смешивали с выходным потоком перекрестного смешивания черезобразное соединение (см. WO 2016010840, фиг. 2). ЛНЧ выдерживали в течение 1 часа при комнатной температуре (КТ) и дополнительно разбавляли водой (приблизительно 1:1 об./об.). ЛНЧ концентрировали с использованием тангенциальной проточной фильтрации на картридже с плоским листом (Sartorius, 100 кДа MWCO) и заменяли буфер на 50 мМ Трис, 45 мМ NaCl, 5% (мас./об.) сахарозу, pH 7,5 (TSS). Альтернативно, ЛНЧ необязательно концентрировали с применением центрифужного фильтра Amicon 100 кДа, а буфер

заменяли с применением колонок для обессоливания PD-10 (GE) на TSS. Полученную смесь затем фильтровали с применением 0,2 мкм стерильного фильтра. Конечный продукт ЛНЧ хранили при 4°C или -80°C до дальнейшего применения.

#### *ТРАНСКРИПЦИЯ IN VITRO («IVT») мРНК*

Кэпированную и полиаденилированную мРНК, содержащую N1-метилпсевдо-U, получали путем транскрипции *in vitro* с применением матрицы линейаризованной плазмидной ДНК и РНК-полимеразы T7. Плазмидную ДНК, содержащую промотор T7, последовательность для транскрипции и последовательность полиаденилирования, линейаризовали путем инкубации при 37°C в течение 2 часов с XbaI при следующих условиях: 200 нг/мкл плазмиды, 2 Ед/мкл XbaI (NEB) и 1x реакционный буфер. XbaI инактивировали нагреванием реакционной смеси при 65°C в течение 20 мин. Линейаризованную плазмиду очищали от фермента и солей буфера. Реакцию IVT для получения модифицированной мРНК проводили путем инкубации при 37°C в течение 1,5-4 часов в следующих условиях: 50 нг/мкл линейаризованной плазмиды; 2-5 мМ каждого из GTP, ATP, CTP и N1-метилпсевдо-UTP (Trilink); 10-25 мМ ARCA (Trilink); 5 Ед/мкл РНК-полимеразы T7 (NEB); 1 Ед/мкл мышинового ингибитора РНКазы (NEB); 0,004 Ед/мкл неорганической пирофосфатазы *E. coli* (NEB); и 1x реакционный буфер. TURBO ДНКазу (ThermoFisher) добавляли до конечной концентрации 0,01 Ед/мкл и реакционную смесь инкубировали в течение дополнительных 30 минут для удаления матрицы ДНК. мРНК очищали с помощью набора для очистки транскрипции MegaClear (ThermoFisher) или набора RNeasy Maxi (Qiagen) в соответствии с протоколами производителей. Альтернативно, мРНК очищали по протоколу преципитации, за которым в некоторых случаях следовала очистка на основе HPLC. Вкратце, после расщепления ДНКазой мРНК очищают с применением преципитации LiCl, преципитации ацетатом аммония и преципитации ацетатом натрия. В случае мРНК, очищенной HPLC, после преципитации и восстановления LiCl мРНК очищали с помощью RP-IP HPLC (см., например, Kariko, et al. Nucleic Acids Research, 2011, Vol. 39, No. 21 e142). Фракции, выбранные для объединения, объединяли и обессоливали осаждением ацетатом натрия/этанола, как описано выше. В еще одном альтернативном способе мРНК очищали методом преципитации LiCl с последующей дополнительной очисткой фильтрацией с тангенциальным потоком. Концентрации РНК определяли путем измерения поглощения света при 260 нм (Nanodrop), а транскрипты анализировали методом капиллярного электрофореза с помощью Bioanalyzer (Agilent).

мРНК Cas9 *Streptococcus pyogenes* («Spy») получали из плазмидной ДНК, кодирующей открытую рамку считывания в соответствии с SEQ ID NO: 857-864 (см. последовательности в **Таблице 9В**). Когда SEQ ID NO: 857-864 упоминаются ниже в отношении РНК, подразумевается, что Т следует заменить на U (которые представляли собой N1-метилпсевдоуридины, как описано выше). РНК-мессенджеры, применяемые в примерах, включают 5'-кэп и 3'-хвост поли-А, например, до 100 нуклеотидов, и идентифицируются с помощью SEQ ID NO: 858-862 в **Таблице 9В**. Направляющие РНК

синтезировали химическим путем с помощью способов, известных в данной области техники.

#### *Клонирование и подготовка плазмид*

Двунаправленная инсерционная конструкция, фланкированная ITR AAV2, была синтезирована и клонирована в pUC57-Кап коммерческим поставщиком. Полученную конструкцию (P00147) использовали в качестве родительского клонирующего вектора для других векторов. Другие инсерционные конструкции (без ITR) также были коммерчески синтезированы и клонированы в pUC57. Очищенную плазмиду расщепляли ферментом рестрикции BglII (New England BioLabs, кат. № R0144S) и инсерционные конструкции клонировали в родительский вектор. Плазмиду размножали в химически компетентной *E. coli* Stb13<sup>TM</sup> (Thermo Fisher, кат. № C737303).

#### *Получение AAV*

Тройную трансфекцию в клетках HEK293 использовали для упаковки геномов в конструкции, представляющие интерес для продукции AAV8 и AAV-DJ, и полученные векторы очищали как от лизированных клеток, так и от культуральной среды с использованием обычных методов, например, хроматографии или ультрацентрифугирования в градиенте йодиксанола (см., *например*, Lock et al., Hum Gene Ther. 2010 Oct; 21(10):1259-71). Выделенный AAV диализовали в буфере для хранения (PBS с 0,001% Pluronic F68). Титр AAV определяли с помощью кПЦР с использованием праймеров/зондов, расположенных в пределах области ITR.

#### *Доставка ЛНЧ и AAV in vivo*

Мышам в возрасте 6-8 недель вводили как AAV, так и ЛНЧ или носитель (PBS+0,001% Pluronic для носителя AAV, TSS для носителя ЛНЧ) через латеральную хвостовую вену. AAV вводили в объеме 0,1 мл на животное в количествах (векторные геномы/мышь, «вг/мш»), как описано в настоящем документе. ЛНЧ разводили в TSS и вводили в количествах, указанных в данном документе, около 5 мкл/грамм массы тела. Объемы ЛНЧ и AAV смешивают перед введением дозы и вводят дозы одновременно. В различные моменты времени после обработки сыворотку собирали для определенных анализов, как описано ниже.

#### *Анализ ИФА альфа-1-антитрипсина человека (hA1AT)*

Для исследований *in vivo* собирали кровь и отделяли сыворотку, как указано. Общие уровни альфа-1-антитрипсина человека определяли с использованием набора для ИФА для альфа-1-антитрипсина (человека) (Aviva Biosystems, кат. № OKIA00048) в соответствии с протоколом производителя. Уровни hA1AT в сыворотке определяли количественно по стандартной кривой с использованием логистической подгонки по 4 параметрам и выражали в мкг/мл сыворотки.

Понятно, что направляющие последовательности могут включать или не включать нули перед номером направляющей. То есть G000400 - это то же самое, что G400, или с промежуточными числами нулей перед 400.

#### **Пример 2. Редактирование *in vivo* трансгена *hSERPINA1* PIZ.**

Три онРНК были оценены в отношении редактирования посредством образования индела и экспрессии белка альфа-1-антитрипсина (A1AT) из вариантного трансгена hSERPINA1 PIZ. ЛНЧ, протестированные в этом примере, были приготовлены и доставлены мышам, как описано в Примере 1. Каждую из трех онРНК, указанных в Таблице 8, оценивали при четырех уровнях дозы (0,3, 0,1, 0,03 и 0,01 мг/кг) в анализе доза-ответ. Через три недели после введения дозы животных подвергали эвтаназии, собирали ткань печени и кровь для оценки уровня редактирования в печени и уровня экспрессии hA1AT в сыворотке, соответственно. Образование индела определяли с помощью NGS, как описано в Примере 1. Уровни A1AT человека в сыворотке определяли с помощью ИФА (Aviva Biosystems, кат. № OKIA00048), как описано в Примере 1. Результаты редактирования в локусе hSERPINA1 показаны на Фиг. 1 и в Таблице 10. Уровни hA1AT в сыворотке показаны на Фиг. 2А и в Таблице 11. Относительная экспрессия A1AT в сыворотке рассчитывалась в процентах по сравнению с группой TSS и показана на Фиг. 2В и в Таблице 11.

**Таблица 10: Средний процент редактирования в печени мышей**

Группа лечения	Направляющая	Доза мг/кг	Среднее % инделов	SD	Образцы
Группа 1	G000409	0,01	7,0	3,9	4
Группа 2	G000409	0,03	20,2	3,0	4
Группа 3	G000409	0,1	45,3	2,6	4
Группа 4	G000409	0,3	44,3	2,0	4
Группа 5	G000414	0,01	4,1	1,6	4
Группа 6	G000414	0,03	22,7	6,4	4
Группа 7	G000414	0,1	39,2	4,0	4
Группа 8	G000414	0,3	42,2	3,5	4
Группа 9	G000415	0,01	2,4	0,6	4
Группа 10	G000415	0,03	11,1	3,2	4
Группа 11	G000415	0,1	31,2	2,6	4
Группа 12	G000415	0,3	39,4	2,3	4
Группа 13	TSS	-	0,1	0,0	4

**Таблица 11: Уровни hA1AT в сыворотке**

Группа лечения	Направляющая	Доза мг/кг	Среднее мкг/мл A1AT	SD	% A1AT KD	Образцы
Группа 1	G000409	0,01	1647,6	270,2	23,8	4
Группа 2	G000409	0,03	804,4	159,8	62,8	4

Группа 3	G000409	0,1	181,5	35,2	91,6	4
Группа 4	G000409	0,3	14,9	18,2	99,3	4
Группа 5	G000414	0,01	2328,8	247,7	0,0	4
Группа 6	G000414	0,03	1239,7	210,7	42,6	4
Группа 7	G000414	0,1	220,4	48,9	89,8	4
Группа 8	G000414	0,3	47,1	7,8	97,8	4
Группа 9	G000415	0,01	2118,0	186,3	2,0	4
Группа 10	G000415	0,03	1858,9	225,3	14,0	4
Группа 11	G000415	0,1	489,2	140,3	77,4	4
Группа 12	G000415	0,3	156,1	12,6	92,8	4
Группа 13	TSS	-	2161,0	306,1	-	4

**Пример 3. Нецелевой анализ онРНК, нацеленных на SERPINA1 человека.**

Биохимический анализ (см., например, Cameron et al., Nature Methods. 6, 600-606; 2017) использовали для обнаружения потенциальных нецелевых геномных сайтов, расщепляемых Cas9, нацеленной на SERPINA1. Очищенную геномную ДНК (гДНК) из клеток расщепляли *in vitro* сборным рибонуклеопротеином (РНП) Cas9 и онРНК, чтобы индуцировать расщепление ДНК в целевом сайте и потенциальных нецелевых сайтах с гомологией со спейсерной последовательностью онРНК. После расщепления гДНК концы свободных фрагментов гДНК лигировали с адаптерами для облегчения обогащения отредактированных фрагментов и создания библиотеки NGS. Библиотеки NGS были секвенированы и с помощью биоинформатического анализа считывания были проанализированы для определения геномных координат свободных концов ДНК. Места в геноме человека с накоплением считываний затем были помечены как потенциальные нецелевые сайты.

В известных анализах обнаружения нецелевых сайтов, таких как биохимический анализ, примененный выше, обычно восстанавливается большое количество потенциальных нецелевых сайтов по замыслу, чтобы «закинуть широкую сеть» для потенциальных сайтов, которые могут быть валидированы в других контекстах, например, в представляющей интерес первичной клетке. Например, биохимический анализ обычно завышает количество потенциальных нецелевых сайтов, поскольку в анализе применяется очищенная геномная ДНК с высокой молекулярной массой, свободная от клеточной среды, и он зависит от дозы применяемого рибонуклеопротеина Cas9. Соответственно, потенциальные нецелевые сайты, идентифицированные этими анализами, были подтверждены с помощью целевого секвенирования идентифицированных потенциальных нецелевых сайтов.

В одном подходе к целевому секвенированию Cas9 и представляющую интерес онРНК (например, онРНК, имеющую потенциальные нецелевые сайты для оценки) вводили в клетки РНН или РСН. Затем клетки лизировали и использовали праймеры,

фланкирующие потенциальный нецелевой сайт(ы), для создания ампликона для анализа NGS. Идентификация инделов на определенном уровне может использоваться для проверки потенциального нецелевого сайта, тогда как отсутствие инделов, обнаруженных в потенциально нецелевом сайте, может указывать на ложноположительный результат в использованном анализе нецелевого сайта.

С помощью этого анализа направляющие, показывающие целевую активность инделов, тестировали на наличие потенциальных нецелевых сайтов геномного расщепления. Структуры репарации вручную проверяли в локусах со статистически значимыми показателями инделов в нецелевых сайтах расщепления для проверки структур репарации.

Ни для одной из направляющих G000409, G000414 и G000415 не было выявлено подтвержденных нецелевой активности редактирования.

**Пример 4. Проверка инсерционной матрицы SERPINA1 in vitro в первичные гепатоциты мыши.**

Первичные гепатоциты мыши (PMH) (Gibco, Амарилло, Техас, партия № MC837) высевали по 45 000 клеток на лунку в 96-луночные планшеты Bio-Coat от Corning (Corning, NY, кат. № 354407). Через сорок восемь часов после посева ЛНЧ, содержащую онРНК, нацеленную на интрон 1 альбумина мыши, с мРНК Cas9 (соотношение направляющей к мРНК 2:1) оттаивали на льду, также как и AAV, содержащий перечисленные инсерционные плазмиды. ЛНЧ разводили до 1 мг мРНК Cas9/мл в среде William's E с 3% FBS Media (ThermoFisher, Waltham, MA, кат. № A1217601) и вводили 100 мкл/лунку во все экспериментальные лунки, за исключением тех, которые были «без обработки» или получали «только AAV». Препараты AAV разводили в 10 мкл воды/лунку для достижения множественности заражения (MOI) 5e5 для каждой лунки, куда вводили AAV. Клетки инкубировали при 37°C в течение 96 часов.

Через 96 часов среду удаляли, добавляли свежую среду и клетки инкубировали при 37°C. Еще через 96 часов планшеты с клетками извлекали из инкубатора и собирали среду для количественного определения hAAT с помощью ИФА (Aviva Biosystems, Сан-Диего, Калифорния, кат. № OKIA00048). ИФА проводили согласно протоколу производителя. Тем временем оставшиеся клетки использовали для анализа жизнеспособности клеток CellTiter Glo 2.0 (Promega, Madison, WI, кат. № G9241) для количественного определения относительного количества клеток в каждой лунке. Результаты ИФА A1AT нормализовали по значениям Cell Titer Glo для поправки на количество клеток. Результаты показаны на Фиг. 3.

**Пример 5. Вставка hSERPINA1 in vivo в локус mAlbumin мышам, экспрессирующим трансген hSERPINA1 PIZ.**

Вставку in vivo hSERPINA1 в локус mAlbumin оценивали у самцов мышей NSG-PIZ, экспрессирующих вариантный трансген hSERPINA1 PIZ, и у самцов мышей NSG дикого типа для оценки устойчивости экспрессии белка в течение 6 месяцев после вставки. Мыши NSG-PiZ представляют собой трансгенных мышей, несущих





Группа 5	Средне е (мкг/мл)	2180,7	2021,7	2789, 8	2214, 6	1142,8	692,6	674,7	739,5
	SD	179,7	218,6	392,4	850,5	149,8	206,8	132,4	82,6
	Образцы (n)	5	5	5	5	5	5	5	5
Группа 6	Средне е (мкг/мл)	2771,6	2995,5	3321, 0	4755, 7	4217,0	3670,4	3017,7	3590,3
	SD	382,3	342,9	414,5	823,3	531,7	149,1	126,1	443,4
	Образцы (n)	5	5	5	5	5	5	4*	4*

\*одна мышь была найдена умирающей и подвергнута эвтаназии до 21 недели

**Таблица 14. Уровни ферментов печени в сыворотке (AST и ALT)**

Группа	Штамм	AAV	Среднее AST	SD AST	Среднее ALT	SD ALT
1	NSG	Носитель	83,6	47,5	46,6	34,1
2	NSG	Nanoluc	107,0	87,1	61,0	80,0
3	NSG	Конструкция 1	130,6	102,0	44,4	47,2
4	NSG-PiZ	Носитель	100,8	14,4	35,0	11,0
5	NSG-PiZ	Nanoluc	158,4	90,1	38,4	7,3
6	NSG-PiZ	Конструкция 1	225,2	61,9	52,5	12,9

**Пример 6. Вставка *hSERPINA1* in vivo в локус mAlbumin: проверка шаблона**

**AAV**

Тестировали вставку *hSERPINA1* в локус альбумина самцов мыши C57BL с использованием семи двунаправленных конструкций ssAAV. ssAAV и ЛНЧ, протестированные в этом примере, были приготовлены и доставлены мышам, как описано в Примере 1.

Мышам в возрасте 6-8 недель вводили дозу 1 мг/кг (по отношению к содержанию груза общей РНК) ЛНЧ, несущей мРНК Cas9 и онРНК G000666 (нацеленную на альбумин

мышь). Семь ssAAV оценивали при дозе 5e11 вг/мш (Таблица 15). Кровь собирали через одну, две и три недели после введения дозы. Через четыре недели после введения дозы животных подвергали эвтаназии, собирали ткань печени и кровь для оценки уровня редактирования в печени и уровня экспрессии hA1AT в сыворотке, соответственно. Образование индела определялось с помощью NGS. и сыворотку готовили для измерения экспрессии альфа1-антитрипсина человека (hA1AT) в сыворотке с помощью ИФА (Aviva Biosystems, кат. № OKIA00048). Уровни hA1AT в сыворотке показаны на Фиг.5 и в Таблице 16 через одну, две, три и четыре недели после введения дозы.

Таблица 15

Группа лечения	Направляющая (1мг/кг)	ID Конструкции AAV	Доза AAV (вг/мш)
1	G000666	Конструкция 1	5e11
2	G000666	Конструкция 2	5e11
3	G000666	Конструкция 7	5e11
4	G000666	Конструкция 3	5e11
5	G000666	Конструкция 10	5e11
6	G000666	Конструкция 5	5e11
7	G000666	Конструкция 9	5e11

Таблица 16

Группа лечения	ID AAV	Тип данных	Неделя 1	Неделя 2	3 неделя	4 неделя
Группа 1	Конструкция 1	Среднее (мкг/мл)	1589,5	2142,0	2233,5	1607,6
		SD	359,0	252,4	637,4	312,4
		Образцы (n)	5	5	5	5
Группа 2	Конструкция 2	Среднее (мкг/мл)	1202,0	1360,4	2128,4	2494,3
		SD	442,2	486,4	991,6	10,4
		Образцы (n)	5	5	5	2**

Группа 3	Конструкция 7	Среднее (мкг/мл)	1140,0	1518,1	2285,1	1578,2
		SD	320,8	463,9	686,4	531,2
		Образцы (n)	5	5	5	5
Группа 4	Конструкция 3	Среднее (мкг/мл)	1181,6	1463,3	2344,5	1520,8
		SD	136,5	231,4	339,5	352,5
		Образцы (n)	5	5	5	5
Группа 5	Конструкция 10	Среднее (мкг/мл)	859,7	1104,9	1771,1	1078,6
		SD	228,4	173,3	208,6	189,3
		Образцы (n)	5	5	5	5
Группа 6	Конструкция 5	Среднее (мкг/мл)	1795,6	2332,1	3115,9	2291,5
		SD	585,3	811,4	1084,3	639,1
		Образцы (n)	5	5	5	5
Группа 7	Конструкция 9	Среднее (мкг/мл)	851,6	990,6	1508,9	1082,4
		SD	145,5	483,5	341,3	507,5
		Образцы (n)	5	5	4	4

\*\* За день до умерщвления на 4-й неделе 3 мыши были найдены мертвыми и 2 умирающими. Кровь отбирали у 2 умирающих животных и анализировали согласно протоколу.

**Пример 7. Вставка *hSERPINA1 in vivo* в локус *mAlbumin*: доза-ответ**

Тестировали вставку *hSERPINA1* в локус альбумина самцов мыши C57BL с использованием трех двунаправленных конструкций ssAAV тестировали в анализе доза-ответ. ssAAV и ЛНЧ, протестированные в этом примере, были приготовлены и доставлены мышам, как описано в Примере 1.

Мышам в возрасте 6-8 недель вводили дозу 1 мг/кг (относительно содержания груза общей РНК) ЛНЧ, несущей мРНК Cas9 и онРНК G000666 (нацеленную на альбумин мыши). Три ssAAV, полученные из P00450, оценивали при трех дозах: 5e10, 1e11 и 5e11 вг/мш (Таблица 17). Кровь собирали через одну, две, пять, десять и четырнадцать недель после введения дозы и готовили сыворотку для измерения экспрессии альфа1-антитрипсина человека (hA1AT) в сыворотке с помощью ИФА (Aviva Biosystems, кат. № OKIA00048). Уровни hA1AT в сыворотке показаны на Фиг. 6А-6С и в Таблице 18 через одну, две, пять, десять и четырнадцать (в Таблице 18) недель после введения дозы.

**Таблица 17**

Группа лечения	Направляющая (1мг/кг)	ID Конструкции AAV	Доза AAV (вг/мш)
1	G000666	Конструкция 7	5e10
2	G000666	Конструкция 7	1e11
3	G000666	Конструкция 7	5e11
4	G000666	Конструкция 8	5e10
5	G000666	Конструкция 8	1e11
6	G000666	Конструкция 8	5e11
7	G000666	Конструкция 1	5e10
8	G000666	Конструкция 1	1e11
9	G000666	Конструкция 1	5e11

**Таблица 18**

Группа лечения	ID AAV вг/мш	Тип данных	Неделя 1	Неделя 2	5 неделя	10 неделя	14 неделя
Группа 1	Конструкция 7 5e10	Среднее (мкг/мл)	572,0	676,7	934,5	872,6	1264,9
		SD	81,1	152,6	134,6	96,2	201,6

		Образцы (n)	5	5	4*	4*	4*
Группа 2	Конструкция 7 1e11	Среднее (мкг/мл)	952,2	1249,0	1728,3	1547,5	2027,5
		SD	299,7	353,0	493,8	577,1	583,5
		Образцы (n)	5	5	5	5	5
Группа 3	Конструкция 7 5e11	Среднее (мкг/мл)	1848,1	2391,3	3453,1	3056,7	4836,0
		SD	337,9	476,5	592,5	653,7	994,1
		Образцы (n)	5	5	5	5	5
Группа 4	Конструкция 8 5e10	Среднее (мкг/мл)	637,9	689,8	1052,3	983,8	1329,5
		SD	146,6	92,8	244,4	268,0	311,0
		Образцы (n)	5	5	5	5	5
Группа 5	Конструкция 8 1e11	Среднее (мкг/мл)	1132,4	1092,4	2001,4	1568,5	1921,9
		SD	229,2	315,1	361,2	312,4	488,3
		Образцы (n)	5	5	4*	4*	4*
Группа 6	Конструкция 8 5e11	Среднее (мкг/мл)	1779,5	2225,6	2561,0	2766,5	3194,2
		SD	357,7	372,2	911,6	592,2	1196,3

		Образцы (n)	5	5	5	5	5
Группа 7	Конструкция 1 5e10	Среднее (мкг/мл)	769,9	632,3	995,6	936,3	1449,3
		SD	344,6	313,8	377,8	350,8	409,0
		Образцы (n)	5	5	5	5	5
Группа 8	Конструкция 1 1e11	Среднее (мкг/мл)	1964,3	2248,7	2187,2	2584,2	3459,8
		SD	351,4	521,3	779,6	473,2	593,7
		Образцы (n)	5	5	5	5	5
Группа 9	Конструкция 1 5e11	Среднее (мкг/мл)	2063,0	2789,0	3421,7	2988,5	4409,3
		SD	434,0	703,7	1176,6	936,2	1657,4
		Образцы (n)	5	5	5	5	5

\*мыши умерли во время кровотечения в удерживающем устройстве.

**Пример 8. Восприимчивость открытых рамок считывания SERPINA1 к агентам нуклеиновой кислоты, специфичным для последовательности.**

Лентивирусные плазмидные конструкции были индивидуально разработаны с использованием отдельных копий открытых рамок считывания SERPINA1, каждая из которых соответствует различным последовательностям представляющего интерес гена (GOI) из инсерционных конструкций Конструкции 1, Конструкции 7 и Конструкции 8. Лентивирусные векторы содержат промоторы EF1a для управления экспрессией GOI и устойчивость к пурамицину для селекции.

Дизайны были основаны на инсерционных конструкциях, показанных в Таблице 19:

**Таблица 19**

Лентивирусная конструкция	Описание	Компонент инсерционных конструкций
Конструкция 20	SERPINA1 с нативной сигнальной последовательностью	Отсутствует
Конструкция 21	SERPINA1, без сигнальной последовательности	Конструкция 1
Конструкция 22	SERPINA1, без сигнальной последовательности, истощенный по CpG	Конструкция 7
Конструкция 23	SERPINA1, без сигнальной последовательности, истощенный по CpG, альтернативная частота использования кодонов 1	Конструкция 7, Конструкция 8
Конструкция 24	SERPINA1, без сигнальной последовательности, истощенный по CpG, альтернативная частота использования кодонов 2	Конструкция 8

При секвенировании лентивирусных конструкций в Конструкции 23 были выявлены изменения по сравнению с разработанными конструкциями. В частности, вместо трех несовпадений целевой последовательности G000409 было только одно несовпадение. Изменения в дизайне не привели к изменению кодируемой аминокислотной последовательности. Показано выравнивание нацеливающей последовательности G000409, последовательности SERPINA1 дикого типа, Конструкции 20 и Конструкции 7/8, с подчеркнутыми отличиями от нацеливающего сайта G000409:

G000409 ACTCACGATGAAATCCTGGA (SEQ ID NO: 1567)

Кон 20 ACTCATGATGAAATCCTGGA (SEQ ID NO: 1568)

Кон 7/8 ACCCATGATGAGATCCTGGA (SEQ ID NO: 1569)

\*\* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \*

В эксперименте тестировали специфичные для последовательности агенты нуклеиновой кислоты, представленные в Таблице 20:

**Таблица 20: Агенты нуклеиновых кислот**

Название	Целевая последовательность SEQ ID NO: 703.	SEQ ID NO:
киРНК2	1405-1425	980 (смысловая) 982 (антисмысловая)
киРНК3	957-977	981 (смысловая) 984

		(антисмысловая)
G000409	506-525	1129
G000414	538-557	1130
G000415	413-431	1131

Клетки мышинной гепатомы Hepa1.6 (ATCC, Манассас, Вирджиния, кат. № CRL-1380) высевали по 250 000 клеток/лунку в 6-луночные чашки (Thermo Fisher, Waltham, MA, кат. № 140675) со средой DMEM (Millipore Sigma, Берлингтон, Массачусетс, кат. № D5796) и 10% фетальной бычьей сыворотки и инкубировали при 37°C. Через 24 часа в клетки вводили лентивирус при MOI, равном 6 (при условии удвоения клеток через 24 часа до общего количества клеток в каждой лунке, равного 500 000 клеток), чтобы обеспечить интеграцию и экспрессию лентивирусных генных конструкций.

Через 24 часа трансдуцированные и контрольные клетки обрабатывали ЛНЧ, содержащим кшРНК (конечная концентрация 10 нМ кшРНК на лунку) или кшРНК/мРНК Cas9 (соотношение 1:2, при 3 мкг общей РНК на лунку), нацеленными на SERPINA1 дикого типа, и возвращали к инкубации при 37°C.

Через сорок восемь часов после обработки ЛНЧ РНК собирали с использованием мини-набора Qiagen RNeasy Mini Kit (Hilden, Germany, кат. № 74104) и преобразовывали в кДНК с использованием набора High-Capacity RNA-to-cDNA (Thermo Fisher, Waltham, MA, кат. № 4388950), оба согласно протоколам производителя.

Наборы праймеров-зондов капельной цифровой ПЦР (кцПЦР) были разработаны для обнаружения транскриптов, возникающих в результате экспрессии каждой лентивирусной конструкции (Bio-Rad, Hercules, CA, кат. № 10031277). Контрольный набор праймеров-зондов для обнаружения экспрессии мышинового бета-актина был также заказан у Bio-Rad (кат. № 10031256). Образцы кДНК анализировали с использованием соответствующих наборов праймеров-зондов посредством кцПЦР в соответствии с протоколами производителя.

Для экспериментов по количественному определению кДНК проводили разведения кДНК 1:10000 (полученных в реакции объемом 20 мкл с вводом 1 мкг РНК) в воде. Супермикс для кцПЦР Bio-Rad для зондов (без dUTP, кат. № 1863024) размораживали на льду. Для каждого образца были созданы реакции объемом 20 мкл (10 мкл Супермикс+7 мкл воды+1 мкл кДНК, разведенной в 10 000 раз+1 мкл набора зондов SERPINA1+1 мкл набора зондов контрольного гена) и помещены в 96-луночные планшеты (Bio-Rad кат. № 12001925).

Капли создавали с использованием автоматического генератора капель Bio-Rad (кат. № 1864101) в соответствии с протоколами производителя. Капли, полученные с помощью этого аппарата, затем подвергались термоциклированию при следующих условиях производителя с использованием термоциклера Applied Biosystems VeritiPro (кат. № A48141) (Таблица 21).

**Таблица 21: Условия термоциклера**

Стадия циклирования	Температура, °C	Время	Количество циклов	
Удержание (только система кшПЦР QX ONE)	25	3 мин	1	
Активация фермента	95	10 мин	1	
Денатурация	94	30 сек	40	
Отжиг/удлинение	60	1 мин**	40	
Деактивация фермента	98	10 мин	1	
Удержание	Система кшПЦР QX200 (необязательно)	4	бесконечно	1
	Система кшПЦР QX ONE (обязательно)	25	1 мин	1

\* Для термоциклера C1000 Touch используйте крышку, нагретую до 105°C, и установите объем образца 40 мкл.

\*\* Проверьте/отрегулируйте настройки скорости изменения до -2°C/сек.

После термоциклирования образцы кшПЦР загружали в устройство для считывания капель Bio-Rad QX200 (кат. № 184003) и анализировали образцы с помощью анализа экспрессии генов «GEX». Ридер генерировал результаты для каждого образца, указывая концентрацию (копий/мкл) каждой мишени, SERPINA1 и контрольного гена).

Концентрацию транскрипта SERPINA1 для каждого образца определяли и нормализовали до концентрации мышинового бета-актина для поправки на изменение количества клеток. Затем нормализованные значения сравнивали с контрольными образцами без обработки для определения относительного снижения транскрипта после обработки кшРНК или CRISPR-KO, причем значение 1 указывает на 100% снижение уровня мРНК SERPINA1, а 0 указывает на отсутствие снижения уровня мРНК SERPINA1. В Таблице 22 показано процентное снижение транскрипта hSERPINA1 по сравнению с ненацеленным контролем. Каждый образец сначала обрабатывали лентивирусным вектором (обозначено строкой в таблице), а затем ЛНЧ, содержащий кшРНК или онРНК CRISPR (обозначено столбцом в таблице).

**Таблица 22: Процентное снижение транскрипта hSERPINA1 по сравнению с ненацеленным контролем.**

Первичное лечение	Вторичное лечение					
	Ненацеленный ЛНЧ	кшРНК2	кшРНК3	G000409	G000414	G000415
Лентивирусная конструкция						
Конструкция	0	0,87	0,83	0,72	0,72	0,55

20						
Конструкция 21	0	0,69	0,62	0,69	0,30	-0,10
Конструкция 22	0	0,10	-0,18	0,38	0,07	-0,29
Конструкция 23	0	0,14	-0,53	0,41	-0,04	-0,61
Конструкция 24	0	0,03	-0,02	0,00	-0,30	-0,05

**Пример 9. Вставка hSERPINA1 *in vivo* в локус альбумина яванского макака с последующим нокдауном трансгена cSERPINA1 *in vivo*.**

*Подготовка AAV к доставке hSERPINA1*

Тройную трансфекцию суспензии клеток-продуцентов вируса (Thermo Fisher, кат. № A35347) использовали для упаковки геномов с представляющими интерес генами (GOI) для AAV8 с использованием обычных способов продукции. Через три дня после трансфекции векторы AAV собирали из клеточной культуры посредством лизиса клеток, включая обработку бензоназой, для расщепления плазмиды, клетки-хозяина и любой другой свободной ДНК и РНК. Затем собранный материал осветляли глубинной фильтрацией для удаления остатков клеток и больших молекул с последующей фильтрацией с тангенциальным потоком для удаления небольших молекул, замены буфера и уменьшения объема. Векторы AAV впоследствии очищали с помощью аффинной хроматографии, а полные частицы AAV (оцененные по соотношению титра генома к титру капсида) обогащали с помощью анионообменной хроматографии. Наконец, в очищенных векторах AAV заменяли буфер и концентрировали в буфере конечного состава (PBS с 0,001% Pluronic F68, pH 7,4) с использованием центрифугирующих фильтрующих блоков. Для каждой партии продукции была предоставлена панель из 12 тестов, включая кЦПЦР с использованием праймеров/зондов, расположенных в области ITR, для определения титра генома.

*Анализ ЖХ-МС/МС альфа-1-антитрипсина (hA1AT) яванского макака и человека из сыворотки яванского макака*

Для исследований *in vivo* собирали кровь и отделяли сыворотку, как указано. Общие уровни cA1AT и hA1AT определяли с помощью жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ЖХ-МС/МС). Очищенный лиофилизированный нативный hA1AT, полученный из плазмы человека, был получен от компании Athens Research & Technology. Очищенный лиофилизированный нативный cA1AT, полученный из сыворотки яванского макака, изготавливали внутри компании. Лиофилизированные cA1AT и hA1AT растворяли в фетальной телячьей сыворотке в концентрации, подходящей для стандартов и контроля качества. Образцы сыворотки разводили в 10 раз

фетальной сывороткой теленка. 5 мкл стабильно меченых внутренних стандартов с концентрацией 1900 нг/мл добавляли к 5 мкл разведенных образцов фетальной телячьей сыворотки, стандартов и контролей качества. Затем образцы денатурировали 25 мкл трифторэтанола, разбавляли 25 мкл 50 мМ бикарбоната аммония непосредственно перед добавлением 5 мкл 200 мМ DTT и инкубировали в течение 30 минут при 55°C. Восстановленные образцы обрабатывали 10 мкл 200 мМ йодацетамида и инкубировали в течение часа при комнатной температуре в темноте со встряхиванием. Образцы разбавляли 400 мкл смеси 50 мМ бикарбонат аммония:метол (65:35), обрабатывали 20 мкл 1 г/л трипсина и инкубировали в течение ночи при 37°C. Расщепление прекращали добавлением 10 мкл муравьиной кислоты.

*Идентификация пептидов cA1AT и hA1AT дикого типа.*

Чистый гидролизат A1AT анализировали методом ЖХ-МС/МС и идентифицировали характерные пептиды, содержащие аллели дикого типа. В частности, cA1AT дикого типа выявляли с использованием тяжело меченого специфического пептида (SANLHLPR; SEQ ID NO: 1559), а hA1AT дикого типа выявляли с использованием другого тяжело меченого специфического пептида дикого типа (SASLHLPK; SEQ ID NO: 1560). Объединенную концентрацию cA1AT и hA1AT дикого типа определяли с использованием третьего тяжело меченого пептида (AVLTIDEK; SEQ ID NO: 1561). Каждый из этих пептидов был синтезирован путем включения одного <sup>13</sup>C<sup>6</sup><sup>15</sup>N-лейцина в положение, отмеченное жирным подчеркиванием.

*Определение уровней cA1AT и hA1AT в сыворотке с помощью масс-спектрометрии.*

Сыворотку расщепляли способами, описанными выше. После расщепления расщепленную сыворотку загружали в колонку и анализировали методом ЖХ-МС/МС, как описано ниже. Идентификацию уровней cA1AT и hA1AT дикого типа получали путем сравнения с калибровочными кривыми.

*Условия ЖХ-МС/МС*

Анализ ЖХ-МС/МС проводили на колонке C8 размером 2,1×50 мм. Подвижная фаза А состояла из 0,1% муравьиной кислоты в воде, а подвижная фаза В состояла из 0,1% муравьиной кислоты в ацетонитриле. Промывка иглы состояла из 0,1% муравьиной кислоты, 1% диметилсульфоксида в смеси метанол:вода (35:65). Анализ гидролизата A1AT проводили на масс-спектрометре со следующими параметрами: (a) Источник ионов: Turbo Spray IonDrive; (b) Газовая завеса: 35,0; (c) Газ для соударений: средний; (d) Напряжение ионного распыления: 5500; (e) Температура: 500°C; (f) Газ-источник ионов 1:50; и (g) Газ-источник ионов 2: 50.

*Вставка hSERPINA1 in vivo в локус альбумина яванского макака с последующим нокадауном трансгена cSERPINA1 in vivo.*

Двунаправленную конструкцию SERPINA1 человека (Конструкция 1) в векторе экспрессии AAV8 (AAV8-SERPINA1) в комбинации с составленной онРНК, перекрестно реагирующей с генами альбумина человека и яванского макака (G009860), оценивали на

предмет вставки гена SERPINA1 человека у самцов яванского макака. Целевой сайт онРНК альбумина человека консервативен у яванских макак, что позволяет вставлять трансген SERPINA1 человека в локус альбумина яванских макак. После вставки гена SERPINA1 человека направляющую, специфичную для SERPINA1 яванского макака (G014418), оценивали на предмет нокаута гена (с)SERPINA1 яванского макака путем обнаружения (с)A1AT яванского макака в сыворотке в качестве маркера редактирования гена. Используемые направляющие показаны в таблице ниже.

**Таблица 23: онРНК**

онРНК	Целевая последовательность	Немодифицированная направляющая	Модифицированная направляющая
G009860 (человека/ яванского макака)	UAAAGCAUAGUG CAAUGGAU (SEQ ID NO: 8)	UAAAGCAUAGUGCA AUGGAUGUUUAGA GCUAGAAAUAGCAA GUUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAAC UUGAAAAAGUGGCA CCGAGUCGGUGCUU UU (SEQ ID NO: 1500)	mU*mA*mA*AGCAUAGUG CAAUGGAUGUUUAGAm GmCmUmAmGmAmAmAmU mAmGmCAAGUUAAAAUA AGGCUAGUCCGUUAUCAm AmCmUmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCmAmCm CmGmAmGmUmCmGmGmU mGmCmU*mU*mU*mU (SEQ ID NO: 72)
G014418 (специфичная для яванского макака)	AGACCUUAGUGA UACCCAGG (SEQ ID NO: 1502)	AGACCUUAGUGAUA CCCAGGGUUUAGA GCUAGAAAUAGCAA GUUAAAAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAAC UUGAAAAAGUGGCA CCGAGUCGGUGCUU UU (SEQ ID NO: 1504)	mA*mG*mA*CCUUAGUGA UACCCAGGGUUUAGAmG mCmUmAmGmAmAmAmUm AmGmCAAGUUAAAAUAA GGCUAGUCCGUUAUCAmA mCmUmUmGmAmAmAmAm AmGmUmGmGmCmAmCmC mGmAmGmUmCmGmGmUm GmCmU*mU*mU*mU (SEQ ID NO: 1506)

Обезьянам (n=3) внутривенно вводили болюсную дозу AAV8-SERPINA1 (1,5E13 вг/кг) с последующей 30-минутной в/в инфузией G009860, составленной в ЛНЧ с мРНК Cas9, как указано выше (3,0 мг/кг) в день исследования 1. В день исследования 245 обезьянам вводили 30-минутную в/в инфузию специфической для яванских макак направляющей SERPINA1 G014418, составленной в ЛНЧ с мРНК Cas9, как указано выше (3,0 мг/кг). В день исследования 1 контрольной группе с носителем (n=3) вводили болюсную дозу буфера AAV с последующей 30-минутной инфузией буфера ЛНЧ. На 245-

й день исследования контрольной группе с носителем вводили 30-минутную инфузию буфера ЛНЧ. Всем обезьянам предварительно вводили болюсную дозу дексаметазона 2 мг/кг за 1 час до болюса AAV в 1-й день исследования и за 1 час до инфузии ЛНЧ в 245-й день исследования. AAV и ЛНЧ, протестированные в этом исследовании, были приготовлены, как описано в материалах и методах. Уровни сA1AT/hA1AT в сыворотке и редактирование генов измеряли, как описано в материалах и методах.

Всех животных предварительно проверяли на наличие однонуклеотидных вариантов целевой последовательности онРНК и на наличие ранее существовавших нейтрализующих антител к AAV8. Фармакокинетическая оценка компонентов AAV и ЛНЧ в плазме находилась в пределах исторических диапазонов для всех обработанных животных, что указывает на успешное дозирование всех продуктов. Клиническая патология (клиническая химия, гематология, коагуляция) и мониторинг цитокинов не дали каких-либо необычных результатов, при этом какие-либо повышения параметров возвращались к исходному уровню в течение одной недели.

Животные, обработанные AAV8-SERPINA1 и получившие состав G009860, демонстрировали повышенный уровень hA1AT в сыворотке (Таблица 24 и Фиг. 9А и 9В), тогда как в контрольной группе с буфером экспрессия hA1AT не наблюдалась. У животных, обработанных составом G009860, средний % инделов составлял 44,2, в то время как в контрольной группе с буфером его не наблюдалось (Таблица 25 и Фиг. 7). Уровни hA1AT достигли максимального плато на 4-й неделе и поддерживались до 52-й недели на среднем равновесном уровне 1126 мкг/мл, как было смоделировано с помощью нелинейной аппроксимации однофазной ассоциации. Никаких изменений в hA1AT человека не наблюдалось после нокаутной обработки составом G014418 на 259-й день (Таблица 27 и Фиг. 8).

После нокаутной обработки сA1AT на 245-й день у животных, обработанных составом G014418, наблюдалось снижение уровня сA1AT в сыворотке, тогда как в контрольной группе с буфером не наблюдалось никаких изменений в экспрессии (Таблица 26 и Фиг. 9А и 9В). Животные, обработанные составом G014418, имели средний % инделов 44,0, в то время как в контрольной группе с буфером его не наблюдалось (Таблица 27 и Фиг. 8). Уровни сA1AT поддерживались на уровне 2005 мкг/мл до нокаутной обработки, после чего максимальное снижение сA1AT наблюдалось через 4 недели и поддерживалось до 52 недели на среднем равновесном уровне 652 мкг/мл, как смоделировано с плато нелинейной аппроксимации, за которым следует однофазовый спад. После нокаутной обработки сA1AT не наблюдалось никаких изменений в hA1AT.

**Таблица 24: Уровни hA1AT в сыворотке**

Метка дня исследования	Концентрация hA1AT в сыворотке (мкг/мл) в NHP, измеренная с помощью SASLHLPK (SEQ ID NO: 1560)					
	Контроль-носитель			Обработка вставкой		
	1001	1002	1003	2001	2002	3003

D-10	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL
D-7	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL
D-5	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL
D1	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL
D7	BQL	BQL	BQL	384	158	305
D14	BQL	BQL	BQL	635	429	772
D28	BQL	BQL	BQL	1030	819	1100
D42	BQL	BQL	BQL	1270	922	1470
D56	BQL	BQL	BQL	1120	816	1090
D70	BQL	BQL	BQL	1110	867	800
D78	BQL	BQL	BQL	1260	804	1370
D84	BQL	BQL	BQL	1345	849	1670
D98	BQL	BQL	BQL	1285	935	1700
D112	BQL	BQL	BQL	1290	858	1640
D126	BQL	BQL	BQL	1345	848	1845
D140	BQL	BQL	BQL	922	692	1240
D154	BQL	BQL	BQL	973	691	1260
D168	BQL	BQL	BQL	981	674	1360
D182	BQL	BQL	BQL	1040	634	1150
D196	BQL	BQL	BQL	1030	767	1250
D210	BQL	BQL	BQL	911	564	1090
D224	NR	NR	BQL	1350	889	1670
D238	BQL	BQL	BQL	1140	780	1260
D252	BQL	BQL	BQL	1080	779	1160
D258	BQL	BQL	BQL	1160	738	1220
D266	BQL	BQL	BQL	1060	752	1330
D272	BQL	BQL	BQL	1110	632	1050
D280	BQL	BQL	BQL	1300	857	1470
D294	BQL	BQL	BQL	1390	860	1500
D308	BQL	BQL	BQL	1230	699	1510
D322	BQL	BQL	BQL	1300	800	1450
D336	BQL	BQL	BQL	1280	785	1550
D350	BQL	BQL	BQL	1420	906	1300

D364	BQL	BQL	BQL	1310	821	1560
------	-----	-----	-----	------	-----	------

BQL: Ниже предела количественного определения, NR: Не сообщается из-за аналитической проблемы.

**Таблица 25: Редактирование локуса альбумина яванского макака из биопсии печени на 14-й день**

Условие	Среднее % инделов	SD	Образцы
Контроль-носитель	<1		3
Инсерционная обработка	44,2	11,5	3

**Таблица 26: Уровни сА1АТ в сыворотке**

Метка дня исследования	Концентрация сА1АТ в сыворотке (мкг/мл) в NHP, измеренная с помощью SANLHLPR (SEQ ID NO: 1559)					
	Контроль-носитель			Инсерционная обработка		
	1001	1002	1003	2001	2002	3003
D-10	2050	2100	2370	1870	1080	2170
D-7	2140	2020	2460	1810	NR	2260
D-5	2320	2190	2400	1880	1100	2110
D1	2710	2620	2890	2430	1310	2490
D7	2540	2100	2290	2120	1050	2250
D14	2530	2350	2490	1900	1220	2350
D28	2120	2100	2200	2200	1230	2260
D42	2290	2180	2800	2320	1260	2420
D56	1910	2060	2370	2280	1190	1870
D70	1790	1900	1900	1380	1110	1990
D78	1820	1710	1710	1510	1130	2040
D84	2175	2220	2260	2095	1165	2415
D98	2130	1945	2085	2065	1270	2415
D112	2225	2080	2385	2310	1320	2310
D126	2430	2315	2340	2375	1195	2480
D140	2890	2800	2740	2970	1430	2630
D154	2940	2820	2770	2610	1520	2860
D168	3000	2670	2930	2980	1530	2900
D182	3110	2710	2930	2750	1410	2840
D196	3330	2860	2970	2770	1490	2920

D210	2890	2950	2980	2500	1450	2780
D224	NR	NR	2790	2330	1430	2830
D238	2450	2300	2710	2340	1320	2590
D252	2450	2440	2940	1540	1330	1710
D258	2350	2360	2650	878	1100	1150
D266	2630	2420	2790	519	1210	762
D272	2420	2030	2560	487	1100	631
D280	2600	2470	2680	472	1100	536
D294	2630	2430	2700	439	1000	588
D308	2340	2430	2540	446	943	644
D322	2520	2550	2620	411	1010	545
D336	2390	2540	2630	410	1030	533
D350	2690	2390	2640	428	1060	525
D364	2610	2310	2490	428	1050	512

NR: Не сообщается из-за аналитических проблем.

**Таблица 27. Редактирование локуса SERPINA1 яванского макака из биопсии печени 259-го дня**

Условие	Среднее % инделов	SD	Образцы
Контроль-носитель	<1		3
Инсерционная обработка	44,0	17,7	3

**Пример 10. Вставка hSERPINA1 in vivo в альбумин яванского макака.**

AAV с уникальными последовательностями hSERPINA1 (Конструкция 7 и Конструкция 8) в сочетании с составленной направляющей альбумина G009860 оценивали на предмет вставки гена SERPINA1 человека у самцов яванских макаков, как описано выше.

Двум группам обезьян (n=4/группа, 2 самца и 2 самки) внутривенно вводили болюсную дозу AAV8 (1,5E13 вг/кг с последовательностями hSERPINA1 Конструкции 7 или Конструкции 8) с последующей 30-минутной в/в инфузией, составленной направляющей альбумина G009860 (3,0 мг/кг). Контрольной группе с носителем (n=2, 1 самец и 1 самка) вводили болюсную дозу буфера AAV с последующей 30-минутной инфузией буфера ЛНЧ. Всем обезьянам предварительно вводили болюсную дозу дексаметазона 2 мг/кг за 1 час до болюсного введения AAV. AAV и ЛНЧ, протестированные в этом исследовании, были приготовлены, как описано в материалах и методах. Уровни cA1AT/hA1AT в сыворотке и редактирование генов измеряли, как описано в материалах и методах.

Всех животных предварительно проверяли на наличие однонуклеотидных

вариантов целевой последовательности онРНК и на наличие ранее существовавших нейтрализующих антител к AAV8. Фармакокинетическая оценка компонентов AAV и ЛНЧ в плазме находилась в пределах исторических диапазонов для всех обработанных животных, за исключением компонента AAV у животного 3502. В исследовательских документах для животного 3502 отмечается неправильная доза при введении AAV. Воздействие AAV в плазме у животного 3502 было в 10 раз ниже исторических диапазонов, что указывает на проблему с дозировкой. Принимая во внимание эти соображения, животное 3502 было исключено из оценки эффективности. Клиническая патология (клиническая химия, гематология, коагуляция) и мониторинг цитокинов не дали каких-либо обычных результатов, при этом какие-либо повышения параметров возвращались к исходному уровню в течение одной недели.

Животные, получавшие AAV, содержащий Конструкцию 7 или Конструкцию 8 и составленную направляющую альбумина G009860, демонстрировали повышенные уровни hA1AT в сыворотке, в то время как в контрольной группе с буфером экспрессия не наблюдалась (Таблица 28 и Фиг. 11). Животные, обработанные составленной направляющей альбумина G009860, имели средний % инделов 37,6 в группе с Конструкцией 7 и 42,2 в группе Конструкцией 8. В контрольной группе с буфером не наблюдалось инделов (Таблица 29 и Фиг. 10). Уровни hA1AT достигли максимального плато на 4-й неделе, составив в среднем 882 мкг/мл в группе с Конструкцией 7 и в среднем 1223 мкг/мл в группе Конструкцией 8. На уровни cA1AT не влияла ни одна из инсерционных обработок (Таблица 30).

**Таблица 28: Уровни hA1AT в сыворотке**

Метка дня исследования	Концентрация hA1AT в сыворотке (мкг/мл) в NHP измеренная с помощью SASLHLPK (SEQ ID NO: 1560)										
	Контроль-носитель		Конструкция 7				Конструкция 8				
	1001	1002	2001	2002	2501	2502	3001	3002	3501	3502	
D-12	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	Excl.
D-7	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	Excl.
D-2	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	BQL	Excl.
D8	NR	NR	437	459	290	389	458	486	514		Excl.
D14	BQL	BQL	547	841	613	878	996	928	962		Excl.
D28	BQL	BQL	648	937	863	1080	1520	1120	1030		Excl.

BQL: Ниже предела количественного определения, NR: Не сообщается из-за аналитической проблемы, Excl.: Исключенные значения

**Таблица 29: Редактирование в локусе альбумина яванского макака из биопсии печени на 14-й день**

AAV	Среднее	SD	Образцы
-----	---------	----	---------

	% инделов		
Контроль-носитель	<1		2
Конструкция 7	37,6	6,3	4
Конструкция 8	42,2	1,5	3

Таблица 30: Уровни сА1АТ в сыворотке

Метка дня исследования	Концентрация сА1АТ в сыворотке (мкг/мл) в NHP измеренная с помощью SANLHLPR (SEQ ID NO: 1559)									
	Контроль-носитель		Конструкция 7				Конструкция 8			
	1001	1002	2001	2002	2501	2502	3001	3002	3501	3502
D-12	2240	2250	2090	3010	2220	2430	2590	2220	922	Excl.
D-7	2430	2400	2150	2590	1540	2270	2860	2290	1030	Excl.
D-2	2270	2600	2230	2600	2490	2700	2420	2190	1040	Excl.
D8	NR	NR	2730	3240	2710	3050	2830	2690	1210	Excl.
D14	2410	2710	2470	3220	2590	3140	2870	2330	1390	Excl.
D28	2000	2790	2230	2800	2720	2780	2610	2030	1670	Excl.

NR: Не сообщается из-за аналитической проблемы, Excl: Исключенные значения

#### Пример 11. Оценка hA1AT в сыворотке на ингибирование эластазы нейтрофилов.

Ингибирующую активность эластазы нейтрофилов нативного A1AT человека сравнивали с активностью последовательности hA1AT, которая экспрессируется двунаправленной конструкцией у SerpinA1-нуль-мышей. Белок hA1AT, экспрессируемый из двунаправленной конструкции после вставки в локус альбумина, содержит 3 аминокислоты на N-конце сайта вставки альбумина человека, которые отсутствуют в нативном белке A1AT человека.

мРНК, кодирующие нативный A1AT человека (нативный-A1AT) или A1AT человека, экспрессированный из двунаправленной конструкции после вставки в локус альбумина (Alb-A1AT), были составлены с липидами и доставлены внутривенно в дозе 2 мг/кг SerpinA1-нуль-мышам (Jackson Laboratories, n=4 на группу). Через шесть часов после введения отбирали кровь и готовили сыворотку для количественного определения A1AT человека с помощью ИФА (Aviva Biosystems, кат. № OKIA00048) и ингибирования эластазы нейтрофилов по сравнению с контрольными нуль-мышами, не обработанными мРНК, кодирующей A1AT, и мышами дикого типа, экспрессирующими эндогенный A1AT.

Экспрессия A1AT из конструкций экспрессии, определенная с помощью ИФА, показана на Фиг. 12А и в Таблице 31.

Таблица 31: Экспрессия A1AT у SerpinA1-нуль-мышей

Alb-A1AT			Нативный-A1AT		
Среднее значение hA1AT (мкг/мл)	SD hA1AT (мкг/мл)	Кол-во	Среднее значение hA1AT (мкг/мл)	SD hA1AT (мкг/мл)	Кол-во
112,73	34,99	4	131,02	17,15	4

Для определения способности сывороточного A1AT ингибировать эластазу нейтрофилов использовали коммерчески доступный набор для колориметрического обнаружения лекарственных препаратов для эластазы нейтрофилов (кат. № BLM-AK947; Enzo Life Sciences Inc., Фармингдейл, Нью-Йорк). Сыворотку из исследований *in vivo* готовили для точной оценки A1AT. Образцы сыворотки разводили в 3 раза в PBS и фильтровали через центрифужный фильтр 0,22 мкм (кат. № UFC30GV; Sigma). Двести микролитров смолы Alpha 1 Select (кат. № 17547201; Cytiva, Мальборо, Массачусетс) добавляли в пустую колонку (кат. № 731-1550; BioRad) и трижды промывали 600 мкл PBS. 600 мкл отфильтрованного образца сыворотки, содержащей A1AT, вводили в колонку и инкубировали при вращении в течение 40 минут при комнатной температуре. Колонки трижды промывали PBS и белок A1AT элюировали добавлением 500 мкл элюирующего буфера (2M MgCl<sub>2</sub>, 20 mM Трис, pH 7,5).

Очищенные образцы затем использовали в анализе ингибирования эластазы нейтрофилов, проводимом в соответствии с протоколом производителя. Вкратце, компоненты набора оттаивали на льду, а ингибиторы и субстраты разбавляли до концентраций рабочих растворов. Фермент эластазы нейтрофилов и контрольный ингибитор эластатинал разводили в буфере для анализа и добавляли в соответствующие лунки микропланшета. Очищенные образцы сыворотки разводили в различных концентрациях. Планшет инкубировали в течение 30 минут при 37°C, чтобы обеспечить взаимодействие ингибитора/фермента. Затем вводили колориметрический субстрат и планшеты считывали на планшет-ридере при A<sub>405 нм</sub> с интервалом в 1 минуту в течение 10 минут. Для определения процента ингибирования очищенных образцов сыворотки стандартные значения наносили на график как зависимость mOD от времени и определяли диапазон моментов времени, в течение которых реакция была линейной. Определяли скорость реакции (mOD/мин) и определяли наклон прямой, соответствующей линейной части графика данных. Процент ингибирования показан в Таблице 32 и на Фиг. 12B

**Таблица 32. Процентное ингибирование эластазы нейтрофилов в очищенных образцах сыворотки**

Образец	Средний % ингибирования	SD % ингибирования	Кол-во
Alb-A1AT	21,27	5,07	5
нативный A1AT	22,28	0,79	5
Мыши ДТ	95,56	1,62	4
Нуль-мышы (Контроль)	17,25	0	1

Ингибитор 125 мкг/мл (эластатинал) (контроль)	88,22	0	1
--	-------	---	---

## Alb-A1AT

GGGAAGCUCAGAAUAAACGCUCAACUUUGGCCGGAUCUGGGCGGCCACCA  
UGAAGUGGGUAAACCUUUUUUUCUUCUUUUUCUCUUUAGCUCGGCUUAUCCA  
GGGGUGUGUUUCGUCGAGAUUGCACUUGAGGAUCCCCAGGGAGAUGCUGCCCAGA  
AGACAGAUACAUCCCACCAUGAUCAGGAUCACCCAACCUUCAACAAGAUCACCCC  
CAACCUGGCUGAGUUCGCCUUCAGCCUAUACCGCCAGCUGGCACACCAGUCCAAC  
AGCACCAAUUUCUUCUUCUCCCCAGUGAGCAUCGCUACAGCCUUUGCAAUGCUCU  
CCCUGGGGACCAAGGCUGACACUCACGAUGAAAUCCUGGAGGGCCUGAAUUUCA  
CCUCACGGAGAUUCCGGAGGCUCAGAUCCAUGAAGGCUUCCAGGAACUCCUCCGU  
ACCCUCAACCAGCCAGACAGCCAGCUCACAGCUGACCACCGGCAAUGGCCUGUCC  
UCAGCGAGGGCCUGAAGCUAGUGGAUAAGUUUUUGGAGGAUGUUAAAAAGUUGU  
ACCACUCAGAAGCCUUCACUGUCAACUUCGGGGACACCGAAGAGGCCAAGAAACA  
GAUCAACGAUUACGUGGAGAAGGGUACUCAAGGGAAAAUUGUGGAUUUGGUCAA  
GGAGCUUGACAGAGACACAGUUUUUGCUCUGGUGAAUUACAUCUUCUUUAAAGG  
CAAAUGGGAGAGACCCUUUGAAGUCAAGGACACCGAGGAAGAGGACUCCACGU  
GGACCAGGUGACCACCGUGAAGGUGCCUAUGAUGAAGCGUUUAGGCAUGUUUAA  
CAUCCAGCACUGUAAGAAGCUGUCCAGCUGGGUGCUGCUGAUGAAAUACCUGGGC  
AAUGCCACCGCCAUCUUCUUCUCCUGCCUGAUGAGGGGAAACUACAGCACCUGGAAA  
AUGAACUCACCCACGAUAUCAUCACCAAGUUCUCCUGGAAAUGAAGACAGAAGGUC  
UGCCAGCUUACAUUUACCCAAACUGUCCAUAUACUGGAACCUAUGAUCUGAAGAGC  
GUCCUGGGUCAACUGGGCAUCACUAAGGUCUUCAGCAAUGGGGGCUGACCUCUCCG  
GGGUCACAGAGGAGGCACCCCUGAAGCUCUCCAAGGCCGUGCAUAAGGCUGUGCU  
GACCAUCGACGAGAAAGGGACUGAAGCUGCUGGGGCCAUGUUUUUAGAGGCCAU  
ACCCAUGUCUAUCCCCCCCCGAGGUCAAGUUCAACAAACCCUUUGUCUUCUUAUG  
AUUGAACAAAAUACCAAGUCUCCCCUCUUCAUGGGAAAAGUGGUGAAUCCCACCC  
AAAAAUAAUAGGCUAGCCACCAGCCUCAAGAACACCCGAAUGGAGUCUCUAAGCU  
ACAUAAUACCAACUACACUUUACAAAAUGUUGUCCCCCAAAAUGUAGCCAUUCG  
UAUCUGCUCCUAAUAAAAAGAAAGUUUCUUCACAUUCUCUCGAGAAAAAAAAAAA  
AAUGGAAAAAAAAAAAAACGGAAAAAAAAAAAAAGGUAAAAAAAAAAAAAUAAAAA  
AAAAACAUAAAAAAAAAAAAAACGAAAAAAAAAAAAACGUAAAAAAAAAAAAACUCA  
AAAAAAAAAAGAUAAAAAAAAAAAAACCUAAAAAAAAAAAAAUGUAAAAAAAAAAAA  
AGGGAAAAAAAAAAAAACGCAAAAAAAAAAAAAACACAAAAAAAAAAAAAUGCAAAAAA  
AAAAAAUCGAAAAAAAAAAAAAUCUAAAAAAAAAAAAACGAAAAAAAAAAAAACCCA  
AAAAAAAGACAAAAAAAAAAAAAUAGAAAAAAAAAAAAAGUUAAAAAAAAAAAAA  
ACUGAAAAAAAAAAAAAUUAAAAAAAAAAAAAUCUAG (SEQ ID NO: 1562)

## Нативный A1AT

GGGAAGCUCAGAAUAAACGCUCAACUUUGGCCGGAUCUGGGCGGCCACCA  
UGCCGUCUUCUGUCUCGUGGGGCAUCCUCCUGCUGGCAGGCCUGUGCUGCCUGGU

CCCUGUCUCCCUGGCUGAGGAUCCCCAGGGAGAUGCUGCCCAGAAGACAGAUACA  
 UCCCACCAUGAUCAGGAUCACCCAACCUUCAACAAGAUCACCCCCAACCCUGGCUG  
 AGUUCGCCUUCAGCCUAUACCGCCAGCUGGCACACCAGUCCAACAGCACCAAUAU  
 CUUCUUCUCCCCAGUGAGCAUCGCUACAGCCUUGCAAUGCUCUCCCUGGGGACC  
 AAGGCUGACACUCACGAUGAAAUCCUGGAGGGCCUGAAUUUCAACCUCACGGAGA  
 UUCCGGAGGCUCAGAUCCAUGAAGGCUUCCAGGAACUCCUCCGUACCCUCAACCA  
 GCCAGACAGCCAGCUCAGCUGACCACCGGCAAUGGCCUGUCCUCAGCGAGGGC  
 CUGAAGCUAGUGGAUAAGUUUUUGGAGGAUGUUAAAAAGUUGUACCACUCAGAA  
 GCCUUCACUGUCAACUUCGGGGACACCGAAGAGGCCAAGAAACAGAUCAACGAUU  
 ACGUGGAGAAGGGUACUCAAGGGAAAAUUGUGGAUUUGGUCAAGGAGCUUGACA  
 GAGACACAGUUUUUGCUCUGGUGAAUUACAUCUUCUUUAAAGGCAAUUGGGAGA  
 GACCCUUUGAAGUCAAGGACACCGAGGAAGAGGACUCCACGUGGACCAGGUGAC  
 CACCGUGAAGGUGCCUAUGAUGAAGCGUUUAGGCAUGUUUAACAUCAGCACUG  
 UAAGAAGCUGUCCAGCUGGGUGCUGCUGAUGAAAUACCUGGGCAAUGCCACCGCC  
 AUCUUCUUCUGCCUGAUGAGGGGAAACUACAGCACCUGGAAAAUGAACUCACCC  
 ACGAUAUCAUCACCAAGUCCUGGAAAAUGAAGACAGAAGGUCUGCCAGCUUAC  
 AUUUACCCAAACUGUCCAUAUACUGGAACCUAUGAUCUGAAGAGCGUCCUGGGUCA  
 ACUGGGCAUCACUAAGGUCUUCAGCAAUGGGGGCUGACCUCUCCGGGGUCACAGAG  
 GAGGCACCCUGAAGCUCUCCAAGGCCGUGCAUAAGGCUGUGCUGACCAUCGACG  
 AGAAAGGGACUGAAGCUGCUGGGGGCCAUGUUUUUAGAGGCCAUACCCAUGUCUA  
 UCCCCCGAGGUCAAGUUCAACAAACCCUUGUCUUCUUAUGAUUGAACAAAA  
 UACCAAGUCUCCCCUCUUCAUGGGAAAAGUGGUGAAUCCCACCCAAAAAUAAUAG  
 GCUAGCCACCAGCCUCAAGAACACCCGAAUGGAGUCUCUAAGCUCACUAUAUACCA  
 ACUUCACUUAACAAAAUGUUGUCCCCCAAAUUGUAGCCAUUCGUAUCUGCUCCU  
 AAUAAAAAGAAAGUUUCUUCACAUUCUCUCGAGAAAAAAAAAAAAAAAAAUGGAAAAAA  
 AAAAAACGGAAAAAAAAAAAAAGGUAAAAAAAAAAAAAAAAUAUAAAAAAAAAAAAACAUA  
 AAAAAAAAAACGAAAAAAAAAAAAACGUAAAAAAAAAAAAACUCAAAAAAAAAAAAG  
 AUAAAAAAAAAAAAACCUAAAAAAAAAAAAAUGUAAAAAAAAAAAAAGGGAAAAAA  
 AAAACGCAAAAAAAAAAAAAACACAAAAAAAAAAAAAUGCAAAAAAAAAAAAAUCGAA  
 AAAAAAAAAAUCUAAAAAAAAAAAAACGAAAAAAAAAAAAACCCAAAAAAAAAAAA  
 GACAAAAAAAAAAAAAUAGAAAAAAAAAAAAAGUUAAAAAAAAAAAAACUGAAAAAA  
 AAAAAUUUAAAAAAAAAAAAAUCUAG (SEQ ID NO: 1563)

**Пример 12. Устойчивость последовательностей инсерционной матрицы к последовательному сайленсингу кнРНК и редактированию CRISPR у SERPINA1-нуль-мышей.**

Устойчивость к нуклеазе последовательностей инсерционной матрицы тестировали на SERPINA1-нуль-мышях путем вставки матрицы и последующей обработки кнРНК, нацеленной на SERPINA1 человека дикого типа. Конструкция 1 включает кодирующую последовательность дикого типа и кодон-оптимизированную последовательность для SERPINA1. Кодон-оптимизированная последовательность не полностью комплементарна

антисмысловой последовательности киРНК2 и киРНК3.

В день 0 SERPINA1-нуль-мышам (n=9 самцов, 9 самок) вводили 1 мг/кг (по отношению к содержанию груза общей РНК) ЛНЧ, несущей мРНК Cas9 и онРНК G000666 (нацеленные на мышинный альбумин), а также ssAAV, полученный из матрицы A1AT Конструкции 1, в дозе  $1,5 \times 10^{11}$  вг/мышь. Все реагенты готовили и дозировали, как описано выше. Кровь отбирали и готовили сыворотку перед обработкой киРНК в дни 14 и 28. В дни 28, 29 и 30 мышам (n=3 самца и 3 самки на группу) вводили ЛНЧ, составленные из киРНК2 или киРНК3 (0,3 мг/кг), или контроль носителя. Кровь отбирали и готовили сыворотку на 32-й день.

Уровни A1AT человека в сыворотке определяли с помощью ИФА (Aviva Biosystems, кат. № OKIA00048) в соответствии с протоколом производителя.

На Фиг. 13А и в Таблице 33 показаны уровни белка hA1AT, измеренные с помощью ИФА на 28-й день (до введения дозы) и на 32-й день (после введения дозы). На Фиг. 13В и в Таблице 34 показан процент нокдауна A1AT после введения дозы киРНК2 или киРНК3.

**Таблица 33. Уровни hA1AT, измеренные с помощью ИФА до и после введения киРНК**

День	киРНК2			киРНК3		
	Среднее значение A1AT (мкг/мл)	SD A1AT (мкг/мл)	Кол-во	Среднее значение A1AT (мкг/мл)	SD A1AT (мкг/мл)	Кол-во
День 28	1098,09	476,74	6	973,73	319,92	6
День 32	569,32	306,84	6	590,08	257,15	6

**Таблица 34. Процент нокдауна после введения дозы киРНК2 и киРНК3**

киРНК	киРНК2			киРНК3		
	Среднее значение A1AT (мкг/мл)	SD A1AT (мкг/мл)	Кол-во	Среднее значение A1AT (мкг/мл)	SD A1AT (мкг/мл)	Кол-во
День 28	1098,09	476,74	6	973,73	319,92	6
День 32	569,32	306,84	6	590,08	257,15	6

**Пример 13 - Вставка SERPINA1 с помощью двунаправленных конструкций с различными акцепторами сплайсинга.**

Конструкция 11 представляет собой двунаправленную конструкцию с последовательностями Конструкции 8, кодирующими SERPINA1, с акцепторными сайтами сплайсинга сывороточного альбумина человека. Тестировали вставку hSERPINA1 в локус альбумина мыши C57BL с использованием двунаправленных Конструкций 7 и 11 ssAAV. ssAAV и ЛНЧ, протестированные в этом примере, были приготовлены и

доставлены мышам, как описано в Примере 1.

Мышам в возрасте 8-9 недель вводили дозу 1 мг/кг (по отношению к содержанию груза общей РНК) ЛНЧ, несущей мРНК Cas9 и онРНК G000666 (нацеленную на альбумин мыши). ssAAV оценивали при дозах, представленных в Таблице 35.

**Таблица 35. Режим дозирования Конструкций 7 и 11**

	доза ЛНЧ	Доза AAV	Кол-во
Носитель	X	X	4
Конструкция 11	1 мг/кг	2,5e13 вг/кг	5
Конструкция 11	1 мг/кг	7,5e12 вг/кг	5
Конструкция 11	1 мг/кг	2,5e12 вг/кг	5
Конструкция 7	1 мг/кг	2,5e13 вг/кг	5
Конструкция 7	1 мг/кг	7,5e12 вг/кг	5
Конструкция 7	1 мг/кг	2,5e12 вг/кг	5

Кровь собирали через одну и две недели после введения дозы. Через четыре недели после введения дозы животных подвергают эвтаназии, собирают ткань печени и кровь для оценки уровня редактирования в печени и уровня экспрессии hA1AT в сыворотке, соответственно. Образование индела определяется с помощью NGS. Сыворотку готовили для измерения экспрессии альфа1-антитрипсина человека (hA1AT) в сыворотке с помощью ИФА (Aviva Biosystems, кат. № OKIA00048). Уровни hA1AT в сыворотке показаны на Фиг. 14 и в Таблице 36 через одну и две недели после введения дозы.

**Таблица 36. Уровни A1AT в сыворотке после введения дозы Конструкций 7 и 11**

	Доза AAV	Среднее значение A1AT, неделя 1 (мкг/мл)	SD A1AT (мкг/мл)	Среднее значение A1AT, неделя 2 (мкг/мл)	SD A1AT (мкг/мл)
Носитель	X	BLOD		BLOD	
Конструкция 11	2,5e13 вг/кг	3646,10	1079,49	6066,59	882,25
Конструкция 11	7,5e12 вг/кг	1271,45	234,99	1522,53	320,70
Конструкция 11	2,5e12 вг/кг	596,52	561,83	843,55	969,81
Конструкция 7	2,5e13 вг/кг	4926,10	3244,26	6730,24	4690,71
Конструкция 7	7,5e12 вг/кг	3665,04	1690,07	4340,04	2048,45
Конструкция 7	2,5e12 вг/кг	1498,00	1113,63	1758,13	1339,48

BLOD=ниже предела обнаружения

**Таблица 37: Дополнительные последовательности**

Конструкция	Последовательность
Nanoluc	taggtcagtgaagagaagaacaaaaagcagcatattacagttagttgtcttcatcaatctttaaataatgttgtg gttttctctccctgttccacagttttcttgatcatgaaaacgccaacaaattctgaatcgccaagaggtat aattcaggtaaattggaagagttgtcaagggaaccttgagagagaatgtatggaagaaaagtgtagtttga agaagcaGTATTCAC TTTGGAGGACTTTGTTCGGT GACTGGAGGCAAA CCGCTGGTTATAATCTCGACCAaG TACTGGAACAGGGCGGGGTAA GTTCCCTCTTTCAGAATTTGGGTGTAAGCGTCACACCAATCCAGC GGATTGTGTTGTCTGGAGAGAACGGACTCAA AATTGACATCCATG TTATCATTCATATGAAGGTCTCAGTGGAGACCAAATGGGGCAGA TCGAGAAGATTTTCAAGGTAGTTTACCCAGTCGACGATCACC ACT TCAAAGTCATtCTCCACTATGGCACACTTGTTATCGACGGAGTAAC TCCTAATATGATTGATTACTTTGGTCGCCCCGTATGAGGGCATCGC AGTGTTTGATGGCAAAAAGATCACCGTAACAGGAACGTTGTGGA ATGGGAACAAGATAATCGACGAGAGATTGATAAATCCAGACGGG TCACTCCTGTTCAAGGGTTACAATTAACGGCGTCACAGGATGGAGA CTCTGTGAACGAATACTGGCCacaaaattttcactcctgaagcaggccggagacgtggag gaaaaccagggccctgAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCCGGGGTGGT GCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTT CAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGC TGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGCAAGCTGCCCCGTGCCCT GGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCA GCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCG CCATGCCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGG ACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGC GACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAA GGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACA ACTACA ACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGC ATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAG CGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCCA CGGCCCCGTGCTGCTGCCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTC CGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCC TGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCGGGATCACTCTCGGCATGGACG AGCTGTACAAGGGAGGAGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGT CTAAcctCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCC CTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTC

CTTTCCTAATAAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGG  
TGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGG  
GGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGG  
GCTCTATGGcttctgaggcggaaagaaccagctggggctctagggggtatccccAAAAAAC  
CTCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATAAAAATGAATGCAATT  
GTTGTTGTAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAA  
GCAATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGC  
ATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGT  
CTGTTACACCTTCCTCTTCTTCTTGGGGCTGCCGCCGCCCTTGAC  
AGCTCGTCCATGCCAGGGTGATGCCGGCGGGCGGTCACGAACTCC  
AGCAGCACCATGTGGTCCCTCTTCTCGTTGGGGTCCCTTGCTCAGG  
GCGCTCTGGGTGCTCAGGTAGTGGTTGTCGGGCAGCAGCACGGGG  
CCGTCGCCGATGGGGGTGTTCTGCTGGTAGTGGTCGGCCAGCTGC  
ACGCTGCCGTCCCTCGATGTTGTGCCTGATCTTGAAGTTCACCTTGA  
TGCCGTTCTTCTGCTTGTTCGCCATGATGTACACGTTGTGGCTGTT  
GTAGTTGTACTCCAGCTTGTGGCCAGGATGTTGCCGTCCCTCCTTG  
AAGTCGATGCCCTTCAGCTCGATCCTGTTACCAGGGTGTCGCCC  
TCGAACTTCACCTCGGCCCTGGTCTTGTAGTTGCCGTCTCCTTGA  
AGAAGATGGTCCTCTCCTGCACGTAGCCCTCGGGCATGGCGCTCT  
TGAAGAAGTCGTGCTGCTTCATGTGGTCGGGGTACCTGCTGAAGC  
ACTGCACGCCGTAGGTCAGGGTGGTCACCAGGGTGGGCCAGGGC  
ACGGGCAGCTTGCCGGTGGTGCAGATGAACTTCAGGGTCAGCTTG  
CCGTAGGTGGCGTCGCCCTCGCCCTCGCCGCTCACGCTGAACTTG  
TGGCCGTTACGTCGCCGTCCAGCTCCACCAGGATGGGCACCACG  
CCGGTGAACAGCTCCTCGCCCTTGCTCACGGGGCCGGGGTTCTCC  
TCCACGTCGCCGGCCTGCTTCAGCAGGCTGAAGTTGGTGGCCAGG  
ATCCTCTCGCACAGCCTCCAGCCGGTCACGCCGTTGATGGTCACC  
CTGAACAGCAGGCTGCCGTCGGGGTTGATCAGCCTCTCGTCGATG  
ATCTTGTTGCCGTTCCACAGGGTGCCGGTCACGGTGATCTTCTTGC  
CGTCGAACACGGCGATGCCCTCGTAGGGCCTGCCGAAGTAGTCGA  
TCATGTTGGGGGTCACGCCGTCGATCACCAGGGTGCCGTAGTGCA  
GGATCACCTTGAAGTGGTGGTCGTCCACGGGGTACACCACCTTGA  
AAATCTTCTCGATCTGGCCATCTGGTCCCGCTCAGGCCCTCGTA  
GGGGATGATCACGTGGATGTTCGATCTTACAGGCCGTTCTCGCCGCT  
CAGCACGATCCTCTGGATGGGGGTCACGCTCACGCCAGGTTCTG

<p>GAACAGGCTGCTCACGCCGCCCTGCTCCAGCACCTGGTCCAGGTT GTAGCCGGCGGTCTGCCTCCAGTCGCCACGAAGTCCTCCAGGGT GAACACGGCCTCCTCGAAGCTGCACTTCTCCTCCATGCACTCCCTC TCCAGGTTGCCCTGCACGAACCTCCAGCTTGCCGCTGTTGTACC TCTTGGGCCTGTTTCAGGATCTTGTTGGCGTTCTCGTGGTCCAGGAA aactgtgaaacaggagagaaaaaccacacaacatatttaaagattgatgaagacaactaactgtaatgc tgetttttgttcttctcttcactgaccta (SEQ ID NO: 1550)</p>
---

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Двухнаправленная конструкция нуклеиновой кислоты, содержащая:

а) первый сегмент, содержащий первую кодирующую полипептид альфа-1-антитрипсина (ААТ) последовательность, причем частота использования кодонов в первой кодирующей полипептид ААТ последовательности отличается от частоты использования кодонов в гене *SERPINA1*; и

б) второй сегмент, содержащий обратный комплемент второй кодирующей полипептид ААТ последовательности, причем частота использования кодонов второй кодирующей полипептид ААТ последовательности отличается от частоты использования кодонов первой кодирующей полипептид ААТ последовательности и от частоты использования кодонов в гене *SERPINA1*;

при этом конструкция не содержит промотор, который управляет экспрессией либо первой кодирующей полипептид ААТ последовательности, либо второй кодирующей полипептид ААТ последовательности.

2. Двухнаправленная конструкция нуклеиновой кислоты по п. 1, отличающаяся тем, что второй сегмент находится 3' от первого сегмента.

3. Двухнаправленная конструкция нуклеиновой кислоты по п. 1 или п. 2, отличающаяся тем, что конструкция не содержит плеча гомологии.

4. Двухнаправленная конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-3, отличающаяся тем, что первый сегмент связан со вторым сегментом линкером.

5. Двухнаправленная конструкция нуклеиновой кислоты по п. 4, отличающаяся тем, что длина линкер составляет 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 500, 1000, 1500 или 2000 нуклеотидов.

6. Двухнаправленная конструкция нуклеиновой кислоты по п. 4 или п. 5, отличающаяся тем, что линкер является истощенным по CpG.

7. Двухнаправленная конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-6, отличающаяся тем, что каждый из первого и второго сегментов содержит хвостовую последовательность полиаденилирования, сигнальную последовательность полиаденилирования или сайт полиаденилирования.

8. Двухнаправленная конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-7, отличающаяся тем, что конструкция содержит акцепторный сайт сплайсинга.

9. Двухнаправленная конструкция по п. 8, отличающаяся тем, что акцепторный сайт сплайсинга содержит акцепторный сайт сплайсинга человека.

10. Двухнаправленная конструкция по п. 8, отличающаяся тем, что акцепторный сайт сплайсинга содержит мышинный акцепторный сайт сплайсинга.

11. Двухнаправленная конструкция нуклеиновой кислоты по п. 8, отличающаяся тем, что конструкция содержит первый акцепторный сайт сплайсинга выше первого сегмента и второй (обратный) акцепторный сайт сплайсинга ниже второго сегмента.

12. Двухнаправленная конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-11, отличающаяся тем, что конструкция является двухцепочечной, необязательно

двухцепочечной ДНК.

13. Двухнаправленная конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-12, отличающаяся тем, что конструкция является одноцепочечной, необязательно одноцепочечной ДНК.

14. Двухнаправленная конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-13, отличающаяся тем, что первая кодирующая полипептид ААТ последовательность или вторая кодирующая полипептид ААТ последовательность является кодон-оптимизированной.

15. Двухнаправленная конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-14, отличающаяся тем, что первая кодирующая последовательность является истощенной по CpG и вторая кодирующая последовательность является истощенной по CpG.

16. Двухнаправленная конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-15, отличающаяся тем, что конструкция содержит одну или более из следующих концевых структур: шпильку, петли, инвертированные концевые повторы (ITR) или тороид.

17. Двухнаправленная конструкция нуклеиновой кислоты по п. 16, отличающаяся тем, что концевая структура является истощенной по CpG.

18. Двухнаправленная конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-17, отличающаяся тем, что конструкция содержит один, два или три инвертированных концевых повтора (ITR).

19. Двухнаправленная конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-18, отличающаяся тем, что конструкция содержит не более двух ITR.

20. Двухнаправленная конструкция нуклеиновой кислоты по п. 19, отличающаяся тем, что как первая кодирующая полипептид ААТ последовательность, так и вторая кодирующая полипептид ААТ последовательность содержит по меньшей мере одно, по меньшей мере 2 или по меньшей мере 3 несовпадения с последовательностью гена *SERPINA1* дикого типа в пределах области кодирующей полипептид ААТ последовательности, соответствующей основаниям 1403-1425, необязательно основаниям 1418-1424 SEQ ID NO: 703.

21. Двухнаправленная конструкция нуклеиновой кислоты по пп. 1-20, отличающаяся тем, что как первая кодирующая полипептид ААТ последовательность, так и вторая кодирующая полипептид ААТ последовательность содержит по меньшей мере одно, по меньшей мере 2 или по меньшей мере 3 несовпадения с последовательностью гена *SERPINA1* дикого типа в пределах области кодирующей полипептид ААТ последовательности, соответствующей основаниям 1410-1436, необязательно основаниям 1423-1435 SEQ ID NO: 703.

22. Двухнаправленная конструкция нуклеиновой кислоты по пп. 1-21, отличающаяся тем, что как первая кодирующая полипептид ААТ последовательность, так и вторая кодирующая полипептид ААТ последовательность содержит по меньшей мере одно, по меньшей мере 2 или по меньшей мере 3 несовпадения с последовательностью гена *SERPINA1* дикого типа в пределах области кодирующей полипептид ААТ

последовательности, соответствующей основаниям 957-977, необязательно основаниям 970-976 SEQ ID NO: 703.

23. Двухнаправленная конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-22, отличающаяся тем, что как первая кодирующая полипептид ААТ последовательность, так и вторая кодирующая полипептид ААТ последовательность содержит по меньшей мере одно, по меньшей мере 2 или по меньшей мере 3 несовпадения с последовательностью гена SERPINA1 дикого типа в пределах области кодирующей полипептид ААТ последовательности, соответствующей основаниям 409-431, необязательно основаниям 409-410 и 415-418 SEQ ID NO: 703.

24. Двухнаправленная конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-23, отличающаяся тем, что как первая кодирующая полипептид ААТ последовательность, так и вторая кодирующая полипептид ААТ последовательность содержит по меньшей мере одно, по меньшей мере 2 или по меньшей мере 3 несовпадения с последовательностью гена SERPINA1 дикого типа в пределах области кодирующей полипептид ААТ последовательности, соответствующей основаниям 506-528, необязательно основаниям 519-522 и 527-528 SEQ ID NO: 703.

25. Двухнаправленная конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-24, отличающаяся тем, что как первая кодирующая полипептид ААТ последовательность, так и вторая кодирующая полипептид ААТ последовательность содержит по меньшей мере одно, по меньшей мере 2 или по меньшей мере 3 несовпадения с последовательностью гена SERPINA1 дикого типа в пределах области кодирующей полипептид ААТ последовательности, соответствующей основаниям 538-560, необязательно основаниям 551-554 и 559-560 SEQ ID NO: 703.

26. Двухнаправленная конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-25, отличающаяся тем, что как первая кодирующая полипептид ААТ последовательность, так и вторая кодирующая полипептид ААТ последовательность содержит по меньшей мере одно, по меньшей мере 2 или по меньшей мере 3 несовпадения с последовательностью гена SERPINA1 дикого типа в пределах области кодирующей полипептид ААТ последовательности, соответствующей по меньшей мере двум областям оснований, по меньшей мере трем областям оснований, по меньшей мере четырем областям оснований или всем пяти областям оснований 409-431, 506-528, 538-560, 957-977 и 1403-1436 SEQ ID NO: 703.

27. Двухнаправленная конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-26, отличающаяся тем, что первая кодирующая полипептид ААТ последовательность содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 771, 772, 781 и 782.

28. Двухнаправленная конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-27, отличающаяся тем, что вторая кодирующая полипептид ААТ последовательность содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 771, 772, 781 и 782.

29. Двухнаправленная конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-28, отличающаяся тем, что последовательность нуклеиновой кислоты двухнаправленной

конструкции нуклеиновой кислоты выбрана из: SEQ ID NO: 770, 780 и 1564.

30. Двухнаправленная конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-29, отличающаяся тем, что двухнаправленная конструкция кодирует полипептид, содержащий последовательность SEQ ID NO: 700 или 702.

31. Двухнаправленная конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-30, отличающаяся тем, что нуклеотидная последовательность двухнаправленной конструкции является истощенной по CpG.

32. Двухнаправленная конструкция нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-30, отличающаяся тем, что нуклеотидная последовательность двухнаправленной конструкции является истощенной по CpG, причем ITR не истощены по CpG.

33. Способ внесения последовательности нуклеиновой кислоты *SERPINA1* в клетку или популяцию клеток, включающий введение в клетку или популяцию клеток:

i) двухнаправленной конструкции нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-32;  
ii) РНК-направляемого ДНК-связывающего агента; и  
iii) направляющей РНК (нРНК) альбумина, содержащей последовательность, выбранную из:

a) последовательности, которая составляет по меньшей мере 95% SEQ ID NO: 2-33;  
b) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33;

c) последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33;

тем самым внося нуклеиновую кислоту *SERPINA1* в клетку или популяцию клеток.

34. Способ по п. 33, отличающийся тем, что клетка или популяция клеток включает клетку печени.

35. Способ по п. 34, отличающийся тем, что клетка печени представляет собой гепатоцит.

36. Способ увеличения секреции альфа-1-антитрипсина (ААТ) клеткой или популяцией клеток печени, включающий введение в клетку или популяцию клеток печени:

i) двухнаправленной конструкции нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-32;  
ii) РНК-направляемого ДНК-связывающего агента; и  
iii) направляющей РНК (нРНК) альбумина, содержащей последовательность, выбранную из:

a) последовательности, которая составляет по меньшей мере 95% SEQ ID NO: 2-33;  
b) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33;

c) последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33;

тем самым увеличивая секрецию ААТ клеткой или популяцией клеток печени.

37. Способ по п. 36, отличающийся тем, что клетка печени представляет собой гепатоцит.

38. Способ по любому из пп. 33-37, отличающийся тем, что клетка или популяция

клеток экспрессируют функциональный ААТ на уровне, который увеличен по меньшей мере на около 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% и 100% или более по сравнению с уровнем до введения.

39. Способ экспрессии альфа-1-антитрипсина (ААТ) у субъекта, включающий введение:

i) двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-32;  
ii) РНК-направляемого ДНК-связывающего агента; и  
iii) направляющей РНК (нРНК) альбумина, содержащей последовательность, выбранную из:

a) последовательности, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33;

b) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33;

c) последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33; тем самым экспрессируя ААТ у субъекта.

40. Способ лечения дефицита альфа-1-антитрипсина (ААТД) у субъекта, включающий введение:

i) двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-32;  
ii) РНК-направляемого ДНК-связывающего агента; и  
iii) направляющей РНК (нРНК) альбумина, содержащей последовательность, выбранную из:

a) последовательности, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33;

b) по меньшей мере 17, 18, 19 или 20 смежных нуклеотидов последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33;

c) последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2-33; тем самым обеспечивая лечение ААТД у субъекта.

41. Способ по п. 39 или 40, отличающийся тем, что:

(a) уровень функционального ААТ у субъекта увеличен по меньшей мере до около 500 мкг/мл; или

(b) уровень функционального ААТ у субъекта увеличен по меньшей мере на около 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% или более по сравнению с уровнем функционального ААТ у субъекта до введения.

42. Способ по п. 41, отличающийся тем, что уровень функционального ААТ у субъекта сохраняется в течение по меньшей мере года после введения.

43. Способ по п. 41 или п. 42, отличающийся тем, что уровень ААТ измеряют в сыворотке или плазме.

44. Способ по п. 43, отличающийся тем, что уровень ААТ в сыворотке составляет по меньшей мере 500 мкг/мл, по меньшей мере 571 мкг/мл, по меньшей мере 750 мкг/мл, по меньшей мере 1000 мкг/мл, 500-4000 мкг/мл, 500- 3500 мкг/мл, 750-3500 мкг/мл, 1000-

3500 мкг/мл, 1000-3000 мкг/мл или 1000-2700 мкг/мл.

45. Способ по п. 44, отличающийся тем, что уровень измеряют по меньшей мере через 8 недель, по меньшей мере через 9 недель, по меньшей мере через 10 недель, по меньшей мере через 11 недель или по меньшей мере через 12 недель после введения двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты.

46. Способ по любому из пп. 39-45, отличающийся тем, что у субъекта нарушена функция печени или легких.

47. Способ по любому из пп. 39-46, отличающийся тем, что введение замедляет прогрессирование эмфиземы у субъекта.

48. Способ по любому из пп. 33-47, отличающийся тем, что способ дополнительно включает снижение экспрессии эндогенного гена *SERPINA1* без значительного снижения экспрессии кодирующих полипептид ААТ последовательностей двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты.

49. Способ по п. 48, отличающийся тем, что способ включает введение терапевтического агента на основе нуклеиновой кислоты, нацеленного на эндогенный ген *SERPINA1*.

50. Способ по п. 49, отличающийся тем, что терапевтический агент на основе нуклеиновой кислоты, нацеленный на эндогенный ген *SERPINA1*, представляет собой кРНК, дцРНК или направляющую РНК.

51. Способ по п. 50, отличающийся тем, что терапевтический агент на основе нуклеиновой кислоты, нацеленный на эндогенный ген *SERPINA1*, выбран из агента РНКи, нацеленного на нуклеотиды 957-977, 1403-1425 или 1410-1436 SEQ ID NO: 703, и направляющей РНК, нацеленной на эндогенный ген *SERPINA1* в положении, соответствующем нуклеотидам 412-431, 506-525 или 538-557 SEQ ID NO: 703.

52. Способ по любому из пп. 33-51, отличающийся тем, что способ дополнительно включает индукцию двухцепочечного разрыва (DSB) в эндогенном гене *SERPINA1*.

53. Способ по п. 52, отличающийся тем, что способ включает индукцию двухцепочечного разрыва (DSB) в эндогенном гене *SERPINA1* в положении, соответствующем нуклеотидам 412-431, 506-525 или 538-557 SEQ ID NO: 703.

54. Способ по любому из пп. 33-51, отличающийся тем, что способ дополнительно включает модификацию эндогенного гена *SERPINA1*.

55. Способ по любому из пп. 52-54, отличающийся тем, что DSB индуцируют в эндогенном гене *SERPINA1* или эндогенный ген *SERPINA1* модифицируют после контакта с клеткой или популяцией клеток или введения субъекту двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты.

56. Способ по любому из пп. 33-55, отличающийся тем, что агент на основе нуклеиновой кислоты, нацеленный на эндогенный ген *SERPINA1*, представляет собой направляющую РНК *SERPINA1*, которая по меньшей мере частично комплементарна целевой последовательности, присутствующей в экзоне 2, 3, 4 или 5 эндогенного гена *SERPINA1* человека, и которая не нацелена ни на первую кодирующую полипептид ААТ

последовательность, ни на вторую кодирующую полипептид AAT последовательность.

57. Способ по любому из пп. 33-55, отличающийся тем, что агент на основе нуклеиновой кислоты, нацеленный на эндогенный ген *SERPINA1*, представляет собой направляющую РНК *SERPINA1*, которая по меньшей мере частично комплементарна целевой последовательности в пределах эндогенного гена *SERPINA1* в положении, соответствующем нуклеотидам 412-431, 506-525 или 538-557 SEQ ID NO: 703.

58. Способ по п. 56 или п. 57, отличающийся тем, что направляющая РНК *SERPINA1* содержит:

направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1129-1131;

направляющую последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 1129-1131; или

17, 18, 19 или 20 последовательных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1129-1131.

59. Способ по любому из пп. 33-58, отличающийся тем, что введение осуществляют *in vivo*.

60. Способ по любому из пп. 33-59, отличающийся тем, что конструкцию нуклеиновой кислоты вводят в векторе нуклеиновой кислоты или липидной наночастице.

61. Способ по любому из пп. 33-60, отличающийся тем, что РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нРНК альбумина доставляют или вводят в векторе нуклеиновой кислоты или липидной наночастице.

62. Способ по любому из пп. 33-61, отличающийся тем, что РНК-направляемый ДНК-связывающий агент или нРНК *SERPINA1* доставляют или вводят в векторе нуклеиновой кислоты или липидной наночастице.

63. Способ по п. 62, отличающийся тем, что вектор нуклеиновой кислоты представляет собой вирусный вектор.

64. Способ по п. 63, отличающийся тем, что вирусный вектор выбран из группы, состоящей из аденоассоциированного вирусного (AAV) вектора, аденовирусного вектора, ретровирусного вектора и лентивирусного вектора.

65. Способ по п. 64, отличающийся тем, что вектор AAV выбран из группы, состоящей из AAV1, AAV2, AAV3, AAV3B, AAV4, AAV5, AAV6, AAV6.2, AAV7, AAVrh.64R1, AAVhu.37, AAVrh.8, AAVrh.32.33, AAV8, AAV9, AAV-DJ, AAV2/8, AAVrh10, AAVLK03, AV10, AAV11, AAV12, rh10 и их гибридов.

66. Способ по любому из пп. 33-65, отличающийся тем, что РНК-направляемый ДНК-связывающий агент представляет собой нуклеазу Cas класса 2.

67. Способ по п. 66, в котором нуклеаза Cas представляет собой нуклеазу Cas9.

68. Способ по п. 67, отличающийся тем, что нуклеаза Cas9 представляет собой нуклеазу Cas9 *S. pyogenes*.

69. Способ по любому из пп. 66-68, отличающийся тем, что нуклеаза Cas представляет собой кливазу.

70. Вектор, содержащий конструкцию по любому из пп. 1-32.

71. Вектор по п. 70, отличающийся тем, что вектор представляет собой аденоассоциированный вирусный (AAV) вектор.

72. Вектор по п. 71, отличающийся тем, что AAV содержит одноцепочечный геном (ssAAV) или самокомплементарный геном (scAAV).

73. Вектор по п. 71 или п. 72, отличающийся тем, что вектор AAV выбран из группы, состоящей из AAV1, AAV2, AAV3, AAV3B, AAV4, AAV5, AAV6, AAV6.2, AAV7, AAVrh.64R1, AAVhu.37, AAVrh.8, AAVrh.32.33, AAV8, AAV9, AAV-DJ, AAV2/8, AAVrh10, AAVLK03, AV10, AAV11, AAV12, rh10 и их гибридов.

74. Вектор по любому из пп. 70-73, отличающийся тем, что вектор не содержит плеча гомологии.

75. Вектор по любому из пп. 70-74, отличающийся тем, что вектор является истощенным по CpG.

76. Липидная наночастица, содержащая двунаправленную конструкцию нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-32.

77. Клетка-хозяин, содержащая двунаправленную конструкцию нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-32.

78. Клетка-хозяин по п. 77, отличающаяся тем, что клетка-хозяин представляет собой клетку печени.

79. Клетка-хозяин по п. 78, отличающаяся тем, что клетка-хозяин представляет собой гепатоцит.

80. Клетка-хозяин по любому из пп. 77-79, отличающаяся тем, что клетка-хозяин относится к типу неделящихся клеток.

81. Клетка-хозяин по любому из пп. 77-80, отличающаяся тем, что клетка-хозяин экспрессирует полипептид ААТ, кодируемый двунаправленной конструкцией.

82. Способ снижения экспрессии эндогенного альфа-1-антитрипсина (ААТ) у субъекта, включающий двунаправленную конструкцию нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-32, при этом способ включает введение субъекту агента на основе нуклеиновой кислоты, нацеленного на эндогенный ген *SERPINA1*, который снижает экспрессию эндогенного гена *SERPINA1* без значительного снижения экспрессии кодирующих полипептид ААТ последовательностей двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты.

83. Способ по п. 82, отличающийся тем, что агент на основе нуклеиновой кислоты, нацеленный на эндогенный ген *SERPINA1*, представляет собой киРНК, дцРНК или направляющую РНК.

84. Способ по п. 83, отличающийся тем, что терапевтический агент на основе нуклеиновой кислоты, нацеленный на эндогенный ген *SERPINA1*, выбран из агента РНКи, нацеленного на нуклеотиды 957-977, 1403-1425 или 1410-1436 SEQ ID NO: 703, и направляющей РНК, нацеленной на эндогенный ген *SERPINA1* в положении, соответствующем нуклеотидам 412-431, 506-525 или 538-557 SEQ ID NO: 703.

85. Способ по любому из пп. 82-84, отличающийся тем, что способ включает

индукцию двухцепочечного разрыва (DSB) в эндогенном гене *SERPINA1*.

86. Способ по п. 85, отличающийся тем, что способ включает индукцию двухцепочечного разрыва (DSB) в эндогенном гене *SERPINA1* в положении, соответствующем нуклеотидам 412-431, 506-525 или 538-557 SEQ ID NO: 703.

87. Способ по любому из пп. 82-86, отличающийся тем, что способ включает модификацию эндогенного гена *SERPINA1*.

88. Способ по любому из пп. 82-87, отличающийся тем, что агент на основе нуклеиновой кислоты, нацеленный на ген *SERPINA1*, представляет собой направляющую РНК *SERPINA1*, которая по меньшей мере частично комплементарна целевой последовательности, присутствующей в экзоне 2, 3, 4 или 5 эндогенного гена *SERPINA1* человека, и которая не нацелена ни на первую кодирующую полипептид ААТ последовательность, ни на вторую кодирующую полипептид ААТ последовательность.

89. Способ по любому из пп. 82-88, отличающийся тем, что агент на основе нуклеиновой кислоты, нацеленный на ген *SERPINA1*, представляет собой направляющую РНК *SERPINA1*, которая по меньшей мере частично комплементарна целевой последовательности в пределах эндогенного гена *SERPINA1* в положении, соответствующем нуклеотидам 412-431, 506-525 или 538-557 SEQ ID NO: 703.

90. Способ по п. 88 или п. 89, отличающийся тем, что направляющая РНК *SERPINA1* содержит:

направляющую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1129-1131;

направляющую последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 1129-1131; или

17, 18, 19 или 20 последовательных нуклеотидов последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1129-1131.

91. Способ по любому из пп. 82-90, отличающийся тем, что способ дополнительно включает снижение экспрессии эндогенного гена *SERPINA1* без значительного снижения экспрессии кодирующих полипептид ААТ последовательностей двунаправленной конструкции нуклеиновой кислоты.

92. Способ по любому из пп. 82-91, отличающийся тем, что у субъекта наблюдается повышенный уровень ферментов печени.

93. Способ по п. 92, отличающийся тем, что у субъекта уровень одного или более ферментов печени превышает верхнюю границу нормы (ВГН) по меньшей мере в 3 раза.

94. Способ по п. 93, отличающийся тем, что один или более ферментов печени выбраны из аланинаминотрансферазы (ALT) и аспартатаминотрансферазы (AST).

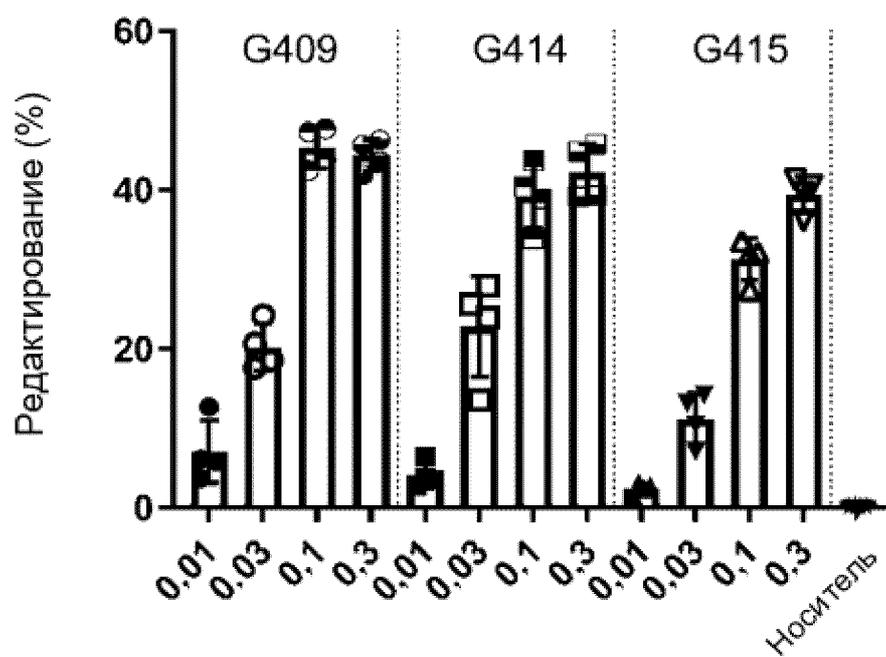
95. Способ по любому из пп. 82-94, отличающийся тем, что способ приводит к клинически значимому снижению уровня ферментов печени.

96. Способ по любому из пп. 82-94, отличающийся тем, что лечение приводит к снижению повышенного уровня ферментов печени в пределах 3 раз от ВГН.

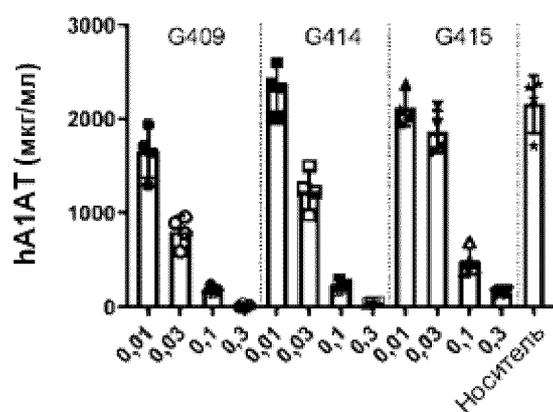
97. Способ по любому из пп. 82-96, отличающийся тем, что способ приводит к лечению или профилактике фиброза печени у субъекта.



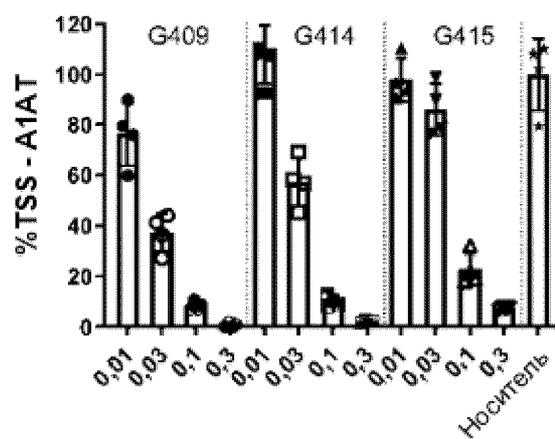
Фиг. 1



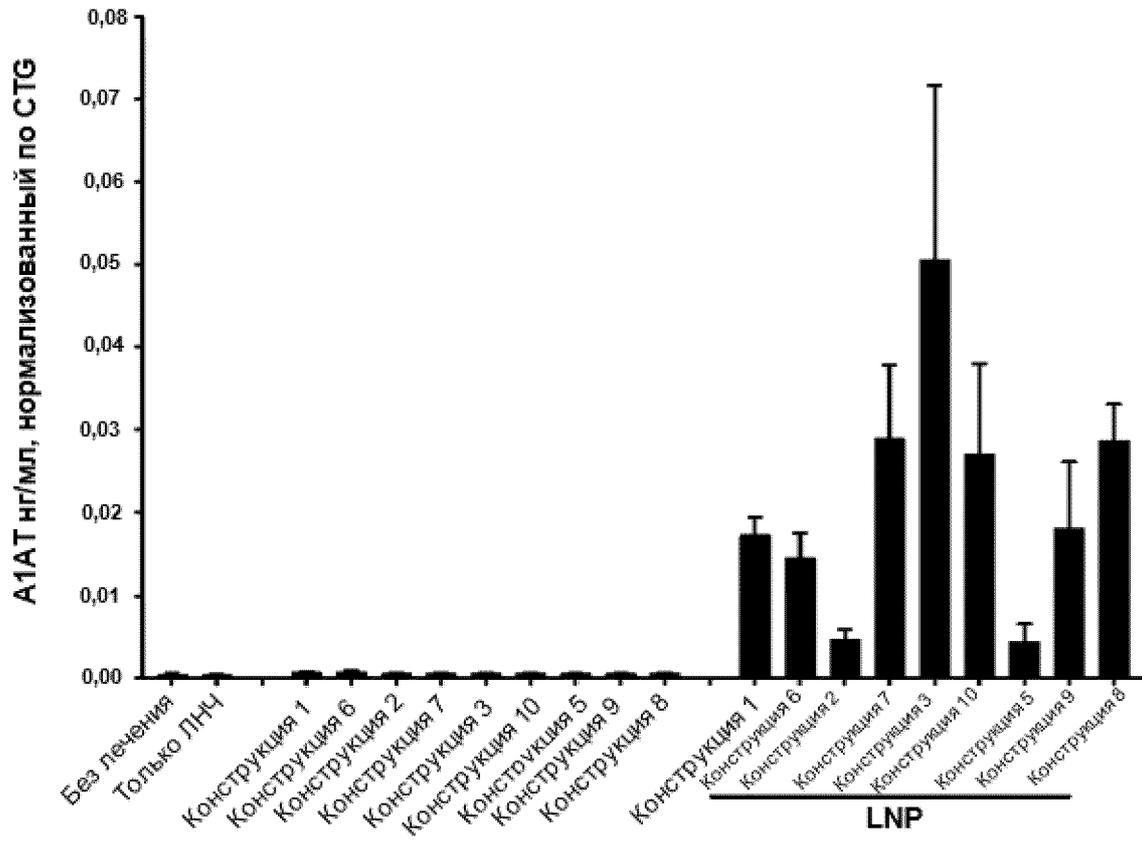
Фиг. 2А



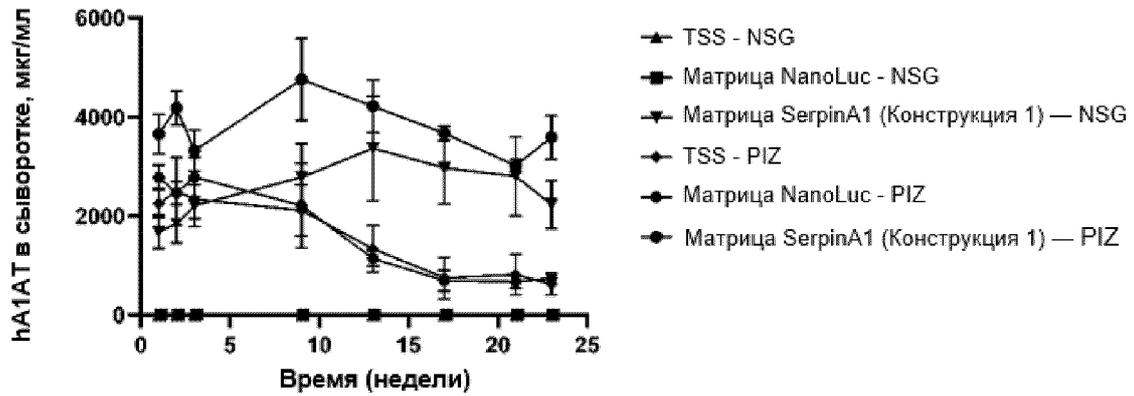
Фиг. 2В



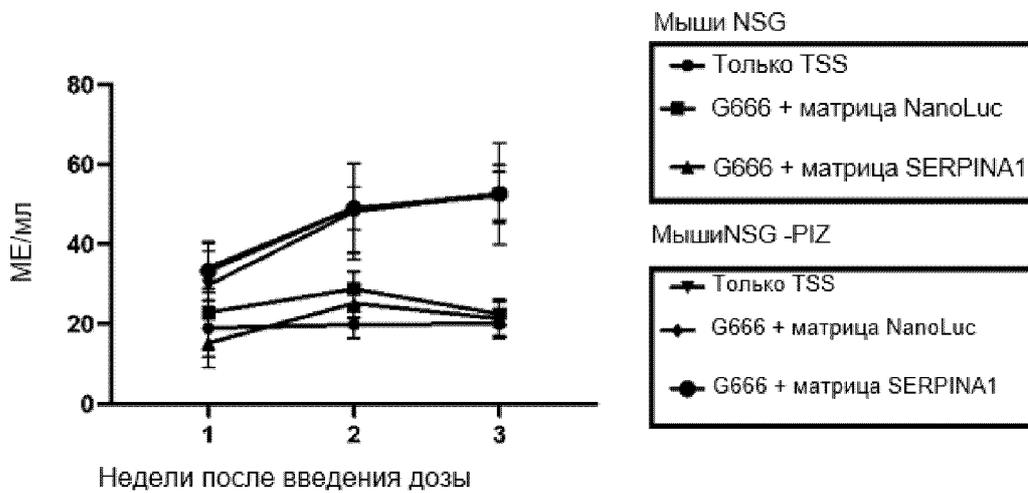
Фиг. 3



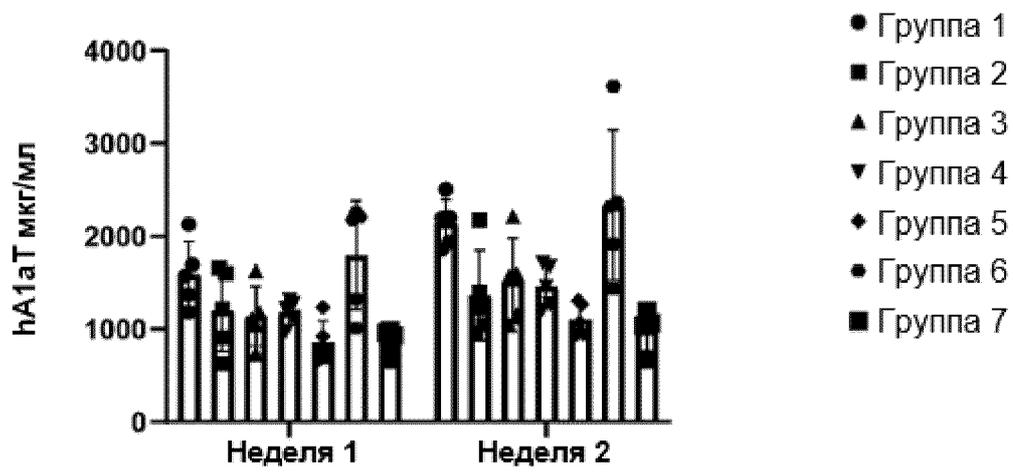
Фиг. 4А



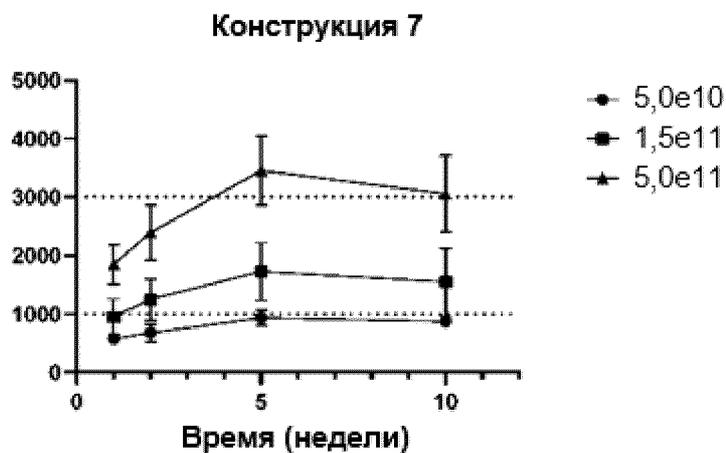
Фиг. 4В



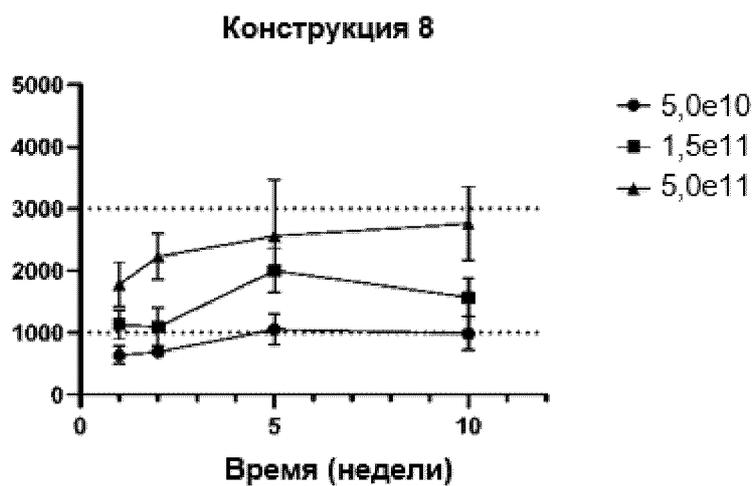
Фиг. 5



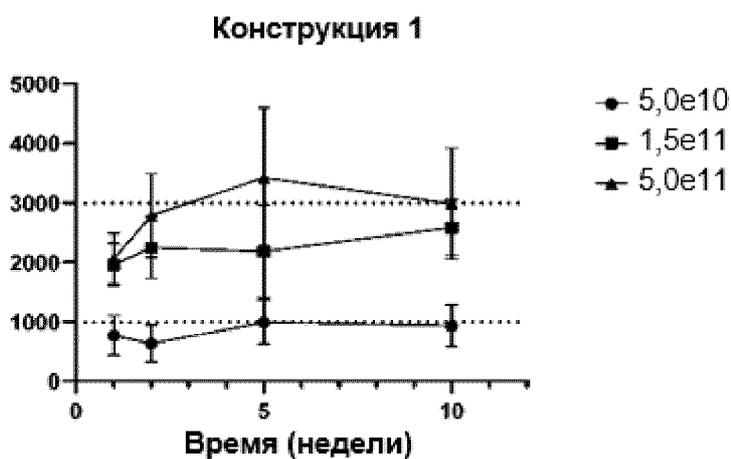
Фиг. 6А



Фиг. 6В

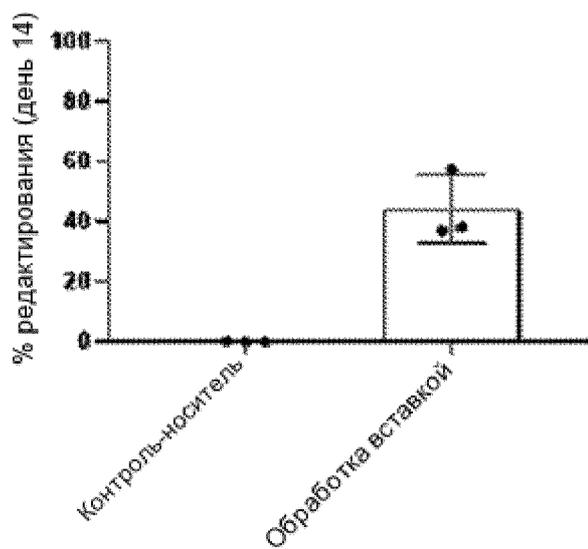


Фиг. 6С



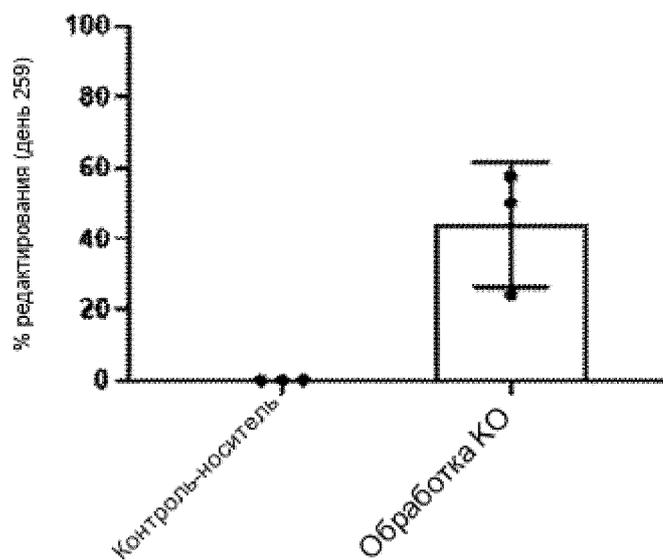
Фиг. 7

**Редактирование локуса альбумина  
яванского макака после обработки  
вставкой**

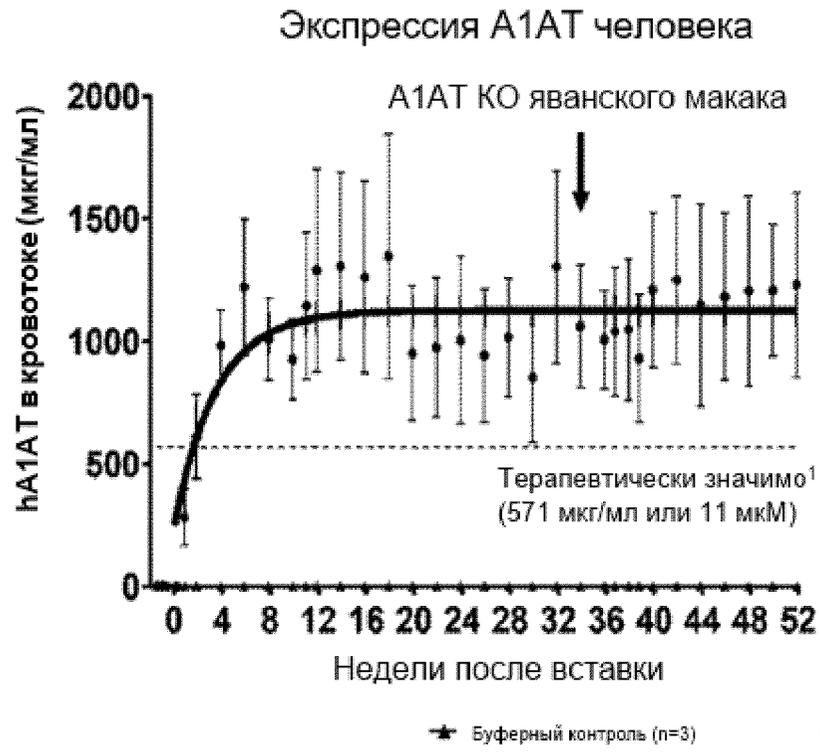


Фиг. 8

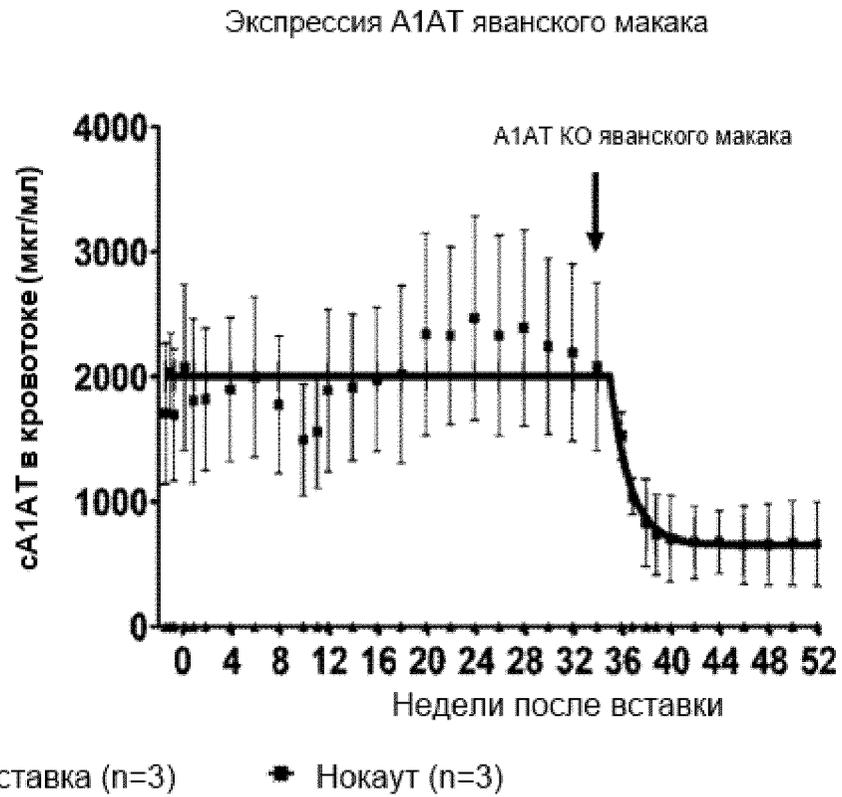
**Редактирование локуса SERPINA1  
яванского макака после обработки КО**



Фиг. 9А

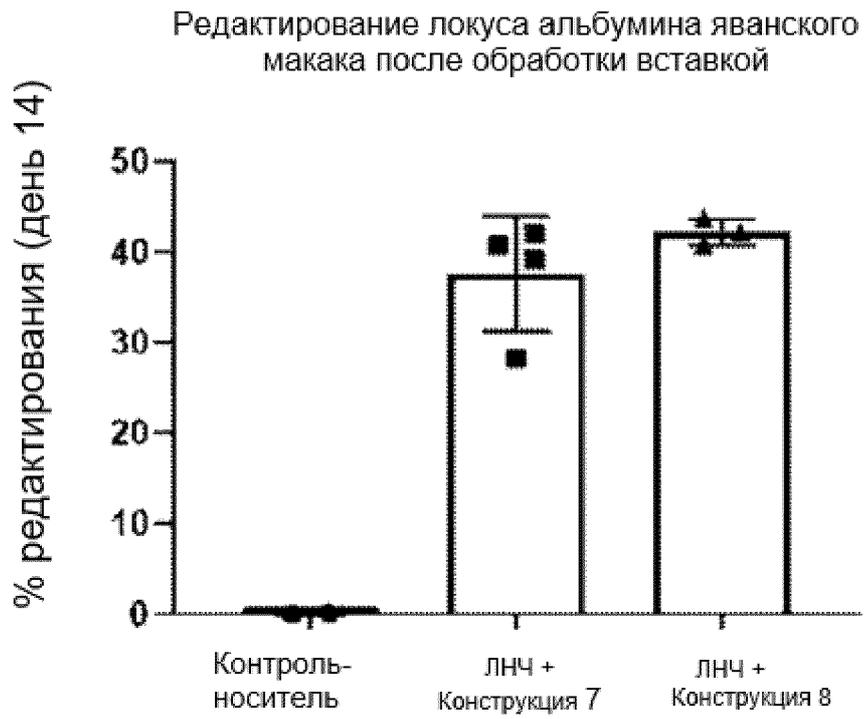


Фиг. 9В

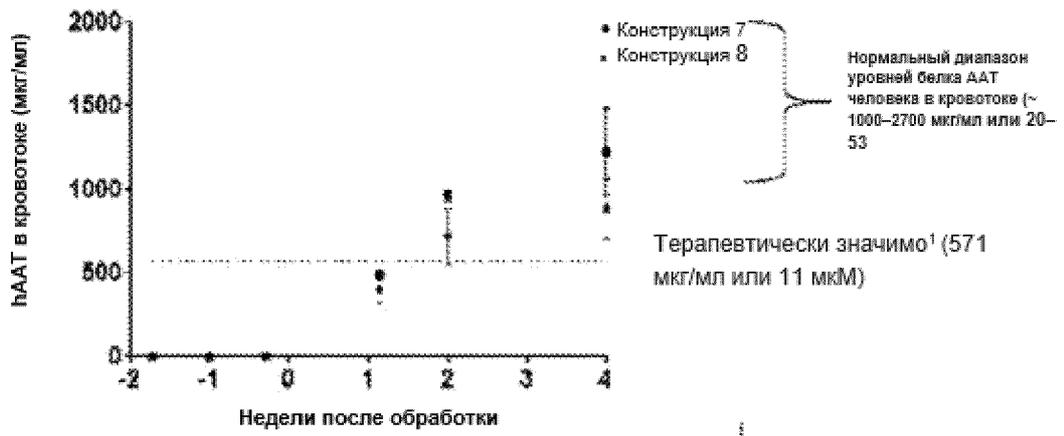


<sup>1</sup> Stoller & Abcussouan The Lancet, 2005

Фиг. 10

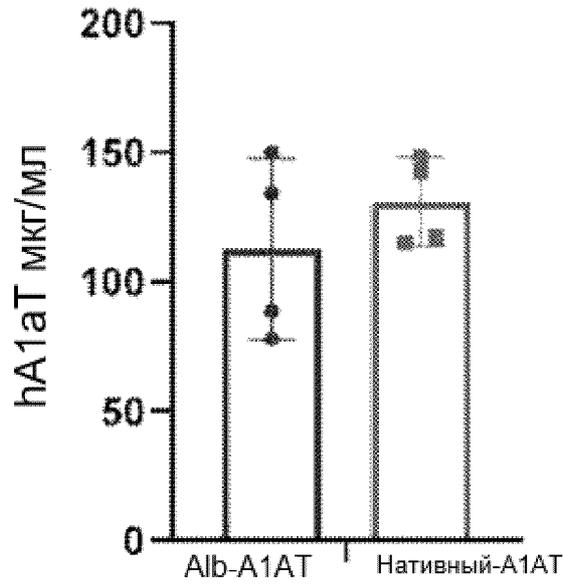


Фиг. 11

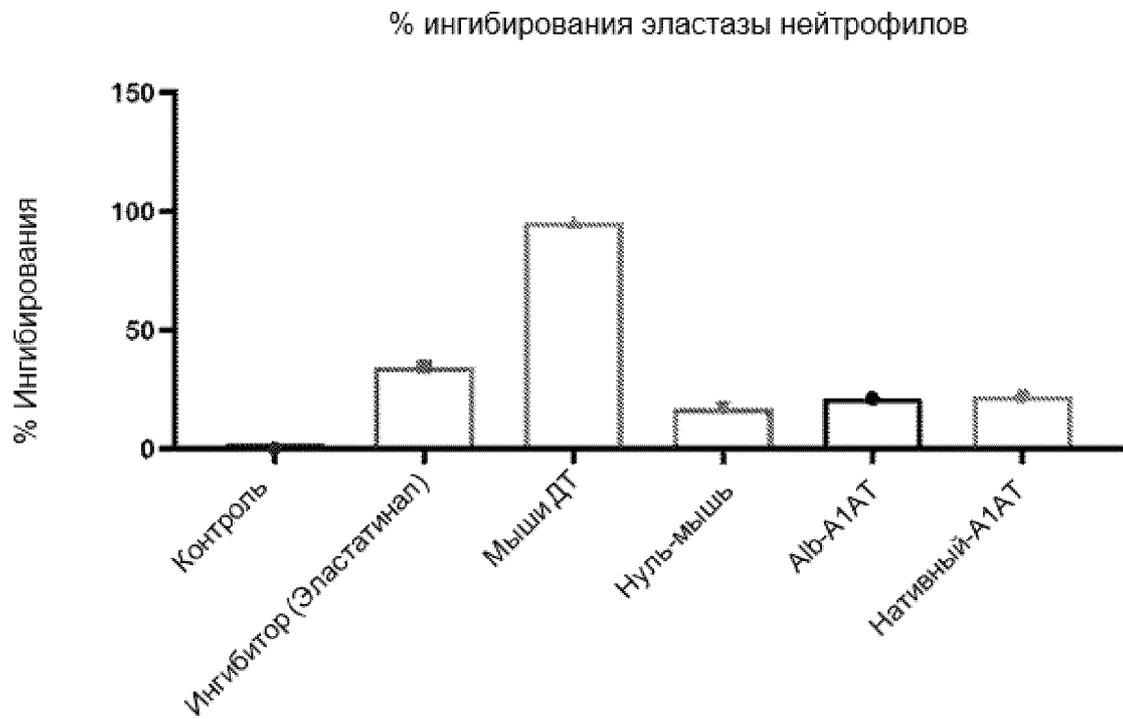


<sup>1</sup> Stoller & Aboussouan The Lancet, 2005.

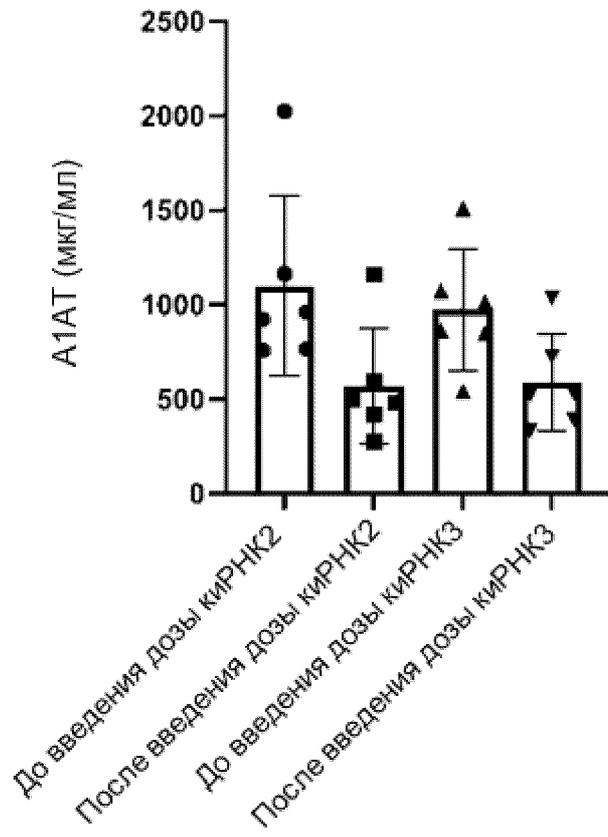
Фиг. 12А



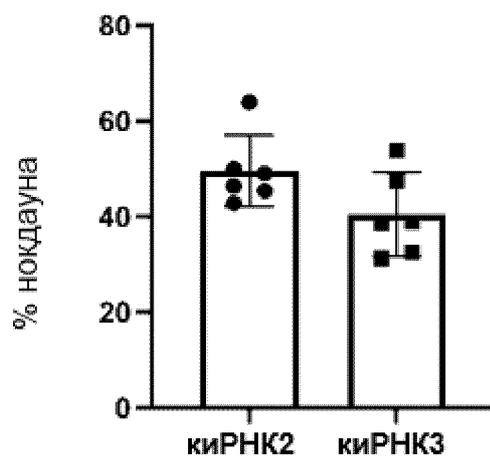
Фиг. 12В



Фиг. 13А



Фиг. 13В



Фиг. 14

