



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C12Y 301/00 (2013.01); C12N 15/01 (2013.01); C12N 15/52 (2013.01); C12N 15/63 (2013.01); C12N 15/85 (2013.01); C12N 15/86 (2013.01); C12N 15/79 (2013.01); C12N 15/902 (2013.01); C12N 15/1082 (2013.01); C12N 9/16 (2013.01); C12N 9/22 (2013.01); C12Q 1/6806 (2013.01)

(21)(22) Заявка: 2015128098, 12.12.2013

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
12.12.2013Дата регистрации:
01.10.2019

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:

12.12.2012 US 61/736,527;
02.01.2013 US 61/748,427;
30.01.2013 US 61/758,468;
25.02.2013 US 61/769,046;
15.03.2013 US 61/791,409;
15.03.2013 US 61/802,174;
28.03.2013 US 61/806,375;
20.04.2013 US 61/814,263;
06.05.2013 US 61/819,803;
28.05.2013 US 61/828,130;

(см. прод.)

(43) Дата публикации заявки: 28.03.2019 Бюл. № 10

(45) Опубликовано: 01.10.2019 Бюл. № 28

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 13.07.2015

(86) Заявка РСТ:
US 2013/074819 (12.12.2013)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2014/093712 (19.06.2014)Адрес для переписки:
109012, Москва, ул. Ильинка, 5/2, ООО
"Союзпатент"

(72) Автор(ы):

ЧЖАН Фэн (US),
ЦУН Лэ (US),
ХСЮ Патрик (US),
РАН Фэй (US)

(73) Патентообладатель(и):

ТЕ БРОД ИНСТИТЮТ, ИНК. (US),
МАССАЧУСЕТС ИНСТИТЮТ ОФ
ТЕКНОЛОДЖИ (US),
ПРЕЗИДЕНТ ЭНД ФЕЛЛОУЗ ОФ
ХАРВАРД КОЛЛИДЖ (US)

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: Dana Carrall et al. A CRISPR Approach to Gene Targeting, Mol. Ther., 2012 ser. 4; 20(9): 1658-1660. RU 2009136452 A, 10.04.2011.

(54) КОНСТРУИРОВАНИЕ СИСТЕМ, СПОСОБЫ И ОПТИМИЗИРОВАННЫЕ НАПРАВЛЯЮЩИЕ КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ МАНИПУЛЯЦИИ С ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЯМИ

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии.

Описана система CRISPR-Cas для редактирования

генома в эукариотической клетке, содержащая: белок Cas9, содержащий по меньшей мере одну последовательность ядерной локализации, и химерную РНК (chiRNA) системы CRISPR-Cas, содержащую: (а) направляющую последовательность, способную гибридизоваться с целевой последовательностью в эукариотической клетке, (b) парную tracr-последовательность, способную гибридизоваться с tracr-последовательностью, и (с) tracr-последовательность, где (а), (b) и (с) расположены в 5'-3' ориентации, где одна или несколько из направляющей, tracr- и парной tracr-последовательностей модифицированы для повышения стабильности и где необязательно белок Cas9 образует комплекс с химерной РНК (chiRNA) системы CRISPR-Cas. Представлена векторная система CRISPR-Cas для модификации целевой последовательности в эукариотической клетке, содержащая один или несколько векторов, содержащих: I. первый регуляторный элемент, функционально связанный с нуклеотидной

последовательностью, кодирующей химерную РНК (chiRNA) системы CRISPR-Cas, содержащую: (а) направляющую последовательность, способную гибридизоваться с целевой последовательностью в эукариотической клетке, (b) парную tracr-последовательность, способную гибридизоваться с tracr-последовательностью, и (с) tracr-последовательность, где (а), (b) и (с) расположены в 5'-3' ориентации, и II. второй регуляторный элемент, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей белок Cas9, содержащий по меньшей мере одну последовательность ядерной локализации, где компоненты I и II находятся в одном и том же или в разных векторах системы, где одна или несколько из направляющей, tracr- и парной tracr-последовательностей модифицированы для повышения стабильности. Изобретение расширяет арсенал средств, контролирующей экспрессию. 2 н. и 47 з.п. ф-лы, 23 ил., 4 табл., 8 пр.

(30) (продолжение):
US61/835,93117.06.2013;
US61/836,12717.06.2013

R U 2 7 0 1 8 5 0 C 2

R U 2 7 0 1 8 5 0 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

C12Y 301/00 (2013.01); C12N 15/01 (2013.01); C12N 15/52 (2013.01); C12N 15/63 (2013.01); C12N 15/85 (2013.01); C12N 15/86 (2013.01); C12N 15/79 (2013.01); C12N 15/902 (2013.01); C12N 15/1082 (2013.01); C12N 9/16 (2013.01); C12N 9/22 (2013.01); C12Q 1/6806 (2013.01)

(21)(22) Application: **2015128098, 12.12.2013**

(24) Effective date for property rights:
12.12.2013

Registration date:
01.10.2019

Priority:

(30) Convention priority:
12.12.2012 US 61/736,527;
02.01.2013 US 61/748,427;
30.01.2013 US 61/758,468;
25.02.2013 US 61/769,046;
15.03.2013 US 61/791,409;
15.03.2013 US 61/802,174;
28.03.2013 US 61/806,375;
20.04.2013 US 61/814,263;
06.05.2013 US 61/819,803;
28.05.2013 US 61/828,130;

(to be continued)

(43) Application published: **28.03.2019 Bull. № 10**

(45) Date of publication: **01.10.2019 Bull. № 28**

(85) Commencement of national phase: **13.07.2015**

(86) PCT application:
US 2013/074819 (12.12.2013)

(87) PCT publication:
WO 2014/093712 (19.06.2014)

Mail address:
109012, Moskva, ul. Ilinka, 5/2, OOO "Soyuzpatent"

(72) Inventor(s):

**CHZHAN Fen (US),
TSUN Le (US),
KHSYU Patrik (US),
RAN Fej (US)**

(73) Proprietor(s):

**TE BROD INSTITYUT, INK. (US),
MASSACHUSETTS INSTITYUT OF
TEKNOLODZHI (US),
PREZIDENT END FELLOUZ OF
KHARVARD KOLLIDZH (US)**

(54) **DESIGNING SYSTEMS, METHODS AND OPTIMIZED GUIDE COMPOSITIONS FOR MANIPULATING SEQUENCES**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnologies.

SUBSTANCE: invention relates to the biotechnology. Described is a CRISPR-Cas system for

editing a genome in a eukaryotic cell, comprising: Cas9 protein containing at least one nuclear localization sequence, and a chimeric RNA (chiRNA) of the

CRISPR-Cas system, comprising: (a) a guide sequence capable of hybridising with a target sequence in a eukaryotic cell, (b) a paired tracr sequence capable of hybridising with the tracr-sequence, and (c) tracr-sequence, where (a), (b) and (c) are located in 5'-3' orientation, where one or more of the tracr- and paired tracr-sequence guides are modified to increase stability and where optionally a protein Cas9 forms a complex with chimeric RNA (chiRNA) of the CRISPR-Cas system. Also presented is the CRISPR-Cas vector system for modifying the target sequence in a eukaryotic cell containing one or more vectors containing: I. a first regulatory element operably linked to a nucleotide sequence encoding a chimeric RNA (chiRNA) of the CRISPR-Cas system, comprising: (a) a guide sequence

capable of hybridising with a target sequence in a eukaryotic cell, (b) a paired tracr sequence capable of hybridising with a tracr sequence, and (c) a tracr sequence, where (a), (b) and (c) are located in 5'-3' orientation, and II. a second regulatory element operably linked to a nucleotide sequence encoding a Cas9 protein comprising at least one nuclear localization sequence, where components I and II are in the same or different vectors of the system, where one or more of the tracr- and paired tracr-sequences are modified to increase stability.

EFFECT: invention extends the range of products which control expression.

49 cl, 23 dwg, 4 tbl, 8 ex

(30) Convention priority:
US61/835,93117.06.2013;
US61/836,12717.06.2013

R U 2 7 0 1 8 5 0 C 2

R U 2 7 0 1 8 5 0 C 2

Родственные заявки и включение при помощи ссылки

Данная заявка заявляет приоритет предварительной заявки на патент США 61/836127, озаглавленной "КОНСТРУИРОВАНИЕ СИСТЕМ, СПОСОБЫ И ОПТИМИЗИРОВАННЫЕ КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ МАНИПУЛЯЦИИ С ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЯМИ" (ENGINEERING OF SYSTEMS, METHODS AND OPTIMIZED COMPOSITIONS FOR SEQUENCE MANIPULATION), поданной 17 июня 2013 г. Данная заявка также заявляет приоритет предварительных заявок на патент США 61/758468; 61/769046; 61/802174; 61/806375; 61/814263; 61/819803 и 61/828130, каждая из которых озаглавлена "КОНСТРУИРОВАНИЕ И ОПТИМИЗАЦИЯ СИСТЕМ, СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ МАНИПУЛЯЦИИ С ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЯМИ" (ENGINEERING AND OPTIMIZATION OF SYSTEMS, METHODS AND COMPOSITIONS FOR SEQUENCE MANIPULATION), поданных 30 января 2013 г.; 25 февраля 2013 г.; 15 марта 2013 г.; 28 марта 2013 г.; 20 апреля 2013 г.; 6 мая 2013 г. и 28 мая 2013 г., соответственно. Также заявляется приоритет предварительных заявок на патент США 61/736527 и 61/748427, обе из которых озаглавлены "СИСТЕМЫ, СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ МАНИПУЛЯЦИИ С ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЯМИ" (SYSTEMS METHODS AND COMPOSITIONS FOR SEQUENCE MANIPULATION), поданных 12 декабря 2012 г. и 2 января 2013 г., соответственно. Также заявляется приоритет предварительных заявок на патент США 61/791409 и 61/835931, обе из которых озаглавлены WI-2011/008/44790.02.2003 и WI-2011/008/44790.03.2003, поданных 15 марта 2013 г. и 17 июня 2013 г., соответственно.

Также делается ссылка на предварительные заявки на патент США 61/835936, 61/836101, 61/836080, 61/836123 и 61/835973, каждая из которых подана 17 июня 2013 г.

Вышеприведенные заявки и все документы, цитируемые в них или во время их рассмотрения ("цитируемые документы заявки"), и все документы, цитируемые или упомянутые в цитируемых документах заявки, и все документы, цитируемые или упомянутые в данном документе ("документы, цитируемые в данном документе"), и все документы, цитируемые или упомянутые в документах, цитируемых в данном документе, совместно с любыми инструкциями изготовителя, описаниями, характеристиками продукта и технологическими картами для любых продуктов, упомянутых в данном документе или в любом документе, включенном с помощью ссылки в данный документ, таким образом, включены в данный документ с помощью ссылки и могут быть использованы в практическом осуществлении настоящего изобретения. Более конкретно, все документы, на которые ссылаются, включены при помощи ссылки в такой же мере, как если бы конкретно и отдельно было указано, что каждый отдельный документ включен при помощи ссылки.

Область техники

Настоящее изобретение в целом относится к системам, способам и композициям, применяемым для контроля экспрессии генов, включающего целенаправленное воздействие на последовательность, такое как внесение изменений в геном или редактирование гена, при котором можно использовать векторные системы, близкие к коротким палиндромным повторам, регулярно расположенным группами, (CRISPR) и их компонентам.

Утверждение касательно финансируемого из федерального бюджета исследования Настоящее изобретение было разработано при правительственной поддержке, выданной Национальными институтами здравоохранения, NIH Pioneer Award DP1MH100706. Правительство обладает определенными правами на настоящее изобретение.

Предпосылки изобретения

Недавние достижения в технологиях секвенирования генома и способах анализа значительно ускорили возможность каталогизации и картирования генетических факторов, ассоциированных с широким разнообразием биологических функций и заболеваний. Технологии точного целенаправленного воздействия на геном необходимы для обеспечения систематического обратного конструирования казуальных генетических изменений путем обеспечения возможности селективного внесения изменений в отдельные генетические элементы, а также для продвижения применений в области синтетической биологии, биотехнологии и медицины. Несмотря на то, что технологии редактирования генома, такие как конструктор доменов "цинковые пальцы", подобные транскрипционным активаторам эффекторы (TALE) или хоминг мегануклеазы, доступны для осуществления внесения изменений в целевой геном, все еще существует необходимость в новых технологиях конструирования генома, которые являются доступными, простыми в осуществлении, масштабируемыми и характеризуются возможностью целенаправленного воздействия на несколько положений в эукариотическом геноме.

Краткое описание изобретения

Существует актуальная необходимость в альтернативных и функциональных системах и технологиях для целенаправленного воздействия на последовательность с широким спектром применений. Настоящее изобретение удовлетворяет этой необходимости и предусматривает связанные с этим преимущества. CRISPR/Cas или система CRISPR-Cas (оба выражения используют взаимозаменяемо по всей данной заявке) не предусматривает получение индивидуализированных белков для целенаправленного воздействия на конкретные последовательности, но скорее один фермент Cas может быть запрограммирован короткой молекулой РНК для узнавания специфичной ДНК-мишени, другими словами, фермент Cas может связываться со специфичной ДНК-мишенью при помощи указанной короткой молекулы РНК. Добавление системы CRISPR-Cas к спектру технологий секвенирования генома и способов анализа может значительно упростить методику и ускорить возможность каталогизации и картирования генетических факторов, ассоциированных с широким разнообразием биологических функций и заболеваний. Для того чтобы эффективно использовать систему CRISPR-Cas для редактирования генома без вредного действия, важно понимать аспекты конструирования и оптимизации этих средств для конструирования генома, которые являются аспектами заявленного изобретения.

В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает векторную систему, содержащую один или несколько векторов. В некоторых вариантах осуществления система содержит (а) первый регуляторный элемент, функционально связанный с парной tracr-последовательностью и одним или несколькими сайтами встраивания для встраивания одной или нескольких направляющих последовательностей выше парной tracr-последовательности, где при экспрессии направляющая последовательность управляет специфичным к последовательности связыванием комплекса CRISPR с целевой последовательностью в клетке, к примеру, эукариотической клетке, где комплекс CRISPR содержит фермент CRISPR, образующий комплекс с (1) направляющей последовательностью, которая гибридизируется с целевой последовательностью, и (2) парной tracr-последовательностью, которая гибридизируется с tracr-последовательностью; и (b) второй регуляторный элемент, функционально связанный с кодирующей фермент последовательностью, кодирующей указанный фермент CRISPR, содержащий последовательность ядерной локализации; где компоненты (а) и (b) находятся в одном и том же или в разных векторах системы. В некоторых вариантах

осуществления компонент (а) дополнительно содержит tracr-последовательность ниже парной tracr-последовательности под контролем первого регуляторного элемента. В некоторых вариантах осуществления компонент (а) дополнительно содержит две или более направляющие последовательности, функционально связанные с первым регуляторным элементом, где при экспрессии каждая из двух или более направляющих последовательностей управляет специфичным к последовательности связыванием комплекса CRISPR со своей целевой последовательностью в эукариотической клетке. В некоторых вариантах осуществления система содержит tracr-последовательность под контролем третьего регуляторного элемента, такого как промотор полимеразы III. В некоторых вариантах осуществления tracr-последовательность характеризуется по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 99% комплементарности последовательности по длине парной tracr-последовательности при оптимальном выравнивании. В некоторых вариантах осуществления комплекс CRISPR содержит одну или несколько последовательностей ядерной локализации, достаточно эффективных, чтобы управлять накоплением указанного комплекса CRISPR в обнаруживаемом количестве в ядре эукариотической клетки. Не желая быть связанными теорией, полагают, что последовательность ядерной локализации не является необходимой для активности комплекса CRISPR у эукариот, но что включение таких последовательностей повышает активность системы, особенно в отношении нацеливания на молекулы нуклеиновых кислот в ядре. В некоторых вариантах осуществления фермент CRISPR является ферментом системы CRISPR II типа. В некоторых вариантах осуществления фермент CRISPR является ферментом Cas9. В некоторых вариантах осуществления фермент Cas9 представляет собой Cas9 *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* или *S. thermophilus* и может включать мутированный Cas9, полученный из этих организмов. Фермент может быть гомологом или ортологом Cas9. В некоторых вариантах осуществления фермент CRISPR кодон-оптимизирован для экспрессии в эукариотической клетке. В некоторых вариантах осуществления фермент CRISPR управляет расщеплением одной или двух нитей в определенной точке целевой последовательности. В некоторых вариантах осуществления у фермента CRISPR отсутствует активность для расщепления нитей ДНК. В некоторых вариантах осуществления первый регуляторный элемент является промотором полимеразы III. В некоторых вариантах осуществления второй регуляторный элемент является промотором полимеразы II. В некоторых вариантах осуществления направляющая последовательность составляет по меньшей мере 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25 нуклеотидов, или от 10 до 30, или от 15 до 25, или от 15 до 20 нуклеотидов в длину. В целом и по всему данному описанию выражение "вектор" относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной переносить другую нуклеиновую кислоту, с которой она была связана. Векторы включают, без ограничения, молекулы нуклеиновых кислот, которые являются одноцепочечными, двухцепочечными или частично двухцепочечными; молекулы нуклеиновых кислот, которые содержат один или несколько свободных концов, не содержат свободных концов (к примеру, кольцевые); молекулы нуклеиновых кислот, которые содержат ДНК, РНК или и ту, и другую; и другие разновидности полинуклеотидов, известных в уровне техники. Одним типом вектора является "плазмида", которая означает кольцевую петлю двухцепочечной ДНК, в которую можно встраивать дополнительные сегменты ДНК, как, например, при помощи стандартных технологий молекулярного клонирования. Другим типом вектора является вирусный вектор, где полученные из вируса последовательности ДНК или РНК присутствуют в векторе для упаковки в вирус (к примеру, ретровирусы, ретровирусы с дефективной системой репликации, аденовирусы, аденовирусы с

дефективной системой репликации и аденоассоциированные вирусы). Вирусные векторы также включают полинуклеотиды, переносимые вирусами для трансфекции клетки-хозяина. Определенные векторы способны к саморегулируемой репликации в клетке-хозяине, в которую они введены (к примеру, бактериальные векторы с бактериальной точкой начала репликации и эписомные векторы для млекопитающих). Другие векторы (к примеру, векторы для млекопитающих, отличные от эписомных) интегрируются в геном клетки-хозяина после введения в клетку-хозяина и, таким образом, реплицируются наряду с геномом хозяина. Более того, определенные векторы способны управлять экспрессией генов, с которыми они функционально связаны. Такие векторы в данном документе называют "векторами экспрессии". Общепринятые пригодные в технологиях рекомбинантной ДНК векторы экспрессии часто находятся в форме плазмид.

Рекомбинантные векторы экспрессии могут содержать нуклеиновую кислоту согласно настоящему изобретению в форме, подходящей для экспрессии нуклеиновой кислоты в клетке-хозяине, что означает, что рекомбинантные векторы экспрессии включают один или несколько регуляторных элементов, которые могут быть выбраны с учетом клеток-хозяев, которые предполагается использовать для экспрессии, которые функционально связаны с последовательностью нуклеиновой кислоты, экспрессия которой предполагается. В контексте рекомбинантного вектора экспрессии выражение "функционально связанный" предназначено означать, что представляющая интерес нуклеотидная последовательность связана с регуляторным(и) элементом(ами) таким образом, при котором обеспечивается экспрессия нуклеотидной последовательности (к примеру, в *in vitro* системе транскрипции/трансляции или в клетке-хозяине, когда вектор вводят в клетку-хозяина).

Выражение "регуляторный элемент" предназначено включать промоторы, энхансеры, участки внутренней посадки рибосомы (IRES) и другие контролирующие экспрессию элементы (к примеру, сигналы терминации транскрипции, такие как сигналы полиаденилирования и поли-U-последовательности). Такие регуляторные элементы описаны, например, в Goeddel, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990). Регуляторные элементы включают такие, которые управляют конститутивной экспрессией нуклеотидной последовательности во многих типах клеток-хозяев, и такие, которые управляют экспрессией нуклеотидной последовательности только в определенных клетках-хозяевах (к примеру, тканеспецифичные регуляторные последовательности). Тканеспецифичный промотор может управлять экспрессией преимущественно в представляющей интерес целевой ткани, такой как мышца, нейрон, кость, кожа, кровь, конкретных органах (к примеру, печени, поджелудочной железе) или определенных типах клеток (к примеру, лимфоцитах). Регуляторные элементы также могут управлять экспрессией зависимым от времени образом, как, например, зависимым от клеточного цикла или зависимым от стадии развития образом, который может быть или может не быть также тканеспецифичным или специфичным к типу клеток. В некоторых вариантах осуществления вектор содержит один или несколько промоторов pol III (к примеру, 1, 2, 3, 4, 5 или более промоторов pol III), один или несколько промоторов pol II (к примеру, 1, 2, 3, 4, 5 или более промоторов pol II), один или несколько промоторов pol I (к примеру, 1, 2, 3, 4, 5 или более промоторов pol I) или их комбинации. Примеры промоторов pol III включают без ограничения промоторы U6 и H1. Примеры промоторов pol II включают без ограничения ретровирусный промотор LTR вируса саркомы Рауса (RSV) (необязательно с энхансером RSV), промотор цитомегаловируса (CMV) (необязательно с энхансером CMV) [см., например, Boshart et al, Cell, 41: 521-530 (1985)], промотор SV40,

промотор дигидрофолатредуктазы, промотор β -актина, промотор глицерофосфатакиназы (PGK) и промотор EF1 α . Также выражением "регуляторный элемент" охвачены энхансерные элементы, такие как WPRE; энхансеры CMV; сегмент R-U5' в LTR HTLV-I (Mol. Cell. Biol., Vol.8(1), p.466-472, 1988); энхансер SV40; и интронная

5 последовательность между экзонами 2 и 3 β -глобина кролика (Proc. Natl. Acad. Sci. USA., Vol.78(3), p.1527-31, 1981). Специалистам в данной области будет понятно, что структура вектора экспрессии может зависеть от таких факторов, как выбор клетки хозяина, подлежащей трансформации, желательный уровень экспрессии и т.п. Вектор можно

10 вводить в клетки-хозяева с получением, таким образом, транскриптов, белков или пептидов, в том числе слитых белков или пептидов, кодируемых нуклеиновыми кислотами, которые описаны в данном документе (к примеру, транскриптов коротких палиндромных повторов, регулярно расположенных группами (CRISPR), белков, ферментов, их мутантных форм, их слитых белков и т.п.).

15 Преимущественные векторы включают лентивирусы и аденоассоциированные вирусы, и типы таких векторов также могут быть выбраны для целенаправленного воздействия на определенные типы клеток.

В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает вектор, содержащий регуляторный элемент, функционально связанный с кодирующей фермент

20 последовательностью, кодирующей фермент CRISPR, содержащий одну или несколько последовательностей ядерной локализации. В некоторых вариантах осуществления указанный регуляторный элемент управляет транскрипцией фермента CRISPR в эукариотической клетке, так что указанный фермент CRISPR накапливается в

обнаруживаемом количестве в ядре эукариотической клетки. В некоторых вариантах осуществления регуляторный элемент является промотором полимеразы II. В некоторых

25 вариантах осуществления фермент CRISPR является ферментом системы CRISPR II типа. В некоторых вариантах осуществления фермент CRISPR является ферментом Cas9. В некоторых вариантах осуществления фермент Cas9 представляет собой Cas9 *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* или *S. thermophilus* и может включать мутированный Cas9, полученный из этих организмов. В некоторых вариантах осуществления фермент

30 CRISPR кодон-оптимизирован для экспрессии в эукариотической клетке. В некоторых вариантах осуществления фермент CRISPR управляет расщеплением одной или двух нитей в определенной точке целевой последовательности. В некоторых вариантах осуществления у фермента CRISPR отсутствует активность для расщепления нитей ДНК.

35 В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает фермент CRISPR, содержащий одну или несколько последовательностей ядерной локализации, достаточно эффективных, чтобы управлять накоплением указанного фермента CRISPR в

обнаруживаемом количестве в ядре эукариотической клетки. В некоторых вариантах осуществления фермент CRISPR является ферментом системы CRISPR II типа. В

40 некоторых вариантах осуществления фермент CRISPR является ферментом Cas9. В некоторых вариантах осуществления фермент Cas9 представляет собой Cas9 *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* или *S. thermophilus* и может включать мутированный Cas9, полученный из этих организмов. Фермент может быть гомологом или ортологом Cas9. В некоторых вариантах осуществления у фермента CRISPR отсутствует способность

45 расщеплять одну или несколько нитей целевой последовательности, с которой он связывается.

В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает эукариотическую клетку-хозяина, содержащую (а) первый регуляторный элемент, функционально связанный с

парной *tracr*-последовательностью и одним или несколькими сайтами встраивания для встраивания одной или нескольких направляющих последовательностей выше парной *tracr*-последовательности, где при экспрессии направляющая последовательность управляет специфичным к последовательности связыванием комплекса CRISPR с целевой последовательностью в эукариотической клетке, где комплекс CRISPR содержит фермент CRISPR, образующий комплекс с (1) направляющей последовательностью, которая гибридизируется с целевой последовательностью, и (2) парной *tracr*-последовательностью, которая гибридизируется с *tracr*-последовательностью; и/или (b) второй регуляторный элемент, функционально связанный с кодирующей фермент последовательностью, кодирующей указанный фермент CRISPR, содержащий последовательность ядерной локализации. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин содержит компоненты (a) и (b). В некоторых вариантах осуществления компонент (a), компонент (b) или компоненты (a) и (b) стабильно интегрируются в геном эукариотической клетки-хозяина. В некоторых вариантах осуществления компонент (a) дополнительно содержит *tracr*-последовательность ниже парной *tracr*-последовательности под контролем первого регуляторного элемента. В некоторых вариантах осуществления компонент (a) дополнительно содержит две или более направляющие последовательности, функционально связанные с первым регуляторным элементом, где при экспрессии каждая из двух или более направляющих последовательностей управляет специфичным к последовательности связыванием комплекса CRISPR со своей целевой последовательностью в эукариотической клетке. В некоторых вариантах осуществления эукариотическая клетка-хозяин дополнительно содержит третий регуляторный элемент, такой как промотор полимеразы III, функционально связанный с указанной *tracr*-последовательностью. В некоторых вариантах осуществления *tracr*-последовательность характеризуется по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 99% комплементарности последовательности по длине парной *tracr*-последовательности при оптимальном выравнивании. В некоторых вариантах осуществления фермент CRISPR содержит одну или несколько последовательностей ядерной локализации, достаточно эффективных, чтобы управлять накоплением указанного фермента CRISPR в обнаруживаемом количестве в ядре эукариотической клетки. В некоторых вариантах осуществления фермент CRISPR является ферментом системы CRISPR II типа. В некоторых вариантах осуществления фермент CRISPR является ферментом Cas9. В некоторых вариантах осуществления фермент Cas9 представляет собой Cas9 *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* или *S. thermophilus* и может включать мутированный Cas9, полученный из этих организмов. Фермент может быть гомологом или ортологом Cas9. В некоторых вариантах осуществления фермент CRISPR кодон-оптимизирован для экспрессии в эукариотической клетке. В некоторых вариантах осуществления фермент CRISPR управляет расщеплением одной или двух нитей в определенной точке целевой последовательности. В некоторых вариантах осуществления у фермента CRISPR отсутствует активность для расщепления нитей ДНК. В некоторых вариантах осуществления первый регуляторный элемент является промотором полимеразы III. В некоторых вариантах осуществления второй регуляторный элемент является промотором полимеразы II. В некоторых вариантах осуществления направляющая последовательность составляет по меньшей мере 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25 нуклеотидов, или от 10 до 30, или от 15 до 25, или от 15 до 20 нуклеотидов в длину. В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает отличный от человека эукариотический организм, предпочтительно многоклеточный эукариотический организм, содержащий эукариотическую клетку-хозяина согласно

любому из описанных вариантов осуществления. В других аспектах настоящее изобретение предусматривает эукариотический организм, предпочтительно многоклеточный эукариотический организм, содержащий эукариотическую клетку-хозяина согласно любому из описанных вариантов осуществления. Организм в некоторых вариантах осуществления данных аспектов может быть животным, например, млекопитающим. Также организмом может быть членистоногое, как, например, насекомое. Организмом также может быть растение. Кроме того, организмом может быть гриб.

В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает набор, содержащий один или несколько компонентов, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления набор содержит векторную систему и инструкции по применению набора. В некоторых вариантах осуществления векторная система содержит (а) первый регуляторный элемент, функционально связанный с парной *tracr*-последовательностью и одним или несколькими сайтами встраивания для встраивания одной или нескольких направляющих последовательностей выше парной *tracr*-последовательности, где при экспрессии направляющая последовательность управляет специфичным к последовательности связыванием комплекса CRISPR с целевой последовательностью в эукариотической клетке, где комплекс CRISPR содержит фермент CRISPR, образующий комплекс с (1) направляющей последовательностью, которая гибридизируется с целевой последовательностью, и (2) парной *tracr*-последовательностью, которая гибридизируется с *tracr*-последовательностью; и/или (b) второй регуляторный элемент, функционально связанный с кодирующей фермент последовательностью, кодирующей указанный фермент CRISPR, содержащий последовательность ядерной локализации. В некоторых вариантах осуществления набор содержит компоненты (а) и (b), находящиеся в одном и том же или в разных векторах системы. В некоторых вариантах осуществления компонент (а) дополнительно содержит *tracr*-последовательность ниже парной *tracr*-последовательности под контролем первого регуляторного элемента. В некоторых вариантах осуществления компонент (а) дополнительно содержит две или более направляющие последовательности, функционально связанные с первым регуляторным элементом, где при экспрессии каждая из двух или более направляющих последовательностей управляет специфичным к последовательности связыванием комплекса CRISPR со своей целевой последовательностью в эукариотической клетке. В некоторых вариантах осуществления система дополнительно содержит третий регуляторный элемент, такой как промотор полимеразы III, функционально связанный с указанной *tracr*-последовательностью. В некоторых вариантах осуществления *tracr*-последовательность характеризуется по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 99% комплементарности последовательности по длине парной *tracr*-последовательности при оптимальном выравнивании. В некоторых вариантах осуществления фермент CRISPR содержит одну или несколько последовательностей ядерной локализации, достаточно эффективных, чтобы управлять накоплением указанного фермента CRISPR в обнаруживаемом количестве в ядре эукариотической клетки. В некоторых вариантах осуществления фермент CRISPR является ферментом системы CRISPR II типа. В некоторых вариантах осуществления фермент CRISPR является ферментом Cas9. В некоторых вариантах осуществления фермент Cas9 представляет собой Cas9 *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* или *S. thermophilus* и может включать мутированный Cas9, полученный из этих организмов. Фермент может быть гомологом или ортологом Cas9. В некоторых вариантах осуществления фермент CRISPR кодон-оптимизирован для экспрессии в эукариотической клетке. В некоторых вариантах

осуществления фермент CRISPR управляет расщеплением одной или двух нитей в определенной точке целевой последовательности. В некоторых вариантах осуществления у фермента CRISPR отсутствует активность для расщепления нитей ДНК. В некоторых вариантах осуществления первый регуляторный элемент является промотором полимеразы III. В некоторых вариантах осуществления второй регуляторный элемент является промотором полимеразы II. В некоторых вариантах осуществления направляющая последовательность составляет по меньшей мере 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25 нуклеотидов, или от 10 до 30, или от 15 до 25, или от 15 до 20 нуклеотидов в длину.

В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает способ модификации целевого полинуклеотида в эукариотической клетке. В некоторых вариантах осуществления способ включает обеспечение связывания комплекса CRISPR с целевым полинуклеотидом для осуществления расщепления указанного целевого полинуклеотида с модификацией, таким образом, целевого полинуклеотида, где комплекс CRISPR содержит фермент CRISPR, образующий комплекс с направляющей последовательностью, гибридизирующейся с целевой последовательностью в указанном целевом полинуклеотиде, где указанная направляющая последовательность связана с парной *tracr*-последовательностью, которая, в свою очередь, гибридизируется с *tracr*-последовательностью. В некоторых вариантах осуществления указанное расщепление включает расщепление одной или двух нитей в определенной точке целевой последовательности указанным ферментом CRISPR. В некоторых вариантах осуществления указанное расщепление приводит к сниженной транскрипции целевого гена. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает репарацию указанного расщепленного целевого полинуклеотида при помощи гомологичной рекомбинации с экзогенным матричным полинуклеотидом, где указанная репарация приводит к мутации, включающей вставку, делецию или замену одного или нескольких нуклеотидов указанного целевого полинуклеотида. В некоторых вариантах осуществления указанная мутация приводит к одной или нескольким аминокислотным заменам в белке, экспрессируемом с гена, содержащего целевую последовательность. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает доставку одного или нескольких векторов в указанную эукариотическую клетку, где один или несколько векторов управляют экспрессией одного или нескольких из: фермента CRISPR, направляющей последовательности, связанной с парной *tracr*-последовательностью, и *tracr*-последовательности. В некоторых вариантах осуществления указанные векторы доставляют в эукариотическую клетку в субъекте. В некоторых вариантах осуществления указанная модификация имеет место в указанной эукариотической клетке в клеточной культуре. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает выделение указанной эукариотической клетки из субъекта перед указанной модификацией. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает возвращение указанной эукариотической клетки и/или клеток, полученных из субъекта, указанному субъекту.

В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает способ модификации экспрессии полинуклеотида в эукариотической клетке. В некоторых вариантах осуществления способ включает обеспечение связывания комплекса CRISPR с полинуклеотидом так, что указанное связывание приводит к повышенной или пониженной экспрессии указанного полинуклеотида; где комплекс CRISPR содержит фермент CRISPR, образующий комплекс с направляющей последовательностью, гибридизирующейся с целевой последовательностью в указанном целевом полинуклеотиде, где указанная направляющая последовательность связана с парной

tracr-последовательностью, которая, в свою очередь, гибридизируется с tracr-последовательностью. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает доставку одного или нескольких векторов в указанные эукариотические клетки, где один или несколько векторов управляют экспрессией одного или нескольких из: фермента CRISPR, направляющей последовательности, связанной с парной tracr-последовательностью, и tracr-последовательности.

В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает способ получения модельной эукариотической клетки, содержащей мутированный ген, ответственный за развитие заболевания. В некоторых вариантах осуществления ген, ответственный за развитие заболевания, является любым геном, ассоциированным с повышением риска наличия или развития заболевания. В некоторых вариантах осуществления способ включает (а) введение одного или нескольких векторов в эукариотическую клетку, где один или несколько векторов управляют экспрессией одного или нескольких из: фермента CRISPR, направляющей последовательности, связанной с парной tracr-последовательностью, и tracr-последовательности; и (b) обеспечение связывания комплекса CRISPR с целевым полинуклеотидом для осуществления расщепления целевого полинуклеотида в указанном гене, ответственном за развитие заболевания, где комплекс CRISPR содержит фермент CRISPR, образующий комплекс с (1) направляющей последовательностью, которая гибридизируется с целевой последовательностью в целевом полинуклеотиде, и (2) парной tracr-последовательностью, которая гибридизируется с tracr-последовательностью, таким образом, получая модельную эукариотическую клетку, содержащую мутированный ген, ответственный за развитие заболевания. В некоторых вариантах осуществления указанное расщепление включает расщепление одной или двух нитей в определенной точке целевой последовательности указанным ферментом CRISPR. В некоторых вариантах осуществления указанное расщепление приводит к сниженной транскрипции целевого гена. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает репарацию указанного расщепленного целевого полинуклеотида при помощи гомологичной рекомбинации с экзогенным матричным полинуклеотидом, где указанная репарация приводит к мутации, включающей вставку, делецию или замену одного или нескольких нуклеотидов указанного целевого полинуклеотида. В некоторых вариантах осуществления указанная мутация приводит к одной или нескольким аминокислотным заменам при экспрессии белка с гена, содержащего целевую последовательность.

В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает способ получения биологически активного средства, которое модулирует процесс передачи сигнала в клетке, ассоциированный с геном, ответственным за развитие заболевания. В некоторых вариантах осуществления ген, ответственный за развитие заболевания, является любым геном, ассоциированным с повышением риска наличия или развития заболевания. В некоторых вариантах осуществления способ включает (а) приведение тестового соединения в контакт с модельной клеткой по любому одному из описанных вариантов осуществления и (b) обнаружение изменения при считывании, которое свидетельствует об уменьшении или усилении процесса передачи сигнала в клетке, ассоциированного с указанной мутацией в указанном гене, ответственном за развитие заболевания, с получением, таким образом, указанного биологически активного средства, которое модулирует указанный процесс передачи сигнала в клетке, ассоциированный с указанным геном, ответственным за развитие заболевания.

В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает рекомбинантный полинуклеотид, содержащий направляющую последовательность выше парной tracr-

последовательности, где направляющая последовательность при экспрессии управляет специфичным к последовательности связыванием комплекса CRISPR с соответствующей целевой последовательностью, присутствующей в эукариотической клетке. В некоторых вариантах осуществления целевая последовательность является вирусной последовательностью, присутствующей в эукариотической клетке. В некоторых вариантах осуществления целевая последовательность является протоонкогеном или онкогеном.

В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает способ отбора одной или нескольких прокариотических клеток путем введения одной или нескольких мутаций в ген в одной или нескольких прокариотических клетках, при этом способ включает введение одного или нескольких векторов в прокариотическую(ие) клетку(и), где один или несколько векторов управляют экспрессией одного или нескольких из: фермента CRISPR, направляющей последовательности, связанной с парной tracr-последовательностью, tracr-последовательности и матрицы редактирования; где матрица редактирования содержит одну или несколько мутаций, которые прекращают расщепление фермента CRISPR; обеспечение гомологичной рекомбинации матрицы редактирования с целевым полинуклеотидом в отбираемой(ых) клетке(ах); обеспечение связывания комплекса CRISPR с целевым полинуклеотидом для осуществления расщепления целевого полинуклеотида в указанном гене, где комплекс CRISPR содержит фермент CRISPR, образующий комплекс с (1) направляющей последовательностью, которая гибридизируется с целевой последовательностью в целевом полинуклеотиде, и (2) парной tracr-последовательностью, которая гибридизируется с tracr-последовательностью, где связывание комплекса CRISPR с целевым полинуклеотидом индуцирует гибель клеток, с обеспечением тем самым отбора одной или нескольких прокариотических клеток, в которые были введены одна или несколько мутаций. В предпочтительном варианте осуществления фермент CRISPR представляет собой Cas9. В другом аспекте настоящего изобретения отбираемая клетка может быть эукариотической клеткой. Аспекты настоящего изобретения предусматривают отбор конкретных клеток без необходимости наличия маркера отбора или двухстадийного способа, который может включать систему негативного отбора.

В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает не встречающуюся в природе или сконструированную композицию, содержащую полинуклеотидную последовательность химерной РНК (chiRNA) системы CRISPR-CAS, где полинуклеотидная последовательность содержит (a) направляющую последовательность, способную гибридизоваться с целевой последовательностью в эукариотической клетке, (b) парную tracr-последовательность и (c) tracr-последовательность, где (a), (b) и (c) расположены в 5'-3' ориентации, где при транскрипции парная tracr-последовательность гибридизируется с tracr-последовательностью, а направляющая последовательность управляет специфичным к последовательности связыванием комплекса CRISPR с целевой последовательностью, где комплекс CRISPR содержит фермент CRISPR, образующий комплекс с (1) направляющей последовательностью, которая гибридизируется с целевой последовательностью, и (2) парной tracr-последовательностью, которая гибридизируется с tracr-последовательностью,

или

ферментную систему CRISPR, где система кодируется векторной системой, содержащей один или несколько векторов, которые содержат I. первый регуляторный элемент, функционально связанный с полинуклеотидной последовательностью химерной

РНК (chiRNA) системы CRISPR-CAS, где полинуклеотидная последовательность содержит (а) одну или несколько направляющих последовательностей, способных гибридизироваться с одной или несколькими целевыми последовательностями в эукариотической клетке, (b) парную tracr-последовательность и (с) одну или несколько tracr-последовательностей, и II. второй регуляторный элемент, функционально связанный с кодирующей фермент последовательностью, кодирующей фермент CRISPR, содержащий по меньшей мере одну или несколько последовательностей ядерной локализации, где (а), (b) и (с) расположены в 5'-3' ориентации, где компоненты I и II находятся в одном и том же или в разных векторах системы, где при транскрипции парная tracr-последовательность гибридизуется с tracr-последовательностью, а направляющая последовательность управляет специфичным к последовательности связыванием комплекса CRISPR с целевой последовательностью, где комплекс CRISPR содержит фермент CRISPR, образующий комплекс с (1) направляющей последовательностью, которая гибридизуется с целевой последовательностью, и (2) парной tracr-последовательностью, которая гибридизуется с tracr-последовательностью, или мультиплексную ферментную систему CRISPR, где система кодируется векторной системой, содержащей один или несколько векторов, которые содержат I. первый регуляторный элемент, функционально связанный с (а) одним или несколькими направляющими последовательностями, способными гибридизироваться с целевой последовательностью в клетке, и (b) по меньшей мере одной или несколькими парными tracr-последовательностями, II. второй регуляторный элемент, функционально связанный с кодирующей фермент последовательностью, кодирующей фермент CRISPR, и III. третий регуляторный элемент, функционально связанный с tracr-последовательностью, где компоненты I, II и III находятся в одном и том же или в разных векторах системы, где при транскрипции парная tracr-последовательность гибридизуется с tracr-последовательностью, а направляющая последовательность управляет специфичным к последовательности связыванием комплекса CRISPR с целевой последовательностью, где комплекс CRISPR содержит фермент CRISPR, образующий комплекс с (1) направляющей последовательностью, которая гибридизуется с целевой последовательностью, и (2) парной tracr-последовательностью, которая гибридизуется с tracr-последовательностью, и где в мультиплексной системе используется множество направляющих последовательностей и одна tracr-последовательность; и где одна или несколько из направляющих, tracr- и парных tracr-последовательностей модифицируются с повышением стабильности.

В аспектах настоящего изобретения модификация включает сконструированную вторичную структуру. Например, модификация может включать уменьшение участка гибридизации между парной tracr-последовательностью и tracr-последовательностью. Например, модификация также может включать слияние парной tracr-последовательности и tracr-последовательности посредством искусственной петли.

Модификация может включать tracr-последовательность с длиной от 40 до 120 п.о. В вариантах осуществления настоящего изобретения tracr-последовательность составляет от 40 п.о. до полной длины tracr. В определенных вариантах осуществления длина tracrRNA включает по меньшей мере нуклеотиды 1-67, а в некоторых вариантах осуществления по меньшей мере нуклеотиды 1-85 tracrRNA дикого типа. В некоторых вариантах осуществления можно использовать по меньшей мере нуклеотиды, соответствующие нуклеотидам 1-67 или 1-85 tracrRNA Cas9 *S. pyogenes* дикого типа. В тех случаях, когда в системе CRISPR используются ферменты, отличные от Cas9 или отличные от SpCas9, тогда в релевантной tracrRNA дикого типа могут присутствовать

соответствующие нуклеотиды. В некоторых вариантах осуществления длина tracrRNA включает не более чем нуклеотиды 1-67 или 1-85 tracrRNA дикого типа. Модификация может включать оптимизацию последовательности. В определенных аспектах оптимизация последовательности может включать снижение частоты встречаемости полиТ-последовательностей в tracr- и/или парной tracr-последовательности. Оптимизацию последовательности можно совмещать с уменьшением участка гибридизации между парной tracr-последовательностью и tracr- последовательностью; например, tracr-последовательностью уменьшенной длины.

В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает систему CRISPR-Cas или ферментную систему CRISPR, где модификация включает уменьшение полиТ-последовательностей в tracr- и/или парной tracr-последовательности. В некоторых аспектах настоящего изобретения один или несколько Т, присутствующих в полиТ-последовательности соответствующей последовательности дикого типа (то есть, фрагмент из более 3, 4, 5, 6 или более смежных Т-оснований; в некоторых вариантах осуществления фрагмент из не более 10, 9, 8, 7, 6 смежных Т-оснований), могут быть заменены на отличный от Т нуклеотид, к примеру, А, так что цепочка распадается на меньшие фрагменты из Т, при этом каждый фрагмент имеет 4 или менее 4 (например, 3 или 2) смежных Т. Основания, отличные от А можно использовать для замены, например, С или G, или не встречающиеся в природе нуклеотиды, или модифицированные нуклеотиды. Если цепочка из Т участвует в образовании "шпильки" (или структуры по типу "петля-на-стебле"), тогда предпочтительно, чтобы комплементарное основание для отличного от Т основания было изменено на комплементарное отличному от Т нуклеотиду. Например, если отличным от Т основанием является А, тогда его комплементарное основание может быть изменено на Т, к примеру, для сохранения или содействия сохранению вторичной структуры. К примеру, 5'-TTTTT может быть изменено с получением 5'-TTTAT, а комплементарная 5'-AAAAA может быть изменена на 5'- АТААА.

В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает систему CRISPR-Cas или ферментную систему CRISPR, где модификация включает добавление терминаторной полиТ-последовательности. В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает систему CRISPR-Cas или ферментную систему CRISPR, где модификация включает добавление терминаторной полиТ-последовательности в tracr- и/или парные tracr-последовательности. В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает систему CRISPR-Cas или ферментную систему CRISPR, где модификация включает добавление терминаторной полиТ-последовательности в направляющую последовательность. Терминаторная полиТ-последовательность может содержать 5 смежных Т-оснований или более 5.

В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает систему CRISPR-Cas или ферментную систему CRISPR, где модификация включает изменение петель и/или "шпилек". В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает систему CRISPR-Cas или ферментную систему CRISPR, где модификация включает обеспечение минимум двух "шпилек" в направляющей последовательности. В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает систему CRISPR-Cas или ферментную систему CRISPR, где модификация включает обеспечение "шпильки", образованной при помощи комплементации между tracr- и парной tracr-последовательностью (прямой повтор). В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает систему CRISPR-Cas или ферментную систему CRISPR, где модификация включает обеспечение одной или нескольких дополнительных "шпилек" на 3'-конце последовательности tracrRNA или

по направлению к нему. Например, "шпилька" может быть образована путем обеспечения самокомплементарных последовательностей в последовательности *tracRNA*, соединенных петлей так, что "шпилька" образуется при самосворачивании. В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает систему CRISPR-Cas или ферментную систему CRISPR, где модификация включает обеспечение дополнительных "шпилек", добавленных на 3' направляющей последовательности. В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает систему CRISPR-Cas или ферментную систему CRISPR, где модификация включает удлинение 5'-конца направляющей последовательности. В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает систему CRISPR-Cas или ферментную систему CRISPR, где модификация включает обеспечение одной или нескольких "шпилек" на 5'-конце направляющей последовательности. В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает систему CRISPR-Cas или ферментную систему CRISPR, где модификация включает введение последовательности (5'-AGGACGAAGTCCTAA) на 5'-конце направляющей последовательности. Другие последовательности, подходящие для образования "шпилек", известны специалисту в данной области, и их можно использовать в определенных аспектах настоящего изобретения. В некоторых аспектах настоящего изобретения предусмотрено по меньшей мере 2, 3, 4, 5 или более дополнительных "шпилек". В некоторых аспектах настоящего изобретения предусмотрено не более 10, 9, 8, 7, 6 дополнительных "шпилек". В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает систему CRISPR-Cas или ферментную систему CRISPR, где модификация включает две "шпильки". В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает систему CRISPR-Cas или ферментную систему CRISPR, где модификация включает три "шпильки". В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает систему CRISPR-Cas или ферментную систему CRISPR, где модификация включает самое большее пять "шпилек".

В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает систему CRISPR-Cas или ферментную систему CRISPR, где модификация включает обеспечение образования перекрестных связей или обеспечение одного или нескольких модифицированных нуклеотидов в полинуклеотидной последовательности. Модифицированные нуклеотиды и/или образование перекрестных связей могут предусматриваться в любой или во всех из *trac*-, парных *trac*- и/или направляющих последовательностей, и/или кодирующей фермент последовательности, и/или в векторных последовательностях. Модификации могут включать включение по меньшей мере одного не встречающегося в природе нуклеотида или модифицированного нуклеотида, или их аналогов. Модифицированные нуклеотиды могут быть модифицированы по фрагменту рибозы, фосфата и/или основания. Модифицированные нуклеотиды могут включать 2'-О-метил-аналоги, 2'-дезоксид-аналоги или 2'-фтор-аналоги. Остов нуклеиновой кислоты можно модифицировать, например, можно использовать фосфотиоатный остов. Также возможно использование закрытых нуклеиновых кислот (LNA) или мостиковых нуклеиновых кислот (BNA). Дополнительные примеры модифицированных оснований включают без ограничения 2-аминопурин, 5-бромурин, псевдоурин, инозин, 7-метилгуанозин.

Будет понятно, что любая или все из вышеперечисленных модификаций могут быть предусмотрены в отдельности или в комбинации в данной системе CRISPR-Cas или ферментной системе CRISPR. Такая система может включать одну, две, три, четыре, пять или более указанных модификаций.

В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает систему CRISPR-Cas или ферментную систему CRISPR, где фермент CRISPR является ферментом системы CRISPR

II типа, к примеру, ферментом Cas9. В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает систему CRISPR-Cas или ферментную систему CRISPR, где фермент CRISPR состоит менее чем из одной тысячи аминокислот, или менее чем из четырех тысяч аминокислот. В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает систему CRISPR-Cas или ферментную систему CRISPR, где фермент Cas9 представляет собой StCas9 или StlCas9, или фермент Cas9 является ферментом Cas9 из организма, выбранного из группы, состоящей из рода Streptococcus, Campylobacter, Nitratifractor, Staphylococcus, Parvibaculum, Roseburia, Neisseria, Gluconacetobacter, Azospirillum, Sphaerochaeta, Lactobacillus, Eubacterium или Corynebacter. В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает систему CRISPR-Cas или ферментную систему CRISPR, где фермент CRISPR является нуклеазой, управляющей расщеплением обеих нитей в определенной точке целевой последовательности.

В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает систему CRISPR-Cas или ферментную систему CRISPR, где первый регуляторный элемент является промотором полимеразы III. В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает систему CRISPR-Cas или ферментную систему CRISPR, где второй регуляторный элемент является промотором полимеразы II.

В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает систему CRISPR-Cas или ферментную систему CRISPR, где направляющая последовательность содержит по меньшей мере пятнадцать нуклеотидов.

В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает систему CRISPR-Cas или ферментную систему CRISPR, где модификация включает оптимизированную tracr-последовательность, и/или оптимизированную направляющую последовательность РНК, и/или совместно свернутую структуру tracr-последовательности и/или парной(ых) tracr-последовательности(ей), и/или стабилизирующие вторичные структуры tracr-последовательности, и/или tracr-последовательности с уменьшенным участком спаривания оснований, и/или tracr-последовательности, слитой с РНК-элементами; и/или в мультиплексной системе находятся две РНК, содержащие tracr и содержащие множество гидов, или одна РНК, содержащая множество химерных элементов.

В аспектах настоящего изобретения архитектура химерной РНК дополнительно оптимизирована в соответствии с результатами исследований мутационного процесса. В химерной РНК с двумя или более "шпильками" мутации в проксимальном прямом повторе для стабилизации "шпильки" могут привести к разрушению активности комплекса CRISPR. Мутации в дистальном прямом повторе для укорачивания или стабилизации "шпильки" могут не производить никакого воздействия на активность комплекса CRISPR. Рандомизация последовательности в петлевом участке между проксимальным и дистальным повторами может значительно снизить активность комплекса CRISPR. Замены одной пары оснований или рандомизация последовательности в линкерном участке между "шпильками" может привести к полной потере активности комплекса CRISPR. Стабилизация "шпильки" дистальных "шпилек", которые следуют за первой "шпилькой" после направляющей последовательности, может привести к сохранению или улучшению активности комплекса CRISPR. Соответственно, в предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения архитектура химерной РНК может быть дополнительно оптимизирована путем получения меньшей химерной РНК, которая может иметь практическую значимость в отношении возможностей доставки для терапевтических целей и других применений, и этого можно достичь путем изменения дистального прямого повтора для того, чтобы укоротить или стабилизировать "шпильку". В дополнительных предпочтительных

вариантах осуществления настоящего изобретения архитектура химерной РНК может быть дополнительно оптимизирована путем стабилизации одной или нескольких дистальных "шпилек". Стабилизация "шпилек" может включать модификацию последовательностей, подходящих для образования "шпилек". В некоторых аспектах настоящего изобретения предусмотрено по меньшей мере 2, 3, 4, 5 или более дополнительных "шпилек". В некоторых аспектах настоящего изобретения предусмотрено не более 10, 9, 8, 7, 6 дополнительных "шпилек". В некоторых аспектах настоящего изобретения стабилизацией может быть образование перекрестных связей и другие модификации. Модификации могут включать включение по меньшей мере одного не встречающегося в природе нуклеотида или модифицированного нуклеотида, или их аналогов. Модифицированные нуклеотиды могут быть модифицированы по фрагменту рибозы, фосфата и/или основания. Модифицированные нуклеотиды могут включать 2'-О-метил-аналоги, 2'-дезоксид-аналоги или 2'-фтор-аналоги. Остов нуклеиновой кислоты можно модифицировать, например, можно использовать фосфотиоатный остов. Также возможно использование закрытых нуклеиновых кислот (LNA) или мостиковых нуклеиновых кислот (BNA). Дополнительные примеры модифицированных оснований включают без ограничения 2-аминопурин, 5-бромурдин, псевдоуридин, инозин, 7-метилгуанозин.

В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает систему CRISPR-Cas или ферментную систему CRISPR, где фермент CRISPR кодон-оптимизирован для экспрессии в эукариотической клетке.

Соответственно, в некоторых аспектах настоящего изобретения длина tracrRNA, необходимая для конструкции согласно настоящему изобретению, к примеру, химерной конструкции, необязательно должна быть фиксированной, и в некоторых аспектах настоящего изобретения она может составлять от 40 до 120 п.о., а в некоторых аспектах настоящего изобретения может составлять до полной длины tracr, к примеру, в некоторых аспектах настоящего изобретения, до 3'-конца tracr, которая прерывается сигналом терминации транскрипции в бактериальном геноме. В определенных вариантах осуществления длина tracrRNA включает по меньшей мере нуклеотиды 1-67, а в некоторых вариантах осуществления по меньшей мере нуклеотиды 1-85 tracrRNA дикого типа. В некоторых вариантах осуществления можно использовать по меньшей мере нуклеотиды, соответствующие нуклеотидам 1-67 или 1-85 tracrRNA Cas9 *S. pyogenes* дикого типа. В тех случаях, когда в системе CRISPR используются ферменты, отличные от Cas9 или отличные от SpCas9, тогда в релевантной tracrRNA дикого типа могут присутствовать соответствующие нуклеотиды. В некоторых вариантах осуществления длина tracrRNA включает не более чем нуклеотиды 1-67 или 1-85 tracrRNA дикого типа. В отношении оптимизации последовательности (к примеру, уменьшения полиТ-последовательностей), к примеру, касательно цепочек из Т, внутренних по отношению к парной tracr (прямой повтор) или tracrRNA, в некоторых аспектах настоящего изобретения один или несколько Т, присутствующих в полиТ-последовательности соответствующей последовательности дикого типа (то есть фрагмент из более 3, 4, 5, 6 или более смежных Т-оснований; в некоторых вариантах осуществления фрагмент из не более 10, 9, 8, 7, 6 смежных Т-оснований), могут быть заменены на отличный от Т нуклеотид, к примеру, А, так что цепочка распадается на меньшие фрагменты из Т, при этом каждый фрагмент имеет 4 или менее 4 (например, 3 или 2) смежных Т. Если цепочка из Т участвует в образовании "шпильки" (или структуры по типу "петля-на-стебле"), тогда предпочтительно, чтобы комплементарное основание для отличного от Т основания было изменено на комплементарное отличному от Т нуклеотиду.

Например, если отличным от Т основанием является А, тогда его комплементарное основание может быть изменено на Т, к примеру, для сохранения или содействия сохранению вторичной структуры. К примеру, 5'-ТТТТТ может быть изменено с получением 5'-ТТТАТ, а комплементарная 5'-ААААА может быть изменена на 5'-АТААА. В отношении присутствия терминаторных полиТ-последовательностей в транскрипте *tracr* + парная *tracr*, к примеру, поли-Т-терминатора (ТТТТТ или больше), в некоторых аспектах настоящего изобретения предпочтительно, чтобы таковой был добавлен к концу транскрипта, будь то в форме с двумя РНК (*tracr* и парной *tracr*) или с одной направляющей РНК. Касательно петель и "шпилек" в транскриптах *tracr* и парной *tracr*, в некоторых аспектах настоящего изобретения предпочтительно, чтобы минимум две "шпильки" присутствовали в химерной направляющей РНК. Первая "шпилька" может быть "шпилькой", образованной при помощи комплементации между *tracr*-последовательностью и парной *tracr*-последовательностью (прямой повтор). Вторая "шпилька" может быть на 3'-конце последовательности *tracr*RNA, и это может обеспечивать вторичную структуру для взаимодействия с Cas9. Дополнительные "шпильки" могут быть добавлены на 3' направляющей РНК, к примеру, в некоторых аспектах настоящего изобретения для того, чтобы повысить стабильность направляющей РНК. Кроме того, 5'-конец направляющей РНК в некоторых аспектах настоящего изобретения может быть удлинен. В некоторых аспектах настоящего изобретения можно рассматривать 20 п.о. на 5'-конце в качестве направляющей последовательности. 5'-часть может быть удлинена. Одна или несколько "шпилек" могут быть предусмотрены на 5'-части, к примеру, в некоторых аспектах настоящего изобретения это также может повышать стабильность направляющей РНК. В некоторых аспектах настоящего изобретения конкретная "шпилька" может быть обеспечена путем введения последовательности (5'-AGGACGAAGTCCTAA) на 5'-конце направляющей последовательности, а в некоторых аспектах настоящего изобретения это может помочь повысить стабильность. Другие последовательности, подходящие для образования "шпилек", известны специалисту в данной области, и их можно использовать в определенных аспектах настоящего изобретения. В некоторых аспектах настоящего изобретения предусмотрено по меньшей мере 2, 3, 4, 5 или более дополнительных "шпилек". В некоторых аспектах настоящего изобретения предусмотрено не более 10, 9, 8, 7, 6 дополнительных "шпилек". Вышеизложенное также предусматривает аспекты настоящего изобретения, включающие вторичную структуру в направляющие последовательности. В некоторых аспектах настоящего изобретения могут иметь место образование перекрестных связей и другие модификации, к примеру, для повышения стабильности. Модификации могут включать включение по меньшей мере одного не встречающегося в природе нуклеотида или модифицированного нуклеотида, или их аналогов. Модифицированные нуклеотиды могут быть модифицированы по фрагменту рибозы, фосфата и/или основания. Модифицированные нуклеотиды могут включать 2'-О-метил-аналоги, 2'-дезоксид-аналоги или 2'-фтор-аналоги. Остов нуклеиновой кислоты можно модифицировать, например, можно использовать фосфотиоатный остов. Также возможно использование закрытых нуклеиновых кислот (LNA) или мостиковых нуклеиновых кислот (BNA). Дополнительные примеры модифицированных оснований включают без ограничения 2-аминопурин, 5-бромуридин, псевдоуридин, инозин, 7-метилгуанозин. Такие модификации или образование перекрестных связей могут иметь место в направляющей последовательности или других последовательностях, смежных с направляющей последовательностью.

Соответственно, целью настоящего изобретения не является охват в пределах

настоящего изобретения любого ранее известного продукта, способа получения продукта или способа применения продукта, так что заявители оставляют за собой право и настоящим раскрывают отказ от прав на любой ранее известный продукт, процесс или способ. Следует дополнительно отметить, что настоящее изобретение не
5 предназначено охватывать в пределах объема настоящего изобретения любой продукт, способ получения продукта или способ применения продукта, который не соответствует письменному описанию и требованиям достаточного раскрытия сути изобретения USPTO (первый пункт § 112 статьи 35 USC) или ЕРО (статья 83 ЕРС), так что заявители оставляют за собой право и настоящим раскрывают отказ от прав на любой ранее
10 описанный продукт, способ получения продукта или способ применения продукта.

Следует отметить, что в данном раскрытии и особенно в формуле изобретения и/или параграфах такие выражения, как "содержит", "содержащийся", "содержащий" и т.п., могут иметь значение, приписываемое им в патентном законодательстве США, например, они могут означать "включает", "включенный", "включающий" и т.п., и что
15 такие выражения, как "состоящий, по сути, из" и "состоит, по сути, из" имеют значение, приписываемое им в патентном законодательстве США, например, они допускают не указанные прямо элементы, но исключают элементы, которые имеются в известном уровне техники или которые влияют на основные или новые характеристики настоящего изобретения. Эти и другие варианты осуществления раскрыты или являются очевидными,
20 исходя из следующего подробного описания, и охвачены им.

Краткое описание графических материалов

Новые признаки настоящего изобретения изложены с характерными особенностями в прилагаемой формуле изобретения. Лучшее понимание признаков и преимуществ настоящего изобретения будет доступно благодаря ссылке на следующее подробное
25 описание, в котором изложены показательные варианты осуществления, в которых используют принципы настоящего изобретения, и на сопутствующие графические материалы.

На фигуре 1 изображена схематическая модель системы CRISPR. Нуклеаза Cas9 из *Streptococcus pyogenes* (желтый) нацелена на геномную ДНК при помощи синтетической
30 направляющей РНК (sgRNA), состоящей из 20-нуклеотидной направляющей последовательности (голубой) и каркаса (красный). Направляющая последовательность образует пары оснований с ДНК-мишенью (голубой) непосредственно выше необходимого мотива, смежного с протоспейсером (PAM; пурпурный) 5'-NGG, и Cas9 опосредует двухцепочечный разрыв (DSB) на ~3 п.о. выше PAM (красный треугольник).

На фигурах 2A-F изображена показательная система CRISPR, возможный механизм действия, иллюстративная адаптация для экспрессии в эукариотических клетках и
35 результаты тестов, оценивающих ядерную локализацию и активность CRISPR.

На фигурах 3A-C изображена показательная кассета экспрессии для экспрессии элементов системы CRISPR в эукариотических клетках, предсказанные структуры
40 иллюстративных направляющих последовательностей и активность системы CRISPR, которая измерена в эукариотических и прокариотических клетках.

На фигурах 4A-D показаны результаты оценивания специфичности SpCas9 в отношении иллюстративной мишени.

На фигурах 5A-G изображена показательная векторная система и результаты ее
45 применения при управлении гомологичной рекомбинацией в эукариотических клетках.

На фигурах 6A-C показано сравнение различных транскриптов tracrRNA для опосредованного Cas9 целенаправленного воздействия на ген.

На фигурах 7A-D изображена показательная система CRISPR, иллюстративная

адаптация для экспрессии в эукариотических клетках и результаты тестов, оценивающих активность CRISPR.

На фигурах 8А-С изображены иллюстративные манипуляции с системой CRISPR для целенаправленного воздействия на локусы генома в клетках млекопитающего.

5 На фигурах 9А-В показаны результаты анализа с помощью нозерн-блоттинга процессинга crRNA в клетках млекопитающего.

На фигурах 10А-С показаны схематическое изображение химерных РНК и результаты анализа с помощью SURVEYOR относительно активности системы CRISPR в эукариотических клетках.

10 На фигурах 11А-В показано графическое изображение результатов анализа с помощью SURVEYOR относительно активности системы CRISPR в эукариотических клетках.

На фигуре 12 показаны предсказанные вторичные структуры для показательных химерных РНК, содержащих направляющую последовательность, парную tracr-
15 последовательность и tracr-последовательность.

На фигуре 13 представлено филогенетическое дерево генов Cas.

На фигурах 14А-Е показан филогенетический анализ, выявляющий пять семейств Cas9, включая три группы больших Cas9 (~1400 аминокислот) и две малых Cas9 (~1100 аминокислот).

20 На фигуре 15 показан график, показывающий функцию разных оптимизированных направляющих РНК.

На фигуре 16 показана последовательность и структура разных направляющих химерных РНК.

На фигуре 17 показана совместно свернутая структура tracrRNA и прямого повтора.

25 На фигуре 18А и В показаны данные, полученные в результате *in vitro* оптимизации химерной направляющей РНК StlCas9.

На фигуре 19А-В показано расщепление либо неметилованных, либо метилированных мишеней при помощи клеточного лизата с SpCas9.

На фигурах 20А-Г показана оптимизация архитектуры направляющей РНК для SpCas9-опосредованного редактирования генома млекопитающих, (а) Схематическое
30 изображение бицистронного вектора экспрессии (PX330) для управляемой промотором U6 одиночной направляющей РНК (sgRNA) и управляемого промотором CBh человеческого кодон-оптимизированного Cas9 *Streptococcus pyogenes* (hSpCas9), применяемых для всех последующих экспериментов. sgRNA, усеченная в разных

35 указанных положениях, состоит из 20-нт направляющей последовательности (голубой) и каркаса (красный). (b) Анализ с помощью SURVEYOR в отношении опосредованных SpCas9 вставок/делений в локусах EMX1 и PVALB человека. Стрелки указывают на ожидаемые фрагменты, полученные в результате расщепления с помощью SURVEYOR (n=3). (c) Анализ с помощью нозерн-блоттинга для четырех усеченных архитектур
40 sgRNA с U1 в качестве загрузочного контроля, (d) Как SpCas9 дикого типа (wt), так и никаза-мутант (D10A) SpCas9 способствовали вставке сайта HindIII. в ген EMX1 человека. Однонитевые олигонуклеотиды (ssODN), ориентированные либо в

45 смысловом, либо антисмысловом направлении по отношению к геномной последовательности, использовали в качестве матриц для гомологичной рекомбинации, (e) Схематическое изображение локуса SERPINB5 человека. sgRNA и PAM указаны при помощи цветных полос над последовательностями; метилцитозины (Me) выделены (розовый) и пронумерованы по отношению к сайту инициации транскрипции (TSS, +1). (f) Статус метилирования SERPINB5, оцененный при помощи бисульфитного

секвенирования 16 клонов. Заполненные круги, метилированный CpG; белые круги, неметилированный CpG. (g) Эффективность модификации у трех sgRNA, нацеливающих на метилированный участок SEKPINB5, оцененная при помощи "глубокого" секвенирования (n=2). "Усы" указывают на интервалы Уилсона (способы он-лайн).

5 На фигурах 21А-В показана дополнительная оптимизация архитектуры sgRNA CRISPR-Cas. (a) Схематическое изображение четырех дополнительных архитектур sgRNA, I-IV. Каждая состоит из 20-нт направляющей последовательности (голубой), соединенной с прямым повтором (DR, серый), который гибридизируется с tracrRNA (красный). Гибрид DR-tracrRNA усечен в +12 или +22, которые указаны, искусственной
10 структурой по типу "петля-на-стебле" GAAA. Положения усечения tracrRNA пронумерованы в соответствии с предварительно сообщенным сайтом инициации транскрипции для tracrRNA. Архитектуры II и IV sgRNA несут мутации в их полиU отрезках, которые могут служить в качестве терминаторов для осуществления преждевременной терминации транскрипции. (b) Анализ с помощью SURVEYOR в
15 отношении опосредованных SpCas9 вставок/делеций в локусе EMX1 человека для целевых сайтов 1-3. Стрелки указывают на ожидаемые фрагменты, полученные в результате расщепления с помощью SURVEYOR (n=3).

На фигуре 22 показана визуализация некоторых целевых сайтов в геноме человека.

На фигурах 23А-В показаны (А) схематическое изображение sgRNA и (В) анализ при
20 помощи SURVEYOR пяти вариантов sgRNA касательно SaCas9 в отношении оптимальной усеченной архитектуры с наивысшей эффективностью расщепления.

Фигуры приведены в данном документе только в целях иллюстрации, и они не обязательно изображены в масштабе.

Подробное описание изобретения

25 Выражения "полинуклеотид", "нуклеотид", "нуклеотидная последовательность", "нуклеиновая кислота" и "олигонуклеотид" используют взаимозаменяемо. Они обозначают полимерную форму нуклеотидов любой длины, как дезоксирибонуклеотидов, так и рибонуклеотидов или их аналогов. Полинуклеотиды могут обладать любой пространственной структурой и могут выполнять любую
30 функцию, известную или неизвестную. Неограничивающими примерами полинуклеотидов являются следующие: кодирующие или некодирующие участки гена или фрагмента гена, локусы(локус), определенные в результате анализа сцепления, экзоны, интроны, информационная РНК (иРНК), транспортная РНК, рибосомная РНК, короткая интерферирующая РНК (siRNA), короткая шпилечная РНК (shRNA),
35 микроРНК (miRNA), рибозимы, кДНК, рекомбинантные полинуклеотиды, разветвленные полинуклеотиды, плазмиды, векторы, выделенная ДНК любой последовательности, выделенная РНК любой последовательности, зонды для нуклеиновых кислот и праймеры. Полинуклеотид может содержать один или несколько модифицированных нуклеотидов, как, например, метилированные нуклеотиды и аналоги
40 нуклеотидов. При наличии, модификации в нуклеотидную структуру могут быть внесены до или после сборки полимера. Последовательность нуклеотидов может прерываться отличными от нуклеотидов компонентами. Полинуклеотид можно дополнительно модифицировать после полимеризации, как, например, путем конъюгации с компонентом для мечения.

45 В аспектах настоящего изобретения выражения "химерная РНК", "химерная направляющая РНК", "направляющая РНК", "одионочная направляющая РНК" и "синтетическая направляющая РНК" используют взаимозаменяемо, и они обозначают полинуклеотидную последовательность, содержащую направляющую

последовательность, транс-последовательность и парную транс-последовательность.

Выражение "направляющая последовательность" обозначает последовательность из приблизительно 20 п.о. в пределах направляющей РНК, которая определяет целевой сайт, и ее можно использовать взаимозаменяемо с выражениями "гид" или "спейсер".

5 Выражение "парная транс-последовательность" также можно использовать взаимозаменяемо с выражением "прямой(ые) повтор(ы)".

Используемое в данном документе выражение "дикий тип" является выражением из данной области, понятным специалисту в данной области, и означает типичную форму организма, штамма, гена или характеристики, которые встречаются в природе в отличие
10 от мутантных или вариантных форм.

Используемое в данном документе выражение "вариант" следует понимать как означающее проявление качеств, которые характеризуются паттерном, который отличается от такового, встречающегося в природе.

Выражение "не встречающийся в природе" или "сконструированный" используют
15 взаимозаменяемо, и оно указывает на вмешательство человека. Выражения, в тех случаях, когда они касаются молекул нуклеиновых кислот или полипептидов, означают, что молекула нуклеиновой кислоты или полипептид по меньшей мере практически не содержат по меньшей мере один отличный компонент, с которым они естественным образом связаны в природе и встречаются в природе.

"Комплементарность" означает способность нуклеиновой кислоты образовывать
20 водородную(ые) связь(и) с другой последовательностью нуклеиновой кислоты при помощи либо традиционного спаривания оснований по Уотсону-Крику, либо других нетрадиционных типов. Процент комплементарности показывает процентную долю остатков в молекуле нуклеиновой кислоты, которые могут образовывать водородные
25 связи (к примеру, образование пар по Уотсону-Крику) со второй последовательностью нуклеиновой кислоты (к примеру, при этом 5, 6, 7, 8, 9, 10 из 10 будут на 50%, 60%, 70%, 80%, 90% и 100% комплементарны). "Точная комплементарность" означает, что все граничащие остатки последовательности нуклеиновой кислоты будут связаны
30 водородными связями с тем же количеством граничащих остатков во второй последовательности нуклеиновой кислоты. Выражение "практически комплементарный", используемое в данном документе, означает степень комплементарности, которая составляет по меньшей мере 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% или 100% в пределах участка из 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24,
35 25, 30, 35, 40, 45, 50 или более нуклеотидов, или относится к двум нуклеиновым кислотам, которые гибридизируются при жестких условиях.

Используемые в данном документе "жесткие условия" в отношении гибридизации означают условия, при которых нуклеиновая кислота с комплементарностью к целевой последовательности преимущественно гибридизируется с целевой последовательностью и практически не гибридизируется с нецелевыми последовательностями. Жесткие
40 условия, как правило, являются зависимыми от последовательности и изменяются в зависимости от ряда факторов. Как правило, чем длиннее последовательность, тем выше температура, при которой последовательность специфично гибридизируется с целевой последовательностью. Неограничивающие примеры жестких условий описаны подробно в Tijssen (1993), Laboratory Techniques In Biochemistry And Molecular Biology-
45 Hybridization With Nucleic Acid Probes Part I, Second Chapter "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assay", Elsevier, N.Y.

"Гибридизация" означает реакцию, при которой один или несколько полинуклеотидов реагируют с образованием комплекса, который стабилизируется посредством

образования водородных связей между основаниями нуклеотидных остатков.

Образование водородных связей может происходить по принципу спаривания оснований по Уотсону-Крику, Хугстиновского связывания или любым другим специфичным к последовательности образом. Комплекс может содержать две нити, образующие дуплексную структуру, три или более нитей, образующих многонитевой комплекс, 5 одиночную самогибридирующуюся нить или любую их комбинацию. Реакция габридации может представлять собой стадию в более обширном способе, такую как начальная стадия ПЦР или расщепление полинуклеотида при помощи фермента. Последовательность, способную гибридизироваться с данной последовательностью, называют "комплементарной последовательностью" данной последовательности. 10

Используемое в данном документе выражение "стабилизация" или "повышение стабильности" в отношении компонентов системы CRISPR относится к предохранению или обеспечению устойчивости структуры молекулы. Это можно выполнить путем введения одной или нескольких мутаций, в том числе замен одной или нескольких пар 15 оснований, увеличения количества "шпилек", образования перекрестных связей, разрушения определенных фрагментов нуклеотидов и других модификаций.

Модификации могут включать включение по меньшей мере одного не встречающегося в природе нуклеотида или модифицированного нуклеотида, или их аналогов.

Модифицированные нуклеотиды могут быть модифицированы по фрагменту рибозы, 20 фосфата и/или основания. Модифицированные нуклеотиды могут включать 2'-О-метил-аналоги, 2'-дезокс-аналоги или 2'-фтор-аналоги. Остов нуклеиновой кислоты можно модифицировать, например, можно использовать фосфотиоатный остов. Также возможно использование закрытых нуклеиновых кислот (LNA) или мостиковых нуклеиновых кислот (BNA). Дополнительные примеры модифицированных оснований 25 включают без ограничения 2-аминопурин, 5-бромурдин, псевдоурдин, инозин, 7-метилгуанозин. Такие модификации можно применять по отношению к любому компоненту системы CRISPR. В предпочтительных вариантах осуществления такие модификации осуществляют с РНК-компонентами, к примеру, направляющей РНК или химерной полинуклеотидной последовательностью.

Используемое в данном документе выражение "экспрессия" означает процесс, при котором полинуклеотид транскрибируется с ДНК-матрицы (как, например, с образованием мРНК или другого РНК-транскрипта), и/или способ, при помощи 30 которого транскрибированная мРНК далее транслируется с образованием пептидов, полипептидов или белков. Транскрипты и кодируемые полипептиды можно в совокупности называть "продукт гена". Если полинуклеотид получен из геномной ДНК, то экспрессия может включать сплайсинг иРНК в эукариотической клетке. 35

Выражения "полипептид", "пептид" и "белок" используют взаимозаменяемо в данном документе для обозначения полимеров из аминокислот любой длины. Полимер может быть линейным или разветвленным, он может содержать модифицированные 40 аминокислоты, и его структура может прерываться отличными от аминокислот компонентами. Выражения также охватывают полимер из аминокислот, который был модифицирован; например, образованием дисульфидных связей, гликозилированием, липидизацией, ацетилизацией, фосфорилированием или любой другой манипуляцией, такой как соединение с компонентом для мечения. Используемое в данном документе 45 выражение "аминокислота" включает природные и/или неприродные или синтетические аминокислоты, в том числе глицин и как D-, так и L-оптические изомеры, и аналога аминокислот, и пептидомиметики.

Выражения "субъект", "индивидуум" и "пациент" используют взаимозаменяемо в

данном документе для обозначения позвоночного, предпочтительно млекопитающего, более предпочтительно человека. Млекопитающие включают без ограничения мышей, обезьян, людей, сельскохозяйственных животных, животных для спорта и домашних животных. Также охватываются ткани, клетки и их потомство биологического
5 организма, полученные *in vivo* или культивированные *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления субъектом может быть беспозвоночное животное, например, насекомое или нематода; в то время как в других субъектом может быть растение или гриб.

Выражения "терапевтическое средство", "оказывающее терапевтический эффект средство" или "средство для лечения" используют взаимозаменяемо, и они означают
10 молекулу или соединение, которые оказывают некоторое благоприятное воздействие при введении субъекту. Благоприятное воздействие включает осуществление диагностических определений; облегчение заболевания, симптома, нарушения или патологического состояния; ослабление или предупреждение начала проявления заболевания, симптома, нарушения или состояния; а также общее противодействие
15 заболеванию, симптому, нарушению или патологическому состоянию.

Используемые в данном документе выражения "лечение", или "осуществление лечения", или "временное ослабление", или "облегчение" используют взаимозаменяемо. Эти выражения означают подход для получения благоприятных или желательных
20 результатов, в том числе без ограничения терапевтической полезности и/или профилактической полезности. Под терапевтическим эффектом понимают любые терапевтически значимые улучшение или действие в отношении одного или нескольких заболеваний, состояний или симптомов при лечении. Для профилактического эффекта композиции можно вводить субъекту с риском развития конкретного заболевания, состояния или симптома или субъекту, который сообщает об одном или нескольких
25 физиологических симптомах заболевания, даже если заболевание, состояние или симптом могли еще не проявиться.

Выражение "эффективное количество" или "терапевтически эффективное количество" означает количество средства, которого достаточно для обеспечения благоприятных или желательных результатов. Терапевтически эффективное количество может
30 изменяться в зависимости от одного или нескольких из: субъекта и болезненного состояния, которые подлежат лечению, веса и возраста субъекта, тяжести болезненного состояния, способа введения и подобного, что специалист в данной области легко может определить. Выражение также применимо к дозе, с помощью которой можно получить изображение для определения любым одним из способов визуализации, описанных в
35 данном документе. Конкретная доза может изменяться в зависимости от одного или нескольких из: конкретного выбранного средства, режима дозирования, которому следуют, того, вводят ли его в комбинации с другими средствами, выбора времени введения, визуализируемой ткани и физической системы доставки, в которой оно заключено.

Практическое применение настоящего изобретения предусматривает, если не указано иное, традиционные методики иммунологии, биохимии, химии, молекулярной биологии, микробиологии, клеточной биологии, геномики и технологию рекомбинантной ДНК, которые находятся в пределах квалификации специалиста в данной области. См.
40 Sambrook, Fritsch and Maniatis, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2nd edition (1989); CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F.M. Ausubel, et al. eds., (1987)); серия METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.): PCR 2: A PRACTICAL APPROACH (M.J. MacPherson, B.D. Hames and G.R. Taylor eds. (1995)), Harlow and Lane, eds. (1988) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, and ANIMAL CELL

CULTURE (R.I. Freshney, ed. (1987)).

Некоторые аспекты настоящего изобретения касаются векторных систем, содержащих один или несколько векторов, или векторов как таковых. Векторы могут быть разработаны для экспрессии транскриптов CRISPR (к примеру, транскриптов нуклеиновых кислот, белков или ферментов) в прокариотических или эукариотических клетках. Например, транскрипты CRISPR могут экспрессироваться в бактериальных клетках, как, например, *Escherichia coli*, клетках насекомых (с использованием бакуловирусных векторов экспрессии), клетках дрожжей или клетках млекопитающих. Подходящие клетки-хозяева дополнительно рассматриваются в Goeddel, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990). В качестве альтернативы рекомбинантный вектор экспрессии может транскрибироваться и транслироваться *in vitro*, например, при помощи регуляторных последовательностей промотора T7 и полимеразы T7.

Векторы можно вводить и размножать в прокариоте. В некоторых вариантах осуществления прокариота используют для амплификации копий вектора, который предполагается вводить в эукариотическую клетку, или в качестве промежуточного вектора при получении вектора, который предполагается вводить в эукариотическую клетку (к примеру, путем амплификации плазмиды как части системы упаковки вирусного вектора). В некоторых вариантах осуществления прокариота используют для амплификации копий вектора и экспрессии одной или нескольких нуклеиновых кислот, как, например, для обеспечения источника одного или нескольких белков для доставки в клетку-хозяина или организм-хозяин. Экспрессию белков в прокариотах наиболее часто осуществляют в *Escherichia coli* с векторами, содержащими конститутивные или индуцибельные промоторы, управляющие экспрессией либо слитых белков, либо отличных от слитых белков. В слитых векторах добавляют некоторое количество аминокислот к белку, закодированному в них, как, например, к аминоконцу рекомбинантного белка. Такие слитые векторы могут служить для одной или нескольких целей, как например: (i) для повышения экспрессии рекомбинантного белка; (ii) для повышения растворимости рекомбинантного белка и (iii) для содействия очистке рекомбинантного белка посредством функционирования в качестве лиганда при аффинной очистке. Часто в слитые векторы экспрессии сайт протеолигического расщепления вводят в место соединения фрагмента слияния и рекомбинантного белка для облегчения отделения рекомбинантного белка от фрагмента слияния после очистки слитого белка. Такие ферменты и их когнатные распознающие последовательности включают фактор Ха, тромбин и энтерокиназу. Иллюстративные слитые векторы экспрессии включают pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith and Johnson, 1988. Gene 67: 31-40), pMAL (New England Biolabs, Беверли, Массачусетс) и pRTT5 (Pharmacia, Пискатауэй, Нью-Джерси), в которых глутатион-S-трансфераза (GST), мальтоза-связывающий белок E или белок A, соответственно, слиты с целевым рекомбинантным белком.

Примеры подходящих индуцибельных не являющихся слитыми векторов экспрессии *E. coli* включают pTrc (Amrann et al., (1988) Gene 69: 301-315) и pET 11d (Studier et al., GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990) 60-89).

В некоторых вариантах осуществления вектор является вектором экспрессии для дрожжей. Примеры векторов для экспрессии в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* включают pYerSecl (Baldari, et al., 1987. EMBO J. 6: 229-234), pMFa (Kuijan and Herskowitz, 1982. Cell 30: 933-943), pJRY88 (Schultz et al., 1987. Gene 54: 113-123), pYES2 (Invitrogen Corporation, Сан-Диего, Калифорния) и picZ (Invitrogen Corp, Сан-Диего, Калифорния).

В некоторых вариантах осуществления вектор управляет экспрессией белка в клетках насекомых при помощи бакуловирусных векторов экспрессии. Бакуловирусные векторы, доступные для экспрессии белков в культивируемых клетках насекомых (к примеру, клетках SF9), включают группу pAc (Smith, et al., 1983. Mol. Cell. Biol. 3: 2156-2165) и группу pVL (Lucklow and Summers, 1989. Virology 170: 31-39).

В некоторых вариантах осуществления вектор способен управлять экспрессией одной или нескольких последовательностей в клетках млекопитающих при помощи вектора экспрессии для млекопитающих. Примеры векторов экспрессии для млекопитающих включают pCDM8 (Seed, 1987. Nature 329: 840) и pMT2PC (Kaufman, et al., 1987. EMBO J. 6: 187-195). При использовании клеток млекопитающих функции контроля вектора экспрессии, как правило, обеспечиваются одним или несколькими регуляторными элементами. Например, широко используемые промоторы получают из вируса полиомы, аденовируса 2, цитомегаловируса, вируса обезьян 40 и других, раскрытых в данном документе и известных в уровне техники. Что касается других подходящих систем экспрессии как для прокариотических, так и для эукариотических клеток, см., к примеру, главы 16 и 17 в Sambrook, et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989.

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные векторы экспрессии для млекопитающих способны управлять экспрессией нуклеиновой кислоты преимущественно в определенном типе клеток (к примеру, тканеспецифичные регуляторные элементы используют для экспрессии нуклеиновой кислоты). Тканеспецифичные регуляторные элементы известны из уровня техники. Неограничивающие примеры подходящих тканеспецифичных промоторов включают промотор гена альбумина (специфичный к печени; Pinkert, et al., 1987. Genes Dev. 1: 268-277), специфичные к лимфоидной ткани промоторы (Calame and Eaton, 1988. Adv. Immunol. 43: 235-275), в частности, промоторы рецепторов Т-клеток (Winoto and Baltimore, 1989. EMBO J. 8: 729-733) и иммуноглобулины (Baneiji, et al., 1983. Cell 33: 729-740; Queen and Baltimore, 1983. Cell 33: 741-748), нейрон-специфичные промоторы (к примеру, промотор гена нейрофиламента; Byrne and Ruddle, 1989. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 5473-5477), специфичные к клеткам поджелудочной железы промоторы (Edlund, et al., 1985. Science 230: 912-916) и специфичные к клеткам молочной железы промоторы (к примеру, промотор молочной сыворотки; патент США №4873316 и публикация европейской заявки №264166). Регулируемые стадией развития промоторы также охвачены, к примеру, промоторы генов hox мыши (Kessel and Grass, 1990. Science 249: 374-379) и промотор гена α -фетопротеина (Campes and Tilghman, 1989. Genes Dev. 3: 537- 546).

В некоторых вариантах осуществления регуляторный элемент является функционально связанным с одним или несколькими элементами системы CRISPR так, чтобы управлять экспрессией одного или нескольких элементов системы CRISPR. В целом, CRISPR (короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами), также известные как SPIDR (чередующиеся со спейсерами прямые повторы), составляют семейство локусов ДНК, которые, как правило, специфичны для определенного вида бактерий. Локус CRISPR включает определенный класс чередующихся коротких повторов последовательностей (SSR), которые были обнаружены у *E. coli* (Ishino et al., J. Bacteriol., 169: 5429-5433 [1987]; и Nakata et al., J. Bacteriol., 171: 3553-3556 [1989]), и ассоциированные гены. Подобные чередующиеся SSR были идентифицированы у *Haloferax mediterranei*, *Streptococcus pyogenes*, *Anabaena* и *Mycobacterium tuberculosis* (см., Groenen et al., Mol. Microbiol., 10: 1057-1065 [1993]; Hoe et al., Emerg. Infect. Dis., 5: 254-263

[1999]; Masepohl et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1307: 26-30 [1996]; и Mojica et al., *Mol. Microbiol.*, 17: 85-93 [1995]). Локусы CRISPR, как правило, отличаются от других SSR по структуре повторов, которые были названы короткими повторами с регулярными интервалами (SRSR) (Janssen et al., *OMICS J. Integ. Biol.*, 6:23-33 [2002]; и Mojica et al., *Mol. Microbiol.*, 36:244-246 [2000]). В целом, повторы являются короткими элементами, которые встречаются группами, которые регулярно разделены уникальными вставочными последовательностями с практически постоянной длиной (Mojica et al., [2000], выше). Несмотря на то, что последовательности повторов высоко консервативны между штаммами, некоторое количество чередующихся повторов и последовательностей спейсерных участков, как правило, отличаются от штамма к штамму (van Embden et al., *J. Bacteriol.*, 182: 2393-2401 [2000]). Локусы CRISPR были идентифицированы у более чем 40 видов прокариот (см., к примеру, Jansen et al., *Mol. Microbiol.*, 43: 1565-1575 [2002]; и Mojica et al., [2005]), в том числе, без ограничения, *Aeropyrum*, *Pyrobaculum*, *Sulfolobus*, *Archaeoglobus*, *Halocarcula*, *Methanobacterium*, *Methanococcus*, *Methanosarcina*, *Methanopyrus*, *Pyrococcus*, *Picrophilus*, *Thermoplasma*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Streptomyces*, *Aquifex*, *Porphyromonas*, *Chlorobium*, *Thermus*, *Bacillus*, *Listeria*, *Staphylococcus*, *Clostridium*, *Thermoanaerobacter*, *Mycoplasma*, *Fusobacterium*, *Azarcus*, *Chromobacterium*, *Neisseria*, *Nitrosomonas*, *Desulfovibrio*, *Geobacter*, *Mycococcus*, *Campylobacter*, *Wolinella*, *Acinetobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Legionella*, *Methylococcus*, *Pasteurella*, *Photobacterium*, *Salmonella*, *Xanthomonas*, *Yersinia*, *Treponema* и *Thermotoga*.

В целом, "система CRISPR" означает в совокупности транскрипты и другие элементы, участвующие в экспрессии CRISPR-ассоциированных ("Cas") генов или управлении их активностью, в том числе последовательности, кодирующие ген Cas, *tracr*-(трансактивируемую CRISPR) последовательность (к примеру, *tracrRNA* или активную частичную *tracrRNA*), парную *tracr*-последовательность (охватывающую "прямой повтор" и *tracrRNA*-процессированный неполный прямой повтор в контексте эндогенной системы CRISPR), направляющую последовательность (также называемую "спейсером" в контексте эндогенной системы CRISPR) или другие последовательности и транскрипты с локуса CRISPR. В некоторых вариантах осуществления один или несколько элементов системы CRISPR получены из системы CRISPR I типа, II типа или III типа. В некоторых вариантах осуществления один или несколько элементов системы CRISPR получены из определенного организма, содержащего эндогенную систему CRISPR, как, например, *Streptococcus pyogenes*. В целом, система CRISPR характеризуется элементами, которые способствуют образованию комплекса CRISPR на сайте целевой последовательности (также называемой протоспейсером в контексте эндогенной системы CRISPR). В контексте образования комплекса CRISPR "целевая последовательность" означает последовательность, по отношению к которой направляющая последовательность разработана так, чтобы обладать комплементарностью, где гибридизация между целевой последовательностью и направляющей последовательностью способствует образованию комплекса CRISPR. Полная комплементарность не обязательна при условии, что имеет место достаточная комплементарность для осуществления гибридизации и способствования образованию комплекса CRISPR. Целевая последовательность может содержать любой полинуклеотид, как, например, ДНК- или РНК-полинуклеотиды. В некоторых вариантах осуществления целевая последовательность расположена в ядре или цитоплазме клетки. В некоторых вариантах осуществления целевая последовательность может находиться в органелле эукариотической клетки, например, митохондрии или хлоропласте. Последовательность или матрицу, которую можно применять для рекомбинации в целевом локусе, содержащем целевые

последовательности, называют "матрицей редактирования", или "полинуклеотидом для редактирования", или "последовательностью для редактирования". В аспектах настоящего изобретения экзогенный матричный полинуклеотид можно называть матрицей редактирования. В одном аспекте настоящего изобретения рекомбинация является гомологичной рекомбинацией.

Как правило, в контексте эндогенной системы CRISPR образование комплекса CRISPR (содержащего направляющую последовательность, гибридизирующуюся с целевой последовательностью и образующую комплекс с одним или несколькими белками Cas) приводит к расщеплению одной или обеих нитей в или около (к примеру, в пределах 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 50 или более пар оснований от) целевой последовательности. Не желая быть связанными теорией, полагают, что *tracr*-последовательность, которая может содержать или состоять из всей или части *tracr*-последовательности дикого типа (к примеру, приблизительно или более чем приблизительно 20, 26, 32, 45, 48, 54, 63, 67, 85 или более нуклеотидов *tracr*-последовательности дикого типа), может также образовывать часть комплекса CRISPR, как, например, путем гибридизации вдоль по меньшей мере части *tracr*-последовательности со всей или частью парной *tracr*-последовательности, которая функционально связана с направляющей последовательностью. В некоторых вариантах осуществления *tracr*-последовательность обладает достаточной комплементарностью с парной *tracr*-последовательностью для гибридизации и участия в образовании комплекса CRISPR. Как и в случае с целевой последовательностью, полагают, что полная комплементарность не является необходимой при условии, что она является достаточной для выполнения функции. В некоторых вариантах осуществления *tracr*-последовательность характеризуется по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 99% комплементарности последовательности по длине парной *tracr*-последовательности при оптимальном выравнивании. В некоторых вариантах осуществления один или несколько векторов, управляющих экспрессией одного или нескольких элементов системы CRISPR, вводят в клетку-хозяина, так что экспрессия элементов системы CRISPR управляет образованием комплекса CRISPR на одном или нескольких целевых сайтах. Например, каждое из фермента Cas, направляющей последовательности, связанной с парной *tracr*-последовательностью, и *tracr*-последовательности может быть функционально связано с отдельными регуляторными элементами в отдельных векторах. В качестве альтернативы, два или более элементов, экспрессируемых с одних и тех же или разных регуляторных элементов, можно объединять в одном векторе, с одним или несколькими дополнительными векторами, обеспечивая любые компоненты системы CRISPR, не включенные в первый вектор. Элементы системы CRISPR, которые объединены в один вектор, могут быть расположены в любой удобной ориентации, как, например, один элемент, расположенный 5' ("выше") относительно или 3' ("ниже") относительно второго элемента. Кодированная последовательность одного элемента может быть расположена на той же или противоположной нити кодирующей последовательности второго элемента и направлена в том же или противоположном направлении. В некоторых вариантах осуществления один промотор управляет экспрессией транскрипта, кодирующего фермент CRISPR, и одной или нескольких из направляющей последовательности, парной *tracr*-последовательности (необязательно функционально связанной с направляющей последовательностью) и *tracr*-последовательности, встроенных в одну или несколько интронных последовательностей (к примеру, каждая в разном интроне, две или более по меньшей мере в одном интроне или все в одном интроне). В некоторых вариантах

осуществления фермент CRISPR, направляющая последовательность, парная *trac*-последовательность и *trac*-последовательность функционально связаны с одним и тем же промотором и экспрессируются с него.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит один или несколько сайтов встраивания, как, например, последовательность узнавания рестрикционной эндонуклеазой (также называемая "сайтом клонирования"). В некоторых вариантах осуществления один или несколько сайтов встраивания (к примеру, приблизительно или более чем приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более сайтов встраивания) расположены выше и/или ниже одного или нескольких элементов последовательности одного или нескольких векторов. В некоторых вариантах осуществления вектор содержит сайт встраивания выше парной *trac*-последовательности и необязательно ниже регуляторного элемента, функционально связанного с парной *trac*-последовательностью, так что после встраивания направляющей последовательности в сайт встраивания и при экспрессии направляющая последовательность управляет специфичным к последовательности связыванием комплекса CRISPR с целевой последовательностью в эукариотической клетке. В некоторых вариантах осуществления вектор содержит два или более сайта встраивания, при этом каждый сайт встраивания расположен между двумя парными *trac*-последовательностями с тем, чтобы обеспечить возможность встраивания направляющей последовательности в каждый сайт. В таком расположении две или более направляющие последовательности могут содержать две или более копий одной направляющей последовательности, две или более различных направляющих последовательностей или их комбинации. В тех случаях, когда применяют несколько различных направляющих последовательностей, может быть использована одна экспрессирующая конструкция для целенаправленного воздействия активности CRISPR на несколько различных соответствующих целевых последовательностей в клетке. Например, один вектор может содержать приблизительно или более чем приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 или более направляющих последовательностей. В некоторых вариантах осуществления приблизительно или более чем приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более таких содержащих направляющие последовательности векторов могут быть предусмотрены и необязательно доставлены в клетку.

В некоторых вариантах осуществления вектор содержит регуляторный элемент, функционально связанный с кодирующей фермент последовательностью, кодирующей фермент CRISPR, как, например, белок Cas. Неограничивающие примеры белков Cas включают Cas1, Cas1B, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8, Cas9 (также известный как Csn1 и Csx12), Cas10, Csy1, Csy2, Csy3, Csc1, Cse2, Csc1, Csc2, Csa5, Csn2, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csm6, Cmr1, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Csb1, Csb2, Csb3, Csx17, Csx14, Csx10, Csx16, CsaX, Csx3, Csx1, Csx15, Csf1, Csf2, Csf3, Csf4, их гомологи или их модифицированные варианты. Эти ферменты известны; например, аминокислотную последовательность белка Cas9 *S. pyogenes* можно найти в базе данных SwissProt под номером доступа Q99ZW2. В некоторых вариантах осуществления немодифицированный фермент CRISPR характеризуется активностью для расщепления ДНК, как, например, Cas9. В некоторых вариантах осуществления фермент CRISPR представляет собой Cas9, и им может быть Cas9 из *S. pyogenes* или *S. pneumoniae*. В некоторых вариантах осуществления фермент CRISPR управляет расщеплением одной или обеих нитей в определенной точке целевой последовательности, как, например, в пределах целевой последовательности и/или в пределах комплементарной последовательности целевой последовательности. В некоторых вариантах осуществления фермент CRISPR управляет

расщеплением одной или обеих нитей в пределах приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 50, 100, 200, 500 или более пар оснований от первого или последнего нуклеотида целевой последовательности. В некоторых вариантах осуществления вектор кодирует фермент CRISPR, который является мутированным по отношению к

5 соответствующему ферменту дикого типа, так что у мутированного фермента CRISPR отсутствует способность расщеплять одну или обе нити целевого полинуклеотида, содержащего целевую последовательность. Например, замена аспартата на аланин (D10A) в каталитическом домене RuvC I Cas9 из *S. pyogenes* трансформирует Cas9 из нуклеазы, которая расщепляет обе нити, в никазу (расщепляет одну нить). Другие

10 примеры мутаций, которые превращают Cas9 в никазу, включают без ограничения H840A, N854A и N863A. В некоторых вариантах осуществления никазу Cas9 можно использовать в комбинации с направляющей(ими) последовательность(ями), к примеру, двумя направляющими последовательностями, которые целенаправленно воздействуют, соответственно, на смысловую и антисмысловую нити ДНК-мишени. Эта комбинация

15 позволяет надрезать обе нити и использовать их для индукции NHEJ. Авторы данной заявки показали (данные не показаны) эффективность двух мишеней для никаза (т.е. sgRNA, нацеленных на одну и ту же точку, но на различные нити ДНК) при индуцировании мутагенного NHEJ. Одиночная никаза (Cas9-D10A с одной sgRNA) не способна индуцировать NHEJ и создавать вставки/делеции, но авторы данной заявки

20 показали, что двойная никаза (Cas9- D10A и две sgRNA, нацеленные на различные нити в одной и той же точке) способна делать это в эмбриональных стволовых клетках человека (hESC). Эффективность составляет приблизительно 50% таковой нуклеазы (т.е. нормального Cas9 без мутации D10) в hESC.

В качестве дополнительного примера два или более каталитических доменов Cas9

25 (RuvC I, RuvC II и RuvC III) можно подвергать мутациям с получением мутированного Cas9, у которого практически отсутствует вся активность для расщепления ДНК. В некоторых вариантах осуществления мутацию D10A объединяют с одной или несколькими из мутаций H840A, N854A или N863A с получением фермента Cas9, у которого практически отсутствует вся активность для расщепления ДНК. В некоторых

30 вариантах осуществления фермент CRISPR рассматривают как такой, у которого практически отсутствует вся активность для расщепления ДНК, в случаях, когда активность для расщепления ДНК мутированного фермента составляет менее приблизительно 25%, 10%, 5%, 1%, 0,1%, 0,01% или меньше по отношению к его не мутированной форме. Могут быть целесообразными другие мутации; в тех случаях,

35 когда Cas9 или другой фермент CRISPR получен из вида, отличного от *S. pyogenes*, могут быть произведены мутации в соответствующих аминокислотах для достижения подобных эффектов.

В некоторых вариантах осуществления кодирующая фермент последовательность, кодирующая фермент CRISPR, является кодон-оптимизированной для экспрессии в

40 определенных клетках, как, например, эукариотических клетках. Эукариотические клетки могут быть клетками определенного организма или полученными из него, как, например, млекопитающего, в том числе, без ограничения, человека, мыши, крысы, кролика, собаки или отличного от человека примата. В целом, оптимизация кодонов означает способ модификации последовательности нуклеиновой кислоты для повышения

45 экспрессии в представляющих интерес клетках-хозяевах путем замещения по меньшей мере одного кодона (к примеру, приблизительно или более чем приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 50 или более кодонов) нативной последовательности кодонами, которые чаще или наиболее часто используют в генах этой клетки-хозяина, в то же

время сохранения нативную аминокислотную последовательность. Разные виды проявляют определенное "предпочтение" в отношении конкретных кодонов определенной аминокислоты. "Предпочтение" кодонов (различия в частоте использования кодонов между организмами) часто соотносят с эффективностью трансляции информационной РНК (иРНК), которая, в свою очередь, как полагают, зависит, среди прочего, от свойств кодонов, которые транслируются, и доступности конкретных молекул транспортной РНК (тРНК). Преобладание выбранных тРНК в клетке, как правило, является отражением кодонов, используемых наиболее часто при синтезе пептидов. Соответственно, гены могут быть приспособлены для оптимальной экспрессии генов в данном организме с использованием оптимизации кодонов. Таблицы частоты использования кодонов общедоступны, например, в "Базе данных частот использования кодонов" ("Codon Usage Database"), и эти таблицы можно адаптировать различными способами. См. Nakamura, Y., et al. "Codon usage tabulated from the international DNA sequence databases: status for the year 2000" Nucl. Acids Res. 28:292 (2000). Также доступны компьютерные алгоритмы для оптимизации кодонов определенной последовательности для экспрессии в определенной клетке-хозяине, как, например, также доступный Gene Forge (Aptagen; Джакобус, Пенсильвания). В некоторых вариантах осуществления один или несколько кодонов (к примеру, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 50 или более или все кодоны) в последовательности, кодирующей фермент CRISPR, соответствуют наиболее часто используемому кодону для определенной аминокислоты.

В некоторых вариантах осуществления вектор кодирует фермент CRISPR, содержащий одну или несколько последовательностей ядерной локализации (NLS), как, например, приблизительно или более чем приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более NLS. В некоторых вариантах осуществления фермент CRISPR содержит приблизительно или более чем приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более NLS на аминоконце или рядом с ним, приблизительно или более чем приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более NLS на карбокси-конце или рядом с ним или комбинацию этого (к примеру, одну или несколько NLS на аминоконце и одну или несколько NLS на карбокси-конце). В тех случаях, когда присутствуют несколько NLS, каждая может быть выбрана независимо от других, так что одна NLS может присутствовать в нескольких копиях и/или в комбинации с одной или несколькими другими NLS, присутствующими в одной или нескольких копиях. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения фермент CRISPR содержит самое большее 6 NLS. В некоторых вариантах осуществления считают, что NLS находится рядом с N- или C-концом в тех случаях, когда самая близкая аминокислота NLS находится в пределах приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 или более аминокислот вдоль полипептидной цепи от N- или C-конца. Обычно, NLS состоит из одной или нескольких коротких последовательностей положительно заряженных молекул лизина или аргинина, расположенных на поверхности белка, но известны другие типы NLS. Неограничивающие примеры NLS включают NLS-последовательности, полученные из: NLS из большого Т-антигена вируса SV40 с аминокислотной последовательностью PKKKRKV; NLS из нуклеоплазмينا (к примеру, двойной NLS из нуклеоплазмينا с последовательностью KRPAATKKAGQAKKKK); NLS из с-мус с аминокислотной последовательностью PAAKRVKLD или RQRRNELKRSP; NLS из hRNPA1 M9 с последовательностью NQSS NFGPMKGGNFGGRSSGPYGGGGQYFAKPRNQGGY; последовательность RMRIZFKN KGKTDTAELRRRRVEVSVELRKAkkDEQILKRRNV домена IBB из импортина-альфа; последовательности VSRKRPRP и PPKKARED из Т-белка миомы; последовательность PPKKKPL из p53 человека; последовательность SALIKKKKKMAP из с-abl IV мышцы;

последовательности DRLRR и PKQKKRK из NS1 вируса гриппа; последовательность PKLKKKIKKL из дельта-антигена вируса гепатита; последовательность REKKKFLKRR из белка Mx1 мыши; последовательность KRKGDEV DGVDEVAKKKSKK из поли(АДФ-рибоза)-полимеразы человека и последовательность RKCLQAGMNLEARKTKK из рецепторов стероидных гормонов для глюкокортикоидов (человека).

В целом, одна или несколько NLS являются достаточно эффективными, чтобы управлять накоплением фермента CRISPR в обнаруживаемом количестве в ядре эукариотической клетки. В целом, степень проявления активности ядерной локализации может быть результатом следующего: количества NLS в ферменте CRISPR, конкретных (ой) используемых(ой) NLS или комбинации этих факторов. Обнаружение накопления в ядре можно выполнять при помощи любой подходящей методики. Например, детектируемый маркер может быть слит с ферментом CRISPR, так что расположение в клетке может быть визуализировано, как, например, в комбинации со средствами для обнаружения расположения ядра (к примеру, окрашивающим средством, специфичным к ядру, таким как DAPI). Примеры детектируемых маркеров включают флуоресцентные белки (такие как зеленые флуоресцентные белки или GFP; RFP; CFP) и эпитопные метки (HA-метку, flag-метку, SNAP-метку). Ядра клеток также можно выделять из клеток, содержащее которых можно затем анализировать при помощи любого подходящего способа для обнаружения белка, как, например, иммуногистохимии, вестерн-блоттинга или анализа на активность фермента. Накопление в ядре также можно определить опосредованно, как, например, при помощи анализа действия образования комплекса CRISPR (к примеру, анализа на расщепление ДНК или мутацию в целевой последовательности или анализа на измененную при помощи образования комплекса CRISPR и/или активности фермента CRISPR активность экспрессии генов) по сравнению с контролем, который не подвергали воздействию фермента или комплекса CRISPR или подвергали воздействию фермента CRISPR, у которого отсутствуют одна или несколько NLS.

В целом, направляющая последовательность представляет собой любую полинуклеотидную последовательность, обладающую достаточной комплементарностью с целевой полинуклеотидной последовательностью для гибридизации с целевой последовательностью и управления специфичным к последовательности связыванием комплекса CRISPR с целевой последовательностью. В некоторых вариантах осуществления степень комплементарности между направляющей последовательностью и ее соответствующей целевой последовательностью при оптимальном выравнивании с использованием подходящего алгоритма выравнивания составляет приблизительно или более чем приблизительно 50%, 60%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97,5%, 99% или более. Оптимальное выравнивание можно определять при помощи любого подходящего алгоритма для выравниваемых последовательностей, неограничивающие примеры которого включают алгоритм Смита-Ватермана, алгоритм Нидлмана-Вунша, алгоритмы, основанные на преобразовании Барроуза-Уилера (к примеру, Burrows Wheeler Aligner), ClustalW, Clustal X, BLAT, Novoalign (Novocraft Technologies), ELAND (Illumina, Сан-Диего, Калифорния), SOAP (доступный на soap.genomics.org.cn) и Maq (доступный на maq.sourceforge.net). В некоторых вариантах осуществления направляющая последовательность составляет приблизительно или более чем приблизительно 5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 75 или более нуклеотидов в длину. В некоторых вариантах осуществления направляющая последовательность составляет менее чем приблизительно 75, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 12 или менее нуклеотидов в

длину. Способность направляющей последовательности управлять специфичным к последовательности связыванием комплекса CRISPR с целевой последовательностью можно оценить при помощи любого подходящего анализа. Например, компоненты системы CRISPR, достаточные для образования комплекса CRISPR, в том числе направляющая последовательность, которую необходимо исследовать, могут быть доставлены в клетку-хозяина с соответствующей целевой последовательностью, как, например, при помощи трансфекции векторами, кодирующими компоненты последовательности CRISPR, с последующей оценкой предпочтительного расщепления в пределах целевой последовательности, как, например, при помощи анализа с помощью Surveyor, который описан в данном документе. Подобным образом, расщепление целевой полинуклеотидной последовательности может быть установлено в пробирке путем обеспечения целевой последовательности, компонентов комплекса CRISPR, в том числе направляющей последовательности, которую необходимо исследовать, и контрольной направляющей последовательности, отличной от тестовой направляющей последовательности, и сравнения воздействий тестовой и контрольной направляющей последовательности на связывание или скорость расщепления целевой последовательности. Другие анализы возможны и будут очевидны специалисту в данной области.

Направляющая последовательность может быть выбрана для целенаправленного воздействия на любую целевую последовательность. В некоторых вариантах осуществления целевая последовательность является последовательностью в пределах генома клетки. Иллюстративные целевые последовательности включают те, которые являются уникальными в целевом геноме. Например, для Cas9 *S. pyogenes* уникальная целевая последовательность в геноме может включать целевой сайт для Cas9 в виде **MMMMMMMMNNNNNNNNNNNNXGG**, где **NNNNNNNNNNNNXGG** (N представляет собой A, G, T или C; и X может быть любым) характеризуется единичным появлением в геноме. Уникальная целевая последовательность в геноме может включать целевой сайт для Cas9 *S. pyogenes* в виде **MMMMMMMMNNNNNNNNNNNNXGG** где **NNNNNNNNNNNNXGG** (N представляет собой A, G, T или C; и X может быть любым) характеризуется единичным появлением в геноме. Для Cas9 CRISPR1 *S. thermophilus* уникальная целевая последовательность в геноме может включать целевой сайт для Cas9 в виде **MMMMMMMMNNNNNNNNNNNNXXAGAAW**, где **NNNNNNNNNNNNXXAGAAW** (N представляет собой A, G, T или C; X может быть любым; и W представляет собой A или T) характеризуется единичным появлением в геноме. Уникальная целевая последовательность в геноме может включать целевой сайт для Cas9 CRISPR1 *S. thermophilus* в виде **MMMMMMMMNNNNNNNNNNNNXXAGAAW**, где **NNNNNNNNNNNNXXAGAAW** (N представляет собой A, G, T или C; X может быть любым; и W представляет собой A или T) характеризуется единичным появлением в геноме. Для Cas9 *S. pyogenes* уникальная целевая последовательность в геноме может включать целевой сайт для Cas9 в виде **MMMMMMMMNNNNNNNNNNNNXGGXG**, где **NNNNNNNNNNNNXGGXG** (N представляет собой A, G, T или C; и X может быть любым) характеризуется единичным появлением в геноме. Уникальная целевая последовательность в геноме может включать целевой сайт для Cas9 *S. pyogenes* в виде **MMMMMMMMNNNNNNNNNNNNXGGXG** где **NNNNNNNNNNNNXGGXG** (N представляет собой A, G, T или C; и X может быть любым) характеризуется единичным появлением в геноме. В каждой из этих последовательностей "M" может представлять

собой А, G, T или C и не должен учитываться при идентификации последовательности как уникальной.

В некоторых вариантах осуществления направляющая последовательность выбрана для снижения доли вторичной структуры в направляющей последовательности.

5 Вторичную структуру можно определить при помощи любого подходящего алгоритма сворачивания полинуклеотида. Некоторые программы основаны на вычислении минимальной свободной энергии Гиббса. Примером одного такого алгоритма является mFold, который описан Zuker и Stiegler (Nucleic Acids Res. 9 (1981), 133-148). Другим примером алгоритма сворачивания является доступный в режиме онлайн веб-сервер
10 RNAfold, разработанный в Институте теоретической химии при Венском университете, в котором используется алгоритм прогнозирования структуры на основе центроидного метода (см., к примеру, A.R. Gruber et al., 2008, Cell 106(1): 23-24; и PA Carr and GM Church, 2009, Nature Biotechnology 27(12): 1151-62). Дополнительные алгоритмы можно найти в заявке на патент США с серийным номером ТВА (общая ссылка В1-2012/084
15 44790.11.2022); включенной в данный документ при помощи ссылки.

В общем, парная *tracr*-последовательность включает любую последовательность, которая характеризуется достаточной комплементарностью с *tracr*-последовательностью для содействия одному или нескольким из следующих: (1) вырезания направляющей последовательности, фланкированной парными *tracr*-последовательностями, в клетке,
20 содержащей соответствующую *tracr*-последовательность; и (2) образования комплекса CRISPR на целевой последовательности, где комплекс CRISPR содержит парную *tracr*-последовательность, гибридизирующуюся с *tracr*-последовательностью. В общем, степень комплементарности указана на основании оптимального выравнивания парной *tracr*-последовательности и *tracr*-последовательности по длине более короткой из двух
25 последовательностей. Оптимальное выравнивание можно определить при помощи любого подходящего алгоритма выравнивания и можно дополнительно высчитать для вторичных структур, как, например, самокомплементарность в пределах либо *tracr*-последовательности, либо парной *tracr*-последовательности. В некоторых вариантах осуществления степень комплементарности между *tracr*-последовательностью и парной
30 *tracr*-последовательностью по длине более короткой из двух при оптимальном выравнивании составляет приблизительно или более чем приблизительно 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97,5%, 99% или более. Примерные иллюстрации оптимального выравнивания между *tracr*-последовательностью и парной *tracr*-последовательностью представлены на фигурах 12В и 13В. В некоторых вариантах
35 осуществления *tracr*-последовательность составляет приблизительно или более чем приблизительно 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 50 или более нуклеотидов в длину. В некоторых вариантах осуществления *tracr*-последовательность и парная *tracr*-последовательность содержатся в одном транскрипте, так что гибридизация между ними двумя дает транскрипт со вторичной структурой, такой как
40 "шпилька". Предпочтительные петлеобразующие последовательности для использования в "шпилечных" структурах составляют четыре нуклеотида в длину и наиболее предпочтительно имеют последовательность GAAA. Однако можно использовать более короткие или длинные последовательности петли, а также альтернативные последовательности. Последовательности предпочтительно включают нуклеотидный триплет (например, AAA) и дополнительный нуклеотид (например, C или G). Примеры петлеобразующих последовательностей включают СААА и АААG. В одном варианте осуществления настоящего изобретения транскрипт или транскрибируемая полинуклеотидная последовательность характеризуются по меньшей мере двумя или

более "шпильками". В предпочтительных вариантах осуществления транскрипт характеризуется двумя, тремя, четырьмя или пятью "шпильками". В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения транскрипт характеризуется самое большее пятью "шпильками". В некоторых вариантах осуществления один транскрипт дополнительно включает последовательность терминации транскрипции; предпочтительно она является полиТ-последовательностью, например, из шести нуклеотидов Т. Примерная иллюстрация такой "шпилечной" структуры представлена в нижней части фигуры 13В, где часть последовательности в 5' направлении по отношению к концевому "N" и выше петли соответствует парной *trac*-последовательности, а часть последовательности в 3' направлении по отношению к петле соответствует *trac*-последовательности. Дополнительными неограничивающими примерами отдельных полинуклеотидов, содержащих направляющую последовательность, парную *trac*-последовательность и *trac*-последовательность, являются следующие (перечисленные от 5' к 3'), где "N" представляет собой основание направляющей последовательности, первый блок букв нижнего регистра представляет собой парную *trac*-последовательность, а второй блок букв нижнего регистра представляет собой *trac*-последовательность, и конечная поли-Т-последовательность представляет собой терминатор транскрипции:

(1) NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNggttttgactctcaagatttaGAAAtaaatcttgacagaagctacaagataaggcttcatgccgaaatcaacaccctgtcattttatggcagggtgttttcgttatttaaTTTTTT;

(2) NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNggttttgactctcaGAAAtgcagaagctacaagataaggcttcatgccgaaatcaacaccctgtcattttatggcagggtgttttcgttatttaaTTTTTT;

(3) NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNggttttgactctcaGAAAtgcagaagctacaagataaggcttcatgccgaaatcaacaccctgtcattttatggcagggtgtTTTTTT;

(4) NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNggttttagagctaGAAAtagcaagttaaaataaggctagtcggttatcaacttgaaaaagtggcaccgagtcggtgcTTTTTT;

(5) NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNggttttagagctaGAAATAGcaagttaaaataaggctagtcggttatcaacttgaaaaagtgtTTTTTT и (6)

(6) NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNggttttagagctagAAATAGcaagttaaaataaggctagtcggttatcaTTTTT TTT. В некоторых вариантах осуществления последовательности (1)-(3) используют в комбинации с Cas9 из CRISPR1 *S. thermophilus*. В некоторых вариантах осуществления последовательности (4)-(6) используют в комбинации с Cas9 из *S. pyogenes*. В некоторых вариантах осуществления *trac*-последовательность является транскриптом, отдельным от транскрипта, содержащего парную *trac*-последовательность (как, например, показанная в верхней части фигуры 13В).

В некоторых вариантах осуществления также предусмотрена матрица для рекомбинации. Матрица для рекомбинации может быть компонентом другого вектора, который описан в данном документе, может содержаться в отдельном векторе или предусматриваться в виде отдельного полинуклеотида. В некоторых вариантах осуществления матрица для рекомбинации разработана так, чтобы служить в качестве матрицы при гомологичной рекомбинации, как, например, в пределах или рядом с целевой последовательностью, надрезанной или расщепленной ферментом CRISPR, в качестве части комплекса CRISPR. Матричный полинуклеотид может быть любой

подходящей длины, как, например, приблизительно или более чем приблизительно 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 500, 1000 или более нуклеотидов в длину. В некоторых вариантах осуществления матричный полинуклеотид комплементарен части полинуклеотида, содержащего целевую последовательность. При оптимальном
5 выравнивании матричный полинуклеотид может перекрываться с одним или несколькими нуклеотидами целевых последовательностей (к примеру, с приблизительно или более чем приблизительно 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100 или более нуклеотидами). В некоторых вариантах осуществления при оптимальном
10 выравнивании матричной последовательности и полинуклеотида, содержащего целевую последовательность, наиболее близкий нуклеотид матричного полинуклеотида находится в пределах приблизительно 1, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500, 1000, 5000, 10000 или более нуклеотидов от целевой последовательности.

В некоторых вариантах осуществления фермент CRISPR является частью слитого белка, содержащего один или несколько доменов гетерологичного белка (к примеру,
15 приблизительно или более чем приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более доменов в дополнение к ферменту CRISPR). Слитый белок, содержащий фермент CRISPR, может содержать любую дополнительную последовательность белка и необязательно линкерную последовательность между любыми двумя доменами. Примеры белковых доменов, которые могут быть слиты с ферментом CRISPR, включают, без ограничения,
20 эпитопные метки, последовательности генов-репортеров и белковые домены с одним или несколькими из следующих видов активности: метилазной активности, деметилазной активности, активности для активации транскрипции, активности для репрессии транскрипции, активности фактора освобождения при транскрипции, активности для модификации гистонов, активности для расщепления ДНК и активности для связывания
25 нуклеиновой кислоты. Неограничивающие примеры эпитопных меток включают гастидиновые (His) метки, V5-метки, FLAG-метки, метки гемагглютинаина вируса гриппа (HA), Мус-метки, VSV-G-метки и тиоредоксиновые (Trx) метки. Примеры генов-репортеров включают, без ограничения, глутатион-S-трансферазу (GST), пероксидазу хрена (HRP), хлорамфеникол-ацетилтрансферазу (CAT), бета-галактозидазу, бета-
30 глюкоуридазу, люциферазу, зеленый флуоресцентный белок (GFP), HcRed, DsRed, голубой флуоресцентный белок (CFP), желтый флуоресцентный белок (YFP) и автофлуорисцирующие белки, в том числе синий флуоресцентный белок (BFP). Фермент CRISPR может быть слит с последовательностью гена, кодирующей белок или фрагмент
35 белка, которые связываются с молекулой ДНК или связываются с другими клеточными молекулами, в том числе, без ограничения, связывающим мальтозу белком (МБП), S-меткой, продуктами слияния Lex A и ДНК-связывающего домена (DBD), продуктами слияния GAL4 и ДНК-связывающего домена и продуктами слияния белка BP 16 вируса простого герпеса (HSV). Дополнительные домены, которые могут образовывать часть
40 слитого белка, содержащего фермент CRISPR, описаны в US 20110059502, включенном в данный документ при помощи ссылки. В некоторых вариантах осуществления меченный фермент CRISPR используют для идентификации расположения целевой последовательности.

В некоторых аспектах настоящее изобретение предусматривает способы, включающие доставку одного или нескольких полинуклеотидов, как, например, или одного или
45 нескольких векторов, которые описаны в данном документе, одного или нескольких их транскриптов и/или одного или нескольких белков, транскрибируемых с них, в клетку-хозяина. В некоторых аспектах настоящее изобретение дополнительно предусматривает клетки, полученные при помощи таких способов, и организмы (такие

как животные, растения или грибы), содержащие такие клетки или полученные из них. В некоторых вариантах осуществления фермент CRISPR в комбинации с (и необязательно образующий комплекс с) направляющей последовательностью доставляют в клетку. Традиционные способы переноса генов с использованием вирусов и без использования вирусов можно применять для введения нуклеиновых кислот в клетки млекопитающих или целевые ткани. Такие способы можно использовать для введения нуклеиновых кислот, кодирующих компоненты системы CRISPR, в клетки в культуре и в организме-хозяине. Системы доставки на основе отличных от вирусных векторов включают ДНК-плазмиды РНК (к примеру, транскрипт вектора, описанного в данном документе), "оголенную" нуклеиновую кислоту и нуклеиновую кислоту, образующую комплекс со средством доставки, как, например, липосому. Системы доставки на основе вирусного вектора включают ДНК- и РНК-вирусы, которые имеют либо эписомальный, либо интегрированный геномы после доставки в клетку. В отношении обзора процедур генной терапии см. Anderson, *Science* 256: 808-813 (1992); Nabel & Feigner, *TIBTECH* 11: 211-217 (1993); Mitani & Caskey, *TIBTECH* 11: 162-166 (1993); Dillon, *TIBTECH* 11: 167-175 (1993); Miller, *Nature* 357: 455-460 (1992); Van Brunt, *Biotechnology* 6(10): 1149-1154 (1988); Vigne, *Restorative Neurology and Neuroscience* 8: 35-36 (1995); Kremer & Perricaudet, *British Medical Bulletin* 51(1): 31-44 (1995); Haddada et al., в *Current Topics in Microbiology and Immunology*, Doerfler and Böhm (eds) (1995); и Yu et al., *Gene Therapy* 1: 13-26 (1994).

Способы отличной от вирусной доставки нуклеиновых кислот включают липофекцию, нуклеофекцию, микроинъекцию, баллистическую трансфекцию, виросомы, липосомы, иммунолипосомы, поликатион или конъюгаты липид: нуклеиновая кислота, "оголенную" ДНК, искусственные вирионы и повышенное при помощи средства поглощение ДНК. Липофекция описана, например, в патентах США №№5049386, 4946787 и 4897355), и реагенты для липофекции реализуются в промышленных масштабах (к примеру, Transfectam™ и Lipofectin™). Катионные и нейтральные липиды, которые подходят для эффективной липофекции полинуклеотидов с узнаванием рецептора, включают таковые из Feigner, WO 91/17424; WO 91/16024. Доставка может осуществляться в клетки (к примеру, *in vitro* или *ex vivo* введение) или целевые ткани (к примеру, *in vivo* введение).

Получение комплексов липид: нуклеиновая кислота, в том числе целенаправленно воздействующих липосом, как, например, иммунолипидных комплексов, хорошо известно специалистам в данной области (см., к примеру, Crystal, *Science* 270: 404-410 (1995); Blaese et al., *Cancer Gene Ther.* 2: 291-297 (1995); Behr et al., *Bioconjugate Chem.* 5: 382-389 (1994); Remy et al., *Bioconjugate Chem.* 5: 647-654 (1994); Gao et al., *Gene Therapy* 2: 710-722 (1995); Ahmad et al., *Cancer Res.* 52: 4817-4820 (1992); патенты США №№4186183, 4217344, 4235871, 4261975, 4485054, 4501728, 4774085, 4837028 и 4946787).

При применении систем на основе РНК- и ДНК-вирусов для доставки нуклеиновых кислот используют тщательно разработанные способы обеспечения целенаправленного воздействия вируса на конкретные клетки в организме и перемещения полезных последовательностей вируса в ядро. Вирусные векторы можно вводить непосредственно пациентам (*in vivo*) или их можно использовать для обработки клеток *in vitro* и модифицированные клетки можно необязательно вводить пациентам (*ex vivo*). Традиционные системы на основе вирусов могут включать ретровирусные, лентивирусные, аденовирусные векторы, векторы на основе аденоассоциированного вируса и вируса простого герпеса для переноса генов. Интеграция в геном хозяина возможна со способами переноса генов на основе ретровируса, лентивируса и аденоассоциированного вируса, что часто приводит к длительной экспрессии встроенного трансгена. Кроме того, высокие показатели эффективности трансдукции

наблюдали у многих различных типов клеток и целевых тканей.

Тропизм ретровирусов может быть изменен путем включения чужеродных белков оболочки с расширением возможной целевой популяции целевых клеток. Лентивирусные векторы являются ретровирусными векторами, которые способны трансфицировать или инфицировать неделящиеся клетки и, как правило, дают высокие вирусные титры. Выбор системы переноса генов на основе ретровирусов, таким образом, будет зависеть от целевой ткани. Ретровирусные векторы состоят из действующих в цис-положении длинных концевых повторов с упаковывающей способностью до 6-10 п.о. чужеродной последовательности. Минимальных действующих в цис-положении LTR достаточно для репликации и упаковки векторов, которые затем используют для интеграции терапевтического гена в целевую клетку с получением постоянной экспрессии трансгена. Широко применяемые ретровирусные векторы включают такие, которые основаны на вирусе лейкоза мышей (MuLV), вирусе лейкоза гиббонов (GaLV), вирусе иммунодефицита обезьян (SIV), вирусе иммунодефицита человека (HIV) и их комбинациях (см., к примеру, Buchscher et al., J. Virol. 66: 2731-2739 (1992); Johann et al., J. Virol. 66: 1635-1640 (1992); Sommerfelt et al., Virol. 176:58-59 (1990); Wilson et al., J. Virol. 63: 2374-2378 (1989); Miller et al., J. Virol. 65: 2220-2224 (1991); PCT/US94/05700).

В применениях, в которых транзистная экспрессия является предпочтительной, можно применять системы на основе аденовирусов. Векторы на основе аденовирусов способны проявлять очень высокую эффективность трансдукции во многих типах клеток и не требуют деления клеток. С такими векторами были получены высокие титры и уровни экспрессии. Такой вектор можно получать в больших количествах в относительно простой системе. Векторы на основе аденоассоциированного вируса ("AAV") также можно использовать для трансдукции клеток целевыми нуклеиновыми кислотами, к примеру, при получении *in vitro* нуклеиновых кислот и пептидов, и для процедур генной терапии *in vivo* и *ex vivo* (см., к примеру, West et al., Virology 160: 38-47 (1987); патент США №4797368; WO 93/24641; Kotin, Human Gene Therapy 5: 793-801 (1994); Muzyczka, J. Clin. Invest. 94: 1351 (1994). Создание рекомбинантных AAV-векторов описано в ряде публикаций, в том числе в патенте США №5173414; Tratschin et al., Mol. Cell. Biol. 5: 3251-3260 (1985); Tratschin, et al., Mol. Cell. Biol. 4: 2072-2081 (1984); Hermonat & Muzyczka, PNAS 81: 6466-6470 (1984); и Samulski et al., J. Virol. 63: 03822-3828 (1989).

Упаковывающие клетки, как правило, используют для получения вирусных частиц, которые способны инфицировать клетку-хозяина. Такие клетки включают клетки 293, которые упаковывают аденовирус, и клетки ψ 2 или клетки PA3 17, которые упаковывают ретровирус. Вирусные векторы, используемые в генной терапии, как правило, создают путем получения линии клеток, которые упаковывают вектор на основе нуклеиновой кислоты в вирусную частицу. Векторы обычно содержат минимальные вирусные последовательности, необходимые для упаковки и последующей интеграции в хозяина, при этом другие вирусные последовательности замещены кассетой экспрессии для экспрессии полинуклеотида(ов). Отсутствующие вирусные функции, как правило, обеспечивают во вспомогательном объекте при помощи линии упаковывающих клеток. Например, AAV-векторы, применяемые в генной терапии, как правило, имеют только ITR-последовательности из генома AAV, которые необходимы для упаковки и интеграции в геном хозяина. Вирусная ДНК упакована в линии клеток, которая содержит вспомогательную плазмиду, кодирующую другие гены AAV, а именно *her* и *cap*, но без ITR-последовательностей. Линия клеток также может быть инфицирована аденовирусом в качестве вируса-помощника. Вирус-помощник способствует репликации AAV-вектора и экспрессии генов AAV из вспомогательной

плазмиды. Вспомогательная плазида не упакована в значительном количестве в связи с отсутствием ITR-последовательностей. Контаминация аденовирусом может быть снижена, к примеру, при помощи тепловой обработки, к которой аденовирус более чувствителен, чем AAV. Дополнительные способы доставки нуклеиновых кислот в клетки известны специалистам в данной области. См., например, US 20030087817, включенный в данный документ при помощи ссылки.

В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин транзientно или не транзientно трансфицирована одним или несколькими векторами, описанными в данном документе. В некоторых вариантах осуществления клетка трансфицирована так, как это в естественных условиях происходит у субъекта. В некоторых вариантах осуществления клетка, которую трансфицируют, взята от субъекта. В некоторых вариантах осуществления клетка получена из клеток, взятых от субъекта, как, например, линия клеток. Широкий спектр линий клеток для культуры тканей известен из уровня техники. Примеры линий клеток включают, без ограничения, C8161, CCRF-CEM, MOLT, mIMCD-3, NHDF, HeLa-S3, Huh1, Huh4, Huh7, HUVEC, HASMC, HEKн, HEKa, MiaPaCell, Panc1, PC-3, TF1, CTLL-2, C1R, Rat6, CV1, RPTE, A10, T24, J82, A375, ARH-77, Calu1, SW480, SW620, SKOV3, SK-UT, CaCo2, P388D1, SEM-K2, WENI-231, HB56, TIB55, Jurkat, J45.01, LRMB, Bcl-1, BC-3, IC21, DLD2, Raw264.7, NRK, NRK-52E, MRC5, MEF, Hep G2, HeLa B, HeLa T4, COS, COS-1, COS-6, COS-M6A, эпителиальные клетки почки обезьяны BS-C-1, эмбриональные фибробласты мыши BALB/ 3T3, 3T3 Swiss, 3T3-L1, фетальные фибробласты человека 132-d5; фибробласты мыши 10.1, 293-T, 3T3, 721, 9L, A2780, A2780ADR, A2780cis, A172, A20, A253, A431, A-549, ALC, B16, B35, клетки BCP-1, BEAS-2B, bEnd.3, BHK-21, BR 293, BxPC3, C3H-10T1/2, C6/36, Cal-27, CHO, CHO-7, CHO-IR, CHO-K1, CHO-K2, CHO-T, CHO Dhfr -/-, COR-L23, COR-L23/CPR, COR-L23/5010, COR-L23/R23, COS-7, COV-434, CML T1, CMT, CT26, D17, DH82, DU145, DuCaP, EL4, EM2, EM3, EMT6/AR1, EMT6/AR10.0, FM3, H1299, H69, HB54, HB55, HCA2, HEK-293, HeLa, Hepa1c1c7, HL-60, HMEC, HT-29, Jurkat, клетки JY, клетки K562, Ku812, KCL22, KG1, KY01, LNCap, Ma-Mel 1-48, MC-38, MCF-7, MCF-10A, MDA-MB-231, MDA-MB-468, MDA-MB-435, MDCK II, MDCK II, MOR/0.2R, MONO-MAC 6, MTD-1A, MyEnd, NCI-H69/CPR, NCI-H69/LX10, NCI-H69/LX20, NCI-H69/LX4, NIH-3T3, NALM-1, NW-145, линии клеток OPCN/OPCT, Peer, PNT-1A/PNT 2, RenCa, RIN-5F, RMA/RMAS, клетки Saos-2, Sf-9, SkBr3, T2, T-47D, T84, линию клеток THP1, U373, U87, U937, VCaP, клетки Vero, WM39, WT-49, X63, YAC-1, YAR и их трансгенные варианты. Линии клеток доступны из ряда источников, известных специалистам в данной области (см., к примеру, Американскую коллекцию типовых культур (ATCC) (Манассас, Вирджиния)). В некоторых вариантах осуществления клетку, трансфицированную одним или несколькими векторами, описанными в данном документе, используют для получения новой линии клеток, содержащей одну или несколько полученных из вектора последовательностей. В некоторых вариантах осуществления клетку, транзientно трансфицированную компонентами системы CRISPR, которая описана в данном документе (как, например, путем транзientной трансфекции одним или несколькими векторами или трансфекции РНК), и модифицированную при помощи активности комплекса CRISPR, используют для получения новой линии клеток, содержащей клетки, которые содержат модификацию, но у которых отсутствует любая другая экзогенная последовательность. В некоторых вариантах осуществления клетки, транзientно или не транзientно трансфицированные одним или несколькими векторами, описанными в данном документе, или линии клеток, полученные из таких клеток, использовали при оценивании одного или нескольких тестовых соединений.

В некоторых вариантах осуществления один или несколько векторов, описанных в данном документе, используют для получения отличного от человека трансгенного животного или трансгенного растения. В некоторых вариантах осуществления трансгенным животным является млекопитающее, как, например, мышь, крыса или кролик. В определенных вариантах осуществления организмом или субъектом является растение. В определенных вариантах осуществления организмом, или субъектом, или растением является водоросль. Способы получения трансгенных растений и животных известны в уровне техники и, как правило, начинаются со способа трансфекции клетки, такого как описанный в данном документе. Также представлены трансгенные животные, как и трансгенные растения, в частности, сельскохозяйственные культуры и водоросли. Трансгенное животное или растение могут быть полезными в других путях применения, помимо обеспечения модели заболевания. Они могут включать производство пищи или кормопроизводство посредством биосинтеза, например, белков, углеводов, питательных веществ или витаминов на более высоких уровнях, чем будет наблюдаться в обычных условиях у дикого типа. В этом отношении предпочтительными являются трансгенные растения, в особенности зернобобовые и клубнеплоды, и животные, в особенности млекопитающие, такие как крупный рогатый скот (коровы, овцы, козы и свиньи), но также домашняя птица и съедобные насекомые.

Трансгенные водоросли или другие растения, такие как рапс, могут быть особенно применимыми в производстве растительных масел или таких видов биотоплива, как, например, спирты (особенно метанол и этанол). Они могут быть сконструированы для синтеза или сверхсинтеза масла или спиртов на высоких уровнях для применения в масложировой или биотопливной промышленности.

В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает способы модификации целевого полинуклеотида в эукариотической клетке. В некоторых вариантах осуществления способ включает обеспечение связывания комплекса CRISPR с целевым полинуклеотидом для осуществления расщепления указанного целевого полинуклеотида с модификацией, таким образом, целевого полинуклеотида, где комплекс CRISPR содержит фермент CRISPR, образующий комплекс с направляющей последовательностью, гибридирующей с целевой последовательностью в указанном целевом полинуклеотиде, где указанная направляющая последовательность связана с парной *tracr*-последовательностью, которая, в свою очередь, гибридируется с *tracr*-последовательностью.

В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает способ модификации экспрессии полинуклеотида в эукариотической клетке. В некоторых вариантах осуществления способ включает обеспечение связывания комплекса CRISPR с полинуклеотидом так, что указанное связывание приводит к повышенной или пониженной экспрессии указанного полинуклеотида; где комплекс CRISPR содержит фермент CRISPR, образующий комплекс с направляющей последовательностью, гибридирующей с целевой последовательностью в указанном целевом полинуклеотиде, где указанная направляющая последовательность связана с парной *tracr*-последовательностью, которая, в свою очередь, гибридируется с *tracr*-последовательностью.

С учетом недавних достижений в области геномики сельскохозяйственных культур возможность применения системы CRISPR-Cas для осуществления эффективных и экономичных редактирования генов и манипуляции с ними обеспечит возможность быстрого отбора и сравнения одиночных и мультиплексных генетических манипуляций для трансформирования таких геномов в отношении повышенного производства и

улучшенных признаков. В связи с этим делается ссылка на патенты США и публикации патентов США: патент США №6603061 - опосредованный агробактериями способ трансформации растений (Agrobacterium-Mediated Plant Transformation Method); патент США №7868149 - последовательности генома растений и их применение (Plant Genome Sequences and Uses Thereof) и US 2009/0100536 - трансгенные растения с улучшенными агротехническими признаками (Transgenic Plants with Enhanced Agronomic Traits), все содержания и раскрытия каждого из которых включены в данный документ при помощи ссылки в полном объеме. При осуществлении на практике настоящего изобретения содержание и раскрытие Morrell et al "Crop genomics: advances and applications" Nat Rev Genet. 2011 Dec 29;13(2): 85-96 также включены в данный документ при помощи ссылки в полном объеме. В преимущественном варианте осуществления настоящего изобретения систему CRISPR/Cas9 используют для конструирования микроводорослей (пример 14). Соответственно, в данном документе ссылка на клетки животных также может быть применима, с учетом необходимых изменений, по отношению к клеткам растений, если явно не следует иное.

В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает способы модификации целевого полинуклеотида в эукариотической клетке, что может происходить *in vivo*, *ex vivo* или *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления способ включает забор клетки или популяции клеток от человека, или отличного от человека животного, или растения (в том числе микроскопических водорослей) и модификацию клетки или клеток. Культивирование можно осуществлять на любой стадии *ex vivo*. Клетку или клетки можно даже повторно вводить отличному от человека животному или в растение (в том числе микроскопические водоросли).

В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает наборы, содержащие любой один или несколько из элементов, раскрытых в приведенных выше способах и композициях. В некоторых вариантах осуществления набор содержит векторную систему и инструкции по применению набора. В некоторых вариантах осуществления векторная система содержит (а) первый регуляторный элемент, функционально связанный с парной *tracr*-последовательностью и одним или несколькими сайтами встраивания для встраивания направляющей последовательности выше парной *tracr*-последовательности, где при экспрессии направляющая последовательность управляет специфичным к последовательности связыванием комплекса CRISPR с целевой последовательностью в эукариотической клетке, где комплекс CRISPR содержит фермент CRISPR, образующий комплекс с (1) направляющей последовательностью, которая гибридизируется с целевой последовательностью, и (2) парной *tracr*-последовательностью, которая гибридизируется с *tracr*-последовательностью; и/или (b) второй регуляторный элемент, функционально связанный с кодирующей фермент последовательностью, кодирующей указанный фермент CRISPR, содержащий последовательность ядерной локализации. Элементы могут быть предоставлены отдельно или в комбинациях и могут быть предоставлены в любом подходящем контейнере, как, например, пузырьке, флаконе или пробирке. В некоторых вариантах осуществления набор включает инструкции на одном или нескольких языках, например, на более чем одном языке.

В некоторых вариантах осуществления набор содержит один или несколько реагентов для применения в способе, в котором используется один или несколько элементов, описанных в данном документе. Реагенты могут быть предоставлены в любом подходящем контейнере. Например, набор может предусматривать один или несколько реакционных буферов или буферов для хранения. Реагенты могут быть предоставлены

в форме, которая применима в конкретном анализе, или в форме, которая предусматривает добавление одного или нескольких других компонентов перед применением (к примеру, в форме концентрата или лиофилизированной форме). Буфер может быть любым буфером, в том числе без ограничения буфером с карбонатом натрия, буфером с бикарбонатом натрия, боратным буфером, Tris-буфером, буфером MOPS, буфером HEPES и их комбинациями. В некоторых вариантах осуществления буфер является щелочным. В некоторых вариантах осуществления буфер имеет значение рН от приблизительно 7 до приблизительно 10. В некоторых вариантах осуществления набор содержит один или несколько олигонуклеотидов, соответствующих направляющей последовательности, для встраивания в вектор для того, чтобы имела место функциональная связь направляющей последовательности и регуляторного элемента. В некоторых вариантах осуществления набор содержит матричный полинуклеотид для гомологичной рекомбинации.

В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает способы применения одного или нескольких элементов системы CRISPR. Комплекс CRISPR по настоящему изобретению обеспечивает эффективное средство модификации целевого полинуклеотида. Комплекс CRISPR по настоящему изобретению характеризуется большим разнообразием полезных свойств, включая модификацию (например, делению, вставку, транслокацию, инактивацию, активацию) целевого полинуклеотида во множестве типов клеток. Комплекс CRISPR по настоящему изобретению как таковой имеет широкий спектр применений, к примеру, в генной терапии, скрининге лекарственных средств, диагностике и прогнозировании заболеваний. Иллюстративный комплекс CRISPR содержит фермент CRISPR, образующий комплекс с направляющей последовательностью, которая гибридизируется с целевой последовательностью в целевом полинуклеотиде. Направляющая последовательность связана с парной *trac*-последовательностью, которая, в свою очередь, гибридизируется с *trac*-последовательностью.

Целевым полинуклеотидом комплекса CRISPR может быть любой полинуклеотид, эндогенный или экзогенный по отношению к эукариотической клетке. Например, целевой полинуклеотид может быть полинуклеотидом, находящимся в ядре эукариотической клетки. Целевой полинуклеотид может быть последовательностью, кодирующей продукт гена (к примеру, белок), или некодирующей последовательностью (к примеру, регуляторным полинуклеотидом или избыточной ДНК). Не желая быть связанными теорией, полагают, что целевая последовательность должна быть ассоциирована с PAM (мотивом, смежным с протоспейсером); то есть короткой последовательностью, узнаваемой комплексом CRISPR. Определенные требования в отношении последовательности и длины PAM различаются в зависимости от применяемого фермента CRISPR, но PAM, как правило, является последовательностью в 2-5 пар оснований, смежной с протоспейсером (то есть целевой последовательности). Примеры последовательностей PAM приведены в разделе "Примеры" ниже, и специалист в данной области сможет выявить дополнительные последовательности PAM для применения с данным ферментом CRISPR.

Целевой полинуклеотид комплекса CRISPR может включать некоторое количество ассоциированных с заболеваниями генов и полинуклеотидов, а также ассоциированных с биохимическими путями проведения сигнала генов и полинуклеотидов, которые перечислены в предварительных заявках на патент США 61/736527 и 61/748427 с общей ссылкой WI-2011/008/WSGR, номер в реестре 44063-701.101, и WI-2011/008/WSGR, номер в реестре 44063-701.102, соответственно, обе озаглавленные "СИСТЕМЫ, СПОСОБЫ

И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ МАНИПУЛЯЦИЯ С ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЯМИ" (SYSTEMS METHODS AND COMPOSITIONS FOR SEQUENCE MANIPULATION), поданные 12 декабря 2012 г. и 2 января 2013 г., соответственно, содержания всех из которых включены в данный документ при помощи ссылки в полном объеме.

5 Примеры целевых полинуклеотидов включают последовательность, ассоциированную с биохимическими путями передачи сигнала, к примеру, ген или полинуклеотид, ассоциированные с биохимическими путями передачи сигнала. Примеры целевых полинуклеотидов включают ассоциированный с заболеванием ген или полинуклеотид. "Ассоциированный с заболеванием" ген или полинуклеотид означает любой ген или
10 полинуклеотид, который обеспечивает продукты транскрипции или трансляции на отклоняющемся от нормы уровне или в отклоняющейся от нормы форме в клетках, полученных из пораженных заболеванием тканей, по сравнению с тканями или клетками контроля без заболевания. Это может быть ген, который начинает экспрессироваться при ненормально высоком уровне; это может быть ген, который начинает
15 экспрессироваться при ненормально низком уровне, где измененная экспрессия коррелирует с появлением и/или развитием заболевания. Ассоциированный с заболеванием ген также означает ген, несущий мутацию(и) или генетическое изменение, который непосредственно ответственен или находится в неравновесном сцеплении с геном(ами), который(е) ответственен(ны) за этиологию заболевания. Транскрибируемые
20 или транслируемые продукты могут быть известными или неизвестными и могут быть на нормальном уровне или на отклоняющемся от нормального уровне.

Примеры ассоциированных с заболеваниями генов и полинуклеотидов доступны от Института генетической медицины Маккьюсика-Натанса (McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine) при Университете Джонса Хопкинса (Johns Hopkins University)
25 (Балтимор, Мэриленд) и Национального центра биотехнологической информации (National Center for Biotechnology Information) при Национальной библиотеке медицины (National Library of Medicine) (Бетесда, Мэриленд), доступных во всемирной сети Интернет.

Примеры ассоциированных с заболеваниями генов и полинуклеотидов перечислены
30 в таблицах А и В. Конкретная информация в отношении заболеваний доступна от Института генетической медицины Маккьюсика-Натанса (McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine) при Университете Джонса Хопкинса (Johns Hopkins University) (Балтимор, Мэриленд) и Национального центра биотехнологической информации (National Center for Biotechnology Information), Национальной библиотеки медицины
35 (National Library of Medicine) (Бетесда, Мэриленд), доступных во всемирной сети Интернет. Примеры ассоциированных с биохимическими путями передачи сигнала генов и полинуклеотидов перечислены в таблице С.

Мутации в этих генах и путях могут приводить к продуцированию несоответствующих белков или белков в несоответствующих количествах, которые воздействуют на
40 функцию. Дополнительные примеры генов, заболеваний и белков, таким образом, включены при помощи ссылки из предварительных заявок на патент США 61/736527 и 61/748427. Такие гены, белки и пути могут быть целевым полинуклеотидом комплекса CRISPR.

Таблица А

ЗАБОЛЕВАНИЕ/ НАРУШЕНИЯ	ГЕН(Ы)
5 Неоплазия	PTEN; ATM; ATR; EGFR; ERBB2; ERBB3; ERBB4; Notch1; Notch2; Notch3; Notch4; AKT; AKT2; AKT3; HIF; HIF1a; HIF3a; Met; HRG; Bcl2; PPAR альфа; PPAR гамма; WT1 (опухоль Вильмса); представители семейства рецепторов FGF (5 представителей: 1, 2, 3, 4, 5); CDKN2a; APC; RB (ретинобластома); MEN1; VHL; BRCA1; BRCA2; AR (андрогеновый рецептор); TSG101; IGF; рецептор IGF; Igf1 (4 Варианта); Igf2 (3 варианта); рецептор Igf 1; рецептор Igf 2; Вах; Bcl2; семейство каспаз (9 представителей: 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 12); Kras; Arc
10 Возрастная дегенерация желтого пятна	Abcr; Ccl2; Cc2; ср (церулоплазмин); Timр3; катепсин D; Vldlr; Ccr2
15 Психозы	Нейрегулин 1 (Nrg1); Erb4 (рецептор для нейрегулина); Комплексин 1 (Cplx1); Trp1, триптофан-гидроксилаза; Trp2, триптофан-гидроксилаза 2; нейрексин 1; GSK3; GSK3a; GSK3b
20 нарушения	5-HTT (Slc6a4); COMT; DRD (Drd1a); SLC6A3; DAOA; DTNBP1; Dao (Dao1)
25 Связанные с тринуклеотидным повтором нарушения	HTT (болезнь Гентингтона); SBMA/SMAX1/AR (синдром Кеннеди); FXN/X25 (атаксия Фридрейха); ATX3 (болезнь Мачадо- Джозефа); ATXN1 и ATXN2 (формы спинально-церебеллярной атаксии); DMPK (миотоническая дистрофия); атрофин-1 и Atn1 (заболевание DRPLA); CBP (Creb-BP - общая нестабильность); VLDLR (болезнь Альцгеймера); Atxn7; Atxn10
30 Синдром ломкой X- хромосомы	FMR2; FXR1; FXR2; mGLUR5
35 Связанные с активностью секретазы нарушения	APH-1 (альфа и бета); пресенилин (Psen1); никастрин (Ncstn); PEN-2
Другие	Nos1; Parp1; Nat1; Nat2
Связанные с прионами нарушения	Prp
40 ALS	SOD1; ALS2; STEX; FUS; TARDBP; VEGF (VEGF-a; VEGF-b; VEGF-c)
Привыкание к наркотическим средствам	Prkce (алкоголь); Drd2; Drd4; AVAT (алкоголь); GRIA2; Grm5; Grin1; Htr1b; Grin2a; Drd3; Pdyn; Gria1 (алкоголь)
45 Аутизм	Mecp2; BZRAP1; MDGA2; Sema5A; нейрексин 1; ломкая X (FMR2 (AFF2); FXR1; FXR2; Mglur5)
Болезнь Альцгеймера	E1; CHIP; UCH; UBB; Тау; LRP; PICALM; кластерин; PS1; SORL1; CR1; Vldlr; Uba1; Uba3; CHIP28 (Aqp1,

	аквапорин 1); Uchl1; Uchl3; APP
Воспаление	IL-10; IL-1 (IL-1a; IL-1b); IL-13; IL-17 (IL-17a (CTLA8); IL-17b; IL-17c; IL-17d; IL-17f); IL-23; Cx3cr1; ptpn22; TNFa;
	NOD2/CARD15 для IBD; IL-6; IL-12 (IL-12a; IL-12b);
	CTLA4; Cx3cl1
Болезнь Паркинсона	α-синуклеин; DJ-1; LRRK2; паркин; PINK1

5

10

15

20

25

30

35

40

45

Таблица В

<p>5 10 15 20</p> <p>Заболевания и нарушения, связанные с кровеносной системой и свертыванием крови</p>	<p>Анемия (CDAN1, CDA1, RPS19, DBA, PKLR, PK1, NT5C3, UMPH1, PSN1, RHAG, RH50A, NRAMP2, SPTB, ALAS2, ANH1, ASB, ABCB7, ABC7, ASAT); синдром "голых" лимфоцитов (TAPBP, TPSN, TAP2, ABCB3, PSF2, RING11, MHC2TA, C2TA, RFX5, RFXAP, RFX5), нарушения свертываемости крови (TBXA2R, P2RX1, P2X1); фактор Н и фактор Н-подобный 1 (HF1, CFH, HUS); фактор V и фактор VIII (MCFD2); недостаток фактора VII (F7); недостаток фактора X (F10); недостаток фактора XI (F11); недостаток фактора XII (F12, HAF); недостаток фактора XIIIА (F13A1, F13A); недостаток фактора XIIIВ (F13B); синдром Фанкони (FANCA, FACA, FA1, FA, FAA, FAAP95, FAAP90, FLJ34064, FANCB, FANCC, FACC, BRCA2, FANCD1, FANCD2, FANCD, FACD, FAD, FANCE, FACE, FANCF, XRCC9, FANCG, BRIP1, BACH1, FANCI, PHF9, FANCL, FANCM, KIAA1596); нарушения по типу гемофагоцитарного лимфогистиоцитоза (PRF1, HPLH2, UNC13D, MUNC13-4, HPLH3, HLH3, FHL3); гемофилия А (F8, F8C, HEMA); гемофилия В (F9, HEMВ), геморрагические нарушения (PI, АТТ, F5); связанные с лейкоцитами недостаточности и нарушения (ITGB2, CD18, LCAMB, LAD, EIF2B1, EIF2BA, EIF2B2, EIF2B3, EIF2B5, LVWM, CACH, CLE, EIF2B4); серповидно-клеточная анемия (HBB); талассемия (HBA2, HBB, HBD, LCRB, HBA1).</p>
<p>25 30</p> <p>Связанные с клеточной дисрегуляцией заболевания и нарушения и онкологические заболевания и нарушения</p>	<p>В-клеточная неходжкинская лимфома (BCL7A, BCL7); лейкоз (TAL1, TCL5, SCL, TAL2, FLT3, NBS1, NBS, ZNFN1A1, IK1, LYF1, HOXD4, HOX4B, BCR, CML, PHL, ALL, ARNT, KRAS2, RASK2, GMPS, AF10, ARHGEF12, LARG, KIAA0382, CALM, CLTH, SEBPA, SEBP, CHIC2, BTL, FLT3, KIT, PBT, LPP, NPM1, NUP214, D9S46E, CAN, CAIN, RUNX1, CBFA2, AML1, WHSC1L1, NSD3, FLT3, AF1Q, NPM1, NUMA1, ZNF145, PLZF, PML, MYL, STAT5B, AF10, CALM, CLTH, ARL11, ARLTS1, P2RX7, P2X7, BCR, CML, PHL, ALL, GRAF, NF1, VRNF, WSS, NFNS, PTPN11, PTP2C, SHP2, NS1, BCL2, CCND1, PRAD1, BCL1, TCRA, GATA1, GF1, ERYF1, NFE1, ABL1, NQO1, DIA4, NMOR1, NUP214, D9S46E, CAN, CAIN).</p>
<p>35 40</p> <p>Связанные с воспалением и иммунной системой заболевания и нарушения</p>	<p>AIDS (KIR3DL1, NKAT3, NKB1, AMB11, KIR3DS1, IFNG, CXCL12, SDF1); аутоиммунный лимфопролиферативный синдром (TNFRSF6, APT1, FAS, CD95, ALPS1A); комбинированный иммунодефицит (IL2RG, SCIDX1, SCIDX, IMD4); HIV-1 (CCL5, SCYA5, D17S136E, TCP228), восприимчивость к HIV или HIV-инфекция (IL10, CSIF, CMKBR2, CCR2, CMKBR5, CCCR5 (CCR5)); типы иммунодефицита (CD3E, CD3G, AICDA, AID, HIGM2, TNFRSF5, CD40, UNG, DGU, HIGM4, TNFSF5, CD40LG, HIGM1, IGM, FOXP3, IPKX, AIPD, XPID, PIDX, TNFRSF14B, TAC1); воспаление</p>

	(IL-10, IL-1 (IL-1a, IL-1b), IL-13, IL-17 (IL-17a (CTLA8), IL-17b, IL-17c, IL-17d, IL-17f), IL-23, Cx3cr1, ptpn22, TNFa, NOD2/CARD15 for IBD, IL-6, IL-12 (IL-12a, IL-12b), CTLA4, Cx3cl1); типы тяжелого комбинированного иммунодефицита (SCID) (JAK3, JAK1, DCLRE1C, ARTEMIS, SCIDA, RAG1, RAG2, ADA, PTPRC, CD45, LCA, IL7R, CD3D, T3D, IL2RG, SCIDX1, SCIDX, IMD4).
<p>5</p> <p>10</p> <p>15</p> <p>20</p>	<p>Метаболические, печеночные, почечные и связанные с обменом белка заболевания и нарушения</p> <p>Амилоидная невропатия (TTR, PALB); амилоидоз (APOA1, APP, AAA, CVAP, AD1, GSN, FGA, LYZ, TTR, PALB); цирроз (KRT18, KRT8, CIRH1A, NAIC, TEX292, KIAA1988); муковисцидоз (CFTR, ABCC7, CF, MRP7); болезни накопления гликогена (SLC2A2, GLUT2, G6PC, G6PT, G6PT1, GAA, LAMP2, LAMPB, AGL, GDE, GBE1, GYS2, PYGL, PFKM); аденома печени, 142330 (TCF1, HNF1A, MODY3), печеночная недостаточность, с ранним началом и с неврологическим нарушением (SCOD1, SCO1), недостаточность печеночной липазы (LIPC), гептобластома, рак и виды эпителиомы (CTNNB1, PDGFRL, PDGRL, PRLTS, AXIN1, AXIN, CTNNB1, TP53, P53, LFS1, IGF2R, MPRI, MET, CASP8, MCH5); заболевание по типу медуллярной кистозной нефропатии (UMOD, HNFJ, FJHN, MCKD2, ADMCKD2); фенилкетонурия (PAH, PKU1, QDPR, DHPR, PTS); поликистоз почек и печени (FCYT, PKHD1, ARPKD, PKD1, PKD2, PKD4, PKDTS, PRKCSH, G19P1, PCLD, SEC63).</p>
<p>25</p> <p>30</p> <p>35</p>	<p>Мышечные/костные заболевания и нарушения</p> <p>Миопатия Беккера (DMD, BMD, MYF6), миопатия Дюшенна (DMD, BMD); мышечная дистрофия Эмери-Дрейфуса (LMNA, LMN1, EMD2, FPLD, CMD1A, HGPS, LGMD1B, LMNA, LMN1, EMD2, FPLD, CMD1A); плече-лопаточно-лицевая миопатия (FSHMD1A, FSHD1A); мышечная дистрофия (FKRP, MDC1C, LGMD2I, LAMA2, LAMM, LARGE, KIAA0609, MDC1D, FCMD, TTID, MYOT, CAPN3, CANP3, DYSF, LGMD2B, SGCG, LGMD2C, DMDA1, SCG3, SGCA, ADL, DAG2, LGMD2D, DMDA2, SGCB, LGMD2E, SGCD, SGD, LGMD2F, CMD1L, TCAP, LGMD2G, CMD1N, TRIM32, HT2A, LGMD2H, FKRP, MDC1C, LGMD2I, TTN, CMD1G, TMD, LGMD2J, POMT1, CAV3, LGMD1C, SEPNI, SELN, RSMD1, PLEC1, PLTN, EBS1); остеопороз (LRP5, BMND1, LRP7, LR3, OPPG, VBCH2, CLCN7, CLC7, OPTA2, OSTM1, GL, TCIRG1, TIRC7, OC116, OPTB1); мышечная атрофия (VAPB, VAPC, ALS8, SMN1, SMA1, SMA2, SMA3, SMA4, BSCL2, SPG17, GARS, SMAD1, CMT2D, HEXB, IGHMBP2, SMUBP2, CATF1, SMARD1).</p>
<p>40</p> <p>45</p>	<p>Неврологические и нейрональные заболевания и нарушения</p> <p>ALS (SOD1, ALS2, STEX, FUS, TARDBP, VEGF (VEGF-a, VEGF-b, VEGF-c); болезнь Альцгеймера (APP, AAA, CVAP, AD1, APOE, AD2, PSEN2, AD4, STM2, APBB2, FE65L1, NOS3, PLAUI, URK, ACE, DCP1, ACE1, MPO, PACIP1, PAXIP1L, PTIP, A2M, BLMH, BMH, PSEN1, AD3); аутизм (Mecp2, BZRAP1, MDGA2, Sema5A, нейрексин 1, GLO1, MECP2, RTT, PPMX, MRX16, MRX79, NLGN3, NLGN4, KIAA1260, AUTSX2); синдром ломкой X-хромосомы (FMR2, FXR1, FXR2, mGLUR5); болезнь Гентингтона и подобные этому заболеванию нарушения (HD, IT15, PRNP, PRIP, JPH3, JP3, HDL2, TBP, SCA17); болезнь Паркинсона (NR4A2, NURR1, NOT, TINUR, SNCAIP, TBP, SCA17, SNCA, NACP, PARK1, PARK4, DJ1, PARK7, LRRK2, PARK8, PINK1, PARK6, UCHL1, PARK5, SNCA,</p>

5 10 15	NACP, PARK1, PARK4, PRKN, PARK2, PDJ, DBH, NDUFV2); синдром Ретта (MECP2, RTT, PPMX, MRX16, MRX79, CDKL5, STK9, MECР2, RTT, PPMX, MRX16, MRX79, х-синуклеин, DJ-1); шизофрения (нейрегулин 1 (Nrg1), Erb4 (рецептор для нейрегулина), комплексин 1 (Cplx1), Trh1, триптофан-гидроксилаза, Trh2, триптофан-гидроксилаза 2, нейрексин 1, GSK3, GSK3a, GSK3b, 5-HTT (Slc6a4), COMT, DRD (Drd1a), SLC6A3, DAOA, DTNBP1, Dao (Dao1)); связанные с активностью секретазы нарушения (APH-1 (альфа и бета), пресенилин (Psen1), никастрин, (Ncstn), PEN-2, Nos1, Papr1, Nat1, Nat2); связанные с тринуклеотидным повтором нарушения (HTT (болезнь Гентингтона), SBMA/SMAX1/AR (болезнь Кеннеди), FXN/X25 (атаксия Фридрейха), ATX3 (болезнь Мачадо-Джозефа), ATXN1 и ATXN2 (формы спинально-церебеллярной атаксии), DMPK (миотоническая дистрофия), атрофин-1 и Atn1 (заболевание DRPLA), CBP (Creb-BP - общая нестабильность), VLDLR (болезнь Альцгеймера), Atxn7, Atxn10).
20 25 30	Глазные заболевания и нарушения Возрастная дегенерация желтого пятна (Abcr, Ccl2, Cc2, ср (перулоплазмин), Timp3, катепсин D, Vldlr, Ccr2); катаракта (CRYAA, CRYA1, CRYBB2, CRYB2, PITX3, BFSP2, CP49, CP47, CRYAA, CRYA1, PAX6, AN2, MGDA, CRYBA1, CRYB1, CRYGC, CRYG3, CCL, LIM2, MP19, CRYGD, CRYG4, BFSP2, CP49, CP47, HSF4, CTM, HSF4, CTM, MIP, AQP0, CRYAB, CRYA2, STPP2, CRYBB1, CRYGD, CRYG4, CRYBB2, CRYB2, CRYGC, CRYG3, CCL, CRYAA, CRYA1, GJA8, CX50, CAE1, GJA3, CX46, CZP3, CAE3, CCM1, CAM, KRIT1); помутнение и дистрофия роговицы (APOA1, TGFBI, CSD2, CDGG1, CSD, BIGH3, CDG2, TACSTD2, TROP2, M1S1, VSX1, RINX, PPCD, PPD, KTCN, COL8A2, FECD, PPCD2, PIP5K3, CFD); врожденная плоская роговица (KERA, CNA2); глаукома (MYOC, TIGR, GLC1A, JOAG, GPOA, OPTN, GLC1E, FIP2, HYPL, NRP, CYP1B1, GLC3A, OPA1, NTG, NPG, CYP1B1, GLC3A); амавроз Лебера (CRB1, RP12, CRX, CORD2, CRD, RPGRIP1, LCA6, CORD9, RPE65, RP20, AIPL1, LCA4, GUCY2D, GUC2D, LCA1, CORD6, RDH12, LCA3); макулярная дистрофия (ELOVL4, ADMD, STGD2, STGD3, RDS, RP7, PRPH2, PRPH, AVMD, AOFMD, VMD2).

Таблица С

КЛЕТОЧНАЯ ФУНКЦИЯ	ГЕНЫ
Передача сигнала с участием PI3K/AKT	PRKCE; ITGAM; ITGA5; IRAK1; PRKAA2; EIF2AK2;
	PTEN; EIF4E; PRKCZ; GRK6; MAPK1; TSC1; PLK1;
40	AKT2; IKBKB; PIK3CA; CDK8; CDKN1B; NFKB2; BCL2;
	PIK3CB; PPP2R1A; MAPK8; BCL2L1; MAPK3; TSC2;
	ITGA1; KRAS; EIF4EBP1; RELA; PRKCD; NOS3;
	PRKAA1; MAPK9; CDK2; PPP2CA; PIM1; ITGB7;
45	YWHAZ; ILK; TP53; RAF1; IKBKG; RELB; DYRK1A;
	CDKN1A; ITGB1; MAP2K2; JAK1; AKT1; JAK2; PIK3R1;
	CHUK; PDPK1; PPP2R5C; CTNNB1; MAP2K1; NFKB1;
	PAK3; ITGB3; CCND1; GSK3A; FRAP1; SFN; ITGA2;

	TTK; CSNK1A1; BRAF; GSK3B; AKT3; FOXO1; SGK; HSP90A1; RPS6KB1
5	Передача сигнала с участием ERK/MAPK
	PRKCE; ITGAM; ITGA5; HSPB1; IRAK1; PRKAA2;
	EIF2AK2; RAC1; RAP1A; TLN1; EIF4E; ELK1; GRK6; MAPK1; RAC2; PLK1; AKT2; PIK3CA; CDK8; CREB1; PRKCI; PTK2; FOS; RPS6KA4; PIK3CB; PPP2R1A; PIK3C3; MAPK8; MAPK3; ITGA1; ETS1; KRAS; MYCN; EIF4EBP1; PPARG; PRKCD; PRKAA1; MAPK9; SRC; 10 CDK2; PPP2CA; PIM1; PIK3C2A; ITGB7; YWHAZ; PPP1CC; KSR1; PXN; RAF1; FYN; DYRK1A; ITGB1; MAP2K2; PAK4; PIK3R1; STAT3; PPP2R5C; MAP2K1; PAK3; ITGB3; ESR1; ITGA2; MYC; TTK; CSNK1A1; CRKL; BRAF; ATF4; PRKCA; SRF; STAT1; SGK
15	Передача сигнала с участием глюкокортикоидного рецептора
	RAC1; TAF4B; EP300; SMAD2; TRAF6; PCAF; ELK1; MAPK1; SMAD3; AKT2; IKBKB; NCOR2; UBE2I;
	PIK3CA; CREB1; FOS; HSPA5; NFKB2; BCL2; 20 MAP3K14; STAT5B; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; BCL2L1; MAPK3; TSC22D3; MAPK10; NRIP1; KRAS; MAPK13; RELA; STAT5A; MAPK9; NOS2A; PBX1; NR3C1; PIK3C2A; CDKN1C; TRAF2; SERPINE1; NCOA3; MAPK14; TNF; RAF1; IKBKG; MAP3K7; CREBBP; CDKN1A; MAP2K2; JAK1; IL8; NCOA2; AKT1; JAK2; PIK3R1; CHUK; STAT3; MAP2K1; NFKB1; TGFBR1; 25 ESR1; SMAD4; CEBPB; JUN; AR; AKT3; CCL2; MMP1; STAT1; IL6; HSP90AA1
	Передача сигнала для аксонального наведения
	PRKCE; ITGAM; ROCK1; ITGA5; CXCR4; ADAM12; 30 IGF1; RAC1; RAP1A; EIF4E; PRK CZ; NRP1; NTRK2; ARHGEF7; SMO; ROCK2; MAPK1; PGF; RAC2; PTPN11; GNAS; AKT2; PIK3CA; ERBB2; PRKCI; PTK2; CFL1; GNAQ; PIK3CB; CXCL12; PIK3C3; WNT11; PRKD1; GNB2L1; ABL1; MAPK3; ITGA1; KRAS; RHOA; PRKCD; PIK3C2A; ITGB7; GLI2; PXN; VASP; RAF1; 35 FYN; ITGB1; MAP2K2; PAK4; ADAM17; AKT1; PIK3R1; GLI1; WNT5A; ADAM10; MAP2K1; PAK3; ITGB3; CDC42; VEGFA; ITGA2; EPHA8; CRKL; RND1; GSK3B; AKT3; PRKCA
40	Передача сигнала с участием эфринового рецептора
	PRKCE; ITGAM; ROCK1; ITGA5; CXCR4; IRAK1; PRKAA2; EIF2AK2; RAC1; RAP1A; GRK6; ROCK2; MAPK1; PGF; RAC2; PTPN11; GNAS; PLK1; AKT2; DOK1; CDK8; CREB1; PTK2; CFL1; GNAQ; MAP3K14; CXCL12; MAPK8; GNB2L1; ABL1; MAPK3; ITGA1; 45 KRAS; RHOA; PRKCD; PRKAA1; MAPK9; SRC; CDK2; PIM1; ITGB7; PXN; RAF1; FYN; DYRK1A; ITGB1; MAP2K2; PAK4; AKT1; JAK2; STAT3; ADAM10;

	MAP2K1; PAK3; ITGB3; CDC42; VEGFA; ITGA2;
	EPHA8; TTK; CSNK1A1; CRKL; BRAF; PTPN13; ATF4;
	AKT3; SGK
5	Передача сигнала на актиновый цитоскелет
	ACTN4; PRKCE; ITGAM; ROCK1; ITGA5; IRAK1;
	PRKAA2; EIF2AK2; RAC1; INS; ARHGEF7; GRK6;
	ROCK2; MAPK1; RAC2; PLK1; AKT2; PIK3CA; CDK8;
	PTK2; CFL1; PIK3CB; MYH9; DIAPH1; PIK3C3; MAPK8;
10	F2R; MAPK3; SLC9A1; ITGA1; KRAS; RHOA; PRKCD;
	PRKAA1; MAPK9; CDK2; PIM1; PIK3C2A; ITGB7;
	PPP1CC; PXN; VIL2; RAF1; GSN; DYRK1A; ITGB1;
	MAP2K2; PAK4; PIP5K1A; PIK3R1; MAP2K1; PAK3;
	ITGB3; CDC42; APC; ITGA2; TTK; CSNK1A1; CRKL;
	BRAF; VAV3; SGK
15	Передача сигнала при болезни Гентингтона
	PRKCE; IGF1; EP300; RCOR1; PRKCZ; HDAC4; TGM2;
	MAPK1; CAPNS1; AKT2; EGFR; NCOR2; SP1; CAPN2;
	PIK3CA; HDAC5; CREB1; PRKCI; HSPA5; REST;
	GNAQ; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; IGF1R; PRKD1;
20	GNB2L1; BCL2L1; CAPN1; MAPK3; CASP8; HDAC2;
	HDAC7A; PRKCD; HDAC11; MAPK9; HDAC9; PIK3C2A;
	HDAC3; TP53; CASP9; CREBBP; AKT1; PIK3R1;
	PDPK1; CASP1; APAF1; FRAP1; CASP2; JUN; BAX;
	ATF4; AKT3; PRKCA; CLTC; SGK; HDAC6; CASP3
25	Передача сигнала при апоптозе
	PRKCE; ROCK1; BID; IRAK1; PRKAA2; EIF2AK2; BAK1;
	BIRC4; GRK6; MAPK1; CAPNS1; PLK1; AKT2; IKBKB;
	CAPN2; CDK8; FAS; NFKB2; BCL2; MAP3K14; MAPK8;
	BCL2L1; CAPN1; MAPK3; CASP8; KRAS; RELA;
	PRKCD; PRKAA1; MAPK9; CDK2; PIM1; TP53; TNF;
30	RAF1; IKBKG; RELB; CASP9; DYRK1A; MAP2K2;
	CHUK; APAF1; MAP2K1; NFKB1; PAK3; LMNA; CASP2;
	BIRC2; TTK; CSNK1A1; BRAF; BAX; PRKCA; SGK;
	CASP3; BIRC3; PARP1
35	Передача сигнала с участием В-клеточного рецептора
	RAC1; PTEN; LYN; ELK1; MAPK1; RAC2; PTPN11;
	AKT2; IKBKB; PIK3CA; CREB1; SYK; NFKB2; CAMK2A;
	MAP3K14; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; BCL2L1; ABL1;
	MAPK3; ETS1; KRAS; MAPK13; RELA; PTPN6; MAPK9;
	EGR1; PIK3C2A; BTK; MAPK14; RAF1; IKBKG; RELB;
40	MAP3K7; MAP2K2; AKT1; PIK3R1; CHUK; MAP2K1;
	NFKB1; CDC42; GSK3A; FRAP1; BCL6; BCL10; JUN;
	GSK3B; ATF4; AKT3; VAV3; RPS6KB1
45	Передача сигнала при диapedезе лейкоцитов
	ACTN4; CD44; PRKCE; ITGAM; ROCK1; CXCR4; CYBA;
	RAC1; RAP1A; PRKCZ; ROCK2; RAC2; PTPN11;
	MMP14; PIK3CA; PRKCI; PTK2; PIK3CB; CXCL12;
	PIK3C3; MAPK8; PRKD1; ABL1; MAPK10; CYBB;
	MAPK13; RHOA; PRKCD; MAPK9; SRC; PIK3C2A; BTK;

	MAPK14; NOX1; PXN; VIL2; VASP; ITGB1; MAP2K2;
	CTNND1; PIK3R1; CTNNB1; CLDN1; CDC42; F11R; ITK;
	CRKL; VAV3; CTTN; PRKCA; MMP1; MMP9
5	Передача сигнала с участием интегрина
	ACTN4; ITGAM; ROCK1; ITGA5; RAC1; PTEN; RAP1A;
	TLN1; ARHGEF7; MAPK1; RAC2; CAPNS1; AKT2;
	CAPN2; PIK3CA; PTK2; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8;
	CAV1; CAPN1; ABL1; MAPK3; ITGA1; KRAS; RHOA;
10	SRC; PIK3C2A; ITGB7; PPP1CC; ILK; PXN; VASP;
	RAF1; FYN; ITGB1; MAP2K2; PAK4; AKT1; PIK3R1;
	TNK2; MAP2K1; PAK3; ITGB3; CDC42; RND3; ITGA2;
	CRKL; BRAF; GSK3B; AKT3
	Передача сигнала при острофазном ответе
	IRAK1; SOD2; MYD88; TRAF6; ELK1; MAPK1; PTPN11;
15	AKT2; IKKBK; PIK3CA; FOS; NFKB2; MAP3K14;
	PIK3CB; MAPK8; RIPK1; MAPK3; IL6ST; KRAS;
	MAPK13; IL6R; RELA; SOCS1; MAPK9; FTL; NR3C1;
	TRAF2; SERPINE1; MAPK14; TNF; RAF1; PDK1;
	IKBKG; RELB; MAP3K7; MAP2K2; AKT1; JAK2; PIK3R1;
	CHUK; STAT3; MAP2K1; NFKB1; FRAP1; CEBPB; JUN;
	AKT3; IL1R1; IL6
20	Передача сигнала с участием PTEN
	ITGAM; ITGA5; RAC1; PTEN; PRKCZ; BCL2L11;
	MAPK1; RAC2; AKT2; EGFR; IKKBK; CBL; PIK3CA;
	CDKN1B; PTK2; NFKB2; BCL2; PIK3CB; BCL2L1;
25	MAPK3; ITGA1; KRAS; ITGB7; ILK; PDGFRB; INSR;
	RAF1; IKKBK; CASP9; CDKN1A; ITGB1; MAP2K2;
	AKT1; PIK3R1; CHUK; PDGFRA; PDPK1; MAP2K1;
	NFKB1; ITGB3; CDC42; CCND1; GSK3A; ITGA2;
	GSK3B; AKT3; FOXO1; CASP3; RPS6KB1
	Передача сигнала с участием p53
30	PTEN; EP300; BBC3; PCAF; FASN; BRCA1; GADD45A;
	BIRC5; AKT2; PIK3CA; CHEK1; TP53INP1; BCL2;
	PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; THBS1; ATR; BCL2L1; E2F1;
	PMAIP1; CHEK2; TNFRSF10B; TP73; RB1; HDAC9;
	CDK2; PIK3C2A; MAPK14; TP53; LRDD; CDKN1A;
35	HIPK2; AKT1; PIK3R1; RRM2B; APAF1; CTNNB1;
	SIRT1; CCND1; PRKDC; ATM; SFN; CDKN2A; JUN;
	SNAI2; GSK3B; BAX; AKT3
	Передача сигнала с участием арил-гидрокарбонового рецептора
40	HSPB1; EP300; FASN; TGM2; RXRA; MAPK1; NQO1;
	NCOR2; SP1; ARNT; CDKN1B; FOS; CHEK1;
	SMARCA4; NFKB2; MAPK8; ALDH1A1; ATR; E2F1;
	MAPK3; NRIP1; CHEK2; RELA; TP73; GSTP1; RB1;
	SRC; CDK2; AHR; NFE2L2; NCOA3; TP53; TNF;
	CDKN1A; NCOA2; APAF1; NFKB1; CCND1; ATM; ESR1;
45	CDKN2A; MYC; JUN; ESR2; BAX; IL6; CYP1B1;
	HSP90AA1

	Передача сигнала при метаболизме ксенобиотиков	PRKCE; EP300; PRKCZ; RXRA; MAPK1; NQO1; NCOR2; PIK3CA; ARNT; PRKCI; NFKB2; CAMK2A;
5		PIK3CB; PPP2R1A; PIK3C3; MAPK8; PRKD1; ALDH1A1; MAPK3; NRIP1; KRAS; MAPK13; PRKCD; GSTP1; MAPK9; NOS2A; ABCB1; AHR; PPP2CA; FTL; NFE2L2; PIK3C2A; PPARGC1A; MAPK14; TNF; RAF1; CREBBP; MAP2K2; PIK3R1; PPP2R5C; MAP2K1; NFKB1; KEAP1; PRKCA; EIF2AK3; IL6; CYP1B1; HSP90AA1
10	Передача сигнала с участием SAPK/JNK	PRKCE; IRAK1; PRKAA2; EIF2AK2; RAC1; ELK1; GRK6; MAPK1; GADD45A; RAC2; PLK1; AKT2; PIK3CA; FADD; CDK8; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; RIPK1; GNB2L1; IRS1; MAPK3; MAPK10; DAXX; KRAS; PRKCD; PRKAA1; MAPK9; CDK2; PIM1; PIK3C2A; TRAF2; TP53; LCK; MAP3K7; DYRK1A; MAP2K2; PIK3R1; MAP2K1; PAK3; CDC42; JUN; TTK; CSNK1A1; CRKL; BRAF; SGK
15		
20	Передача сигнала с участием PPA γ /RXR	PRKAA2; EP300; INS; SMAD2; TRAF6; PPARA; FASN; RXRA; MAPK1; SMAD3; GNAS; IKBKB; NCOR2; ABCA1; GNAQ; NFKB2; MAP3K14; STAT5B; MAPK8; IRS1; MAPK3; KRAS; RELA; PRKAA1; PPARGC1A; NCOA3; MAPK14; INSR; RAF1; IKBKG; RELB; MAP3K7; CREBBP; MAP2K2; JAK2; CHUK; MAP2K1; NFKB1; TGFBR1; SMAD4; JUN; IL1R1; PRKCA; IL6; HSP90AA1; ADIPOQ
25		
30	Передача сигнала с участием NF- κ B	IRAK1; EIF2AK2; EP300; INS; MYD88; PRKCZ; TRAF6; TBK1; AKT2; EGFR; IKBKB; PIK3CA; BTRC; NFKB2; MAP3K14; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; RIPK1; HDAC2; KRAS; RELA; PIK3C2A; TRAF2; TLR4; PDGFRB; TNF; INSR; LCK; IKBKG; RELB; MAP3K7; CREBBP; AKT1; PIK3R1; CHUK; PDGFRA; NFKB1; TLR2; BCL10; GSK3B; AKT3; TNFAIP3; IL1R1
35		
40	Передача сигнала с участием нейрегулина	ERBB4; PRKCE; ITGAM; ITGA5; PTEN; PRKCZ; ELK1; MAPK1; PTPN11; AKT2; EGFR; ERBB2; PRKCI; CDKN1B; STAT5B; PRKD1; MAPK3; ITGA1; KRAS; PRKCD; STAT5A; SRC; ITGB7; RAF1; ITGB1; MAP2K2; ADAM17; AKT1; PIK3R1; PDPK1; MAP2K1; ITGB3; EREG; FRAP1; PSEN1; ITGA2; MYC; NRG1; CRKL; AKT3; PRKCA; HSP90AA1; RPS6KB1
45	Передача сигнала с участием Wnt и бета-катенина	CD44; EP300; LRP6; DVL3; CSNK1E; GJA1; SMO; AKT2; PIN1; CDH1; BTRC; GNAQ; MARK2; PPP2R1A; WNT11; SRC; DKK1; PPP2CA; SOX6; SFRP2; ILK; LEF1; SOX9; TP53; MAP3K7; CREBBP; TCF7L2; AKT1; PPP2R5C; WNT5A; LRP5; CTNNB1; TGFBR1; CCND1;

	GSK3A; DVL1; APC; CDKN2A; MYC; CSNK1A1; GSK3B; AKT3; SOX2
5	Передача сигнала с участием инсулинового рецептора
	PTEN; INS; EIF4E; PTPN1; PRKCZ; MAPK1; TSC1;
	PTPN11; AKT2; CBL; PIK3CA; PRKCI; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; IRS1; MAPK3; TSC2; KRAS; EIF4EBP1; SLC2A4; PIK3C2A; PPP1CC; INSR; RAF1; FYN; MAP2K2; JAK1; AKT1; JAK2; PIK3R1; PDPK1; MAP2K1; 10 GSK3A; FRAP1; CRKL; GSK3B; AKT3; FOXO1; SGK; RPS6KB1
	Передача сигнала с участием IL-6
	HSPB1; TRAF6; MAPKAPK2; ELK1; MAPK1; PTPN11; 15 IKBKB; FOS; NFKB2; MAP3K14; MAPK8; MAPK3; MAPK10; IL6ST; KRAS; MAPK13; IL6R; RELA; SOCS1; MAPK9; ABCB1; TRAF2; MAPK14; TNF; RAF1; IKBKG; RELB; MAP3K7; MAP2K2; IL8; JAK2; CHUK; STAT3; MAP2K1; NFKB1; CEBPB; JUN; IL1R1; SRF; IL6
	Холестаз в печени
	PRKCE; IRAK1; INS; MYD88; PRKCZ; TRAF6; PPARA; 20 RXRA; IKBKB; PRKCI; NFKB2; MAP3K14; MAPK8; PRKD1; MAPK10; RELA; PRKCD; MAPK9; ABCB1; TRAF2; TLR4; TNF; INSR; IKBKG; RELB; MAP3K7; IL8; CHUK; NR1H2; TJP2; NFKB1; ESR1; SREBF1; FGFR4; JUN; IL1R1; PRKCA; IL6
	Передача сигнала с участием IGF-1
	IGF1; PRKCZ; ELK1; MAPK1; PTPN11; NEDD4; AKT2; 25 PIK3CA; PRKCI; PTK2; FOS; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; IGF1R; IRS1; MAPK3; IGFBP7; KRAS; PIK3C2A; YWHAZ; PXN; RAF1; CASP9; MAP2K2; AKT1; PIK3R1; PDPK1; MAP2K1; IGFBP2; SFN; JUN; CYR61; AKT3; FOXO1; SRF; CTGF; RPS6KB1
	NRF2-опосредованный ответ на окислительный стресс
	PRKCE; EP300; SOD2; PRKCZ; MAPK1; SQSTM1; 30 NQO1; PIK3CA; PRKCI; FOS; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; PRKD1; MAPK3; KRAS; PRKCD; GSTP1; MAPK9; FTL; NFE2L2; PIK3C2A; MAPK14; RAF1; MAP3K7; CREBBP; MAP2K2; AKT1; PIK3R1; MAP2K1; PPIB; JUN; KEAP1; GSK3B; ATF4; PRKCA; EIF2AK3; HSP90AA1
	Фиброз печени/активация звездчатых клеток печени
	EDN1; IGF1; KDR; FLT1; SMAD2; FGFR1; MET; PGF; 40 SMAD3; EGFR; FAS; CSF1; NFKB2; BCL2; MYH9; IGF1R; IL6R; RELA; TLR4; PDGFRB; TNF; RELB; IL8; PDGFRA; NFKB1; TGFBR1; SMAD4; VEGFA; BAX; IL1R1; CCL2; HGF; MMP1; STAT1; IL6; CTGF; MMP9
	Передача сигнала с участием PPAR
	EP300; INS; TRAF6; PPARA; RXRA; MAPK1; IKBKB; 45 NCOR2; FOS; NFKB2; MAP3K14; STAT5B; MAPK3; NRIP1; KRAS; PPARG; RELA; STAT5A; TRAF2; PPARGC1A; PDGFRB; TNF; INSR; RAF1; IKBKG;

	RELB; MAP3K7; CREBBP; MAP2K2; CHUK; PDGFRA; MAP2K1; NFKB1; JUN; IL1R1; HSP90AA1
5	Передача сигнала с участием Fc-эпсилон-RI
	PRKCE; RAC1; PRKCZ; LYN; MAPK1; RAC2; PTPN11; AKT2; PIK3CA; SYK; PRKCI; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; PRKD1; MAPK3; MAPK10; KRAS; MAPK13; PRKCD; MAPK9; PIK3C2A; BTK; MAPK14; TNF; RAF1; FYN; MAP2K2; AKT1; PIK3R1; PDPK1; MAP2K1; AKT3; VAV3; PRKCA
10	Передача сигнала с участием рецептора, связанного с G-белком
	PRKCE; RAP1A; RGS16; MAPK1; GNAS; AKT2; IKBKB; PIK3CA; CREB1; GNAQ; NFKB2; CAMK2A; PIK3CB; PIK3C3; MAPK3; KRAS; RELA; SRC; PIK3C2A; RAF1; IKBKG; RELB; FYN; MAP2K2; AKT1; PIK3R1; CHUK; PDPK1; STAT3; MAP2K1; NFKB1; BRAF; ATF4; AKT3; PRKCA
15	Метаболизм инозитолфосфата
	PRKCE; IRAK1; PRKAA2; EIF2AK2; PTEN; GRK6; MAPK1; PLK1; AKT2; PIK3CA; CDK8; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; MAPK3; PRKCD; PRKAA1; MAPK9; CDK2; PIM1; PIK3C2A; DYRK1A; MAP2K2; PIP5K1A; PIK3R1; MAP2K1; PAK3; ATM; TTK; CSNK1A1; BRAF; SGK
20	Передача сигнала с участием PDGF
	EIF2AK2; ELK1; ABL2; MAPK1; PIK3CA; FOS; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; CAV1; ABL1; MAPK3; KRAS; SRC; PIK3C2A; PDGFRB; RAF1; MAP2K2; JAK1; JAK2; PIK3R1; PDGFRA; STAT3; SPHK1; MAP2K1; MYC; JUN; CRKL; PRKCA; SRF; STAT1; SPHK2
25	Передача сигнала с участием VEGF
	ACTN4; ROCK1; KDR; FLT1; ROCK2; MAPK1; PGF; AKT2; PIK3CA; ARNT; PTK2; BCL2; PIK3CB; PIK3C3; BCL2L1; MAPK3; KRAS; HIF1A; NOS3; PIK3C2A; PXN; RAF1; MAP2K2; ELAVL1; AKT1; PIK3R1; MAP2K1; SFN; VEGFA; AKT3; FOXO1; PRKCA
30	Передача сигнала с участием клеток натуральных киллеров
	PRKCE; RAC1; PRKCZ; MAPK1; RAC2; PTPN11; KIR2DL3; AKT2; PIK3CA; SYK; PRKCI; PIK3CB; PIK3C3; PRKD1; MAPK3; KRAS; PRKCD; PTPN6; PIK3C2A; LCK; RAF1; FYN; MAP2K2; PAK4; AKT1; PIK3R1; MAP2K1; PAK3; AKT3; VAV3; PRKCA
35	Клеточный цикл: регуляция G1/S-контрольной точки
	HDAC4; SMAD3; SUV39H1; HDAC5; CDKN1B; BTRC; ATR; ABL1; E2F1; HDAC2; HDAC7A; RB1; HDAC11; HDAC9; CDK2; E2F2; HDAC3; TP53; CDKN1A; CCND1; E2F4; ATM; RBL2; SMAD4; CDKN2A; MYC; NRG1; GSK3B; RBL1; HDAC6
40	Передача сигнала с участием T-клеточного рецептора
	RAC1; ELK1; MAPK1; IKBKB; CBL; PIK3CA; FOS;
45	

	NFKB2; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; MAPK3; KRAS;
	RELA; PIK3C2A; BTK; LCK; RAF1; IKBKG; RELB; FYN;
	MAP2K2; PIK3R1; CHUK; MAP2K1; NFKB1; ITK; BCL10;
	JUN; VAV3
5	Передача сигнала с участием рецептора смерти
	CRADD; HSPB1; BID; BIRC4; TBK1; IKBKB; FADD;
	FAS; NFKB2; BCL2; MAP3K14; MAPK8; RIPK1; CASP8;
10	DAXX; TNFRSF10B; RELA; TRAF2; TNF; IKBKG; RELB;
	CASP9; CHUK; APAF1; NFKB1; CASP2; BIRC2; CASP3;
	BIRC3
	Передача сигнала с участием FGF
	RAC1; FGFR1; MET; MAPKAPK2; MAPK1; PTPN11;
	AKT2; PIK3CA; CREB1; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8;
15	MAPK3; MAPK13; PTPN6; PIK3C2A; MAPK14; RAF1;
	AKT1; PIK3R1; STAT3; MAP2K1; FGFR4; CRKL; ATF4;
	AKT3; PRKCA; HGF
	Передача сигнала с участием GM-CSF
	LYN; ELK1; MAPK1; PTPN11; AKT2; PIK3CA; CAMK2A;
20	STAT5B; PIK3CB; PIK3C3; GNB2L1; BCL2L1; MAPK3;
	ETS1; KRAS; RUNX1; PIM1; PIK3C2A; RAF1; MAP2K2;
	AKT1; JAK2; PIK3R1; STAT3; MAP2K1; CCND1; AKT3;
	STAT1
	Передача сигнала при амиотрофическом латеральном склерозе
25	BID; IGF1; RAC1; BIRC4; PGF; CAPNS1; CAPN2;
	PIK3CA; BCL2; PIK3CB; PIK3C3; BCL2L1; CAPN1;
	PIK3C2A; TP53; CASP9; PIK3R1; RAB5A; CASP1;
	APAF1; VEGFA; BIRC2; BAX; AKT3; CASP3; BIRC3
	Передача сигнала с участием JAK/Stat
	PTPN1; MAPK1; PTPN11; AKT2; PIK3CA; STAT5B;
30	PIK3CB; PIK3C3; MAPK3; KRAS; SOCS1; STAT5A;
	PTPN6; PIK3C2A; RAF1; CDKN1A; MAP2K2; JAK1;
	AKT1; JAK2; PIK3R1; STAT3; MAP2K1; FRAP1; AKT3;
	STAT1
	Метаболизм никотинола и никотинамида
35	PRKCE; IRAK1; PRKAA2; EIF2AK2; GRK6; MAPK1;
	PLK1; AKT2; CDK8; MAPK8; MAPK3; PRKCD; PRKAA1;
	PBEF1; MAPK9; CDK2; PIM1; DYRK1A; MAP2K2;
	MAP2K1; PAK3; NT5E; TTK; CSNK1A1; BRAF; SGK
	Передача сигнала с участием хемокина
	CXCR4; ROCK2; MAPK1; PTK2; FOS; CFL1; GNAQ;
40	CAMK2A; CXCL12; MAPK8; MAPK3; KRAS; MAPK13;
	RHOA; CCR3; SRC; PPP1CC; MAPK14; NOX1; RAF1;
	MAP2K2; MAP2K1; JUN; CCL2; PRKCA
	Передача сигнала с участием IL-2
	ELK1; MAPK1; PTPN11; AKT2; PIK3CA; SYK; FOS;
45	STAT5B; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; MAPK3; KRAS;
	SOCS1; STAT5A; PIK3C2A; LCK; RAF1; MAP2K2;
	JAK1; AKT1; PIK3R1; MAP2K1; JUN; AKT3

Длительное синаптическое подавление	PRKCE; IGF1; PRKCZ; PRDX6; LYN; MAPK1; GNAS; PRKCI; GNAQ; PPP2R1A; IGF1R; PRKD1; MAPK3; KRAS; GRN; PRKCD; NOS3; NOS2A; PPP2CA; YWHAZ; RAF1; MAP2K2; PPP2R5C; MAP2K1; PRKCA
Передача сигнала с участием эстрогенового рецептора	TAF4B; EP300; CARM1; PCAF; MAPK1; NCOR2; SMARCA4; MAPK3; NRIP1; KRAS; SRC; NR3C1; HDAC3; PPARGC1A; RBM9; NCOA3; RAF1; CREBBP; MAP2K2; NCOA2; MAP2K1; PRKDC; ESR1; ESR2
Путь убиквитинирования белков	TRAF6; SMURF1; BIRC4; BRCA1; UCHL1; NEDD4; CBL; UBE2I; BTRC; HSPA5; USP7; USP10; FBXW7; USP9X; STUB1; USP22; B2M; BIRC2; PARK2; USP8; USP1; VHL; HSP90AA1; BIRC3
Передача сигнала с участием IL-10	TRAF6; CCR1; ELK1; IKBKB; SP1; FOS; NFKB2; MAP3K14; MAPK8; MAPK13; RELA; MAPK14; TNF; IKBKG; RELB; MAP3K7; JAK1; CHUK; STAT3; NFKB1; JUN; IL1R1; IL6
Активация VDR/RXR	PRKCE; EP300; PRKCZ; RXRA; GADD45A; HES1; NCOR2; SP1; PRKCI; CDKN1B; PRKD1; PRKCD; RUNX2; KLF4; YY1; NCOA3; CDKN1A; NCOA2; SPP1; LRP5; CEBPB; FOXO1; PRKCA
Передача сигнала с участием TGF-бета	EP300; SMAD2; SMURF1; MAPK1; SMAD3; SMAD1; FOS; MAPK8; MAPK3; KRAS; MAPK9; RUNX2; SERPINE1; RAF1; MAP3K7; CREBBP; MAP2K2; MAP2K1; TGFBR1; SMAD4; JUN; SMAD5
Передача сигнала с участием Toll-подобного рецептора	IRAK1; EIF2AK2; MYD88; TRAF6; PPARA; ELK1; IKBKB; FOS; NFKB2; MAP3K14; MAPK8; MAPK13; RELA; TLR4; MAPK14; IKBKG; RELB; MAP3K7; CHUK; NFKB1; TLR2; JUN
Передача сигнала с участием p38 MAPK	HSPB1; IRAK1; TRAF6; MAPKAPK2; ELK1; FADD; FAS; CREB1; DDIT3; RPS6KA4; DAXX; MAPK13; TRAF2; MAPK14; TNF; MAP3K7; TGFBR1; MYC; ATF4; IL1R1; SRF; STAT1
Передача сигнала с участием нейротрофин/TRK	NTRK2; MAPK1; PTPN11; PIK3CA; CREB1; FOS; PIK3CB; PIK3C3; MAPK8; MAPK3; KRAS; PIK3C2A; RAF1; MAP2K2; AKT1; PIK3R1; PDPK1; MAP2K1; CDC42; JUN; ATF4
Активация FXR/RXR	INS; PPARA; FASN; RXRA; AKT2; SDC1; MAPK8; APOB; MAPK10; PPARG; MTTP; MAPK9; PPARGC1A; TNF; CREBBP; AKT1; SREBF1; FGFR4; AKT3; FOXO1

	Долговременное синаптическое	PRKCE; RAP1A; EP300; PRKCZ; MAPK1; CREB1;
	потенцирование	PRKCI; GNAQ; CAMK2A; PRKD1; MAPK3; KRAS;
5		PRKCD; PPP1CC; RAF1; CREBBP; MAP2K2; MAP2K1;
		ATF4; PRKCA
	Передача сигнала с участием кальция	RAP1A; EP300; HDAC4; MAPK1; HDAC5; CREB1;
		CAMK2A; MYH9; MAPK3; HDAC2; HDAC7A; HDAC11;
10		HDAC9; HDAC3; CREBBP; CALR; CAMKK2; ATF4;
		HDAC6
	Передача сигнала с участием EGF	ELK1; MAPK1; EGFR; PIK3CA; FOS; PIK3CB; PIK3C3;
		MAPK8; MAPK3; PIK3C2A; RAF1; JAK1; PIK3R1;
		STAT3; MAP2K1; JUN; PRKCA; SRF; STAT1
15	Передача сигнала при гипоксии в	EDN1; PTEN; EP300; NQO1; UBE2I; CREB1; ARNT;
	сердечно-сосудистой системе	HIF1A; SLC2A4; NOS3; TP53; LDHA; AKT1; ATM;
		VEGFA; JUN; ATF4; VHL; HSP90AA1
20	LPS/IL-1 опосредованное ингибирование	IRAK1; MYD88; TRAF6; PPARA; RXRA; ABCA1;
	функции RXR	MAPK8; ALDH1A1; GSTP1; MAPK9; ABCB1; TRAF2;
		TLR4; TNF; MAP3K7; NR1H2; SREBF1; JUN; IL1R1
25	Активация LXR/RXR	FASN; RXRA; NCOR2; ABCA1; NFKB2; IRF3; RELA;
		NOS2A; TLR4; TNF; RELB; LDLR; NR1H2; NFKB1;
		SREBF1; IL1R1; CCL2; IL6; MMP9
	Процессинг амилоида	PRKCE; CSNK1E; MAPK1; CAPNS1; AKT2; CAPN2;
		CAPN1; MAPK3; MAPK13; MAPT; MAPK14; AKT1;
		PSEN1; CSNK1A1; GSK3B; AKT3; APP
30	Передача сигнала с участием IL-4	AKT2; PIK3CA; PIK3CB; PIK3C3; IRS1; KRAS; SOCS1;
		PTPN6; NR3C1; PIK3C2A; JAK1; AKT1; JAK2; PIK3R1;
		FRAP1; AKT3; RPS6KB1
35	Клеточный цикл: регуляция G2/M-контрольной	EP300; PCAF; BRCA1; GADD45A; PLK1; BTRC;
	точки при	CHEK1; ATR; CHEK2; YWHAZ; TP53; CDKN1A;
	повреждении ДНК	PRKDC; ATM; SFN; CDKN2A
	Передача сигнала с участием оксида азота в	KDR; FLT1; PGF; AKT2; PIK3CA; PIK3CB; PIK3C3;
40	сердечно-сосудистой системе	CAV1; PRKCD; NOS3; PIK3C2A; AKT1; PIK3R1;
		VEGFA; AKT3; HSP90AA1
	Метаболизм пуринов	NME2; SMARCA4; MYH9; RRM2; ADAR; EIF2AK4;
		PKM2; ENTPD1; RAD51; RRM2B; TJP2; RAD51C;
		NT5E; POLD1; NME1
45	cAMP-опосредованная передача сигнала	RAP1A; MAPK1; GNAS; CREB1; CAMK2A; MAPK3;
		SRC; RAF1; MAP2K2; STAT3; MAP2K1; BRAF; ATF4

	Митохондриальная дисфункция	SOD2; MAPK8; CASP8; MAPK10; MAPK9; CASP9;
		PARK7; PSEN1; PARK2; APP; CASP3
5	Передача сигнала Notch	HES1; JAG1; NUMB; NOTCH4; ADAM17; NOTCH2;
		PSEN1; NOTCH3; NOTCH1; DLL4
	Путь при стрессе, связанном с	HSPA5; MAPK8; XBP1; TRAF2; ATF6; CASP9; ATF4;
	эндоплазматическим ретикулулом	EIF2AK3; CASP3
10	Метаболизм пиримидинов	NME2; AICDA; RRM2; EIF2AK4; ENTPD1; RRM2B;
		NT5E; POLD1; NME1
	Передача сигнала при болезни Паркинсона	UCHL1; MAPK8; MAPK13; MAPK14; CASP9; PARK7;
15		PARK2; CASP3
	Передача сигнала в клетках сердечной мышцы и с участием бета-адренергических рецепторов	GNAS; GNAQ; PPP2R1A; GNB2L1; PPP2CA; PPP1CC; PPP2R5C
20	Гликолиз/ гликонеогенез	HK2; GCK; GPI; ALDH1A1; PKM2; LDHA; HK1
	Передача сигнала с участием интерферона	IRF1; SOCS1; JAK1; JAK2; IFITM1; STAT1; IFIT3
25	Передача сигнала с участием Sonic Hedgehog	ARRB2; SMO; GLI2; DYRK1A; GLI1; GSK3B; DYRK1B
	Метаболизм глицерофосфолипидов	PLD1; GRN; GPAM; YWHAZ; SPHK1; SPHK2
30	Разрушение фосфолипидов	PRDX6; PLD1; GRN; YWHAZ; SPHK1; SPHK2
	Метаболизм триптофана	SIAH2; PRMT5; NEDD4; ALDH1A1; CYP1B1; SIAH1
	Разрушение лизина	SUV39H1; EHMT2; NSD1; SETD7; PPP2R5C
	Путь эксцизионной репарации нуклеотидов	ERCC5; ERCC4; XPA; XPC; ERCC1
35	Метаболизм крахмала и сахарозы	UCHL1; HK2; GCK; GPI; HK1
	Метаболизм аминсахаров	NQO1; HK2; GCK; HK1
40	Метаболизм арахидоновой кислоты	PRDX6; GRN; YWHAZ; CYP1B1
	Передача сигнала с вовлечением околосуточного ритма	CSNK1E; CREB1; ATF4; NR1D1
45	Коагулирующая система	BDKRB1; F2R; SERPINE1; F3

	Передача сигнала	PPP2R1A; PPP2CA; PPP1CC; PPP2R5C
	с участием допаминового рецептора	
5	Метаболизм глутатиона	IDH2; GSTP1; ANPEP; IDH1
	Метаболизм глицеролипидов	ALDH1A1; GPAM; SPHK1; SPHK2
	Метаболизм линолевой кислоты	PRDX6; GRN; YWHAZ; CYP1B1
10	Метаболизм метионина	DNMT1; DNMT3B; ANCY; DNMT3A
	Метаболизм пирувата	GLO1; ALDH1A1; PKM2; LDHA
	Метаболизм аргинина и пролина	ALDH1A1; NOS3; NOS2A
	Передача сигнала с участием эйкозаноидов	PRDX6; GRN; YWHAZ
15	Метаболизм фруктозы и маннозы	HK2; GCK; HK1
	Метаболизм галактозы	HK2; GCK; HK1
	Биосинтез стильбена, кумарина и лигнина	PRDX6; PRDX1; TYR
20	Путь с презентацией антигена	CALR; B2M
	Биосинтез стероидов	NQO1; DHCR7
	Метаболизм бутаноата	ALDH1A1; NLGN1
25	Цикл цитрата	IDH2; IDH1
	Метаболизм жирных кислот	ALDH1A1; CYP1B1
	Метаболизм глицерофосфолипидов	PRDX6; CHKA
30	Метаболизм гистидина	PRMT5; ALDH1A1
	Метаболизм инозитола	ERO1L; APEX1
	Метаболизм ксенобиотиков	GSTP1; CYP1B1
	Метаболизм метана с участием цитохрома р450	PRDX6; PRDX1
35	Метаболизм фенилаланина	PRDX6; PRDX1
	Метаболизм пропаноата	ALDH1A1; LDHA
	Метаболизм селеноаминокислоты	PRMT5; ANCY
40	Метаболизм сфинголипидов	SPHK1; SPHK2
	Метаболизм аминоксифоната	PRMT5
	Метаболизм андрогена и эстрогена	PRMT5
45	Метаболизм аскорбата и альдарата	ALDH1A1

Биосинтез желчных кислот	ALDH1A1
Метаболизм цистеина	LDHA
Биосинтез жирных кислот	FASN
Передача сигнала с участием глутаматного рецептора	GNB2L1
NRF2-опосредованный ответ на окислительный стресс	PRDX1
Пентозофосфатный путь	GPI
Взаимное превращение пентозы и глюкуроната	UCHL1
Метаболизм ретинола	ALDH1A1
Метаболизм рибофлавина	TYR
Метаболизм тирозина	PRMT5, TYR
Биосинтез убихинона	PRMT5
Разрушение валина, лейцина и изолейцина	ALDH1A1
Метаболизм глицина, серина и треонина	CHKA
Разрушение лизина	ALDH1A1
Боль/вкус	TRPM5; TRPA1
Боль	TRPM7; TRPC5; TRPC6; TRPC1; Cnr1; cnr2; Grk2; Trpa1; Pomc; Cgrp; Crf; Pka; Era; Nr2b; TRPM5; Prkaca; Prkacb; Prkar1a; Prkar2a
Митохондриальная функция	AIF; CytC; SMAC (Diablo); Aifm-1; Aifm-2
Неврология развития	BMP-4; хордин (Chrd); ноггин (Nog); WNT (Wnt2; Wnt2b; Wnt3a; Wnt4; Wnt5a; Wnt6; Wnt7b; Wnt8b; Wnt9a; Wnt9b; Wnt10a; Wnt10b; Wnt16); бета-катенин; Dkk-1; связанные с ожогом белки; Otx-2; Gbx2; FGF-8; Reelin; Dab1; unc-86 (Pou4f1 или Brn3a); Numb; Reln

Варианты осуществления настоящего изобретения также относятся к способам и композициям, связанным с нокаутированием генов, амплифицированием генов и репарацией конкретных мутаций, ассоциированных с нестабильностью ДНК-повторов и неврологическими нарушениями (Robert D. Wells, Tetsuo Ashizawa, Genetic Instabilities and Neurological Diseases, Second Edition, Academic Press, Oct 13, 2011 - Medical). Как было обнаружено, определенные аспекты последовательностей тандемных повторов ответственны за более двадцати заболеваний человека (New insights into repeat instability: role of RNA•DNA hybrids. Mclvor EI, Polak U, Napierala M. RNA Biol. 2010 Sep-Oct; 7(5): 551-8). Система CRISPR-Cas может быть приспособлена для корректировки таких дефектов геномной нестабильности.

Дополнительный аспект настоящего изобретения относится к использованию системы CRISPR-Cas для корректирования дефектов в генах EMP2A и EMP2 B, которые, как

было обнаружено, ассоциированы с болезнью Лафора. Болезнь Лафора представляет собой аутосомно-рецессивное состояние, которое характеризуется прогрессирующей миоклонус-эпилепсией, которая может начинаться как эпилептический приступ в подростковом возрасте. Некоторые случаи заболевания могут вызываться мутациями в генах, которые уже были выявлены. Заболевание вызывает приступы, мышечные спазмы, затрудненную ходьбу, слабоумие и, в конечном итоге, смерть. В настоящее время не существует терапии, которая показала эффективность против развития заболевания. На другие генетические расстройства, ассоциированные с эпилепсией, также можно целенаправленно воздействовать при помощи системы CRISPR-Cas, и лежащая в основе генетика дополнительно описана в *Genetics of Epilepsy and Genetic Epilepsies*, edited by Giuliano Avanzini, Jeffrey L. Noebels, Mariani Foundation Paediatric Neurology: 20; 2009).

В еще одном аспекте настоящего изобретения систему CRISPR-Cas можно использовать для корректировки офтальмологических дефектов, которые являются результатом нескольких генетических мутаций, дополнительно описанных в *Genetic Diseases of the Eye, Second Edition*, edited by Elias I. Traboulsi, Oxford University Press, 2012.

Некоторые дополнительные аспекты настоящего изобретения связаны с корректированием дефектов, ассоциированных с широким спектром генетических заболеваний, которые дополнительно описаны на веб-сайте Национальных институтов здравоохранения (National Institutes of Health) в тематическом подразделе "Наследственные заболевания" ("Genetic Disorders"). Наследственные заболевания головного мозга могут включать без ограничения аденолейкодистрофию, агенезию мозолистого тела, синдром Айкарди, синдром Альперса, болезнь Альцгеймера, синдром Барта, болезнь Баттена, CADASIL, мозжечковую дегенерацию, болезнь Фабри, синдром Герстмана-Штраусслера-Шейнкера, болезнь Гентингтона и другие связанные с триплетным повтором нарушения, болезнь Лея, синдром Леша-Найхана, болезнь Менкеса, типы митохондриальной миопатии и кольпоцефалию по критериям NTNDS. Такие заболевания дополнительно описаны на веб-сайте Национальных институтов здравоохранения (National Institutes of Health) в тематическом подразделе "Наследственные заболевания головного мозга" ("Genetic Brain Disorders").

В некоторых вариантах осуществления состоянием может быть неоплазия. В некоторых вариантах осуществления, где состоянием является неоплазия, гены, на которые целенаправленно воздействуют, являются любыми из перечисленных в таблице А (в данном случае PTEN и так далее). В некоторых вариантах осуществления состоянием может быть возрастная дегенерация желтого пятна. В некоторых вариантах осуществления состоянием может быть шизофреническое нарушение. В некоторых вариантах осуществления состоянием может быть связанное с тринуклеотидным повтором нарушение. В некоторых вариантах осуществления состоянием может быть синдром ломкой X-хромосомы. В некоторых вариантах осуществления состоянием может быть связанное с активностью секретазы нарушение. В некоторых вариантах осуществления состоянием может быть связанное с прионами нарушение. В некоторых вариантах осуществления состоянием может быть ALS. В некоторых вариантах осуществления состоянием может быть привыкание к наркотическим средствам. В некоторых вариантах осуществления состоянием может быть аутизм. В некоторых вариантах осуществления состоянием может быть болезнь Альцгеймера. В некоторых вариантах осуществления состоянием может быть воспаление. В некоторых вариантах осуществления состоянием может быть болезнь Паркинсона.

Примеры белков, ассоциированных с болезнью Паркинсона, включают без

ограничения α -синуклеин, DJ-1, LRRK2, PINK1, паркин, UCHL1, синфилин-1 и NURR1.

Примеры связанных с привыканием белков могут включать, например, АВАТ.

Примеры связанных с воспалением белков могут включать, например, моноцитарный хемоаттрактантный белок-1 (monocyte chemoattractant protein-1) (MCP1), кодируемый геном Ccr2, C-C рецептор хемокина 5 типа (C-C chemokine receptor type 5) (CCR5), кодируемый геном Ccr5, IgG-рецептор IIВ (IgG receptor IIВ) (FCGR2b, также называемый CD32), кодируемый геном Fcgr2b, или белок Fc-эпсилон-R1g (Fc epsilon R1g) (FCER1g), кодируемый геном Fcer1g.

Примеры ассоциированных с заболеваниями сердечно-сосудистой системы белков могут включать, например, IL1В (интерлейкин 1, бета (interleukin 1, beta)), XDH (ксантиндегидрогеназу (xanthine dehydrogenase)), TP53 (опухольный белок p53 (tumor protein p53)), PTGIS (простагландин-I2(простаглицлин)-синтазу (prostaglandin I2 (prostacyclin) synthase)), MB (миоглобин (myoglobin)), IL4 (интерлейкин 4 (interleukin 4)), ANGPT1 (ангиопоэтин 1 (angiopoietin 1)), ABCG8 (АТФ-связывающую кассету, подсемейство G (WHITE), представитель 8 (ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 8)) или CTSK (катепсин К (cathepsin K)).

Примеры ассоциированных с болезнью Альцгеймера белков могут включать, например, белок, представляющий собой рецептор липопротеинов очень низкой плотности (very low density lipoprotein receptor protein) (VLDLR), кодируемый геном VLDLR, убиквитин-подобный модификатор-активирующий фермент 1 (ubiquitin-like modifier activating enzyme 1) (UBA1), кодируемый геном UBA1, или белок, являющийся каталитической субъединицей NEDD8-активирующего фермента E1 (NEDD8-activating enzyme E1 catalytic subunit protein) (UBE1C), кодируемый геном UBA3.

Примеры белков, ассоциированных с расстройствами аутистического спектра, могут включать, например, белок 1, ассоциированный с периферическим бензодиазепиновым рецептором (benzodiazepine receptor (peripheral) associated protein 1) (BZRAP1), кодируемый геном BZRAP1, белок, представитель 2 семейства AF4/FMR2 (AF4/FMR2 family member 2 protein) (AFF2), кодируемый геном AFF2 (также называемый MFR2), белок-аутосомный гомолог 1, ассоциированный с умственной отсталостью, связанной с ломкой X-хромосомой (fragile X mental retardation autosomal homolog 1 protein) (FXR1), кодируемый геном FXR1, или белок-аутосомный гомолог 2, ассоциированный с умственной отсталостью, связанной с ломкой X-хромосомой (fragile X mental retardation autosomal homolog 2 protein) (FXR2), кодируемый геном FXR2.

Примеры белков, ассоциированных с дегенерацией желтого пятна, могут включать, например, АТФ-связывающую кассету, белок-представитель 4 подсемейства А (ABC1) (ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1) member 4 protein) (ABCA4), кодируемый геном ABCR, белок-аполипротеин Е (apolipoprotein E protein) (APOE), кодируемый геном APOE, или белок-лиганд 2 хемокина (C-C мотив) (chemokine (C-C motif) Ligand 2 protein) (CCL2), кодируемый геном CCL2.

Примеры белков, ассоциированных с шизофренией, могут включать NRG1, ErbB4, CPLX1, TRN1, TRN2, NRXN1, GSK3A, BDNF, DISC1, GSK3B и их комбинации.

Примеры белков, вовлеченных в подавление опухоли, могут включать, например, АТМ (мутированный, атаксия-телеангиэктазия (ataxia telangiectasia mutated)), АТР (атаксия-телеангиэктазия- и Rad3-родственный (ataxia telangiectasia and Rad3 related)), EGFR (рецептор эпидермального фактора роста (epidermal growth factor receptor)), ERBB2 (гомолог 2 v-erb-b2 эритробластического лейкоза вирусного онкогена (v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2)), ERBB3 (гомолог 3 v-erb-b2 эритробластического лейкоза вирусного онкогена (v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral

oncogene homolog 3)), ERBB4 (гомолог 4 v-erb-b2 эритробластического лейкоза вирусного онкогена (v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 4)), Notch 1, Notch 2, Notch 3 или Notch 4.

Примеры белков, ассоциированных с нарушением, связанным с активностью секретазы, могут включать, например, PSENEN (presenilin enhancer 2 homolog (*C. elegans*)), CTSB (катепсин В (cathepsin B)), PSEN1 (пресенилин 1 (presenilin 1)), APP (белок-предшественник бета-амилоида (A4) (amyloid beta (A4) precursor protein)), APH1B (anterior pharynx defective 1 homolog B (*C. elegans*)), PSEN2 (пресенилин 2 (болезнь Альцгеймера 4) (presenilin 2 (Alzheimer disease 4)) или BACE1 (APP-расщепляющий фермент 1 по бета-сайту (beta-site APP-cleaving enzyme 1)).

Примеры белков, ассоциированных с амиотрофическим латеральным склерозом, могут включать, например, SOD1 (супероксиддисмутаза 1 (superoxide dismutase 1)), ALS2 (белок, ассоциированный с амиотрофическим латеральным склерозом 2 (amyotrophic lateral sclerosis 2)), FUS (ФНК-связывающий белок FUS (fused in sarcoma)), TARDBP (TAR-ДНК связывающий белок (TAR DNA binding protein)), VEGFA (фактор роста эндотелия сосудов А (vascular endothelial growth factor A)), VEGFB (фактор роста эндотелия сосудов В (vascular endothelial growth factor B)) и VEGFC (фактор роста эндотелия сосудов С (vascular endothelial growth factor C)) и любую их комбинацию.

Примеры белков, ассоциированных с прионными болезнями, могут включать SOD1 (супероксиддисмутаза 1), ALS2 (белок, ассоциированный с амиотрофическим латеральным склерозом 2 (amyotrophic lateral sclerosis 2)), FUS (ФНК-связывающий белок FUS (fused in sarcoma)), TARDBP (TAR-ДНК связывающий белок (TAR DNA binding protein)), VEGFA (фактор роста эндотелия сосудов А (vascular endothelial growth factor A)), VEGFB (фактор роста эндотелия сосудов В (vascular endothelial growth factor B)) и VEGFC (фактор роста эндотелия сосудов С (vascular endothelial growth factor C)) и любую их комбинацию.

Примеры белков, связанных с нейродегенеративными состояниями при прионных болезнях, могут включать, например, A2M (альфа-2-макроглобулин (Alpha-2-Macroglobulin)), AATF (фактор транскрипции, противодействующий апоптозу (Apoptosis antagonizing transcription factor)), ACPH (простатоспецифическую кислую фосфатазу (Acid phosphatase prostate)), ACTA2 (альфа-актин 2 гладкой мускулатуры аорты (Actin alpha 2 smooth muscle aorta)), ADAM22 (ADAM, металлопептидазный домен (ADAM metalloproteinase domain)), ADORA3 (аденозиновые рецептор А3 типа (Adenosine A3 receptor)) или ADRA1D (альфа-1D адренергический рецептор для альфа-1D адренорецептора (Alpha-1D adrenergic receptor for Alpha-1D adrenoceptor)).

Примеры белков, ассоциированных с иммунодефицитом, могут включать, например, A2M [альфа-2-макроглобулин (alpha-2-macroglobulin)]; AANAT [арилалкиламин-N-ацетилтрансферазу (arylalkylamine N-acetyltransferase)]; ABCA1 [АТФ-связывающую кассету, подсемейство А (ABC1), представитель 1 (ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 1)]; ABCA2 [АТФ-связывающую кассету, подсемейство А (ABC1), представитель 2 (ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 2)] или ABCA3 [АТФ-связывающую кассету, подсемейство А (ABC1), представитель 3 (ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 3)].

Примеры белков, ассоциированных с нарушениями, связанными с тринуклеотидным повтором, включают, например, AR (андрогеновый рецептор (androgen receptor)), FMR1 (белок 1, ассоциированный с умственной отсталостью, связанной с ломкой X-хромосомой (fragile X mental retardation 1)), HTT (хантиггин (huntingtin)) или DMPK (протеинкиназу, ассоциированную с мышечной дистрофией (dystrophia myotonica-protein

kinase)), FXN (фратаксин (frataxin)), ATXN2 (атаксин 2 (ataxin 2)).

Примеры белков, ассоциированных с нарушениями передачи нервных импульсов включают, например, SST (соматостатин (somatostatin)), NOS1 (синтазу оксида азота 1 (нейрональную) (nitric oxide synthase 1 (neuronal))), ADRA2A (адренергический, альфа-2A-, рецептор (adrenergic, alpha-2A-, receptor)), ADRA2C (адренергический, альфа-2C-, рецептор (adrenergic, alpha-2C-, receptor)), TACR1 (тахикининовый рецептор 1 (tachykinin receptor 1)) или HTR2c (5-гидроксиทริปтаминовый (серотониновый) рецептор 2C (5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2C)).

Примеры последовательностей, ассоциированных с неврологическим развитием, включают, например, A2 BP1 [атаксин 2-связывающий белок 1 (ataxin 2-binding protein 1)], AADAT [аминоадипатаминотрансферазу (aminoadipate aminotransferase)], AANAT [арилалкиламин-N-ацетилтрансферазу (arylalkylamine N-acetyltransferase)], ABAT [4-аминобутиратаминотрансферазу (4-aminobutyrate aminotransferase)], ABCA1 [АТФ-связывающую кассету, подсемейство А (ABC1), представитель 1 (ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 1)] или ABCA13 [АТФ-связывающую кассету, подсемейство А (ABC1), представитель 13 (ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 13)].

Дополнительные примеры предпочтительных состояний, которые подлежат лечению с помощью данной системы, включают те, которые могут быть выбраны из синдрома Айкарди-Гутьереса; болезни Александра; синдрома Аллана-Херндона-Дадли; связанных с геном POLG нарушений; альфа-маннозидоза (II и III тип); синдрома Альстрема; синдрома Ангельмана; атаксии-телеангиэктазии; нейронного высоковидного липофусциноза; бета-талассемии; двусторонней атрофии зрительного нерва и (инфантильной) атрофии зрительного нерва 1 типа; ретинобластомы (двусторонней); болезни Канавана; церебро-окуло-фацио-скелетного синдрома 1 [COFS1]; церебротендинального ксантоматоза; синдрома Корнелии де Ланге; связанных с геном МАРТ нарушений; наследственных прионных болезней; синдрома Драве; семейной болезни Альцгеймера с ранним началом; атаксии Фридрейха [FRDA]; синдрома Фринса; фукозидоза; врожденной мышечной дистрофии Фукуямы; галактосиалидоза; болезни Гоше; органической ацидемии; гемофагоцитарного лимфогистиоцитоза; синдрома прогерии Гетчинсона-Гилфорда; муколипидоза II; инфантильной болезни накопления свободной сиаловой кислоты; ассоциированной с геном PLA2G6 нейродегенерации; синдрома Джервелла-Ланге-Нильсена; узелкового врожденного буллезного эпидермолиза; болезни Гентингтона; болезни Краббе (инфантильной); ассоциированного с митохондриальной ДНК синдрома Ли и NARP; синдрома Леша-Найхана; ассоциированной с геном LIS1 лиссэнцефалии; синдрома Лоу; болезни "кленового сиропа"; синдрома дупликации MECP2; связанных с геном ATR7A нарушений обмена меди; связанной с геном LAMA2 мышечной дистрофии; недостаточности арилсульфатазы А; мукополисахаридоза I, II или III типов; связанных с биогенезом пероксисом нарушений, спектра заболеваний по типу синдрома Цельвегера; нарушений по типу нейродегенерации с накоплением железа в головном мозге; недостаточности кислой сфингомиелиназы; болезни Ниманна-Пика С типа; глициновой энцефалопатии; связанных с геном ARX нарушений; нарушений орнитинового цикла; связанного с геном COL1A1/2 несовершенного остеогенеза; синдромов удаления митохондриальной ДНК; связанных с геном PLP1 нарушений; синдрома Перри; синдрома Фелана-МакДермида; болезни накопления гликогена II типа (болезни Помпе) (инфантильной); связанных с геном МАРТ нарушений; связанных с геном MECP2 нарушений; эпифизарной точечной хондродисплазии 1 типа костей верхних конечностей или бедренной кости; синдрома Робертса; болезни Сандхоффа; болезни Шиндлера - 1 типа;

аденозиндезаминазной недостаточности; синдрома Смита-Лемли-Опитца; спинальной мышечной атрофии; спинально-церебеллярной атаксии с возникновением в младенческом возрасте; недостаточности гексозаминидазы А; танатофорной дисплазии 1 типа; связанных с геном коллагена VI типа нарушений; синдрома Ашера I типа; врожденной мышечной дистрофии; синдрома Вольфа-Хиршхорна; недостаточности лизосомной кислой липазы и пигментной ксеродермы.

Длительное введение белковых терапевтических средств может вызвать нежелательные иммунные ответы на данный белок. Иммуногенность белковых лекарственных средств может объясняться наличием нескольких иммунодоминантных эпитопов для Т-лимфоцитов-хелперов (HTL). Путем снижения аффинности связывания этих эпитопов для HTL, содержащихся в данных белках, с МНС можно создавать лекарственные средства с более низкой иммуногенностью (Tangri S, et al. ("Rationally engineered therapeutic proteins with reduced immunogenicity" J Immunol. 2005 Mar 15; 174(6): 3187-96.) В настоящем изобретении иммуногенность фермента CRISPR, в частности, можно снизить, следуя подходу, впервые изложенному Tangri и соавт. в отношении эритропоэтина и впоследствии получившему развитие. Соответственно, для снижения иммуногенности фермента CRISPR (например, Cas9) у вида-хозяина (человека или другого вида) можно применять направленную эволюцию или рациональное проектирование.

У растений патогены часто являются специфичными по отношению к хозяину. Например, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* вызывает фузариозный вилт томата, но поражает только томат, а *F. oxysporum* f. *dianthii* и *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* поражают только пшеницу. Растения обладают присущими и индуцированными защитными реакциями, обеспечивающими устойчивость к большинству патогенов. Мутации и события рекомбинации в поколениях растений приводят к генетической изменчивости, которая обуславливает восприимчивость, тем более, что патогены размножаются с большей частотой, чем растения. У растений может наблюдаться устойчивость видов - нехозяев, например, хозяин и патоген являются несовместимыми. Также может наблюдаться горизонтальная устойчивость, например, частичная устойчивость ко всем расам патогена, обычно контролируемая многими генами, и вертикальная устойчивость, например, полная устойчивость к некоторым расам патогена, но не к другим расам, обычно контролируемая несколькими генами. На уровне взаимодействия генов растения и патогены эволюционируют совместно, а генетические изменения одного уравновешивают изменения другого. Соответственно, используя естественную изменчивость, селекционеры комбинируют наиболее полезные гены для урожайности, качества, однородности, выносливости, устойчивости. Источники генов устойчивости включают нативные или чужеродные сорта, старинные сорта, родственные дикорастущие растения и индуцированные мутации, например, при обработке растительного материала мутагенными средствами. Применяя настоящее изобретение, селекционеры растений получают новый инструмент для индукции мутаций. Соответственно, специалист в данной области может проанализировать геном источников генов устойчивости, а в отношении сортов, имеющих желаемые характеристики или признаки, использовать настоящее изобретение для индукции появления генов устойчивости с большей точностью, чем в случае применявшихся ранее мутагенных средств, и, следовательно, ускорять и улучшать программы селекции растений.

Как будет понятно, предусматривается, что настоящую систему можно использовать для целенаправленного воздействия на любую представляющую интерес

полинуклеотидную последовательность. Некоторые состояния или заболевания, которые можно эффективно лечить с использованием настоящей системы, включены в таблицы выше, и примеры известных на данный момент генов, ассоциированных с такими состояниями, также предоставлены в них. Тем не менее, гены, приведенные в качестве

5 примеров, не являются исчерпывающими.

ПРИМЕРЫ

Следующие примеры приведены с целью иллюстрации различных вариантов осуществления настоящего изобретения и не предназначены для ограничения настоящего изобретения каким-либо образом. Данные примеры совместно со способами,

10 описанными в данном документе, в настоящее время отражают предпочтительные варианты осуществления, являются иллюстративными и не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения. Изменения в данном документе и другие применения, которые охватываются сутью настоящего изобретения, как определено

15 Пример 1: Активность комплекса CRISPR в ядре эукариотической клетки

Примером системы CRISPR II типа является локус CRISPR II типа из *Streptococcus pyogenes* SF370, который содержит кластер из 4 генов Cas9, Cas1, Cas2 и Csn1, а также два некодирующих элемента РНК, tracrRNA и характерный массив повторяющихся последовательностей (прямых повторов), чередующихся с короткими фрагментами

20 неповторяющихся последовательностей (спейсерами, примерно 30 п.о. каждый). В этой системе двухцепочечный разрыв (DSB) целевой ДНК образовывается в ходе четырех последовательных стадий (фигура 2А). Во-первых, две некодирующие РНК, массив pre-crRNA и tracrRNA транскрибируются с локуса CRISPR. Во-вторых, tracrRNA гибридизируется с прямыми повторами pre-crRNA, которая затем процессируется в

25 зрелые crRNA, содержащие индивидуальные спейсерные последовательности. В-третьих, комплекс зрелая crRNA: tracrRNA направляет Cas9 к ДНК-мишени, состоящей из протоспейсера и соответствующего PAM, посредством образования гетеродуплекса между спейсерным участком crRNA и протоспейсерной ДНК. И наконец, Cas9 опосредует расщепление целевой ДНК выше PAM с образованием DSB внутри протоспейсера

30 (фигура 2А). В данном примере описывается иллюстративный способ для приспособления этой РНК-программируемой нуклеазной системы к управлению активностью комплекса CRISPR в ядрах эукариотических клеток.

Для улучшения экспрессии компонентов CRISPR в клетках млекопитающих два гена из локуса 1 SF370 *Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*) были кодон-оптимизированы,

35 Cas9 (SpCas9) и РНКазы III (SpRNase III). Для обеспечения ядерной локализации клеточный сигнал ядерной локализации (NLS) включали в аминоконцевые (N-) или карбоксильные (C-) терминальные области и SpCas9, и SpRNase III (Фигура 2В). Для обеспечения визуализации экспрессии белков ген флуоресцентного белка в качестве маркера также включали в N- или C-терминальные области обоих белков (фигура 2В). Также был

40 создан вариант SpCas9 с NLS, прикрепленным и к N-, и к C-терминальным областям (2xNLS-SpCas9). Конструкции, содержащие слитый с NLS SpCas9 и SpRNase III трансфицировали в клетки почки эмбриона человека (HEK) 293FT, и было обнаружено, что относительное положение NLS относительно SpCas9 и SpRNase III влияет на их эффективность ядерной локализации. Хотя C-терминального NLS было достаточно

45 для нацеливания SpRNase III в ядро, прикрепление одной копии этих конкретных NLS либо к N-, либо к C-терминальной области SpCas9 не было способно обеспечить адекватную ядерную локализацию в этой системе. В этом примере C-терминальный NLS был из нуклеоплазмина (KRPAATKKAGQAKKKK), а C-терминальный NLS был

из большого Т-антигена SV40 (PKKKRKV). Из тестируемых вариантов SpCas9 только 2xNLS-SpCas9 проявлял ядерную локализацию (фигура 2 В).

tracrRNA из локуса CRISPR *S. pyogenes* SF370 содержал два сайта инициации транскрипции, дающие начало двум транскриптам из 89 нуклеотидов (нт) и 171 нт, которые затем подвергались процессингу в идентичные зрелые tracrRNA из 75 нт. Более короткие tracrRNA из 89 нт отбирали на предмет экспрессии в клетках млекопитающих (экспрессирующая конструкция изображена на фигуре 6, с функциональностью, как определено по результатам анализа с помощью Surveyor, показанным на фигуре 6В). Сайты инициации транскрипции обозначены как +1, а также указаны терминатор транскрипции и последовательность, гибридизирующаяся с зондом при нозерн-блоттинге. Экспрессию подвергнутой процессингу tracrRNA также подтверждали с помощью нозерн-блоттинга. На фигуре 7С показаны результаты анализа с помощью нозерн-блоттинга общей РНК, экстрагированной из клеток 293FT, трансфицированных экспрессирующими конструкциями U6, несущими длинную или короткую tracrRNA, а также SpCas9 и DR-EMX1(1)-DR. Левая и правая секции получены с клетками 293FT, трансфицированными без или с SpRNase III, соответственно. U6 являются показателем для контроля загрузки при блоттинге с зондом, нацеленным на малую ядерную РНК (snRNA) U6 человека. Трансфекция экспрессирующей конструкции с короткой tracrRNA приводит к избыточным уровням подвергнутой процессингу формы tracrRNA (~75 п.о.). Очень низкие количества длинных tracrRNA обнаруживали при нозерн-блоттинге.

Для стимуляции точной инициации транскрипции промотор U6 на основе РНК-полимеразы III выбирали для управления экспрессией tracrRNA (фигура 2С). Подобным образом, конструкцию на основе промотора U6 разрабатывали для экспрессии массива pre-crRNA, состоящего из одного спейсера, фланкированного двумя прямыми повторами (DR, также включены в выражение "парные tracr-последовательности"; фигура 2С). Исходный спейсер был разработан для целенаправленного воздействия на целевой сайт из 33 пар оснований (п.о.) (протоспейсер из 30 п.о., а также последовательность мотива CRISPR (PAM) из 3 п.о., соответствующая мотиву узнавания NGG у Cas9) в локусе EMX1 человека (фигура 2С), ключевом гене в развитии коры головного мозга.

Клетки НЕК 293FT трансфицировали комбинациями компонентов CRISPR для того, чтобы определить, возможно ли при гетерологичной экспрессии системы CRISPR (SpCas9, SpRNase III, tracrRNA и pre-crRNA) в клетках млекопитающих достичь целенаправленного расщепления хромосом млекопитающего. Поскольку DSB в ядрах млекопитающих подвергаются частичной репарации с помощью пути негомологичного соединения концов (NHEJ), который приводит к образованию вставок/делений, анализ с помощью Surveyor использовали для выявления возможной активности для расщепления в целевом локусе EMX1 (см., например, Guschin et al., 2010, *Methods Mol Biol* 649: 247). Котрансфекция всех четырех компонентов CRISPR была способна индуцировать расщепления в протоспейсере до 5,0% (см. фигуру 2D). Котрансфекция всех компонентов CRISPR, за исключением SpRNase III, также индуцировала образование вставок/делений в протоспейсере на уровне до 4,7%, что указывало на то, что могут существовать эндогенные РНКазы млекопитающих, которые способны помогать созреванию crRNA, такие как, например, родственные ферменты Dicer и Drosha. Удаление любого из трех остальных компонентов ликвидировало активность системы CRISPR для расщепления генома (фигура 2D). Секвенирование по Сэнгеру ампликонов, содержащих целевой локус, подтверждало активность для расщепления: на 43 подвергнувшихся секвенированию клонов было обнаружено 5 мутированных аллелей (11,6%). В подобных экспериментах с использованием ряда направляющих

последовательностей процентные значения содержания вставок/делеций составляли до 29% (см. фигуры 4-7, 12 и 13). Эти результаты определяют трехкомпонентную систему для эффективной опосредованной CRISPR модификации генома в клетках млекопитающих.

5 Для оптимизации эффективности расщепления авторы данной заявки также определяли, влияют ли различные изоформы tracrRNA на эффективность расщепления, и обнаружили, что в этой иллюстративной системе только короткая (89 п.о.) форма транскрипта была способна опосредовать расщепление локуса генома EMX1. На
10 фигуре 9 представлен дополнительный анализ процессинга crRNA в клетках млекопитающих с помощью нозерн-блоттинга. На фигуре 9А показано схематическое изображение вектора экспрессии для одного спейсера, фланкированного двумя прямыми повторами (DR-EMX1(1)-DR). Спейсер из 30 п.о. нацеленный на протоспейсер 1 локуса EMX1 человека и последовательности прямых повторов показаны в последовательности
15 внизу фигуры 9А. Линия указывает на участок, обратнo комплементарную последовательность которого использовали для создания зондов для нозерн-блоттинга для выявления crRNA EMX1(1). На фигуре 9В показаны результаты анализа с помощью нозерн-блоттинга общей РНК, экстрагированной из клеток 293FT, трансфицированных экспрессирующими конструкциями U6, несущими DR-EMX1(1)-DR. Левая и правая
20 секции получены с клетками 293FT, трансфицированными без или с SpRNase III, соответственно. DR-EMX1(1)-DR подвергался процессингу в зрелые crRNA только в присутствии SpCas9 и короткой tracrRNA и не зависел от присутствия SpRNase III. Зрелая crRNA, обнаруженная в общей РНК трансфицированных 293FT, имела длину ~33 п.о. и была короче, чем зрелая crRNA из *S. pyogenes* длиной 39-42 п.о. Данные результаты демонстрируют, что систему CRISPR можно перенести в эукариотические клетки и
25 перепрограммировать для облегчения расщепления эндогенных целевых полинуклеотидов млекопитающих.

На фигуре 2 показана бактериальная система CRISPR, описанная в этом примере. На фигуре 2А показано схематическое изображение локуса 1 CRISPR из *Streptococcus pyogenes* SF370 и предполагаемый механизм опосредованного CRISPR расщепления
30 ДНК с помощью этой системы. Зрелая crRNA, подвергаясь процессингу из массива прямых повторов-спейсеров, направляет Cas9 к мишеням в геноме, состоящим из комплементарных протоспейсеров и мотива, смежного с протоспейсером (PAM). При спаривании оснований мишень-спейсер Cas9 опосредует двухцепочечный разрыв в целевой ДНК. На фигуре 2 В показано конструирование Cas9 *S. pyogenes* (SpCas9) и
35 РНКазы III (SpRNase III) с клеточными сигналами ядерной локализации (NLS) для обеспечения импорта в ядро млекопитающих. На фигуре 2С показана экспрессия SpCas9 и SpRNase III у млекопитающих, управляемая конститутивным промотором EF1a, и массива tracrRNA и pre-crRNA (DR-cneftcep-DR), управляемая промотором U6 РНК-полимеразы 3 для стимуляции точной инициации и терминации транскрипции.
40 Протоспейсер из локуса EMX1 человека с удовлетворительной последовательностью PAM использовали в качестве спейсера в массиве pre-crRNA. На фигуре 2D показан анализ с помощью нуклеазы Surveyor для опосредованных SpCas9 минорных вставок и делеций. SpCas9 экспрессировался с SpRNase III, tracrRNA и массивом pre-crRNA, несущим целевой спейсер для EMX1, и без таковых. На фигуре 2Е показано
45 схематическое изображение спаривания оснований между целевым локусом и нацеленной на EMX1 crRNA, а также иллюстративная хроматограмма, на которой показана микроделеция, смежная по отношению к сайту расщепления SpCas9. На фигуре 2F показаны мутированные аллели, идентифицированные в результате анализа

секвенирования 43 клональных ампликонов, показывающие разнообразие микровставок и микроделений. Штрихами указаны удаленные основания, а невыровненные или несовпадающие основания указывают на вставки или мутации. Масштабная метка = 10 мкм.

5 Для дальнейшего упрощения трехкомпонентной системы адаптировали химерную crRNA-tracrRNA гибридную структуру, в которой зрелую crRNA (содержащую направляющую последовательность) сливали с частичной tracrRNA при помощи структуры по типу стебель-петля для имитации естественного дуплекса crRNA : tracrRNA (фигура 3А).

10 Направляющие последовательности можно встроить между сайтами BbsI с использованием гибридизированных олигонуклеотидов. Протоспейсеры на смысловой и антисмысловой нитях указаны выше и ниже последовательностей ДНК, соответственно. Степень модификации для локусов PVALB человека и Th мыши достигали 6,3% и 0,75%, соответственно, демонстрируя широкую применимость системы
15 CRISPR при модификации различных локусов у многих организмов. Хотя при использовании химерных конструкций расщепление обнаруживали только с одним из трех спейсеров для каждого локуса, все целевые последовательности расщеплялись с эффективностью получения вставок/делений, достигающей 27%, при использовании схемы с коэкспрессируемой pre-crRNA (фигуры 4 и 5).

20 На фигуре 5 представлена дополнительная иллюстрация того, что SpCas9 можно перепрограммировать для целенаправленного воздействия на несколько локусов генома в клетках млекопитающих. На фигуре 5А представлено схематическое изображение локуса EMX1 человека, на котором показано положение пяти протоспейсеров, указанных с помощью подчеркнутых последовательностей. На фигуре 5В представлено
25 схематическое изображение комплекса pre-crRNA/tracrRNA, на котором показана гибридизация между участком прямого повтора в pre-crRNA и tracrRNA (вверху), и схематическое изображение химерной структуры РНК, содержащей направляющую последовательность из 20 п.о. и парную tracr-последовательность и tracr-последовательность, состоящие из неполного прямого повтора и последовательностей
30 tracrRNA, гибридизированных в "шпильчатую" структуру (внизу). Результаты анализа с помощью Surveyor со сравнением эффективности опосредованного Cas9 расщепления в пяти протоспейсерах в локусе EMX1 человека показаны на фигуре 5С. Целенаправленное воздействие на каждый протоспейсер осуществляли либо с использованием подвергнутого процессингу комплекса pre-crRNA/tracrRNA (crRNA),
35 либо с использованием химерной РНК (chiRNA).

Поскольку вторичная структура РНК может быть важной для межмолекулярных взаимодействий, алгоритм предсказания структуры на основе минимальной свободной энергии и ансамбля взвешенных структур по Больцману использовали для сравнения предполагаемой вторичной структуры всех направляющих последовательностей,
40 используемых в эксперименте с целенаправленным воздействием на геном (фигура 3В) (см., например, Gruber et al., 2008, Nucleic Acids Research, 36: W70). Анализ выявил, что в большинстве случаев эффективные направляющие последовательности в контексте химерной crRNA, по сути, не содержали мотивов вторичной структуры, тогда как неэффективные направляющие последовательности с большей вероятностью
45 образовывали внутренние вторичные структуры, которые могут препятствовать спариванию оснований с ДНК целевого протоспейсера. Следовательно, возможно, что вариабельность во вторичной структуре спейсера может оказывать воздействие на эффективность опосредованной CRISPR интерференции при использовании химерной

crRNA.

На фигуре 3 показан пример векторов экспрессии. На фигуре 3А представлено схематическое изображение бицистронного вектора для управления экспрессией химерной синтетической конструкции crRNA-tracrRNA (химерной РНК), а также SpCas9. Химерная направляющая РНК содержит направляющую последовательность из 20 п.о., соответствующую протоспейсеру в геномном целевом сайте. На фигуре 3В представлено схематическое изображение, на котором показаны направляющие последовательности, нацеленные на локусы EMX1, PVALB человека и Th мыши, а также их предсказанные вторичные структуры. Эффективность модификации в каждом целевом сайте указана ниже рисунка вторичной структуры РНК (EMX1, n=216 считываемых фрагментов при секвенировании ампликонов; PVALB, n=224 считываемых фрагментов; Th, n=265 считываемых фрагментов). Представлены результаты по алгоритму укладки каждого основания, окрашенного соответственно его возможности принятия предсказанной вторичной структуры, как указано с помощью цветной шкалы, воспроизведенной на фигуре 3В в виде серой шкалы. Структуры дополнительных векторов для SpCas9 показаны на фигуре 3А, в том числе отдельные векторы экспрессии, включающие промотор U6, сцепленный с сайтом встраивания для направляющего олигонуклеотида, и промотор Cbh, сцепленный с кодирующей последовательностью SpCas9.

Для того, чтобы определить, способны ли спейсеры с вторичными структурами функционировать в прокариотических клетках, где в естественных условиях функционируют CRISPR, интерференцию при трансформации плазмидами, несущими протоспейсеры, исследовали в штамме *E. coli*, гетерологично экспрессирующем локус 1 CRISPR *S. pyogenes* SF370 (фигура 3С). Локус CRISPR клонировали в низкокопийный вектор экспрессии *E. coli* и массив crRNA замещали одним спейсером, фланкированным парой DR (pCRISPR). Штаммы *E. coli*, несущие разные плазмиды pCRISPR, трансформировали контрольными плазмидами, содержащими соответствующие протоспейсер и последовательности PAM (фигура 3С). При анализе у бактерий все спейсеры способствовали эффективной CMSPR-интерференции (фигура 3С). Эти результаты указывают на то, что могут существовать дополнительные факторы, влияющие на эффективность активности CRISPR в клетках млекопитающих.

Для исследования специфичности опосредованного CRISPR расщепления эффект однонуклеотидных мутаций в направляющей последовательности в отношении расщепления протоспейсера в геноме млекопитающих анализировали с использованием ряда целенаправленно воздействующих на EMX химерных crRNA с единичными точковыми мутациями (фигура 4А). На фигуре 4 В показаны результаты анализа с помощью нуклеазы Surveyor со сравнением эффективности расщепления Cas9 при спаривании с различными мутантными химерными РНК. Несовпадение одного основания в участке вплоть до 12 п.о. с 5' в PAM, по сути, прекращало расщепление генома SpCas9, тогда как спейсеры с мутациями в положениях, расположенных в более отдаленных положениях выше относительно хода транскрипции сохраняли активность в отношении исходного протоспейсера-мишени (фигура 4В). В дополнение к PAM, SpCas9 характеризуется специфичностью в отношении одного основания в последних 12 п.о. спейсера. Кроме того, CRISPR способен опосредовать расщепление генома столь же эффективно, как и пара нуклеаз TALE (TALEN), целенаправленно воздействующих на тот же протоспейсер EMX1. На фигуре 4С представлено схематическое изображение, на котором показана структура TALEN, целенаправленно воздействующих на EMX1, и на фигуре 4D показано сравнение эффективности TALEN и Cas9 (n=3) при разгонке

в геле продуктов, полученных в результате анализа с помощью Surveyor.

Установив набор компонентов для достижения опосредованного CRISPR редактирования генов в клетках млекопитающих посредством склонного к ошибкам механизма NHEJ, исследовали способность CRISPR к стимуляции гомологичной рекомбинации (HR), высокоточный путь репарации генов для создания точных редакционных изменений в геноме. SpCas9 дикого типа способен опосредовать сайт-специфические DSB, которые могут репарироваться как с помощью NHEJ, так и HR. Кроме того, замену аспартата на аланин (D10A) в каталитическом домене RuvCI в SpCas9 производили посредством методик генетической инженерии для превращения нуклеазы в никазу (SpCas9n; проиллюстрировано на фигуре 5A) (см., например, Sapranasaks et al., 2011, *Cucleic Acis Research*, 39: 9275; Gasiunas et al., 2012, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109: E2579) так, чтобы надрезанная геномная ДНК подвергалась высокоточной репарации с использованием гомологичной рекомбинации (HDR). Анализ с помощью Surveyor подтвердил, что SpCas9n не создает вставок/делеций в протоспейсере-мишени EMX1. Как показано на фигуре 5B, коэкспрессия целенаправленно воздействующей на EMX1 химерной crRNA с SpCas9 давала вставки/делеции в целевом сайте, тогда как коэкспрессия с SpCas9n - нет (n=3). Более того, при секвенировании 327 ампликонов не обнаружили каких-либо вставок/делеций, индуцированных SpCas9n. Для исследования опосредованной CRISPR HR при совместной трансфекции клеток НЕК 293FT химерной РНК, целенаправленно воздействующей на EMX1, hSpCas9 или hSpCas9n, выбирали тот же локус, также как и матрицу для HR для введения пары сайтов рестрикции (HindIII и NheI) возле протоспейсера. На фигуре 5 C приведена схематическая иллюстрация стратегии HR с относительными положениями точек рекомбинации и последовательностей для гибридизации праймеров (стрелки). SpCas9 и SpCas9n действительно катализировали интеграцию матрицы для HR в локус EMX1. ПЦР амплификация целевого участка с последующим рестрикционным расщеплением HindIII выявила продукты расщепления, соответствующие ожидаемым размерам фрагментов (стрелки на результатах анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов с помощью гель-электрофореза, показанных на фигуре 5D), причем SpCas9 и SpCas9n опосредуют подобные уровни эффективности HR. Заявители дополнительно подтверждали HR с использованием секвенирования геномных ампликонов по Сэнгеру (фигура 5E). Эти результаты демонстрировали пригодность CRISPR для облегчения целенаправленной вставки генов в геном млекопитающего. С учетом специфичности к мишени в 14 п.о. (12 п.о. от спейсера и 2 п.о. от PAM) SpCas9 дикого типа доступность никазы может значительно снизить вероятность нецелевой модификации, поскольку одноцепочечные разрывы не являются субстратами для склонного к ошибкам пути NHEJ.

Экспрессирующие конструкции, имитирующие естественную архитектуру локусов CRISPR с собранными в массив спейсерами (фигура 2A), создавали для исследования возможности мультиплексного целенаправленного воздействия на последовательности. При использовании одного массива CRISPR, кодирующего пару спейсеров, нацеленных на EMX1 и PVALB, обнаруживали эффективное расщепление в обоих локусах (фигура 4F, на которой показаны как схематическая структура массива crRNA, так и блот, полученный после анализа с помощью Surveyor, показывающий эффективное опосредование расщепления). Также исследовали целенаправленную делецию геномных участков большего размера посредством одновременных DSB с использованием спейсеров против двух мишеней в EMX1, разделенных 119 п.о., и обнаруженная эффективность деления составляла 1,6% (3 из 182 ампликонов; фигура 5G). Это

демонстрирует, что система CRISPR может опосредовать мультиплексное редактирование в пределах одного генома.

Пример 2: модификации и альтернативы системы CRISPR

Возможность применения РНК для программирования специфичного к последовательности расщепления ДНК определяет новый класс инструментов для конструирования генома для разнообразных исследовательских и промышленных применений. Несколько аспектов системы CRISPR можно дополнительно улучшить для повышения эффективности и универсальности целенаправленного воздействия с помощью CRISPR. Оптимальная активность Cas9 может зависеть от доступности несвязанного Mg^{2+} на уровнях, которые превышают имеющиеся в ядре млекопитающего (см., например, Jinek et al., 2012, Science, 337: 816), и предпочтение в отношении мотива NGG непосредственно ниже протоспейсера ограничивает способность к целенаправленному воздействию в среднем на каждые 12 п.о. в геноме человека. Некоторые из этих затруднений можно преодолеть путем изучения разнообразия локусов CRISPR в микробном метагеноме (см., например, Makarova et al., 2011, Nat Rev Microbiol, 9: 467). Другие локусы CRISPR можно переместить в микроокружение клетки млекопитающего с помощью способа, подобного описанному в примере 1. Эффективность модификации в каждом целевом сайте указана ниже вторичных структур РНК. Алгоритм, генерирующий цвета структуры каждого основания соответственно его возможности принятия предсказанной вторичной структуры. РНК направляющих спейсеров 1 и 2 индуцировали 14% и 6,4%, соответственно. Статистический анализ активности для расщепления по биологическим копиям в этих двух протоспейсерных сайтах также приведен на фигуре 7.

Пример 3: алгоритм выбора примерной целевой последовательности
Создали компьютерную программу для идентификации кандидатных целевых последовательностей CRISPR на обеих нитях вводимой последовательности ДНК на основе длины желаемой направляющей последовательности и мотива последовательности CRISPR (PAM) для определенного фермента CRISPR. Например, целевые сайты для Cas9 из *S. pyogenes* с последовательностями PAM NGG можно идентифицировать путем поиска в отношении 5'-N_x-NGG-3' как на вводимой последовательности, так и на последовательности, обратнo-комплементарной вводимой. Подобным образом, целевые сайты для Cas9 CRISPR1 *S. thermophilus* с последовательностью PAM NNAGAAW, можно идентифицировать путем поиска в отношении 5'-N_x-NNAGAAW-3' как на вводимой последовательности, так и на последовательности, обратнo-комплементарной вводимой. Подобным образом, целевые сайты для Cas9 CRISPR3 *S. thermophilus* с последовательностью PAM NGGNG можно идентифицировать путем поиска в отношении 5'-N_x-NGGNG-3' как на вводимой последовательности, так и на последовательности, обратнo-комплементарной вводимой. Значение "x" в N_x может фиксироваться программой или может быть определено пользователем, как, например, 20.

Поскольку несколько случаев появления целевого сайта ДНК в геноме могут приводить к неспецифическому редактированию генома, после идентификации всех возможных сайтов программа фильтрует последовательности, исходя из количества раз, когда они встречаются в соответствующем эталонном геноме. Для тех ферментов CRISPR, для которых специфичность к последовательности определяется "затравочной" последовательностью, такой как находящаяся в 11-12 п.о. в направлении 5' от последовательности PAM, в том числе сама последовательность PAM, стадия

фильтрации может основываться на "затравочной" последовательности.

Следовательно, во избежание редактирования в дополнительных локусах генома результаты фильтруют, исходя из числа случаев обнаружения последовательности затравки: РАМ в подходящем геноме. Пользователь может иметь возможность выбора 5 длины затравочной последовательности. Пользователь также может иметь возможность определять число случаев обнаружения последовательности затравки: РАМ в геноме применительно к прохождению фильтра По умолчанию установлен скрининг в отношении уникальных последовательностей. Уровень фильтрации изменяют путем 10 изменения как длины затравочной последовательности, так и числа случаев обнаружения последовательности в геноме. В качестве дополнения или альтернативы, программа может обеспечивать последовательность направляющей последовательности, комплементарную сообщенной(ым) целевой(ым) последовательности(ям) путем обеспечения последовательности, обратно комплементарной идентифицированной(ым) 15 целевой(ым) последовательности(ям).

Дальнейшие детали способов и алгоритмов для оптимизации выбора последовательности можно найти в заявке на патент США с серийным номером ТВА (общая ссылка В1-2012/084 44790.11.2022); включенной в данный документ при помощи 20 ссылки.

Пример 4: оценка гибридов нескольких химерных crRNA-tracrRNA

В данном примере описаны результаты, полученные для химерных РНК (chiRNA; 25 содержащие направляющую последовательность, парную tracr-последовательность и tracr-последовательность в одном транскрипте), имеющих tracr-последовательности, которые включают фрагменты последовательности tracrRNA дикого типа с разной длиной. На фигуре 18a показано схематическое изображение бицистронного вектора 30 экспрессии для химерной РНК и Cas9. Cas9 управляется промотором CBh, а химерная РНК управляется промотором U6. Химерная направляющая РНК состоит из направляющей последовательности (Ns) из 20 п.о., соединенной с tracr-последовательностью (проходящей от первого "U" в нижней нити к концу транскрипта), которая усечена в разных указанных положениях. Направляющие и tracr- 35 последовательности разделены парной tracr-последовательностью GUUUUAGAGCUA, за которой следует последовательность петли GAAA. Результаты анализов с помощью SURVEYOR в отношении опосредованных Cas9 вставок/делеций в локусах EMX1 и PVALB человека показаны на фигурах 18b и 18c, соответственно. Стрелки указывают на ожидаемые фрагменты, полученные в результате расщепления с помощью 40 SURVEYOR. ChiRNA показаны путем обозначения их "+n", а crRNA относится к гибридной РНК, в которой направляющие и tracr-последовательности экспрессируются в виде отдельных транскриптов. Количественный анализ этих результатов, выполненный в трех повторностях, проиллюстрирован с помощью гистограмм на фигурах 11a и 11b, соответствующих фигурам 10b и 10c, соответственно ("N.D." означает 45 отсутствие обнаруженных вставок/делеций). ID (идентификационные данные) протоспейсеров и их соответствующей мишени в геноме, последовательность протоспейсера, последовательность РАМ и положение нити приведены в таблице D. Направляющие последовательности разработаны так, чтобы они были комплементарны полной последовательности протоспейсера в случае отдельных транскриптов в гибридной системе или только подчеркнутой части в случае химерных РНК.

Таблица D:

ИД протоспей сера	Мишень в геноме	Последовательность протоспейсера (от 5' к 3')	РАМ	Нить
1	<i>EMXI</i>	<u>GGACATCGATGTCACCTCCAATGACTAG</u> GG	TGG	+
2	<i>EMXI</i>	<u>CATTGGAGGTGACATCGATGTCCTCCCC</u> AT	TGG	-
3	<i>EMXI</i>	<u>GGAAGGGCCTGAGTCCGAGCAGAAGAA</u> GAA	GGG	+
4	<i>PVALB</i>	<u>GGTGGCGAGAGGGGCCGAGATTGGGTGT</u> TC	AGG	+
5	<i>PVALB</i>	<u>ATGCAGGAGGGTGGCGAGAGGGGCCGA</u> GAT	TGG	+

Клеточная культура и трансфекция

Линию клеток почки эмбриона человека (HEK) 293FT (Life Technologies) поддерживали в среде Игла в модификации Дульбекко (DMEM), дополненной 10% фетальной бычьей сыворотки (HyClone), 2 мМ GlutaMAX (Life Technologies), 100ЕД/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина, при 37°C с инкубированием при 5% CO₂. Клетки 293FT заседали в 24-луночные планшеты (Corning) за 24 часа до трансфекции при плотности 150000 клеток на лунку. Клетки трансфицировали с применением Lipofectamine 2000 (Life Technologies), следуя рекомендованному производителем протоколу. Для каждой лунки 24-луночного планшета использовали в общей сложности 500 нг плазмид.

Анализ с помощью SURVEYOR на предмет наличия модификации генома

Клетки 293FT трансфицировали плазмидной ДНК, как описано выше. Клетки инкубировали при 37°C в течение 72 часов после трансфекции перед экстракцией геномной ДНК. Геномную ДНК экстрагировали с помощью раствора QuickExtract DNA Extraction Solution (Episentre), следуя протоколу производителя. Вкратце, осажденные центрифугированием клетки ресуспендировали в растворе QuickExtract solution и инкубировали при 65°C в течение 15 минут и 98°C в течение 10 минут. Геномный участок, фланкирующий целевой сайт CRISPR каждого гена, амплифицировали с помощью ПЦР (праймеры перечислены в таблице E) и продукты очищали с применением колонки QiaQuick Spin Column (Qiagen), следуя протоколу производителя. В общей сложности 400 нг очищенных ПЦР-продуктов смешивали с 2 мкл 10X ПЦР-буфера для ДНК-полимеразы Taq (Enzymatics) и воды сверхвысокой чистоты до конечного объема 20 мкл и подвергали процессу повторного отжига для обеспечения образования гетеродуплекса: 95°C в течение 10 мин., линейное снижение температуры с 95°C до 85°C со скоростью 2°C/с, с 85°C до 25°C со скоростью 0,25°C/с и с выдерживанием при 25°C в течение 1 минуты. После повторного отжига продукты обрабатывали нуклеазой SURVEYOR и энхансером S SURVEYOR (Transgenomics), следуя рекомендованному производителем протоколу, и анализировали в 4-20% полиакриламидных гелях Novex TBE (Life Technologies). Гели окрашивали красителем ДНК SYBR Gold (Life Technologies) в течение 30 минут и получали изображение с помощью системы обработки изображений Gel Doc gel imaging system (Bio-rad). Количественный анализ основывался на относительных интенсивностях полос.

Таблица Е:

Название праймера	Мишень в геноме	последовательность праймера (от 5' к 3')
Sp-EMX1-F	<i>EMX1</i>	AAAACCACCCTTCTCTCTGGC
Sp-EMX1-R	<i>EMX1</i>	GGAGATTGGAGACACGGAGA G
Sp-PVALB-F	<i>PVALB</i>	CTGGAAAGCCAATGCCTGAC
Sp-PVALB-R	<i>PVALB</i>	GGCAGCAAACCTTGTCT

Вычислительная идентификация уникальных целевых сайтов CRISPR

Для идентификации уникальных целевых сайтов для фермента Cas9 (SpCas9) S. ruogenes SF370 в геноме человека, мыши, крысы, данио, плодовой мухи и *C. elegans* был разработан пакет программ для сканирования обеих нитей последовательности ДНК и идентификации всех возможных целевых сайтов SpCas9. Для этого примера каждый целевой сайт SpCas9 был оперативно определен как последовательность из 20 п.о., за которой следует последовательность мотива, смежного с протоспейсером, (PAM) NGG, при этом были определены все последовательности, удовлетворяющие определению 5'-N₂₀-NGG-3' на всех хромосомах. Для предотвращения неспецифического редактирования генома после идентификации всех потенциальных сайтов все целевые сайты фильтровали, исходя из количества раз, когда они встречаются в соответствующем эталонном геноме. Для того чтобы извлечь пользу из специфичности к последовательности активности Cas9, обеспечиваемой "затравочной" последовательностью, которой может быть, например, последовательность из приблизительно 11-12 п.о. 5' от последовательности PAM, при этом последовательности 5'-NNNNNNNNNN-NGG-3' выбирали как уникальные в соответствующем геноме. Все геномные последовательности загружали из геномного браузера UCSC (геном человека hg19, геном мыши mm9, геном крысы rn5, геном данио danRer7, геном *D. melanogaster* dm4 и геном *C. elegans* ce10). Все результаты поиска доступны для просмотра с использованием информации из геномного браузера UCSC. Иллюстративная визуализация некоторых целевых сайтов в геноме человека представлена на фигуре 22.

Первоначально целенаправленному воздействию подвергали три сайта в пределах локуса EMX1 в клетках НЕК 293FT человека. Эффективность модификации генома каждой chiРНК оценивали с использованием анализа с помощью нуклеазы SURVEYOR, который позволяет обнаруживать мутации, возникающие в результате двухцепочечных разрывов (DSB) ДНК и их последующей репарации с помощью пути репарации повреждения ДНК за счет негомологичного соединения концов (NHEJ). В конструкциях, обозначенных chiRNA(+n), указывается, что нуклеотиды в количестве до +n нуклеотида tracrRNA дикого типа включены в химерную РНК-конструкцию, при этом для n используются значения 48, 54, 67 и 85. Химерные РНК, содержащие более длинные фрагменты tracrRNA дикого типа (chiRNA(+67) и chiRNA(+85)), опосредовали расщепление ДНК во всех трех целевых сайтах EMX1, причем chiRNA(+85), в частности, демонстрировал значительно более высокие уровни расщепления ДНК, чем соответствующие гибриды crRNA/tracrRNA, у которых направляющие и tracr-последовательности экспрессируются в отдельных транскриптах (фигуры 10b и 10a). Два сайта в локусе PVALB, которые не давали обнаруживаемого расщепления с использованием гибридной системы (направляющая последовательность и tracr-последовательность, экспрессируемые в виде отдельных транскриптов), также подвергались целенаправленному воздействию с использованием chiRNA. chiRNA(+67)

и chiRNA(+85) были способны опосредовать значительное расщепление в двух протоспейсерах в PVALB (фигуры 10c и 10b).

Для всех пяти мишеней в локусах EMX1 и PVALB наблюдали соответствующее повышение эффективности модификации генома с увеличением длины tracr-последовательности. Не вдаваясь в какую-либо теорию, вторичная структура, формируемая 3' концом tracrRNA, может играть роль в увеличении скорости образования комплекса CRISPR. Иллюстрация предсказанных вторичных структур для каждой химерной РНК, использованной в этом примере, представлена на фигуре 21. Вторичную структуру предсказывали с применением RNAfold (<http://RNA.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>) с использованием минимальной свободной энергии и алгоритма функции распределения. Псевдоцвет для каждого основания (воспроизведен в серой шкале) указывает на возможность спаривания. По причине того, что chiRNA с более длинными tracr-последовательностями были способны расщеплять мишени, которые не были расщеплены нативными гибридами crRNA/tracrRNA CRISPR, возможно, что химерная РНК может загружаться на Cas9 более эффективно, чем ее нативный гибридный аналог. Для обеспечения применения Cas9 для сайт-специфического редактирования генома в эукариотических клетках и организмах все предсказанные уникальные целевые сайты для Cas9 *S. pyogenes* определяли путем вычислений в геномах человека, мыши, крысы, данио, *C. elegans* и *D. melanogaster*. Химерные РНК можно разрабатывать для ферментов Cas9 из других микроорганизмов для расширения целевого пространства CRISPR РНК-программируемых нуклеаз.

На фигурах 11 и 21 показаны примерные бицистронные векторы экспрессии для экспрессии химерной РНК, включающие tracr-последовательность РНК дикого типа вплоть до нуклеотида +85 и SpCas9 с последовательностями ядерной локализации SpCas9 экспрессируется с промотора CBh и терминируется polyA-сигналом bGH (bGH pA). Расширенная последовательность, показанная непосредственно под схематическим изображением, соответствует участку, окружающему направляющую последовательность сайта встраивания, и включает от 5' до 3', 3'-часть промотора U6 (первый заштрихованный участок), сайты расщепления BbsI (стрелки), неполный прямой повтор (парная tracr-последовательность GTTTTAGAGCTA, подчеркнутая), последовательность петли GAAA и +85 tracr-последовательность (подчеркнутая последовательность, следующая за последовательностью петли). Иллюстративное встраивание направляющей последовательности изображено ниже сайта встраивания направляющей последовательности, при этом нуклеотиды направляющей последовательности для выбранной мишени представлены как "N".

Последовательности, описанные в приведенных выше примерах, представляют собой следующие (полинуклеотидные последовательности представлены от 5' к 3').

U6 с короткой tracrRNA (*Streptococcus pyogenes* SF370):

GAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAGA
 GAGATAATTGGAATTAATTTGACTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAAATACGTG
 ACGTAGAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTAATGTTTTAAAAT
 GGACSTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATATATC
 TTGTGGAAAGGACGAAACACCGGAACCATTCAAAACAGCATAGCAAGTTAAAAT
 AAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTT

(жирный шрифт = последовательность tracrRNA; подчеркивание = терминаторная

последовательность).

U6 с длинной tracrRNA (*Streptococcus pyogenes* SF370):

5 GAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAGA
 GAGATAATTGGAATTAATTTGACTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAAATACGTG
 ACGTAGAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTTAAAAT
 GGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATATATC
 TTGTGGAAAGGACGAAACACCGGTAGTATTAAGTATTGTTTTATGGCTGATAAATTT
 10 CTTTGAATTTCTCCTTGATTATTTGTTATAAAAAGTTATAAAAATAATCTTGTTGGAACC
 ATTCAAAACAGCATAGCAAGTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAG
 TGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTTT.

U6-DR-BbsI-остов-DR (*Streptococcus pyogenes* SF370):

15 GAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAGA
 GAGATAATTGGAATTAATTTGACTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAAATACGTG
 ACGTAGAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTTAAAAT
 GGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATATATC
 20 TTGTGGAAAGGACGAAACACCGGGTTTTAGAGCTATGCTGTTTTGAATGGTCCCAAA
 ACGGGTCTTCGAGAAGACGTTTTAGAGCTATGCTGTTTTGAATGGTCCCAAAAC.

U6-хиимерная РНК-BbsI-остов (*Streptococcus pyogenes* SF370)

25 GAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAGA
 GAGATAATTGGAATTAATTTGACTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAAATACGTG
 ACGTAGAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTTAAAAT
 GGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATATATC
 30 TTGTGGAAAGGACGAAACACCGGGTCTTCGAGAAGACCTGTTTTAGAGCTAGAAAT
 AGCAAGTAAAATAAGGCTAGTCCG.

NLS-SpCas9-EGFP:

35

40

45

MDYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKMAPKKRKRKVGIHGVPAAADKKYSIGLDIGTNSVG
 WAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRK
 NRICYLQEIFSNEMAKVDDSSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVA YHEKYPTIYH
 5 LRKKLV DSTKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFE
 ENPINASGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIASLGLTPNFKSNFDL
 AEDAQLQSKD TYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLS
 10 ASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIK
 PILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNR
 EKIEKILTRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTN
 FDKNLPNEKVLPKHSLLEYEFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTN
 15 RKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDIL
 EDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQS
 GKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAICK
 GILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIAMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGIKELGSQ
 20 ILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSID
 NKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSE
 LDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDF
 QFYK VREINNYHHAHDAYLNAVVG TALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQE
 25 IGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVL S
 MPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVV
 AKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSSFENPIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELE
 NGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLGKSPEDNEQKQLFVEQHKH
 30 YLDEIIEQISEFSKRVLADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFK
 YFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQ SITGLYETRIDLSQLGGDAAAVSKGEELFTGVVPIL
 VELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATY GKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLYGVQCFSRY
 PDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKED
 35 GNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGP
 VLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDH MVLLEFVTAAGITLGMDELYK.

SpCas9-EGFP-NLS:

40 MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETA
 EATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIF

45

GNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNS
 DVDKLFQQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNGLFG
 NLIALSGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSD
 5 AILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNG
 YAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGE
 LHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTRIPYVVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFE
 10 EVVDKGASASQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLEYEFTVYNELTKVKYVTEGMRKP
 AFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDL
 LKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKYAHLFDDKVMKQLKRRRYT
 GWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQ
 15 GDSLHEHIANLAGSPAIKKILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQK
 NSRERMKRIEELGKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQELDINRLS
 DYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLRSDKNRKGSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLI
 TQRKFDNLTKAERGGSELKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIR
 20 EVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKREINNYHHAHDAYLNAVVGTAIHKYKLESEFVY
 GDYKVYDVRKMLAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKPLIETNGETG
 EIVWDKGRDFATVRKVLSPQVNVKTEVQTTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPK
 KYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGKSKKLKSVKELGITIMERSSSFENPIDFLEAKGYK
 25 EVKKDLIKLPKYSLENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFYLYLASHYEKLGK
 SPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVLADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAE
 NIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQSIITGLYETRIDLSQLGGD
 AAASVSKGEELFTGVVPIVELDGDVNGHKFSVSGEGEDATYGKLTCLKFICTTGKLPVP
 30 WPTLVTTLYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKF
 EGDTLVNRIELKGIKDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIED
 GSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSADPNEKRDHMLLEFVTAAGITLG
 MDELYKKRPAATKKAAGOAKKKK.

35 NLS-SpCas9-EGFP-NLS:

MDYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKMAPKKRKGVIHGVPAAADKKYSIGLDIGTNSVG
 WAVITDEYKVPSSKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRK
 NRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYH
 40 LRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFQQLVQTYNQLFE
 ENPINASGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSGLTPNFKSNFDL
 AEDAKLQLSKDTYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLS
 ASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIK
 45 PILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNR

EKIEKILTRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTN
 FDKNLPNEKVLPHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTN
 RKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDIL
 5 EDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQS
 GKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIAKK
 GILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIAMARENQTTQKGQKNSRERMKRIIEGKELGSQ
 10 ILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSID
 NKVLTRSDKNRGGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSE
 LDKAGFIKRLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDF
 QFYKVREINNYHHAHDAYLNAVVGTAIHKYPKLESEFVYGDYKVDVRKMIKSEQE
 15 IGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVL
 MPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVV
 AKVEKGGKSKKLKSVKELGITIMERSSSFENPIDFLEAKGYKEVKKDLIILPKYSLFELE
 NGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFYLASHYEKLKGSPEDEQKQLFVEQHKH
 20 YLDEIIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIHLFTLTNLGAPAAFK
 YFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQISITGLYETRIDLSQLGGDAAAVSKGEELFTGVVPI
 VELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLYGVQCFSRY
 PDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGDIFKED
 25 GNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGP
 VLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDEL YKKRPAATKKAGQA
 KKKK.

NLS-SpCas9-NLS:

30 MDYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKMAPKKRKRKVGIIHGVPAAADKKYSIGLDIGTNSVG
 WAVITDEYKVPSSKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRK
 NRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVA YHEKYPTIYH
 LRKKLVDSTDKADRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSVDKLFIQLVQTYNQLFE
 35 ENPINASGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIASLGLTPNFKSNFDL
 AEDAQLQLSKDQYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLS
 ASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIK
 PILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNR
 40 EKIEKILTRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTN
 FDKNLPNEKVLPHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTN
 RKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDIL
 EDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQS
 45 GKTILDFLKSDGFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIAKK

GILQTVKVVDELVKVMGRHKPENVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIE EG IKELGSQ
 ILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSID
 NKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGGLSE
 5 LDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDF
 QFYKVVREINNYHHAHDAYLNAVVG TALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSEQE
 IGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLS
 10 MPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVV
 AKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSEKPNIDFLEAKGYKEVKKDLIKLPKYSLFELE
 NGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLGKSPEDNEQKQLFVEQHKH
 YLDEIIEQISEFSKRVLADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFK
 15 YFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQ SITGLYETRIDLSQLGGDKRPAATKKAGQAKKKK.

NLS-mCherry-SpRNase3:

MFLFSLTSFLSSRTLVSKEEDNMAIIEFMRFKVHMEGSVNGHEFEIEGEGEGRPYE
 GTQTAKLKVTKGGPLPFAWDILSPQFMYGSKAYVKHPADIPDYLKLSFPEGFKWERVM
 20 NFEDGGVVTVTQDSSLQDGEFIYKVKLRGTNFPDGPVMQKKTMGWEASSERMYPED
 GALKGEIKQRLKLDGGHYDAEVKTTYKAKKPVQLPGA YNVNIKLDITSHNEDYTIVE
 QYERAEGRHSTGGMDELYKGSKQLELLSTSFDIQFNDLTLETAFTHTSYANEHRLLN
 VSHNERLEFLGDAVLQLIISEYLFAYPKKTEGDMSKLRSMIVREESLAGFSRFCSDAYI
 25 KLKGEEKSGGRRRDTILGDLFEAFLGALLLDKGIDAVRRFLKQVMIPQVEKGNFERVK
 DYKTCLQEFLQTKGDVAIDYQVISEKGPAHAKQFEVSIVVNGAVLSKGLGKSKKLAEQ
 DAAKNALAQLSEV.

SpRNase3-mCherry-NLS:

30 MKQLEELLSTSFDIQFNDLTLETAFTHTSYANEHRLLN VSHNERLEFLGDAVLQLIISEY
 LFAKYPKKTEGDMSKLRSMIVREESLAGFSRFCSDAYIKLKGEEKSGGRRRDTILGDL
 FEAF LGALLLDKGIDAVRRFLKQVMIPQVEKGNFERVKDYKTCLQEFLQTKGDVAIDYQ
 VISEKGPAHAKQFEVSIVVNGAVLSKGLGKSKKLAEQDAAKNALAQLSEVGSVSKGEE
 35 DNMAIIEFMRFKVHMEGSVNGHEFEIEGEGEGRPYE GTQTAKLKVTKGGPLPFAWDIL
 SPQFMYGSKAYVKHPADIPDYLKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVTQDSSLQDGEFI
 YKVKLRGTNFPDGPVMQKKTMGWEASSERMYPEDGALKGEIKQRLKLDGGHYDAE
 40 VKTTYKAKKPVQLPGA YNVNIKLDITSHNEDYTIVEQYERAEGRHSTGGMDELYKRP
 AATKKAGQAKKKK.

NLS-SpCas9n-NLS (D10A мутация никазы представлена в нижнем регистре):

MDYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKMAPKKKRKVG I HGVPAADKKYSIGLaGTNSVGW
 45 AVITDEYKVP SKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKN
 RICYLQEIFSNEMAKVDDSSFFHRLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHL

RKKLV DSTDKADLR LIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEE
 NPINASGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIASLGLTPNFKSNFDLA
 EDAKLQLSKD TYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSA
 5 SMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPI
 LEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREK
 IEKILTRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASAQSFIERMTNFD
 10 KNLPNEKVLPKHSLLEYEFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNR
 KVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLDNEENEDILE
 DIVLTLTLFEDREMIEERLKYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSG
 KTILDFLKSDFANRNFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKG
 15 ILQTVKVVDDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIE EGIKELGSQI
 LKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVDHIVPQSFLKDDSID
 NKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSE
 LDKAGFIKQQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDF
 20 QFYK VREINNYHHAHDA YLNAVVG TALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIAKSEQE
 IGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVL S
 MPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVV
 AKVEKGKSKKLKSVKELLGITIMERSSEKPNIDFLEAKGYKEVKKDLIIKLPKYSLFELE
 25 NGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFLYLASHYEKLGKSPEDNEQKQLFVEQHKH
 YLDEPIEQISEFSKRVILADANLDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIHLFTLTNLGAPAAFK
 YFDTTIDRKRYTSTKEVLDATLIHQ SITGLYETRIDLSQLGGDKRPAATKKAGQAKKKK.
 hEMX1-HR-матрица-HindIII-NheI:

30 GAATGCTGCCCTCAGACCCGCTTCCTCCCTGTCTGTCTGTCCAAGGAGAATGAGG
 TCTCACTGGTGGATTTTCGACTACCCTGAGGAGCTGGCACCTGAGGGACAAGGCC
 CCCACCTGCCAGCTCCAGCCTCTGATGAGGGGTGGGAGAGAGCTACATGAGGTTG
 35 CTAAGAAAGCCTCCCCTGAAGGAGACCACACAGTGTGTGAGGTTGGAGTCTCTAGC
 AGCGGGTTCTGTGCCCCCAGGGATAGTCTGGCTGTCCAGGCACTGCTCTTGATATAA
 ACACCACCTCCTAGTTATGAAACCATGCCATTCTGCCTCTCTGTATGGAAAAGAGC
 ATGGGGCTGGCCCGTGGGGTGGTGTCCACTTTAGGCCCTGTGGGAGATCATGGGAA
 40 CCCACGCAGTGGGTCATAGGCTCTCTCATTACTACTCACATCCACTCTGTGAAGAA
 GCGATTATGATCTCTCCTCTAGAAACTCGTAGAGTCCCATGTCTGCCGGCTTCCAGA
 GCCTGCACTCCTCCACCTTGGCTTGGCTTTGCTGGGGCTAGAGGAGCTAGGATGCAC
 AGCAGCTCTGTGACCCTTTGTTTGAGAGGAACAGGAAAACCACCCTTCTCTCTGGCC
 45 CACTGTGTCCTCTTCCTGCCCTGCCATCCCCTTCTGTGAATGTTAGACCCATGGGAGC
 AGCTGGTCAGAGGGGACCCCGCCTGGGGCCCTAACCCCTATGTAGCCTCAGTCTTC

CCATCAGGCTCTCAGCTCAGCCTGAGTGTTGAGGCCCCAGTGGCTGCTCTGGGGGCC
 TCCTGAGTTTCTCATCTGTGCCCTCCCTCCCTGGCCCAGGTGAAGGTGTGGTTCCAG
 AACCGGAGGACAAAGTACAAACGGCAGAAGCTGGAGGAGGAAGGGCCTGAGTCCG
 5 AGCAGAAGAAGAAGGGCTCCCATCACATCAACCGGTGGCGCATTGCCACGAAGCAG
 GCCAATGGGGAGGACATCGATGTCACCTCCAATGACaagcttgctagcGGTGGGCAACCAC
 AAACCCACGAGGGCAGAGTGCTGCTTGCTGCTGGCCAGGCCCTGCGTGGGCCCAA
 10 GCTGGACTCTGGCCACTCCCTGGCCAGGCTTTGGGGAGGCCTGGAGTCATGGCCCCA
 CAGGGCTTGAAGCCCAGGGCCGCCATTGACAGAGGGACAAGCAATGGGCTGGCTGA
 GGCCTGGGACCACTTGGCCTTCTCCTCGGAGAGCCTGCCTGCCTGGGCGGGCCCGCC
 CGCCACCGCAGCCTCCCAGCTGCTCTCCGTGTCTCCAATCTCCCTTTTGTGTTTATGATGC
 15 ATTTCTGTTTTAATTTATTTTCCAGGCACCACTGTAGTTTAGTGATCCCCAGTGTCCC
 CCTTCCCTATGGGAATAATAAAAGTCTCTCTCTTAATGACACGGGCATCCAGCTCCA
 GCCCCAGAGCCTGGGGTGGTAGATTCCGGCTCTGAGGGCCAGTGGGGGCTGGTAGA
 GCAAACGCGTTCAGGGCCTGGGAGCCTGGGGTGGGGTACTGGTGGAGGGGGTCAAG
 20 GGTAATTCATTAACCTCTCTTTTTGTTGGGGGACCCTGGTCTCTACCTCCAGCTCCA
 CAGCAGGAGAAACAGGCTAGACATAGGGAAGGGCCATCCTGTATCTTGAGGGAGG
 ACAGGCCCAGGTCTTTCTTAACGTATTGAGAGGTGGGAATCAGGCCCAGGTAGTTCA
 ATGGGAGAGGGAGAGTGCTTCCCTCTGCCTAGAGACTCTGGTGGCTTCTCCAGTTGA
 25 GGAGAAACCAGAGGAAAGGGGAGGATTGGGGTCTGGGGGAGGGAACACCATTAC
 AAAGGCTGACGGTTCAGTCCGAAGTCGTGGGCCACCAGGATGCTCACCTGTCCTT
 GGAGAACCGCTGGGCAGGTTGAGACTGCAGAGACAGGGCTTAAGGCTGAGCCTGCA
 ACCAGTCCCAGTGACTCAGGGCCTCCTCAGCCCAAGAAAGAGCAACGTGCCAGGG
 30 CCCGCTGAGCTCTTGTGTTACCTG.

NLS-StCsn1-NLS:

MKRPAATKKAGQAKKKKSDLVLGLDIGIGSVGVGILNKVTGEIIHKNSRIFPAAQAENN
 35 LVRRTNRQGRRLARRKKHRRVRLNRLFEEGLITDFTKISINLNPYQLRVKGLTDELSNE
 ELFIALKNMVKGHRGISYLDDASDDGNSSVGDYAQIVKENSQLETKTPGQIQLERYQTY
 GQLRGDFTVEKDGGKHLINVFPTSA YRSEALRILQTQQEFNPQITDEFINRYLEILTGKR
 KYHGPNEKSRTDYGRYRTSGETLDNIFGILIGKCTFYPDEFRAAKASYTAQEFNLLND
 40 LNNLTVPTETKKLSKEQKNQIINYVKNEKAMGPAKLFKYIAKLLSCDVADIKGYRIDKS
 GKAEIHTFEAYRKMKTLETLDIEQMDRETLDKLAYVLTNTEREIQEALEHEFADGSFS
 QKQVDELVQFRKANSSIFGKGWHNFSVKLMMELIPELYETSEEQMTILTRLGKQKTTSS
 SNKTKYIDEKLLTEEIYNPVAKSVRQAIKIVNAAIKEYGDFDNIVIEMARETNEDDEKK
 45 AIQKIQKANKDEKDAAMLKAANQYNGKAELPHSVFHGHKQLATKIRLWHQQGERCLY
 TGKTISIHDLINNSNQFEVDHILPLSITFDDSLANKVLVYATANQEKGQRTPYQALDSMD

DAWSFRELKAFVRESKTL SNKKKEYLLTEEDISKFDVRKKFIERNLVDTRYASRVVLNA
 LQEHFRAHKIDTKVSVVRGQFTSQLRRHWGIEKTRDTYHHHAVDALIAASSQLNLWK
 KQKNTLVSYSEDQLLDIETGELISDDEYKESVFKAPYQHFVDTLKSKEFEDSILFSYQVDS
 5 KFNRKISDATIYATRQAKVGVKDKADETYVLGKIKDIYTQDGYDAFMKIYKDKSKFLM
 YRHDPQTFEKVIEPILENYPNKQINEKGKEVPCNPFLKYKEEHGYIRKYSKKGNNGPEIKSL
 KYYDSKLGHNHIDITPKDSNNKVVLQSVSPWRADVFNKTTGKYEILGLKYADLQFEKG
 10 TGTYKISQEKYNDIKKKEGVSDSEFKFTLYKNDLLLVKDTETKEQQLFRFLSRTMPKQ
 KHYVELKPYDKQKFEGGEALIKVLGNVANSQCKKGLGKSNISIYKVRTDVLGNQHIIK
 NEGDKPKLDFKRPAATKKAGQAKKKK.

U6-St_tracrRNA(7-97):

15 GAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAGA
 GAGATAATTGGAATTAATTTGACTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAAATACGTG
 ACGTAGAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTTAAAT
 GGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATATATC
 20 TTGTGGAAAGGACGAAACACCGTACTTAAATCTTGCAGAAGCTACAAAGATAAGG
 CTTTCATGCCGAAATCAACACCCTGTCAATTTTATGGCAGGGTGTTCGTTATTTAA.

U6-DR-спейсер-DR (S. pyogenes SF370)

gagggcctatttcccatgattccttcatatttgcatacagatacaaggctgtagagagataattggaattaattgactgtaaacacaaagatat
 25 tagtacaataacgtgacgtagaaagtaataatttcttggttagttgcagttttaaattatgtttaaatggactatcatatgcttaccgtaact
gaaagtatttcgatttcttgctttatatacttgtgaaaggacgaaacaccgggttagagctatgctgtttgaatggtcccaaacNNN
 NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNgtttagagctatgctgtttgaatggtcccaaacTTTTTTT

(нижний регистр, подчеркивание - прямой повтор; N = направляющая последовательность; жирный шрифт = терминатор).

Химерная РНК, содержащая +48 tracr RNA (S. pyogenes SF370)

gagggcctatttcccatgattccttcatatttgcatacagatacaaggctgtagagagataattggaattaattgactgtaaacacaaagatat
 tagtacaataacgtgacgtagaaagtaataatttcttggttagttgcagttttaaattatgtttaaatggactatcatatgcttaccgtaact
 35 gaaagtatttcgatttcttgctttatatacttgtgaaaggacgaaacaccNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
gctagaaatagcaaggttaaataaggctagtcggTTTTTTT (N = направляющая последовательность;

первое подчеркивание = парная tracr-последовательность; второе подчеркивание = tracr-последовательность; жирный шрифт = терминатор).

Химерная РНК, содержащая +54 tracr RNA (S. pyogenes SF370)

gagggcctatttcccatgattccttcatatttgcatacagatacaaggctgtagagagataattggaattaattgactgtaaacacaaagatat
 tagtacaataacgtgacgtagaaagtaataatttcttggttagttgcagttttaaattatgtttaaatggactatcatatgcttaccgtaact
 40 gaaagtatttcgatttcttgctttatatacttgtgaaaggacgaaacaccNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
gctagaaatagcaaggttaaataaggctagtcggTTTTTTT (N = направляющая

последовательность; первое подчеркивание = парная tracr-последовательность; второе подчеркивание = tracr-последовательность; жирный шрифт = терминатор).

Химерная РНК, содержащая +67 tracr RNA (S. pyogenes SF370)

gagggcctatttcccatgattcctcatatttgcataacgatacaaggctgtagagagataattggaattaattgactgtaaacacaagatat
tagtacaaaatgactgacgtagaagaataattcttggttagttgcagttttaaaattatgttttaaaggactatcatatgcttaccgtaactt
gaaagtatttgcattcttgcttataatcttggtgaaaggacgaaacaccNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGttttaga
gctagaaatgcaagttaaataaggctagtcggtatcaactgaaaaagtTTTTTTT (N = направляющая

5

последовательность; первое подчеркивание = парная tracr-последовательность; второе подчеркивание = tracr-последовательность; жирный шрифт = терминатор) Хиимерная РНК, содержащая +85 tracr RNA (S. pyogenes SF370)

10

gagggcctatttcccatgattcctcatatttgcataacgatacaaggctgtagagagataattggaattaattgactgtaaacacaagatat
tagtacaaaatgactgacgtagaagaataattcttggttagttgcagttttaaaattatgttttaaaggactatcatatgcttaccgtaactt
gaaagtatttgcattcttgcttataatcttggtgaaaggacgaaacaccNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGttttaga
gctagaaatgcaagttaaataaggctagtcggtatcaactgaaaaagtggcaccgagtcggtgcTTTTTTT (N =

15

направляющая последовательность; первое подчеркивание = парная tracr-последовательность; второе подчеркивание = tracr-последовательность; жирный шрифт = терминатор).

CBh-NLS-SpCas9-NLS

20

CGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCC
ATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTG

25

ACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTA
TCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCA

30

TTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTA
GTCATCGCTATTACCATGGTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCATCT

35

CCCCCCCCTCCCCACCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTTTAATTATTTTGTGCAGCG
ATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAG

40

GGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGC
TCCGAAAGTTTTCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGA

AGCGCGCGGCGGGCGGGAGTCGCTGCGACGCTGCCTTCGCCCGTGCCCCGCTCCG
CCGCCGCCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCACAGGTGA

GCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCTGAGCAAGAGGTAAGGG
TTTAAGGGATGGTTGGTTGGTGGGGTATTAATGTTTAATTACTGGAGCACCTGCCT

GAAATCACTTTTTTTTCAGGTTGGaccggtgaccaccATGGACTATAAGGACCACGACGGAGA
CTACAAGGATCATGATATTGATTACAAAGACGATGACGATAAGATGGCCCCAAAGA

AGAAGCGGAAGGTCGGTATCCACGGAGTCCAGCAGCCGACAAGAAGTACAGCATC

45

GGCCTGGACATCGGCACCAACTCTGTGGGCTGGGCCGTGATCACCGACGAGTACAA
GGTGCCAGCAAGAAATTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCGGCACAGCATCAAGA
AGAACCTGATCGGAGCCCTGCTGTTTCGACAGCGGCGAAACAGCCGAGGCCACCCGG
CTGAAGAGAACCGCCAGAAGAAGATACACCAGACGGAAGAACCGGATCTGCTATCT
GCAAGAGATCTTCAGCAACGAGATGGCCAAGGTGGACGACAGCTTCTTCCACAGAC
TGGAAGAGTCCTTCTGGTGGAAAGAGGATAAGAAGCACGAGCGGCACCCCATCTTC
GGCAACATCGTGGACGAGGTGGCCTACCACGAGAAGTACCCACCATCTACCACCT
GAGAAAGAACTGGTGGACAGCACCGACAAGGCCGACCTGCGGCTGATCTATCTGG
CCCTGGCCACATGATCAAGTTCCGGGGCCACTTCTGATCGAGGGCGACCTGAACC
CCGACAACAGCGACGTGGACAAGCTGTTTCATCCAGCTGGTGCAGACCTACAACCAG
CTGTTTCGAGGAAAACCCATCAACGCCAGCGGCGTGGACGCCAAGGCCATCCTGTC
TGCCAGACTGAGCAAGAGCAGACGGCTGGAAAATCTGATCGCCCAGCTGCCCGGCG
AGAAGAAGAATGGCCTGTTTCGGCAACCTGATTGCCCTGAGCCTGGGCCTGACCCCC
AACTTCAAGAGCAACTTCGACCTGGCCGAGGATGCCAACTGCAGCTGAGCAAGGA
CACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTGGCCAGATCGGCGACCAGTACGCCG
ACCTGTTTCTGGCCGCCAAGAACCTGTCCGACGCCATCCTGCTGAGCGACATCCTGA
GAGTGAACACCGAGATCACCAAGGCCCCCTGAGCGCCTCTATGATCAAGAGATAC
GACGAGCACCACCAGGACCTGACCCTGCTGAAAGCTCTCGTGCGGCAGCAGCTGCC
TGAGAAGTACAAAGAGATTTTCTTCGACCAGAGCAAGAACGGCTACGCCGGCTACA
TTGACGGCGGAGCCAGCCAGGAAGAGTTCTACAAGTTCATCAAGCCCATCCTGGAA
AAGATGGACGGCACCGAGGAACCTGCTCGTGAAGCTGAACAGAGAGGACCTGCTGCG
GAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCACCAGATCCACCTGGGAGAGC
TGCACGCCATTCTGCGGCGGCAGGAAGATTTTTACCCATTCTGAAGGACAACCGGG
AAAAGATCGAGAAGATCCTGACCTTCCGCATCCCCTACTACGTGGGCCCTCTGGCCA
GGGGAACAGCAGATTCGCCTGGATGACCAGAAAGAGCGAGGAAACCATCACCCC
CTGGAACCTTCGAGGAAGTGGTGGACAAGGGCGCTTCCGCCAGAGCTTCATCGAGC
GGATGACCAACTTCGATAAGAACCTGCCCAACGAGAAGGTGCTGCCCAAGCACAGC
CTGCTGTACGAGTACTTCACCGTGTATAACGAGCTGACCAAAGTGAAATACGTGACC
GAGGGAATGAGAAAGCCCGCCTTCTGAGCGGCGAGCAGAAAAAGGCCATCGTGG
ACCTGCTGTTCAAGACCAACCGGAAAGTGACCGTGAAGCAGCTGAAAGAGGACTAC
TTCAAGAAAATCGAGTGCTTCGACTCCGTGGAAATCTCCGGCGTGGAAGATCGGTTC
AACGCCTCCCTGGGCACATAACCAGATCTGCTGAAAATTATCAAGGACAAGGACTT
CCTGGACAATGAGGAAAACGAGGACATTCTGGAAGATATCGTGCTGACCCTGACAC
TGTTTGAGGACAGAGAGATGATCGAGGAACGGCTGAAAACCTATGCCACCTGTTC
GACGACAAAGTGATGAAGCAGCTGAAGCGGCGGAGATACACCGGCTGGGGCAGGC

TGAGCCGGAAGCTGATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGTCCGGCAAGACAATCCTG
GATTCCTGAAGTCCGACGGCTTCGCCAACAGAACTTCATGCAGCTGATCCACGAC
GACAGCCTGACCTTTAAAGAGGACATCCAGAAAAGCCCAGGTGTCCGGCCAGGGCGA
TAGCCTGCACGAGCACATTGCCAATCTGGCCGGCAGCCCCGCCATTAAGAAGGGCA
TCCTGCAGACAGTGAAGGTGGTGGACGAGCTCGTGAAAGTGATGGGCCGGCACAAG
CCCGAGAACATCGTGATCGAAATGGCCAGAGAGAACCAGACCACCAGAAGGGAC
AGAAGAACAGCCGCGAGAGAATGAAGCGGATCGAAGAGGGCATCAAAGAGCTGGG
CAGCCAGATCCTGAAAGAACACCCCGTGGAAAACACCCAGCTGCAGAACGAGAAG
CTGTACCTGTACTACCTGCAGAATGGGCGGGATATGTACGTGGACCAGGAACTGGA
CATCAACCGGCTGTCCGACTACGATGTGGACCATATCGTGCCTCAGAGCTTTCTGAA
GGACGACTCCATCGACAACAAGGTGCTGACCAGAAGCGACAAGAACCGGGGCAAG
AGCGACAACGTGCCCTCCGAAGAGGTCTGTGAAGAAGATGAAGAACTACTGGCGGCA
GCTGCTGAACGCCAAGCTGATTACCCAGAGAAAAGTTCGACAATCTGACCAAGGCCG
AGAGAGGCGGCCTGAGCGAACTGGATAAGGCCGGCTTCATCAAGAGACAGCTGGTG
GAAACCCGGCAGATCACAAAGCACGTGGCACAGATCCTGGACTCCCGGATGAACAC
TAAGTACGACGAGAATGACAAGCTGATCCGGGAAGTGAAAGTGATCACCTGAAGT
CCAAGCTGGTGTCCGATTTCCGGAAGGATTTCCAGTTTTACAAAGTGCGCGAGATCA
ACAACTACCACCACGCCACGACGCCTACCTGAACGCCGTCGTGGGAACCGCCCTG
ATCAAAAAGTACCCTAAGCTGGAAAGCGAGTTCGTGTACGGCGACTACAAGGTGTA
CGACGTGCGGAAGATGATCGCCAAGAGCGAGCAGGAAATCGGCAAGGCTACCGCC
AAGTACTTCTTCTACAGCAACATCATGAACTTTTTCAAGACCGAGATTACCCTGGCC
AACGGCGAGATCCGGAAGCGGCCTCTGATCGAGACAAACGGCGAAACCGGGGAGA
TCGTGTGGGATAAGGGCCGGGATTTTGCCACCGTGCGGAAAGTGCTGAGCATGCCC
CAAGTGAATATCGTGAAAAGACCGAGGTGCAGACAGGCGGCTTCAGCAAAGAGTC
TATCCTGCCCAAGAGGAACAGCGATAAGCTGATCGCCAGAAAAGAAGGACTGGGACC
CTAAGAAGTACGGCGGCTTCGACAGCCCCACCGTGGCCTATTCTGTGCTGGTGGTGG
CCAAAGTGGAAAAGGGCAAGTCCAAGAACTGAAGAGTGTGAAAGAGCTGCTGGG
GATCACCATCATGGAAAGAAGCAGCTTCGAGAAGAATCCCATCGACTTCTGGAAG
CCAAGGGCTACAAAGAAGTGAAAAGGACCTGATCATCAAGCTGCCTAAGTACTCC
CTGTTGAGCTGGAAAACGGCCGGAAGAGAATGCTGGCCTCTGCCGGCGAACTGCA
GAAGGGAAACGAACTGGCCCTGCCCTCAAATATGTGAACTTCTGTACCTGGCCA
GCCACTATGAGAAGCTGAAGGGCTCCCCGAGGATAATGAGCAGAAACAGCTGTTT
GTGGAACAGCACAAGCACTACCTGGACGAGATCATCGAGCAGATCAGCGAGTTCTC
CAAGAGAGTGATCCTGGCCGACGCTAATCTGGACAAAGTGCTGTCCGCCTACAACA
AGCACCGGGATAAGCCCATCAGAGAGCAGGCCGAGAATATCATCCACCTGTTTACC

GAAGTACATCAAGAAAAACCTGCTGGGCGTGCTGCTGTTTCGACAGCGGCATTACAG
CCGAGGGCAGACGGCTGAAGAGAACCGCCAGACGGCGGTACACCCGGCGGAGAAA
CAGAATCCTGTATCTGCAAGAGATCTTCAGCACCGAGATGGCTACCCTGGACGACG
5 CCTTCTTCCAGCGGCTGGACGACAGCTTCCTGGTGCCCGACGACAAGCGGGACAGC
AAGTACCCCATCTTCGGCAACCTGGTGGAAAGAGAAGGCCTACCACGACGAGTTCCC
CACCATCTACCACCTGAGAAAGTACCTGGCCGACAGCACCAAGAAGGCCGACCTGA
GACTGGTGTATCTGGCCCTGGCCACATGATCAAGTACCGGGGCCACTTCCTGATCG
10 AGGGCGAGTTCAACAGCAAGAACAACGACATCCAGAAGA ACTTCCAGGACTTCCTG
GACACCTACAACGCCATCTTCGAGAGCGACCTGTCCCTGGAAAACAGCAAGCAGCT
GGAAGAGATCGTGAAGGACAAGATCAGCAAGCTGGAAAAGAAGGACCGCATCCTG
AAGCTGTTCCCCGGCGAGAAGAACAGCGGAATCTTCAGCGAGTTTCTGAAGCTGAT
15 CGTGGGCAACCAGGCCGACTTCAGAAAGTGCTTCAACCTGGACGAGAAAGCCAGCC
TGCACTTCAGCAAAGAGAGCTACGACGAGGACCTGGAAACCCTGCTGGGATATATC
GGCGACGACTACAGCGACGTGTTCTGAAGGCCAAGAAGCTGTACGACGCTATCCT
GCTGAGCGGCTTCCTGACCGTGACCGACAACGAGACAGAGGCCCCACTGAGCAGCG
20 CCATGATTAAGCGGTACAACGAGCACAAAGAGGATCTGGCTCTGCTGAAAGAGTAC
ATCCGGAACATCAGCCTGAAAACCTACAATGAGGTGTTCAAGGACGACACCAAGAA
CGGCTACGCCGGCTACATCGACGGCAAGACCAACCAGGAAGATTTCTATGTGTACC
TGAAGAAGCTGCTGGCCGAGTTCGAGGGGGCCGACTACTTTCTGGAAAAAATCGAC
25 CGCGAGGATTTCTGCGGAAGCAGCGGACCTTCGACAACGGCAGCATCCCCTACCA
GATCCATCTGCAGGAAATGCGGGCCATCCTGGACAAGCAGGCCAAGTTCTACCCAT
TCCTGGCCAAGAACAAGAGCGGATCGAGAAGATCCTGACCTTCCGCATCCCTTACT
30 ACGTGGGCCCCCTGGCCAGAGGCAACAGCGATTTTGCCTGGTCCATCCGGAAGCGC
AATGAGAAGATCACCCCTGGA ACTTCGAGGACGTGATCGACAAAGAGTCCAGCGC
CGAGGCCTTCATCAACCGGATGACCAGCTTCGACCTGTACCTGCCCGAGGAAAAGG
TGCTGCCCAAGCACAGCCTGCTGTACGAGACATTCAATGTGTATAACGAGCTGACCA
35 AAGTGCGGTTTATCGCCGAGTCTATGCGGGACTACCAGTTCCTGGACTCCAAGCAGA
AAAAGGACATCGTGCGGCTGTACTTCAAGGACAAGCGGAAAGTGACCGATAAGGAC
ATCATCGAGTACCTGCACGCCATCTACGGCTACGATGGCATCGAGCTGAAGGGCAT
CGAGAAGCAGTTCAACTCCAGCCTGAGCACATAACCACGACCTGCTGAACATTATCA
40 ACGACAAAGAATTTCTGGACGACTCCAGCAACGAGGCCATCATCGAAGAGATCATC
CACACCCTGACCATCTTTGAGGACCGCGAGATGATCAAGCAGCGGCTGAGCAAGTT
CGAGAACATCTTCGACAAGAGCGTGCTGAAAAAGCTGAGCAGACGGCACTACACCG
45 GCTGGGGCAAGCTGAGCGCCAAGCTGATCAACGGCATCCGGGACGAGAAGTCCGGC
AACACAATCCTGGACTACCTGATCGACGACGGCATCAGCAACCGGAACTTCATGCA

GCTGATCCACGACGACGCCCTGAGCTTCAAGAAGAAGATCCAGAAGGCCAGATCA
TCGGGGACGAGGACAAGGGCAACATCAAAGAAGTCGTGAAGTCCCTGCCCGGCAGC
5 CCCGCCATCAAGAAGGGAATCCTGCAGAGCATCAAGATCGTGGACGAGCTCGTGAA
AGTGATGGGCGGCAGAAAGCCCGAGAGCATCGTGGTGGAAATGGCTAGAGAGAAC
CAGTACACCAATCAGGGCAAGAGCAACAGCCAGCAGAGACTGAAGAGACTGGAAA
AGTCCCTGAAAGAGCTGGGCAGCAAGATTCTGAAAGAGAATATCCCTGCCAAGCTG
10 TCCAAGATCGACAACAACGCCCTGCAGAACGACCGGCTGTACCTGTACTACCTGCA
GAATGGCAAGGACATGTATACAGGCGACGACCTGGATATCGACCGCCTGAGCAACT
ACGACATCGACCATATTATCCCCAGGCCTTCCTGAAAGACAACAGCATTGACAAC
AAAGTGCTGGTGTCTCCGCCAGCAACCGCGGCAAGTCCGATGATGTGCCAGCCT
15 GGAAGTCGTGAAAAAGAGAAAGACCTTCTGGTATCAGCTGCTGAAAAGCAAGCTGA
TTAGCCAGAGGAAGTTCGACAACCTGACCAAGGCCGAGAGAGGCGGCCTGAGCCCT
GAAGATAAGGCCGGCTTCATCCAGAGACAGCTGGTGGAAACCCGGCAGATCACCAA
GCACGTGGCCAGACTGCTGGATGAGAAGTTTAACAACAAGAAGGACGAGAACAAC
20 CGGGCCGTGCGGACCGTGAAGATCATCACCTGAAGTCCACCCTGGTGTCCCAGTTC
CGGAAGGACTTCGAGCTGTATAAAGTGC GCGAGATCAATGACTTTCACCACGCCCA
CGACGCCTACCTGAATGCCGTGGTGGCTTCCGCCCTGCTGAAGAAGTACCCTAAGCT
GGAACCCGAGTTCGTGTACGGCGACTACCCCAAGTACAACCTCCTCAGAGAGCGGA
25 AGTCCGCCACCGAGAAGGTGTACTTCTACTCCAACATCATGAATATCTTTAAGAAGT
CCATCTCCCTGGCCGATGGCAGAGTGATCGAGCGGCCCTGATCGAAGTGAACGAA
GAGACAGGCGAGAGCGTGTGGAACAAAGAAAGCGACCTGGCCACCGTGCGGCGGG
TGCTGAGTTATCCTCAAGTGAATGTCGTGAAGAAGGTGGAAGAACAGAACCACGGC
30 CTGGATCGGGGCAAGCCCAAGGGCCTGTTCAACGCCAACCTGTCCAGCAAGCCTAA
GCCCAACTCCAACGAGAATCTCGTGGGGGCCAAAGAGTACCTGGACCCTAAGAAGT
ACGGCGGATACGCCGGCATCTCCAATAGCTTCACCGTGCTCGTGAAGGGCACAATC
35 GAGAAGGGCGCTAAGAAAAAGATCACAAACGTGCTGGAATTTAGGGGATCTCTAT
CCTGGACCGGATCAACTACCGGAAGGATAAGCTGAACTTTCTGCTGGAAAAAGGCT
ACAAGGACATTGAGCTGATTATCGAGCTGCCTAAGTACTCCCTGTTGAACTGAGCG
ACGGCTCCAGACGGATGCTGGCCTCCATCCTGTCCACCAACAACAAGCGGGGCGAG
40 ATCCACAAGGGAAACCAGATCTTCCTGAGCCAGAAATTTGTGAAACTGCTGTACCA
CGCCAAGCGGATCTCCAACACCATCAATGAGAACCACCGGAAATACGTGGAAAACC
ACAAGAAAGAGTTTGAGGAACTGTTCTACTACATCCTGGAGTTCAACGAGAACTAT
GTGGGAGCCAAGAAGAACGGCAAACCTGCTGAACTCCGCCTTCCAGAGCTGGCAGAA
45 CCACAGCATCGACGAGCTGTGCAGCTCCTTCATCGGCCCTACCGGCAGCGAGCGGA
AGGGACTGTTTGAGCTGACCTCCAGAGGCTCTGCCGCCGACTTTGAGTTCCTGGGAG

TGAAGATCCCCCGGTACAGAGACTACACCCCTCTAGTCTGCTGAAGGACGCCACCC
 TGATCCACCAGAGCGTGACCGGCCTGTACGAAACCCGGATCGACCTGGCTAAGCTG
 GGCGAGGGAAAGCGTCCTGCTGCTACTAAGAAAGCTGGTCAAGCTAAGAAAAAGA
 ААТАА.

Пример 5: оптимизация направляющей РНК для Cas9 *Streptococcus pyogenes* (называемого SpCas9)

Авторы данной заявки вносили мутации в tracrRNA и последовательности прямых повторов или вносили мутации в химерную направляющую РНК для повышения экспрессии РНК в клетках.

Оптимизация основана на наблюдении, что присутствовали фрагменты тимина (Ts) в tracrRNA и направляющей РНК, которые могли приводить к ранней терминации транскрипции посредством промотора pol 3. Таким образом заявители создавали следующие оптимизированные последовательности. Оптимизированная tracrRNA и соответствующий оптимизированный прямой повтор представлены в парах.

Оптимизированная tracrRNA 1 (мутация подчеркнута):

GGAACCATTCAACAGCATAGCAAGTTAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAA
 AAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTT.

Оптимизированный прямой повтор 1 (мутация подчеркнута):

GTTATAGAGCTATGCTGTTATGAATGGTCCCAAAC.

Оптимизированная tracrRNA 2 (мутация подчеркнута):

GGAACCATTCAACAGCATAGCAAGTTAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAA
 AAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTT.

Оптимизированный прямой повтор 2 (мутация подчеркнута):

GTAAGTAGAGCTATGCTGTTTGAATGGTCCCAAAC.

Авторы данной заявки также оптимизировали химерную направляющую РНК для оптимальной активности в эукариотических клетках. Исходная направляющая РНК:

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGC
 TAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTTT.

Оптимизированная химерная направляющая последовательность РНК 1:

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGTATTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTATATAAGGC
 TAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTTT.

Оптимизированная химерная направляющая последовательность РНК 2:

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGTTTTAGAGCTATGCTGTTTTGGAAACAAAACAGCA
 TAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCG
 GTGCTTTTTTTT.

Оптимизированная химерная направляющая последовательность РНК 3:

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGTATTAGAGCTATGCTGTTTGGAAACAATACAGC
 ATAGCAAGTTATATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTC
 GGTGCTTTTTTTT.

Авторы данной заявки показали, что оптимизированная химерная направляющая

РНК работает лучше, как показано на фигуре 9. Эксперимент проводили путем котрансфекции клеток 293FT Cas9 и ДНК-кассетой с U6-направляющей РНК для экспрессии одной из четырех форм РНК, показанных выше. Мишень направляющей РНК является таким же целевым сайтом в локусе EMX1 человека:

5 "GTCACCTCCAATGACTAGGG".

Пример 6: оптимизация Cas9 из CRISPR1 LMD-9 *Streptococcus thermophilus* (называемого St1Cas9)

Авторы данной заявки разрабатывали направляющие химерные РНК, как показано на фигуре 12.

10 Направляющие РНК St1Cas9 можно подвергать такому же типу оптимизации, как и направляющие РНК SpCas9, путем разрушения политиминовых фрагментов (Ts).

Пример 7: улучшение системы Cas9 для применения *in vivo*

Авторы данной заявки проводили поиск с использованием метагеномного подхода в отношении Cas9 с малым молекулярным весом. Большинство гомологов Cas9 являются
15 достаточно большими. Например, SpCas9 имеет длину около 1368 а.к., что слишком много для легкой упаковки в вирусные векторы для доставки. Некоторые из последовательностей могли быть неверно аннотированы, и, таким образом, точная частота каждой длины не обязательно может быть достоверной. Тем не менее она дает некоторое представление о распределении белков Cas9 и указывает на то, что
20 существуют более короткие гомологи Cas9.

С помощью анализа на основе расчетов авторы данной заявки обнаружили, что у штамма бактерии *Campylobacter* присутствуют два белка Cas9 с менее чем 1000 аминокислот. Последовательность для одного Cas9 из *Campylobacter jejuni* представлена
25 ниже. При такой длине CjCas9 может быть легко упакован в AAV, лентивирусы, аденовирусы и другие вирусные векторы для надежной доставки в первичные клетки и *in vivo* в животные модели.

>Cas9 *Campylobacter jejuni* (CjCas9)

30

35

40

45

MARILAFDIGISSIGWAFSENDELKDCGVRFKVENPKTGESLALPRRLARSARKRLARR
 KARLNHLKHLIANEFKLNIEDYQSFDESLAKAYKGSLSIPYELRFRALNELLSKQDFAR
 VILHIAKRRGYDDIKNSDDKEKGAILKAIKQNEEKLANYQSVGEYL YKEYFQKFKENSK
 5 EFTNVRNKKESYERCIASFLKDELKLIFKKQREFGFSFSKKFEEVLSVAFYKRALKDFS
 HLVGNCSFFTDEKRAPKNSPLAFMFVALTRIINLLNNLNKNTGILYTKDDLNALLNEVLK
 NGTLTYKQTKKLLGLSDDYEFKGEKGTIFYEFKKYKEFIKALGEHNLSQDDLNEIAKDIT
 10 LIKDEIKLKKALAKYDLNQNQIDSLSKLEFKDHLNISFKALKLVTPMLLEGKKYDEACN
 ELNLKVAINEDKKDFLPAFNETYYKDEVTPVVLRAIKEYRKVLNALLKKYVKVHKINI
 ELAREVGKNHSQRAKIEKEQNENYKAKKDAELECEKLGKINSKNILKRLFKEQKEFC
 AYSGEKIKISDLQDEKMLEIDHIYPYRSFDDSYMNVLVFTKQNQEKLNQTPFEAFGN
 15 DSAKWQKIEVLAKNLPKTKQKRILDKNYKDKEQKNFKDRNLNDTRYIARLVLNITKD
 YLDFLPLSDDENTKLNDTQKGSKVHVEAKSGMLTSALRHTWGFSKDRNNHLHHAID
 AVIAYANNSIVKAFSDFKKEQESNSAELYAKKISELDYKNKRKFFEPFSGFRQKVLKID
 EIFVSKPERKKPSGALHEETFRKEEFYQSYGGKEGVLKALELGKIRKVNGKIVKNGDM
 20 FRVDIFKHKKTNKFYAVPIYTMDFALKVLPNKAVARSKKGEIKDWILMDENYEFCSLY
 KDSLILIQTKDMQEPEFVYYNAFTSSTVSLIVSKHDNKFETLSKNQKILFKNANEKEVIAK
 SIGIQNLKVFEKYIVSALGEVTKAEFRQREDFKK.

Предполагаемый элемент tracrRNA для данного CjCas9 представляет собой:

25 TATAATCTCATAAGAAATTTAAAAAGGGACTAAAATAAAGAGTTTGCGGGACTCTG
 CGGGGTACAATCCCCTAAAACCGCTTTTAAAATT.

Последовательность прямого повтора представляет собой:

30 ATTTTACCATAAAGAAATTTAAAAAGGGACTAAAAC.

Совместно свернутая структура tracrRNA и прямой повтор представлены на фигуре 6.

Пример химерной направляющей РНК для CjCas9 представляет собой:

35 NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUAGUCCCGAAAGGGACUAAAAUAAAGAGUU
 UGCGGGACUCUGCGGGGUACAAUCCCCUAAAACCGCUUUU.

Авторы данной заявки также оптимизировали направляющую РНК для Cas9 с применением способов *in vitro*. На фигуре 18 показаны данные, полученные в результате *in vitro* оптимизации химерной направляющей РНК St1Cas9.

40 Несмотря на то, что предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения были показаны и описаны в данном документе, для специалиста в данной области будет очевидно, что такие варианты осуществления предоставлены только в качестве примера. Многочисленные вариации, изменения и замены теперь будут очевидны для специалиста в данной области без отступления от сути настоящего изобретения. Следует понимать, что различные альтернативные варианты вариантов осуществления настоящего изобретения, раскрытые в данном документе, можно применять при практическом осуществлении настоящего изобретения. Предполагают, что следующая формула изобретения определяет объем настоящего изобретения, и что, таким образом, охвачены способы и структуры в пределах объема данной формулы

изобретения и их эквиваленты.

Пример 8: оптимизация Sa sgRNA

Авторы данной заявки разрабатывали пять вариантов sgRNA для SaCas9 для оптимальной усеченной архитектуры с наивысшей эффективностью расщепления.

5 Кроме того, дуплексную систему нагибный прямой повтор : tracr исследовали совместно с sgRNA. Гиды с указанными длинами совместно трансфицировали SaCas9 и исследовали в клетках НЕК 293FT в отношении активности. Посредством в общей сложности 100 нг sgRNA U6-ПЦР-ампликона (или 50 нг прямого повтора и 50 нг tracrRNA) и 400 нг плазмид с SaCas9 совместно трансфицировали 200000 гепатоцитов мыши Hepa1-6 и
10 ДНК собирали через 72 часа после трансфекции для анализа при помощи SURVEYOR. Результаты показаны на фиг. 23.

Библиографические ссылки:

1. Urnov, F.D., Rebar, E.J., Holmes, M.C., Zhang, H.S. & Gregory, P.D. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat. Rev. Genet.* 11, 636-646 (2010).
- 15 2. Bogdanove, A.J. & Voytas, D.F. TAL effectors: customizable proteins for DNA targeting. *Science* 333, 1843-1846 (2011).
3. Stoddard, B.L. Homing endonuclease structure and function. *Q. Rev. Biophys.* 38, 49-95 (2005).
4. Bae, T. & Schneewind, O. Allelic replacement in *Staphylococcus aureus* with inducible
20 counter-selection. *Plasmid* 55, 58-63 (2006).
5. Sung, C.K., Li, H., Claverys, J.P. & Morrison, D.A. An rpsL cassette, janus, for gene replacement through negative selection in *Streptococcus pneumoniae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67,5190-5196(2001).
6. Sharan, S.K., Thomason, L.C., Kuznetsov, S.G. & Court, D.L. Recombineering: a homologous
25 recombination-based method of genetic engineering. *Nat. Protoc.* 4, 206-223 (2009).
7. Jinek, M. et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337, 816-821 (2012).
8. Deveau, H., Garneau, J.E. & Moineau, S. CRISPR-Cas system and its role in phage-bacteria interactions. *Annu. Rev. Microbiol.* 64, 475-493 (2010).
- 30 9. Horvath, P. & Barrangou, R. CRISPR-Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science* 327,167-170 (2010).
10. Terns, M.P. & Terns, R.M. CRISPR-based adaptive immune systems. *Curr. Opin. Microbiol.* 14, 321-327 (2011).
11. van der Oost, I., Jore, M.M., Westra, E.R., Lundgren, M. & Brouns, S.J. CRISPR-based
35 adaptive and heritable immunity in prokaryotes. *Trends. Biochem. Sci.* 34, 401-407 (2009).
12. Brouns, S.J. et al. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science* 321, 960-964 (2008).
13. Carte, J., Wang, R., Li, H., Terns, R.M. & Terns, M.P. Cas6 is an endonuclease that generates guide RNAs for invader defense in prokaryotes. *Genes Dev.* 22, 3489-3496 (2008).
- 40 14. Deltcheva, E. et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature* 471, 602-607 (2011).
15. Hatoum-Asian, A., Maniv, I. & Marraffini, L.A. Mature clustered, regularly interspaced, short palindromic repeats RNA (crRNA) length is measured by a ruler mechanism anchored at the precursor processing site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 21218-21222 (2011).
- 45 16. Haurwitz, R.E., Jinek, M., Wiedenheft, B., Zhou, K. & Doudna, J.A. Sequence- and structure-specific RNA processing by a CRISPR endonuclease. *Science* 329,1355-1358 (2010).
17. Deveau, H. et al. Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*. *J. Bacteriol.* 190,1390-1400 (2008).

18. Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P. & Siksnys, V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (2012).
19. Makarova, K.S., Aravind, L., Wolf, Y.I. & Koonin, E.V. Unification of Cas protein families and a simple scenario for the origin and evolution of CRISPR-Cas systems. *Biol. Direct.* 6,38 (2011).
20. Barrangou, R. RNA-mediated programmable DNA cleavage. *Nat. Biotechnol.* 30, 836-838 (2012).
21. Brouns, S.J. Molecular biology. A Swiss army knife of immunity. *Science* 337, 808-809 (2012).
22. Carroll, D. A CRISPR Approach to Gene Targeting. *Mol. Ther.* 20, 1658-1660 (2012).
23. Bikard, D., Hatoum-Aslan, A., Mucida, D. & Marraffini, L.A. CRISPR interference can prevent natural transformation and virulence acquisition during in vivo bacterial infection. *Cell Host Microbe* 12,177-186 (2012).
24. Sapranauskas, R. et al. The *Streptococcus thermophilus* CRISPR-Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* (2011).
25. Semenova, E. et al. Interference by clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) RNA is governed by a seed sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (2011).
26. Wiedenheft, B. et al. RNA-guided complex from a bacterial immune system enhances target recognition through seed sequence interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (2011).
27. Zahner, D. & Hakenbeck, R. The *Streptococcus pneumoniae* beta-galactosidase is a surface protein. *J. Bacteriol.* 182, 5919-5921 (2000).
28. Marraffini, L.A., Dedent, A.C. & Schneewind, O. Sortases and the art of anchoring proteins to the envelopes of gram-positive bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70, 192-221 (2006).
29. Motamedi, M.R., Szigety, S.K. & Rosenberg, S.M. Double-strand-break repair recombination in *Escherichia coli*: physical evidence for a DNA replication mechanism in vivo. *Genes Dev.* 13, 2889-2903 (1999).
30. Hosaka, T. et al. The novel mutation K87E in ribosomal protein S12 enhances protein synthesis activity during the late growth phase in *Escherichia coli*. *Mol. Genet. Genomics* 271, 317-324(2004).
31. Costantino, N. & Court, D.L. Enhanced levels of lambda Red-mediated recombinants in mismatch repair mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 15748-15753 (2003).
32. Edgar, R. & Qimron, U. The *Escherichia coli* CRISPR system protects from lambda lysogenization, lysogens, and prophage induction. *J. Bacteriol.* 192, 6291-6294 (2010).
33. Marraffini, L.A. & Sontheimer, E.J. Self versus non-self discrimination during CRISPR RNA-directed immunity. *Nature* 463, 568-571 (2010).
34. Fischer, S. et al. An archaeal immune system can detect multiple Protospacer Adjacent Motifs (PAMs) to target invader DNA. *J. Biol. Chem.* 287, 33351-33363 (2012).
35. Gudbergsdottir, S. et al. Dynamic properties of the *Sulfolobus* CRISPR-Cas and CRISPR/Cmr systems when challenged with vector-borne viral and plasmid genes and protospacers. *Mol. Microbiol.* 79, 35-49 (2011).
36. Wang, H.H. et al. Genome-scale promoter engineering by coselection MAGE. *Nat Methods* 9, 591-593 (2012).
37. Cong, L. et al. Multiplex Genome Engineering Using CRISPR-Cas Systems. *Science в печати* (2013).
38. Mali, P. et al. RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9. *Science в печати* (2013).
39. Hoskins, J. et al. Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6. *J. Bacteriol.*

183, 5709-5717 (2001).

40. Havarstein, L.S., Coomaraswamy, G. & Morrison, D.A. An unmodified heptadecapeptide pheromone induces competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92, 11140-11144 (1995).

5 41. Horinouchi, S. & Weisblum, B. Nucleotide sequence and functional map of pC194, a plasmid that specifies inducible chloramphenicol resistance. J. Bacteriol. 150, 815-825 (1982).

42. Horton, R.M. In Vitro Recombination and Mutagenesis of DNA: SOEing Together Tailor-Made Genes. Methods Mol. Biol. 15, 251-261 (1993).

10 43. Podbielski, A., Spellerberg, B., Woischnik, M., Pohl, B. & Luttmann, R. Novel series of plasmid vectors for gene inactivation and expression analysis in group A streptococci (GAS). Gene 177, 137-147 (1996).

44. Husmann, L.K., Scott, J.R., Lindahl, G. & Stenberg, L. Expression of the Arp protein, a member of the M protein family, is not sufficient to inhibit phagocytosis of *Streptococcus pyogenes*. Infection and immunity 63, 345-348 (1995).

15 45. Gibson, D.G. et al. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. Nat Methods 6, 343-345 (2009).

46. Tangri S, et al. ("Rationally engineered therapeutic proteins with reduced immunogenicity" J Immunol. 2005 Mar 15; 174(6): 3187-96.

* * * *

20 Несмотря на то, что предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения были показаны и описаны в данном документе, для специалиста в данной области будет очевидно, что такие варианты осуществления предоставлены только в качестве примера. Многочисленные вариации, изменения и замены будут теперь будут очевидны для специалиста в данной области без отступления от сути настоящего
25 изобретения. Следует понимать, что различные альтернативные варианты вариантов осуществления настоящего изобретения, раскрытые в данном документе, можно применять при практическом осуществлении настоящего изобретения.

(57) Формула изобретения

30 1. Сконструированная система CRISPR-Cas для редактирования генома в эукариотической клетке, содержащая:

белок Cas9, содержащий по меньшей мере одну последовательность ядерной локализации, и

химерную РНК (chiRNA) системы CRISPR-Cas, содержащую:

35 (а) направляющую последовательность, способную гибридизоваться с целевой последовательностью в эукариотической клетке,

(b) парную tracr-последовательность, способную гибридизоваться с tracr-последовательностью, и

(с) tracr-последовательность,

40 где (а), (b) и (с) расположены в 5'-3' ориентации,

где одна или несколько из направляющей, tracr- и парной tracr-последовательностей модифицированы для повышения стабильности и где необязательно белок Cas9 образует комплекс с химерной РНК (chiRNA) системы CRISPR-Cas.

2. Система CRISPR-Cas по п. 1, где модификация включает сконструированную
45 вторичную структуру.

3. Система CRISPR-Cas по п. 1, где модификация включает уменьшение участка гибридизации между парной tracr-последовательностью и tracr-последовательностью.

4. Система CRISPR-Cas по п. 1, где модификация включает слияние парной tracr-

последовательности и tracr-последовательности посредством искусственной петли.

5. Система CRISPR-Cas п. 1, где модификация включает tracr-последовательность длиной от 40 до 120 п.о.

6. Система CRISPR-Cas п. 1, где tracr-последовательность составляет от 40 п.о. до 5 полной длины tracr.

7. Система CRISPR-Cas по п. 1, где tracr-последовательность включает по меньшей мере нуклеотиды 1-67 соответствующей tracrRNA дикого типа.

8. Система CRISPR-Cas п. 1, где tracr-последовательность включает по меньшей мере нуклеотиды 1-85 соответствующей tracrRNA дикого типа.

10 9. Система CRISPR-Cas по п. 1, где tracr-последовательность содержит нуклеотиды, соответствующие нуклеотидам 1-67 tracrRNA Cas9 *S. pyogenes* дикого типа.

10. Система CRISPR-Cas по п. 1, где tracr-последовательность содержит нуклеотиды, соответствующие нуклеотидам 1-85 tracrRNA Cas9 *S. pyogenes* дикого типа.

11. Система CRISPR-Cas по п. 9, где tracr-последовательность состоит, по сути, из 15 нуклеотидов, соответствующих нуклеотидам 1-67 tracrRNA Cas9 *S. pyogenes* дикого типа.

12. Система CRISPR-Cas по п. 10, где tracr-последовательность состоит, по сути, из нуклеотидов, соответствующих нуклеотидам 1-85 tracrRNA Cas9 *S. pyogenes* дикого типа.

20 13. Система CRISPR-Cas по п. 1, где модификация включает оптимизацию последовательности.

14. Система CRISPR-Cas по п. 13, где модификация включает уменьшение полиТ-последовательностей в tracr- и/или парной tracr-последовательностях.

25 15. Система CRISPR-Cas по п. 14, где один или несколько Т, присутствующие в полиТ-последовательности, соответствующей последовательности дикого типа, были заменены на отличный от Т нуклеотид.

16. Система CRISPR-Cas по пп. 13, 14 или 15, где модифицированная последовательность не содержит какую-либо полиТ-последовательность, имеющую более 4 смежных Т.

30 17. Система CRISPR-Cas по п. 1, где модификация включает добавление терминаторной полиТ-последовательности.

18. Система CRISPR-Cas по п. 17, где модификация включает добавление терминаторной полиТ-последовательности в tracr- и/или парную tracr-последовательности.

35 19. Система CRISPR-Cas по п. 17 или 18, где модификация включает добавление терминаторной полиТ-последовательности в направляющую последовательность.

20. Система CRISPR-Cas по п. 1, где модификация включает изменение петель и/или "шпилек".

40 21. Система CRISPR-Cas по п. 20, где модификация включает обеспечение минимум двух "шпилек" в направляющей последовательности.

22. Система CRISPR-Cas по п. 20 или 21, где модификация включает обеспечение "шпильки", образованной при помощи комплементации между tracr- и парной tracr-последовательностями.

45 23. Система CRISPR-Cas по п. 20 или 21, где модификация включает обеспечение одной или нескольких дополнительных "шпилек" на 3'-конце последовательности tracrRNA.

24. Система CRISPR-Cas по п. 20 или 21, где модификация включает обеспечение одной или нескольких дополнительных "шпилек", добавленных на 3' направляющей

последовательности.

25. Система CRISPR-Cas по п. 1, где модификация включает удлинение 5'-конца направляющей последовательности.

26. Система CRISPR-Cas по п. 25, где модификация включает обеспечение одной или нескольких "шпилек" на 5'-конце направляющей последовательности.

27. Система CRISPR-Cas по п. 25 или 26, где модификация включает введение последовательности (5'-AGGACGAAGTCCTAA) на 5'-конце направляющей последовательности.

28. Система CRISPR-Cas по п. 1, где модификация включает обеспечение образования перекрестных связей или обеспечение одного или нескольких модифицированных нуклеотидов в полинуклеотидной последовательности.

29. Система CRISPR-Cas по п. 28, где модифицированные нуклеотиды предусматриваются в любой или во всех из tracr-, парной tracr- и/или направляющей последовательностей.

30. Система CRISPR-Cas по п. 28 или 29, где обеспечение модифицированных нуклеотидов предусматривает включение по меньшей мере одного не встречающегося в природе нуклеотида, или модифицированного нуклеотида, или их аналогов.

31. Система CRISPR-Cas по п. 30, где модифицированные нуклеотиды модифицированы по компоненту, представляющему собой рибозу, фосфат и/или основание.

32. Система CRISPR-Cas по п. 30, где модифицированный нуклеотид выбран из группы, состоящей из 2'-О-метил-аналогов, 2'-дезоксид-аналогов или 2'-фтор-аналогов.

33. Система CRISPR-Cas по п. 30, где модифицированный нуклеотид выбран из группы, состоящей из 2-аминопурина, 5-бромуридина, псевдоуридина, инозина, 7-метилгуанозина.

34. Система CRISPR-Cas по п. 1, где модификация включает две "шпильки".

35. Система CRISPR-Cas по п. 1, где модификация включает три "шпильки".

36. Система CRISPR-Cas по п. 1, где модификация включает самое большее пять "шпилек".

37. Система CRISPR-Cas по п. 1, где белок Cas9 является SpCas9.

38. Система CRISPR-Cas по п. 1, где белок Cas9 является SaCas9.

39. Система CRISPR-Cas по п. 1, где белок Cas9 состоит менее чем из одной тысячи аминокислот.

40. Система CRISPR-Cas по п. 1, где белок Cas9 состоит менее чем из четырех тысяч аминокислот.

41. Система CRISPR-Cas по п. 1, где белок Cas9 представляет собой StCas9 или StlCas9.

42. Система CRISPR-Cas по п. 1, где белок Cas9 является ферментом Cas9 из организма, выбранного из группы, состоящей из рода Streptococcus, Campylobacter, Nitratifactor, Staphylococcus, Parvibaculum, Roseburia, Neisseria, Gluconacetobacter, Azospirillum, Sphaerochaeta, Lactobacillus, Eubacterium или Corynebacter.

43. Система CRISPR-Cas по п. 1, где белок Cas9 является нуклеазой, управляющей расщеплением обеих нитей в определенной точке целевой последовательности.

44. Система CRISPR-Cas по п. 1, где направляющая последовательность содержит по меньшей мере пятнадцать нуклеотидов.

45. Система CRISPR-Cas по п. 1, где модификация включает оптимизированную tracr-последовательность и/или оптимизированную направляющую последовательность РНК, и/или совместно свернутую структуру tracr-последовательности и/или парной(ых) tracr-последовательности(ей), и/или стабилизирующие вторичные структуры tracr-

последовательности, и/или tracr-последовательности с уменьшенным участком спаривания оснований, и/или tracr-последовательность, слитую с элементами РНК.

46. Система CRISPR-Cas по любому из пп. 1-45, где белок Cas9 кодон-оптимизирован для экспрессии в эукариотической клетке.

5 47. Сконструированная векторная система CRISPR-Cas для модификации целевой последовательности в эукариотической клетке, содержащая один или несколько векторов, содержащих:

10 I. первый регуляторный элемент, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей химерную РНК (chiRNA) системы CRISPR-Cas, содержащую:

(a) направляющую последовательность, способную гибридизоваться с целевой последовательностью в эукариотической клетке,

(b) парную tracr-последовательность, способную гибридизоваться с tracr-последовательностью, и

15 (c) tracr-последовательность,

где (a), (b) и (c) расположены в 5'-3' ориентации, и

II. второй регуляторный элемент, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей белок Cas9, содержащий по меньшей мере одну последовательность ядерной локализации,

20 где компоненты I и II находятся в одном и том же или в разных векторах системы, где одна или несколько из направляющей, tracr- и парной tracr-последовательностей модифицированы для повышения стабильности.

48. Векторная система по п. 47, где компоненты I и II находятся в одном и том же векторе системы.

25 49. Векторная система по п. 47, где первый регуляторный элемент является промотором полимеразы II или промотором полимеразы III.

30

35

40

45

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> THE BROAD INSTITUTE, INC.
 MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY

<120> ENGINEERING OF SYSTEMS, METHODS AND OPTIMIZED GUIDE COMPOSITIONS
 FOR SEQUENCE MANIPULATION

<130> 44790.99.2047

<140> PCT/US2013/074819
 <141> 2013-12-12

<150> 61/836,127
 <151> 2013-06-17

<150> 61/835,931
 <151> 2013-06-17

<150> 61/828,130
 <151> 2013-05-28

<150> 61/819,803
 <151> 2013-05-06

<150> 61/814,263
 <151> 2013-04-20

<150> 61/806,375
 <151> 2013-03-28

<150> 61/802,174
 <151> 2013-03-15

<150> 61/791,409
 <151> 2013-03-15

<150> 61/769,046
 <151> 2013-02-25

<150> 61/758,468
 <151> 2013-01-30

<150> 61/748,427
 <151> 2013-01-02

<150> 61/736,527
 <151> 2012-12-12

<160> 264

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"

<400> 1
 aggacgaagt cctaa

15

<210> 2

Страница 1

<211> 7
 <212> PRT
 <213> Simian virus 40

<400> 2
 Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val
 1 5

<210> 3
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Unknown

<220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Unknown:
 Nucleoplasmin bipartite NLS sequence"

<400> 3
 Lys Arg Pro Ala Ala Thr Lys Lys Ala Gly Gln Ala Lys Lys Lys Lys
 1 5 10 15

<210> 4
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Unknown

<220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Unknown:
 C-myc NLS sequence"

<400> 4
 Pro Ala Ala Lys Arg Val Lys Leu Asp
 1 5

<210> 5
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Unknown

<220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Unknown:
 C-myc NLS sequence"

<400> 5
 Arg Gln Arg Arg Asn Glu Leu Lys Arg Ser Pro
 1 5 10

<210> 6
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6
 Asn Gln Ser Ser Asn Phe Gly Pro Met Lys Gly Gly Asn Phe Gly Gly
 1 5 10 15

Arg Ser Ser Gly Pro Tyr Gly Gly Gly Gly Gln Tyr Phe Ala Lys Pro
 20 25 30

Arg Asn Gln Gly Tyr
35

<210> 7
<211> 42
<212> PRT
<213> Unknown

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Unknown:
IBB domain from importin-alpha sequence"

<400> 7
Arg Met Arg Ile Gln Phe Lys Asn Lys Gly Lys Asp Thr Ala Glu Leu
1 5 10 15

Arg Arg Arg Arg Val Glu Val Ser Val Glu Leu Arg Lys Ala Lys Lys
20 25 30

Asp Glu Gln Ile Leu Lys Arg Arg Asn Val
35 40

<210> 8
<211> 8
<212> PRT
<213> Unknown

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Unknown:
Myoma T protein sequence"

<400> 8
Val Ser Arg Lys Arg Pro Arg Pro
1 5

<210> 9
<211> 8
<212> PRT
<213> Unknown

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Unknown:
Myoma T protein sequence"

<400> 9
Pro Pro Lys Lys Ala Arg Glu Asp
1 5

<210> 10
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10
Pro Gln Pro Lys Lys Lys Pro Leu
1 5

<210> 11

Страница 3

<211> 12
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 11
 Ser Ala Leu Ile Lys Lys Lys Lys Lys Met Ala Pro
 1 5 10

<210> 12
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Influenza virus

<400> 12
 Asp Arg Leu Arg Arg
 1 5

<210> 13
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Influenza virus

<400> 13
 Pro Lys Gln Lys Lys Arg Lys
 1 5

<210> 14
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Hepatitis delta virus

<400> 14
 Arg Lys Leu Lys Lys Lys Ile Lys Lys Leu
 1 5 10

<210> 15
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 15
 Arg Glu Lys Lys Lys Phe Leu Lys Arg Arg
 1 5 10

<210> 16
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 16
 Lys Arg Lys Gly Asp Glu Val Asp Gly Val Asp Glu Val Ala Lys Lys
 1 5 10 15

Lys Ser Lys Lys
 20

<210> 17
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 17
 Arg Lys Cys Leu Gln Ala Gly Met Asn Leu Glu Ala Arg Lys Thr Lys
 1 5 10 15

Lys

<210> 18
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"

<220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(20)
 <223> a, c, t or g

<220>
 <221> modified_base
 <222> (21)..(22)
 <223> a, c, t, g, unknown or other

<400> 18
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnagaaw

27

<210> 19
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"

<220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(12)
 <223> a, c, t or g

<220>
 <221> modified_base
 <222> (13)..(14)
 <223> a, c, t, g, unknown or other

<400> 19
 nnnnnnnnnn nnnnagaaw

19

<210> 20
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"

Страница 5

```

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(20)
<223> a, c, t or g

<220>
<221> modified_base
<222> (21)..(22)
<223> a, c, t, g, unknown or other

<400> 20
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnagaaw 27

<210> 21
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(11)
<223> a, c, t or g

<220>
<221> modified_base
<222> (12)..(13)
<223> a, c, t, g, unknown or other

<400> 21
nnnnnnnnnn nnnagaaw 18

<210> 22
<211> 137
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(20)
<223> a, c, t, g, unknown or other

<400> 22
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn gttttgtac tctcaagatt tagaaataaa tcttcagaaa 60
gctacaaga taaggcttca tgccgaaatc aacaccctgt cattttatgg caggggtgtt 120
tcgttattta atttttt 137

<210> 23
<211> 123
<212> DNA

```

```

<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
      polynucleotide"

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(20)
<223> a, c, t, g, unknown or other

<400> 23
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn gttttgtac tctcagaaat gcagaagcta caagataag      60
gcttcatgcc gaaatcaaca ccctgtcatt ttatggcagg gtgttttcgt tattaattt    120
ttt                                                                    123

<210> 24
<211> 110
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
      polynucleotide"

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(20)
<223> a, c, t, g, unknown or other

<400> 24
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn gttttgtac tctcagaaat gcagaagcta caagataag      60
gcttcatgcc gaaatcaaca ccctgtcatt ttatggcagg gtgttttttt              110

<210> 25
<211> 102
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
      polynucleotide"

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(20)
<223> a, c, t, g, unknown or other

<400> 25
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn gttttagagc tagaaatagc aagttaaagt aaggctagtc    60
cgttatcaac ttgaaaaagt ggcaccgagt cggtgctttt tt                        102

<210> 26
<211> 88
<212> DNA

```

<213> Artificial Sequence
 <220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"

 <220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(20)
 <223> a, c, t, g, unknown or other

 <400> 26
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn gttttagagc tagaaatagc aagttaaaat aaggctagtc 60
 cgttatcaac ttgaaaaagt gttttttt 88

 <210> 27
 <211> 76
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"

 <220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(20)
 <223> a, c, t, g, unknown or other

 <400> 27
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn gttttagagc tagaaatagc aagttaaaat aaggctagtc 60
 cgttatcatt tttttt 76

 <210> 28
 <211> 12
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"

 <400> 28
 guuuuagagc ua 12

 <210> 29
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 29
 ggacatcgat gtcacctcca atgactaggg tgg 33

 <210> 30
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

Страница 8

<400> 30
 cattggagggt gacatcgatg tcctcccat tgg 33

<210> 31
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 31
 ggaagggcct gagtccgagc agaagaaga ggg 33

<210> 32
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 32
 ggtggcgaga ggggccgaga ttgggtgttc agg 33

<210> 33
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 33
 atgcaggagg gtggcgagag gggccgagat tgg 33

<210> 34
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 34
 aaaaccaccc ttctctctgg c 21

<210> 35
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic primer"

<400> 35
 ggagattgga gacacggaga g 21

<210> 36
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

Страница 9

```

    primer"
<400> 36
ctggaaagcc aatgcctgac
20

<210> 37
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer"

<400> 37
ggcagcaaac tccttgcct
20

<210> 38
<211> 12
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 38
gttttagagc ta
12

<210> 39
<211> 335
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"

<400> 39
gagggcctat ttcccatgat tccttcatat ttgcatatac gatacaaggc tgtagagag
60
ataattgaa ttaatttgac tgtaaacaca aagatattag tacaaaatac gtgacgtaga
120
aagtaaatat ttcttgggta gtttgcagtt ttaaaattat gttttaaaat ggactatcat
180
atgcttaccg taacttgaaa gtatttcgat ttcttggcctt tatatatcctt gtgaaagga
240
cgaaacaccg gaaccattca aaacagcata gcaagttaaa ataaggctag tccgttatca
300
acttgaaaaa gtggcaccga gtcggtgctt ttttt
335

<210> 40
<211> 423
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"

```


<400> 40
gagggcctat ttcccatgat tccttcatat ttgcatatac gatacaaggc tgtagagag 60
ataattggaa ttaatttgac tgtaaacaca aagatattag tacaataac gtgacgtaga 120
aagtaataat ttcttgggta gtttgcagtt ttaaaattat gttttaaaat ggactatcat 180
atgcttaccg taacttgaaa gtatttcgat ttcttggcct tatatatcct gtgaaagga 240
cgaacaccg gtagtattaa gtattgtttt atggctgata aatttctttg aatttctcct 300
tgattatttg ttataaaagt tataaaataa tcttgttggg accattcaaa acagcatagc 360
aagttaaaat aaggctagtc cgttatcaac ttgaaaagt ggcaccgagt cgggtgctttt 420
ttt 423

<210> 41
<211> 339
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 41
gagggcctat ttcccatgat tccttcatat ttgcatatac gatacaaggc tgtagagag 60
ataattggaa ttaatttgac tgtaaacaca aagatattag tacaataac gtgacgtaga 120
aagtaataat ttcttgggta gtttgcagtt ttaaaattat gttttaaaat ggactatcat 180
atgcttaccg taacttgaaa gtatttcgat ttcttggcct tatatatcct gtgaaagga 240
cgaacaccg ggttttagag ctatgctggt ttgaatggc ccaaacggg tcttcgagaa 300
gacgttttag agctatgctg tttgaaatgg tcccaaac 339

<210> 42
<211> 309
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 42
gagggcctat ttcccatgat tccttcatat ttgcatatac gatacaaggc tgtagagag 60
ataattggaa ttaatttgac tgtaaacaca aagatattag tacaataac gtgacgtaga 120
aagtaataat ttcttgggta gtttgcagtt ttaaaattat gttttaaaat ggactatcat 180
atgcttaccg taacttgaaa gtatttcgat ttcttggcct tatatatcct gtgaaagga 240
cgaacaccg ggtcttcgag aagacctggt ttagagctag aaatagcaag ttaaaataag 300
gctagtccg 309

<210> 43
<211> 1648

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"
 <400> 43
 Met Asp Tyr Lys Asp His Asp Gly Asp Tyr Lys Asp His Asp Ile Asp
 1 5 10 15
 Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Met Ala Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val
 20 25 30
 Gly Ile His Gly Val Pro Ala Ala Asp Lys Lys Tyr Ser Ile Gly Leu
 35 40 45
 Asp Ile Gly Thr Asn Ser Val Gly Trp Ala Val Ile Thr Asp Glu Tyr
 50 55 60
 Lys Val Pro Ser Lys Lys Phe Lys Val Leu Gly Asn Thr Asp Arg His
 65 70 75 80
 Ser Ile Lys Lys Asn Leu Ile Gly Ala Leu Leu Phe Asp Ser Gly Glu
 85 90 95
 Thr Ala Glu Ala Thr Arg Leu Lys Arg Thr Ala Arg Arg Arg Tyr Thr
 100 105 110
 Arg Arg Lys Asn Arg Ile Cys Tyr Leu Gln Glu Ile Phe Ser Asn Glu
 115 120 125
 Met Ala Lys Val Asp Asp Ser Phe Phe His Arg Leu Glu Glu Ser Phe
 130 135 140
 Leu Val Glu Glu Asp Lys Lys His Glu Arg His Pro Ile Phe Gly Asn
 145 150 155 160
 Ile Val Asp Glu Val Ala Tyr His Glu Lys Tyr Pro Thr Ile Tyr His
 165 170 175
 Leu Arg Lys Lys Leu Val Asp Ser Thr Asp Lys Ala Asp Leu Arg Leu
 180 185 190
 Ile Tyr Leu Ala Leu Ala His Met Ile Lys Phe Arg Gly His Phe Leu
 195 200 205
 Ile Glu Gly Asp Leu Asn Pro Asp Asn Ser Asp Val Asp Lys Leu Phe
 210 215 220
 Ile Gln Leu Val Gln Thr Tyr Asn Gln Leu Phe Glu Glu Asn Pro Ile
 225 230 235 240

Asn Ala Ser Gly Val Asp Ala Lys Ala Ile Leu Ser Ala Arg Leu Ser
 245 250 255
 Lys Ser Arg Arg Leu Glu Asn Leu Ile Ala Gln Leu Pro Gly Glu Lys
 260 265 270
 Lys Asn Gly Leu Phe Gly Asn Leu Ile Ala Leu Ser Leu Gly Leu Thr
 275 280 285
 Pro Asn Phe Lys Ser Asn Phe Asp Leu Ala Glu Asp Ala Lys Leu Gln
 290 295 300
 Leu Ser Lys Asp Thr Tyr Asp Asp Asp Leu Asp Asn Leu Leu Ala Gln
 305 310 315 320
 Ile Gly Asp Gln Tyr Ala Asp Leu Phe Leu Ala Ala Lys Asn Leu Ser
 325 330 335
 Asp Ala Ile Leu Leu Ser Asp Ile Leu Arg Val Asn Thr Glu Ile Thr
 340 345 350
 Lys Ala Pro Leu Ser Ala Ser Met Ile Lys Arg Tyr Asp Glu His His
 355 360 365
 Gln Asp Leu Thr Leu Leu Lys Ala Leu Val Arg Gln Gln Leu Pro Glu
 370 375 380
 Lys Tyr Lys Glu Ile Phe Phe Asp Gln Ser Lys Asn Gly Tyr Ala Gly
 385 390 395 400
 Tyr Ile Asp Gly Gly Ala Ser Gln Glu Glu Phe Tyr Lys Phe Ile Lys
 405 410 415
 Pro Ile Leu Glu Lys Met Asp Gly Thr Glu Glu Leu Leu Val Lys Leu
 420 425 430
 Asn Arg Glu Asp Leu Leu Arg Lys Gln Arg Thr Phe Asp Asn Gly Ser
 435 440 445
 Ile Pro His Gln Ile His Leu Gly Glu Leu His Ala Ile Leu Arg Arg
 450 455 460
 Gln Glu Asp Phe Tyr Pro Phe Leu Lys Asp Asn Arg Glu Lys Ile Glu
 465 470 475 480
 Lys Ile Leu Thr Phe Arg Ile Pro Tyr Tyr Val Gly Pro Leu Ala Arg
 485 490 495
 Gly Asn Ser Arg Phe Ala Trp Met Thr Arg Lys Ser Glu Glu Thr Ile
 500 505 510

Thr Pro Trp Asn Phe Glu Glu Val Val Asp Lys Gly Ala Ser Ala Gln
 515 520 525
 Ser Phe Ile Glu Arg Met Thr Asn Phe Asp Lys Asn Leu Pro Asn Glu
 530 535 540
 Lys Val Leu Pro Lys His Ser Leu Leu Tyr Glu Tyr Phe Thr Val Tyr
 545 550 555 560
 Asn Glu Leu Thr Lys Val Lys Tyr Val Thr Glu Gly Met Arg Lys Pro
 565 570 575
 Ala Phe Leu Ser Gly Glu Gln Lys Lys Ala Ile Val Asp Leu Leu Phe
 580 585 590
 Lys Thr Asn Arg Lys Val Thr Val Lys Gln Leu Lys Glu Asp Tyr Phe
 595 600 605
 Lys Lys Ile Glu Cys Phe Asp Ser Val Glu Ile Ser Gly Val Glu Asp
 610 615 620
 Arg Phe Asn Ala Ser Leu Gly Thr Tyr His Asp Leu Leu Lys Ile Ile
 625 630 635 640
 Lys Asp Lys Asp Phe Leu Asp Asn Glu Glu Asn Glu Asp Ile Leu Glu
 645 650 655
 Asp Ile Val Leu Thr Leu Thr Leu Phe Glu Asp Arg Glu Met Ile Glu
 660 665 670
 Glu Arg Leu Lys Thr Tyr Ala His Leu Phe Asp Asp Lys Val Met Lys
 675 680 685
 Gln Leu Lys Arg Arg Arg Tyr Thr Gly Trp Gly Arg Leu Ser Arg Lys
 690 695 700
 Leu Ile Asn Gly Ile Arg Asp Lys Gln Ser Gly Lys Thr Ile Leu Asp
 705 710 715 720
 Phe Leu Lys Ser Asp Gly Phe Ala Asn Arg Asn Phe Met Gln Leu Ile
 725 730 735
 His Asp Asp Ser Leu Thr Phe Lys Glu Asp Ile Gln Lys Ala Gln Val
 740 745 750
 Ser Gly Gln Gly Asp Ser Leu His Glu His Ile Ala Asn Leu Ala Gly
 755 760 765
 Ser Pro Ala Ile Lys Lys Gly Ile Leu Gln Thr Val Lys Val Val Asp
 770 775 780

Glu Leu Val Lys Val Met Gly Arg His Lys Pro Glu Asn Ile Val Ile
 785 790 795 800
 Glu Met Ala Arg Glu Asn Gln Thr Thr Gln Lys Gly Gln Lys Asn Ser
 805 810 815
 Arg Glu Arg Met Lys Arg Ile Glu Glu Gly Ile Lys Glu Leu Gly Ser
 820 825 830
 Gln Ile Leu Lys Glu His Pro Val Glu Asn Thr Gln Leu Gln Asn Glu
 835 840 845
 Lys Leu Tyr Leu Tyr Tyr Leu Gln Asn Gly Arg Asp Met Tyr Val Asp
 850 855 860
 Gln Glu Leu Asp Ile Asn Arg Leu Ser Asp Tyr Asp Val Asp His Ile
 865 870 875 880
 Val Pro Gln Ser Phe Leu Lys Asp Asp Ser Ile Asp Asn Lys Val Leu
 885 890 895
 Thr Arg Ser Asp Lys Asn Arg Gly Lys Ser Asp Asn Val Pro Ser Glu
 900 905 910
 Glu Val Val Lys Lys Met Lys Asn Tyr Trp Arg Gln Leu Leu Asn Ala
 915 920 925
 Lys Leu Ile Thr Gln Arg Lys Phe Asp Asn Leu Thr Lys Ala Glu Arg
 930 935 940
 Gly Gly Leu Ser Glu Leu Asp Lys Ala Gly Phe Ile Lys Arg Gln Leu
 945 950 955 960
 Val Glu Thr Arg Gln Ile Thr Lys His Val Ala Gln Ile Leu Asp Ser
 965 970 975
 Arg Met Asn Thr Lys Tyr Asp Glu Asn Asp Lys Leu Ile Arg Glu Val
 980 985 990
 Lys Val Ile Thr Leu Lys Ser Lys Leu Val Ser Asp Phe Arg Lys Asp
 995 1000 1005
 Phe Gln Phe Tyr Lys Val Arg Glu Ile Asn Asn Tyr His His Ala
 1010 1015 1020
 His Asp Ala Tyr Leu Asn Ala Val Val Gly Thr Ala Leu Ile Lys
 1025 1030 1035
 Lys Tyr Pro Lys Leu Glu Ser Glu Phe Val Tyr Gly Asp Tyr Lys
 1040 1045 1050

Val Tyr Asp Val Arg Lys Met Ile Ala Lys Ser Glu Gln Glu Ile
 1055 1060 1065
 Gly Lys Ala Thr Ala Lys Tyr Phe Phe Tyr Ser Asn Ile Met Asn
 1070 1075 1080
 Phe Phe Lys Thr Glu Ile Thr Leu Ala Asn Gly Glu Ile Arg Lys
 1085 1090 1095
 Arg Pro Leu Ile Glu Thr Asn Gly Glu Thr Gly Glu Ile Val Trp
 1100 1105 1110
 Asp Lys Gly Arg Asp Phe Ala Thr Val Arg Lys Val Leu Ser Met
 1115 1120 1125
 Pro Gln Val Asn Ile Val Lys Lys Thr Glu Val Gln Thr Gly Gly
 1130 1135 1140
 Phe Ser Lys Glu Ser Ile Leu Pro Lys Arg Asn Ser Asp Lys Leu
 1145 1150 1155
 Ile Ala Arg Lys Lys Asp Trp Asp Pro Lys Lys Tyr Gln Gly Phe
 1160 1165 1170
 Asp Ser Pro Thr Val Ala Tyr Ser Val Leu Val Val Ala Lys Val
 1175 1180 1185
 Glu Lys Gly Lys Ser Lys Lys Leu Lys Ser Val Lys Glu Leu Leu
 1190 1195 1200
 Gly Ile Thr Ile Met Glu Arg Ser Ser Phe Glu Lys Asn Pro Ile
 1205 1210 1215
 Asp Phe Leu Glu Ala Lys Gly Tyr Lys Glu Val Lys Lys Asp Leu
 1220 1225 1230
 Ile Ile Lys Leu Pro Lys Tyr Ser Leu Phe Glu Leu Glu Asn Gly
 1235 1240 1245
 Arg Lys Arg Met Leu Ala Ser Ala Gly Glu Leu Gln Lys Gly Asn
 1250 1255 1260
 Glu Leu Ala Leu Pro Ser Lys Tyr Val Asn Phe Leu Tyr Leu Ala
 1265 1270 1275
 Ser His Tyr Glu Lys Leu Lys Gly Ser Pro Glu Asp Asn Glu Gln
 1280 1285 1290
 Lys Gln Leu Phe Val Glu Gln His Lys His Tyr Leu Asp Glu Ile
 1295 1300 1305

Ile Glu Gln Ile Ser Glu Phe Ser Lys Arg Val Ile Leu Ala Asp
 1310 1315 1320
 Ala Asn Leu Asp Lys Val Leu Ser Ala Tyr Asn Lys His Arg Asp
 1325 1330 1335
 Lys Pro Ile Arg Glu Gln Ala Glu Asn Ile Ile His Leu Phe Thr
 1340 1345 1350
 Leu Thr Asn Leu Gly Ala Pro Ala Ala Phe Lys Tyr Phe Asp Thr
 1355 1360 1365
 Thr Ile Asp Arg Lys Arg Tyr Thr Ser Thr Lys Glu Val Leu Asp
 1370 1375 1380
 Ala Thr Leu Ile His Gln Ser Ile Thr Gly Leu Tyr Glu Thr Arg
 1385 1390 1395
 Ile Asp Leu Ser Gln Leu Gly Gly Asp Ala Ala Ala Val Ser Lys
 1400 1405 1410
 Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu
 1415 1420 1425
 Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly
 1430 1435 1440
 Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys
 1445 1450 1455
 Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr
 1460 1465 1470
 Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met
 1475 1480 1485
 Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val
 1490 1495 1500
 Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr
 1505 1510 1515
 Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile
 1520 1525 1530
 Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly
 1535 1540 1545
 His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met
 1550 1555 1560

Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg
 1565 1570 1575

His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln
 1580 1585 1590

Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn
 1595 1600 1605

His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu
 1610 1615 1620

Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly
 1625 1630 1635

Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
 1640 1645

<210> 44
 <211> 1625
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 44
 Met Asp Lys Lys Tyr Ser Ile Gly Leu Asp Ile Gly Thr Asn Ser Val
 1 5 10 15

Gly Trp Ala Val Ile Thr Asp Glu Tyr Lys Val Pro Ser Lys Lys Phe
 20 25 30

Lys Val Leu Gly Asn Thr Asp Arg His Ser Ile Lys Lys Asn Leu Ile
 35 40 45

Gly Ala Leu Leu Phe Asp Ser Gly Glu Thr Ala Glu Ala Thr Arg Leu
 50 55 60

Lys Arg Thr Ala Arg Arg Tyr Thr Arg Arg Lys Asn Arg Ile Cys
 65 70 75 80

Tyr Leu Gln Glu Ile Phe Ser Asn Glu Met Ala Lys Val Asp Asp Ser
 85 90 95

Phe Phe His Arg Leu Glu Glu Ser Phe Leu Val Glu Glu Asp Lys Lys
 100 105 110

His Glu Arg His Pro Ile Phe Gly Asn Ile Val Asp Glu Val Ala Tyr
 115 120 125

His Glu Lys Tyr Pro Thr Ile Tyr His Leu Arg Lys Lys Leu Val Asp
 130 135 140
 Ser Thr Asp Lys Ala Asp Leu Arg Leu Ile Tyr Leu Ala Leu Ala His
 145 150 155 160
 Met Ile Lys Phe Arg Gly His Phe Leu Ile Glu Gly Asp Leu Asn Pro
 165 170 175
 Asp Asn Ser Asp Val Asp Lys Leu Phe Ile Gln Leu Val Gln Thr Tyr
 180 185 190
 Asn Gln Leu Phe Glu Glu Asn Pro Ile Asn Ala Ser Gly Val Asp Ala
 195 200 205
 Lys Ala Ile Leu Ser Ala Arg Leu Ser Lys Ser Arg Arg Leu Glu Asn
 210 215 220
 Leu Ile Ala Gln Leu Pro Gly Glu Lys Lys Asn Gly Leu Phe Gly Asn
 225 230 235 240
 Leu Ile Ala Leu Ser Leu Gly Leu Thr Pro Asn Phe Lys Ser Asn Phe
 245 250 255
 Asp Leu Ala Glu Asp Ala Lys Leu Gln Leu Ser Lys Asp Thr Tyr Asp
 260 265 270
 Asp Asp Leu Asp Asn Leu Leu Ala Gln Ile Gly Asp Gln Tyr Ala Asp
 275 280 285
 Leu Phe Leu Ala Ala Lys Asn Leu Ser Asp Ala Ile Leu Leu Ser Asp
 290 295 300
 Ile Leu Arg Val Asn Thr Glu Ile Thr Lys Ala Pro Leu Ser Ala Ser
 305 310 315 320
 Met Ile Lys Arg Tyr Asp Glu His His Gln Asp Leu Thr Leu Leu Lys
 325 330 335
 Ala Leu Val Arg Gln Gln Leu Pro Glu Lys Tyr Lys Glu Ile Phe Phe
 340 345 350
 Asp Gln Ser Lys Asn Gly Tyr Ala Gly Tyr Ile Asp Gly Gly Ala Ser
 355 360 365
 Gln Glu Glu Phe Tyr Lys Phe Ile Lys Pro Ile Leu Glu Lys Met Asp
 370 375 380
 Gly Thr Glu Glu Leu Leu Val Lys Leu Asn Arg Glu Asp Leu Leu Arg
 385 390 395 400

Lys Gln Arg Thr Phe Asp Asn Gly Ser Ile Pro His Gln Ile His Leu
 405 410 415
 Gly Glu Leu His Ala Ile Leu Arg Arg Gln Glu Asp Phe Tyr Pro Phe
 420 425
 Leu Lys Asp Asn Arg Glu Lys Ile Glu Lys Ile Leu Thr Phe Arg Ile
 435 440 445
 Pro Tyr Tyr Val Gly Pro Leu Ala Arg Gly Asn Ser Arg Phe Ala Trp
 450 455 460
 Met Thr Arg Lys Ser Glu Glu Thr Ile Thr Pro Trp Asn Phe Glu Glu
 465 470 475
 Val Val Asp Lys Gly Ala Ser Ala Gln Ser Phe Ile Glu Arg Met Thr
 485 490 495
 Asn Phe Asp Lys Asn Leu Pro Asn Glu Lys Val Leu Pro Lys His Ser
 500 505 510
 Leu Leu Tyr Glu Tyr Phe Thr Val Tyr Asn Glu Leu Thr Lys Val Lys
 515 520 525
 Tyr Val Thr Glu Gly Met Arg Lys Pro Ala Phe Leu Ser Gly Glu Gln
 530 535 540
 Lys Lys Ala Ile Val Asp Leu Leu Phe Lys Thr Asn Arg Lys Val Thr
 545 550 555
 Val Lys Gln Leu Lys Glu Asp Tyr Phe Lys Lys Ile Glu Cys Phe Asp
 565 570 575
 Ser Val Glu Ile Ser Gly Val Glu Asp Arg Phe Asn Ala Ser Leu Gly
 580 585 590
 Thr Tyr His Asp Leu Leu Lys Ile Ile Lys Asp Lys Asp Phe Leu Asp
 595 600 605
 Asn Glu Glu Asn Glu Asp Ile Leu Glu Asp Ile Val Leu Thr Leu Thr
 610 615 620
 Leu Phe Glu Asp Arg Glu Met Ile Glu Glu Arg Leu Lys Thr Tyr Ala
 625 630 635 640
 His Leu Phe Asp Asp Lys Val Met Lys Gln Leu Lys Arg Arg Arg Tyr
 645 650 655
 Thr Gly Trp Gly Arg Leu Ser Arg Lys Leu Ile Asn Gly Ile Arg Asp
 660 665 670

Lys Gln Ser Gly Lys Thr Ile Leu Asp Phe Leu Lys Ser Asp Gly Phe
 675 680 685
 Ala Asn Arg Asn Phe Met Gln Leu Ile His Asp Asp Ser Leu Thr Phe
 690 695 700
 Lys Glu Asp Ile Gln Lys Ala Gln Val Ser Gly Gln Gly Asp Ser Leu
 705 710 715 720
 His Glu His Ile Ala Asn Leu Ala Gly Ser Pro Ala Ile Lys Lys Gly
 725 730 735
 Ile Leu Gln Thr Val Lys Val Val Asp Glu Leu Val Lys Val Met Gly
 740 745 750
 Arg His Lys Pro Glu Asn Ile Val Ile Glu Met Ala Arg Glu Asn Gln
 755 760 765
 Thr Thr Gln Lys Gly Gln Lys Asn Ser Arg Glu Arg Met Lys Arg Ile
 770 775 780
 Glu Glu Gly Ile Lys Glu Leu Gly Ser Gln Ile Leu Lys Glu His Pro
 785 790 795 800
 Val Glu Asn Thr Gln Leu Gln Asn Glu Lys Leu Tyr Leu Tyr Tyr Leu
 805 810 815
 Gln Asn Gly Arg Asp Met Tyr Val Asp Gln Glu Leu Asp Ile Asn Arg
 820 825 830
 Leu Ser Asp Tyr Asp Val Asp His Ile Val Pro Gln Ser Phe Leu Lys
 835 840 845
 Asp Asp Ser Ile Asp Asn Lys Val Leu Thr Arg Ser Asp Lys Asn Arg
 850 855 860
 Gly Lys Ser Asp Asn Val Pro Ser Glu Glu Val Val Lys Lys Met Lys
 865 870 875 880
 Asn Tyr Trp Arg Gln Leu Leu Asn Ala Lys Leu Ile Thr Gln Arg Lys
 885 890 895
 Phe Asp Asn Leu Thr Lys Ala Glu Arg Gly Gly Leu Ser Glu Leu Asp
 900 905 910
 Lys Ala Gly Phe Ile Lys Arg Gln Leu Val Glu Thr Arg Gln Ile Thr
 915 920 925
 Lys His Val Ala Gln Ile Leu Asp Ser Arg Met Asn Thr Lys Tyr Asp
 930 935 940

Glu Asn Asp Lys Leu Ile Arg Glu Val Lys Val Ile Thr Leu Lys Ser
 945 950 955 960
 Lys Leu Val Ser Asp Phe Arg Lys Asp Phe Gln Phe Tyr Lys Val Arg
 965 970 975
 Glu Ile Asn Asn Tyr His His Ala His Asp Ala Tyr Leu Asn Ala Val
 980 985 990
 Val Gly Thr Ala Leu Ile Lys Lys Tyr Pro Lys Leu Glu Ser Glu Phe
 995 1000 1005
 Val Tyr Gly Asp Tyr Lys Val Tyr Asp Val Arg Lys Met Ile Ala
 1010 1015 1020
 Lys Ser Glu Gln Glu Ile Gly Lys Ala Thr Ala Lys Tyr Phe Phe
 1025 1030 1035
 Tyr Ser Asn Ile Met Asn Phe Phe Lys Thr Glu Ile Thr Leu Ala
 1040 1045 1050
 Asn Gly Glu Ile Arg Lys Arg Pro Leu Ile Glu Thr Asn Gly Glu
 1055 1060 1065
 Thr Gly Glu Ile Val Trp Asp Lys Gly Arg Asp Phe Ala Thr Val
 1070 1075 1080
 Arg Lys Val Leu Ser Met Pro Gln Val Asn Ile Val Lys Lys Thr
 1085 1090 1095
 Glu Val Gln Thr Gly Gly Phe Ser Lys Glu Ser Ile Leu Pro Lys
 1100 1105 1110
 Arg Asn Ser Asp Lys Leu Ile Ala Arg Lys Lys Asp Trp Asp Pro
 1115 1120 1125
 Lys Lys Tyr Gly Gly Phe Asp Ser Pro Thr Val Ala Tyr Ser Val
 1130 1135 1140
 Leu Val Val Ala Lys Val Glu Lys Gly Lys Ser Lys Lys Leu Lys
 1145 1150 1155
 Ser Val Lys Glu Leu Leu Gly Ile Thr Ile Met Glu Arg Ser Ser
 1160 1165 1170
 Phe Glu Lys Asn Pro Ile Asp Phe Leu Glu Ala Lys Gly Tyr Lys
 1175 1180 1185
 Glu Val Lys Lys Asp Leu Ile Ile Lys Leu Pro Lys Tyr Ser Leu
 1190 1195 1200

Phe Glu Leu Glu Asn Gly Arg Lys Arg Met Leu Ala Ser Ala Gly
 1205 1210 1215
 Glu Leu Gln Lys Gly Asn Glu Leu Ala Leu Pro Ser Lys Tyr Val
 1220 1225 1230
 Asn Phe Leu Tyr Leu Ala Ser His Tyr Glu Lys Leu Lys Gly Ser
 1235 1240 1245
 Pro Glu Asp Asn Glu Gln Lys Gln Leu Phe Val Glu Gln His Lys
 1250 1255 1260
 His Tyr Leu Asp Glu Ile Ile Glu Gln Ile Ser Glu Phe Ser Lys
 1265 1270 1275
 Arg Val Ile Leu Ala Asp Ala Asn Leu Asp Lys Val Leu Ser Ala
 1280 1285 1290
 Tyr Asn Lys His Arg Asp Lys Pro Ile Arg Glu Gln Ala Glu Asn
 1295 1300 1305
 Ile Ile His Leu Phe Thr Leu Thr Asn Leu Gly Ala Pro Ala Ala
 1310 1315 1320
 Phe Lys Tyr Phe Asp Thr Thr Ile Asp Arg Lys Arg Tyr Thr Ser
 1325 1330 1335
 Thr Lys Glu Val Leu Asp Ala Thr Leu Ile His Gln Ser Ile Thr
 1340 1345 1350
 Gly Leu Tyr Glu Thr Arg Ile Asp Leu Ser Gln Leu Gly Gly Asp
 1355 1360 1365
 Ala Ala Ala Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val
 1370 1375 1380
 Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe
 1385 1390 1395
 Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu
 1400 1405 1410
 Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp
 1415 1420 1425
 Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser
 1430 1435 1440
 Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala
 1445 1450 1455

Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp
 1460 1465 1470

Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp
 1475 1480 1485

Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu
 1490 1495 1500

Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser
 1505 1510 1515

His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys
 1520 1525 1530

Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln
 1535 1540 1545

Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro
 1550 1555 1560

Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu
 1565 1570 1575

Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu
 1580 1585 1590

Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr
 1595 1600 1605

Lys Lys Arg Pro Ala Ala Thr Lys Lys Ala Gly Gln Ala Lys Lys
 1610 1615 1620

Lys Lys
 1625

<210> 45
 <211> 1664
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 45
 Met Asp Tyr Lys Asp His Asp Gly Asp Tyr Lys Asp His Asp Ile Asp
 1 5 10 15

Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Met Ala Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val
 20 25 30

Gly Ile His Gly Val Pro Ala Ala Asp Lys Lys Tyr Ser Ile Gly Leu
 Страница 24

35 40 45
 Asp Ile Gly Thr Asn Ser Val Gly Trp Ala Val Ile Thr Asp Glu Tyr
 50 55 60
 Lys Val Pro Ser Lys Lys Phe Lys Val Leu Gly Asn Thr Asp Arg His
 65 70 75 80
 Ser Ile Lys Lys Asn Leu Ile Gly Ala Leu Leu Phe Asp Ser Gly Glu
 85 90 95
 Thr Ala Glu Ala Thr Arg Leu Lys Arg Thr Ala Arg Arg Arg Tyr Thr
 100 105 110
 Arg Arg Lys Asn Arg Ile Cys Tyr Leu Gln Glu Ile Phe Ser Asn Glu
 115 120 125
 Met Ala Lys Val Asp Asp Ser Phe Phe His Arg Leu Glu Glu Ser Phe
 130 135 140
 Leu Val Glu Glu Asp Lys Lys His Glu Arg His Pro Ile Phe Gly Asn
 145 150 155 160
 Ile Val Asp Glu Val Ala Tyr His Glu Lys Tyr Pro Thr Ile Tyr His
 165 170 175
 Leu Arg Lys Lys Leu Val Asp Ser Thr Asp Lys Ala Asp Leu Arg Leu
 180 185 190
 Ile Tyr Leu Ala Leu Ala His Met Ile Lys Phe Arg Gly His Phe Leu
 195 200 205
 Ile Glu Gly Asp Leu Asn Pro Asp Asn Ser Asp Val Asp Lys Leu Phe
 210 215 220
 Ile Gln Leu Val Gln Thr Tyr Asn Gln Leu Phe Glu Glu Asn Pro Ile
 225 230 235 240
 Asn Ala Ser Gly Val Asp Ala Lys Ala Ile Leu Ser Ala Arg Leu Ser
 245 250 255
 Lys Ser Arg Arg Leu Glu Asn Leu Ile Ala Gln Leu Pro Gly Glu Lys
 260 265 270
 Lys Asn Gly Leu Phe Gly Asn Leu Ile Ala Leu Ser Leu Gly Leu Thr
 275 280 285
 Pro Asn Phe Lys Ser Asn Phe Asp Leu Ala Glu Asp Ala Lys Leu Gln
 290 295 300
 Leu Ser Lys Asp Thr Tyr Asp Asp Asp Leu Asp Asn Leu Leu Ala Gln
 Страница 25

305		310		315		320									
Ile	Gly	Asp	Gln	Tyr	Ala	Asp	Leu	Phe	Leu	Ala	Ala	Lys	Asn	Leu	Ser
			325						330					335	
Asp	Ala	Ile	Leu	Leu	Ser	Asp	Ile	Leu	Arg	Val	Asn	Thr	Glu	Ile	Thr
			340					345					350		
Lys	Ala	Pro	Leu	Ser	Ala	Ser	Met	Ile	Lys	Arg	Tyr	Asp	Glu	His	His
		355					360					365			
Gln	Asp	Leu	Thr	Leu	Leu	Lys	Ala	Leu	Val	Arg	Gln	Gln	Leu	Pro	Glu
	370					375					380				
Lys	Tyr	Lys	Glu	Ile	Phe	Phe	Asp	Gln	Ser	Lys	Asn	Gly	Tyr	Ala	Gly
385					390					395					400
Tyr	Ile	Asp	Gly	Gly	Ala	Ser	Gln	Glu	Glu	Phe	Tyr	Lys	Phe	Ile	Lys
				405					410					415	
Pro	Ile	Leu	Glu	Lys	Met	Asp	Gly	Thr	Glu	Glu	Leu	Leu	Val	Lys	Leu
			420					425					430		
Asn	Arg	Glu	Asp	Leu	Leu	Arg	Lys	Gln	Arg	Thr	Phe	Asp	Asn	Gly	Ser
		435					440					445			
Ile	Pro	His	Gln	Ile	His	Leu	Gly	Glu	Leu	His	Ala	Ile	Leu	Arg	Arg
	450					455					460				
Gln	Glu	Asp	Phe	Tyr	Pro	Phe	Leu	Lys	Asp	Asn	Arg	Glu	Lys	Ile	Glu
465					470					475					480
Lys	Ile	Leu	Thr	Phe	Arg	Ile	Pro	Tyr	Tyr	Val	Gly	Pro	Leu	Ala	Arg
				485					490					495	
Gly	Asn	Ser	Arg	Phe	Ala	Trp	Met	Thr	Arg	Lys	Ser	Glu	Glu	Thr	Ile
			500					505					510		
Thr	Pro	Trp	Asn	Phe	Glu	Glu	Val	Val	Asp	Lys	Gly	Ala	Ser	Ala	Gln
		515					520					525			
Ser	Phe	Ile	Glu	Arg	Met	Thr	Asn	Phe	Asp	Lys	Asn	Leu	Pro	Asn	Glu
	530					535					540				
Lys	Val	Leu	Pro	Lys	His	Ser	Leu	Leu	Tyr	Glu	Tyr	Phe	Thr	Val	Tyr
545					550					555					560
Asn	Glu	Leu	Thr	Lys	Val	Lys	Tyr	Val	Thr	Glu	Gly	Met	Arg	Lys	Pro
				565					570					575	
Ala	Phe	Leu	Ser	Gly	Glu	Gln	Lys	Lys	Ala	Ile	Val	Asp	Leu	Leu	Phe

Страница 26

580 585 590
Lys Thr Asn Arg Lys Val Thr Val Lys Gln Leu Lys Glu Asp Tyr Phe
595 600 605
Lys Lys Ile Glu Cys Phe Asp Ser Val Glu Ile Ser Gly Val Glu Asp
610 615 620
Arg Phe Asn Ala Ser Leu Gly Thr Tyr His Asp Leu Leu Lys Ile Ile
625 630 635 640
Lys Asp Lys Asp Phe Leu Asp Asn Glu Glu Asn Glu Asp Ile Leu Glu
645 650 655
Asp Ile Val Leu Thr Leu Thr Leu Phe Glu Asp Arg Glu Met Ile Glu
660 665 670
Glu Arg Leu Lys Thr Tyr Ala His Leu Phe Asp Asp Lys Val Met Lys
675 680 685
Gln Leu Lys Arg Arg Arg Tyr Thr Gly Trp Gly Arg Leu Ser Arg Lys
690 695 700
Leu Ile Asn Gly Ile Arg Asp Lys Gln Ser Gly Lys Thr Ile Leu Asp
705 710 715 720
Phe Leu Lys Ser Asp Gly Phe Ala Asn Arg Asn Phe Met Gln Leu Ile
725 730 735
His Asp Asp Ser Leu Thr Phe Lys Glu Asp Ile Gln Lys Ala Gln Val
740 745 750
Ser Gly Gln Gly Asp Ser Leu His Glu His Ile Ala Asn Leu Ala Gly
755 760 765
Ser Pro Ala Ile Lys Lys Gly Ile Leu Gln Thr Val Lys Val Val Asp
770 775 780
Glu Leu Val Lys Val Met Gly Arg His Lys Pro Glu Asn Ile Val Ile
785 790 795 800
Glu Met Ala Arg Glu Asn Gln Thr Thr Gln Lys Gly Gln Lys Asn Ser
805 810 815
Arg Glu Arg Met Lys Arg Ile Glu Glu Gly Ile Lys Glu Leu Gly Ser
820 825 830
Gln Ile Leu Lys Glu His Pro Val Glu Asn Thr Gln Leu Gln Asn Glu
835 840 845
Lys Leu Tyr Leu Tyr Tyr Leu Gln Asn Gly Arg Asp Met Tyr Val Asp
Страница 27

850 855 860
 Gln Glu Leu Asp Ile Asn Arg Leu Ser Asp Tyr Asp Val Asp His Ile
 865 870 875 880
 Val Pro Gln Ser Phe Leu Lys Asp Asp Ser Ile Asp Asn Lys Val Leu
 885 890
 Thr Arg Ser Asp Lys Asn Arg Gly Lys Ser Asp Asn Val Pro Ser Glu
 900 905 910
 Glu Val Val Lys Lys Met Lys Asn Tyr Trp Arg Gln Leu Leu Asn Ala
 915 920 925
 Lys Leu Ile Thr Gln Arg Lys Phe Asp Asn Leu Thr Lys Ala Glu Arg
 930 935 940
 Gly Gly Leu Ser Glu Leu Asp Lys Ala Gly Phe Ile Lys Arg Gln Leu
 945 950 955 960
 Val Glu Thr Arg Gln Ile Thr Lys His Val Ala Gln Ile Leu Asp Ser
 965 970 975
 Arg Met Asn Thr Lys Tyr Asp Glu Asn Asp Lys Leu Ile Arg Glu Val
 980 985 990
 Lys Val Ile Thr Leu Lys Ser Lys Leu Val Ser Asp Phe Arg Lys Asp
 995 1000 1005
 Phe Gln Phe Tyr Lys Val Arg Glu Ile Asn Asn Tyr His His Ala
 1010 1015 1020
 His Asp Ala Tyr Leu Asn Ala Val Val Gly Thr Ala Leu Ile Lys
 1025 1030 1035
 Lys Tyr Pro Lys Leu Glu Ser Glu Phe Val Tyr Gly Asp Tyr Lys
 1040 1045 1050
 Val Tyr Asp Val Arg Lys Met Ile Ala Lys Ser Glu Gln Glu Ile
 1055 1060 1065
 Gly Lys Ala Thr Ala Lys Tyr Phe Phe Tyr Ser Asn Ile Met Asn
 1070 1075 1080
 Phe Phe Lys Thr Glu Ile Thr Leu Ala Asn Gly Glu Ile Arg Lys
 1085 1090 1095
 Arg Pro Leu Ile Glu Thr Asn Gly Glu Thr Gly Glu Ile Val Trp
 1100 1105 1110
 Asp Lys Gly Arg Asp Phe Ala Thr Val Arg Lys Val Leu Ser Met
 Страница 28

1115		1120		1125
Pro Gln Val Asn Ile Val	Lys 1135	Lys Thr Glu Val	Gln 1140	Thr Gly Gly
Phe Ser 1145	Lys Glu Ser Ile	Leu 1150	Pro Lys Arg Asn	Ser 1155 Asp Lys Leu
Ile Ala 1160	Arg Lys Lys Asp	Trp 1165	Asp Pro Lys Lys	Tyr 1170 Gly Gly Phe
Asp Ser 1175	Pro Thr Val Ala	Tyr 1180	Ser Val Leu Val	Val 1185 Ala Lys Val
Glu Lys 1190	Gly Lys Ser Lys	Lys 1195	Leu Lys Ser Val	Lys 1200 Glu Leu Leu
Gly Ile 1205	Thr Ile Met Glu	Arg 1210	Ser Ser Phe Glu	Lys 1215 Asn Pro Ile
Asp Phe 1220	Leu Glu Ala Lys	Gly 1225	Tyr Lys Glu Val	Lys 1230 Lys Asp Leu
Ile Ile 1235	Lys Leu Pro Lys	Tyr 1240	Ser Leu Phe Glu	Leu 1245 Glu Asn Gly
Arg Lys 1250	Arg Met Leu Ala	Ser 1255	Ala Gly Glu Leu	Gln 1260 Lys Gly Asn
Glu Leu 1265	Ala Leu Pro Ser	Lys 1270	Tyr Val Asn Phe	Leu 1275 Tyr Leu Ala
Ser His 1280	Tyr Glu Lys Leu	Lys 1285	Gly Ser Pro Glu	Asp 1290 Asn Glu Gln
Lys Gln 1295	Leu Phe Val Glu	Gln 1300	His Lys His Tyr	Leu 1305 Asp Glu Ile
Ile Glu 1310	Gln Ile Ser Glu	Phe 1315	Ser Lys Arg Val	Ile 1320 Leu Ala Asp
Ala Asn 1325	Leu Asp Lys Val	Leu 1330	Ser Ala Tyr Asn	Lys 1335 His Arg Asp
Lys Pro 1340	Ile Arg Glu Gln	Ala 1345	Glu Asn Ile Ile	His 1350 Leu Phe Thr
Leu Thr 1355	Asn Leu Gly Ala	Pro 1360	Ala Ala Phe Lys	Tyr 1365 Phe Asp Thr
Thr Ile	Asp Arg Lys Arg Tyr	Thr	Ser Thr Lys Glu	Val Leu Asp

1370		1375		1380
Ala Thr 1385	Leu Ile His Gln	Ser 1390	Ile Thr Gly Leu Tyr 1395	Glu Thr Arg
Ile Asp 1400	Leu Ser Gln Leu	Gly 1405	Gly Asp Ala Ala Ala 1410	Val Ser Lys
Gly Glu 1415	Glu Leu Phe Thr	Gly 1420	Val Val Pro Ile Leu 1425	Val Glu Leu
Asp Gly 1430	Asp Val Asn Gly His 1435	Lys Phe Ser Val 1440	Ser Gly Glu Gly	
Glu Gly 1445	Asp Ala Thr Tyr	Gly 1450	Lys Leu Thr Leu Lys 1455	Phe Ile Cys
Thr Thr 1460	Gly Lys Leu Pro Val 1465	Pro Trp Pro Thr 1470	Leu Val Thr Thr	
Leu Thr 1475	Tyr Gly Val Gln Cys 1480	Phe Ser Arg Tyr 1485	Pro Asp His Met	
Lys Gln 1490	His Asp Phe Phe Lys 1495	Ser Ala Met Pro 1500	Glu Gly Tyr Val	
Gln Glu 1505	Arg Thr Ile Phe Phe 1510	Lys Asp Asp Gly Asn 1515	Tyr Lys Thr	
Arg Ala 1520	Glu Val Lys Phe Glu 1525	Gly Asp Thr Leu Val 1530	Asn Arg Ile	
Glu Leu 1535	Lys Gly Ile Asp Phe 1540	Lys Glu Asp Gly Asn 1545	Ile Leu Gly	
His Lys 1550	Leu Glu Tyr Asn Tyr 1555	Asn Ser His Asn Val 1560	Tyr Ile Met	
Ala Asp 1565	Lys Gln Lys Asn Gly 1570	Ile Lys Val Asn Phe 1575	Lys Ile Arg	
His Asn 1580	Ile Glu Asp Gly Ser 1585	Val Gln Leu Ala Asp 1590	His Tyr Gln	
Gln Asn 1595	Thr Pro Ile Gly Asp 1600	Gly Pro Val Leu Leu 1605	Pro Asp Asn	
His Tyr 1610	Leu Ser Thr Gln Ser 1615	Ala Leu Ser Lys Asp 1620	Pro Asn Glu	
Lys Arg	Asp His Met Val Leu	Leu Glu Phe Val Thr	Ala Ala Gly	

Страница 30

```

1625                      1630                      1635

Ile Thr  Leu Gly Met Asp Glu  Leu Tyr Lys Lys Arg  Pro Ala Ala
1640                1645                1650

Thr Lys  Lys Ala Gly Gln Ala  Lys Lys Lys Lys
1655                1660

<210> 46
<211> 1423
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
      polypeptide"

<400> 46
Met Asp Tyr Lys  Asp His Asp Gly Asp Tyr Lys Asp His Asp Ile Asp
1   5   10   15

Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Met Ala  Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val
20  25  30

Gly Ile His Gly Val Pro Ala Ala Asp Lys Lys Tyr Ser Ile Gly Leu
35  40  45

Asp Ile Gly Thr Asn Ser Val Gly Trp Ala Val Ile Thr Asp Glu Tyr
50  55  60

Lys Val Pro Ser Lys Lys Phe Lys Val Leu Gly Asn Thr Asp Arg His
65  70  75  80

Ser Ile Lys Lys Asn Leu Ile Gly Ala Leu Leu Phe Asp Ser Gly Glu
85  90  95

Thr Ala Glu Ala Thr Arg Leu Lys Arg Thr Ala Arg Arg Arg Tyr Thr
100 105 110

Arg Arg Lys Asn Arg Ile Cys Tyr Leu Gln Glu Ile Phe Ser Asn Glu
115 120 125

Met Ala Lys Val Asp Asp Ser Phe Phe His Arg Leu Glu Glu Ser Phe
130 135 140

Leu Val Glu Glu Asp Lys Lys His Glu Arg His Pro Ile Phe Gly Asn
145 150 155 160

Ile Val Asp Glu Val Ala Tyr His Glu Lys Tyr Pro Thr Ile Tyr His
165 170 175

Leu Arg Lys Lys Leu Val Asp Ser Thr Asp Lys Ala Asp Leu Arg Leu
180 185 190

```

Ile Tyr Leu Ala Leu Ala His Met Ile Lys Phe Arg Gly His Phe Leu
 195 200 205

Ile Glu Gly Asp Leu Asn Pro Asp Asn Ser Asp Val Asp Lys Leu Phe
 210 215 220

Ile Gln Leu Val Gln Thr Tyr Asn Gln Leu Phe Glu Glu Asn Pro Ile
 225 230 235 240

Asn Ala Ser Gly Val Asp Ala Lys Ala Ile Leu Ser Ala Arg Leu Ser
 245 250 255

Lys Ser Arg Arg Leu Glu Asn Leu Ile Ala Gln Leu Pro Gly Glu Lys
 260 265 270

Lys Asn Gly Leu Phe Gly Asn Leu Ile Ala Leu Ser Leu Gly Leu Thr
 275 280 285

Pro Asn Phe Lys Ser Asn Phe Asp Leu Ala Glu Asp Ala Lys Leu Gln
 290 295 300

Leu Ser Lys Asp Thr Tyr Asp Asp Asp Leu Asp Asn Leu Leu Ala Gln
 305 310 315 320

Ile Gly Asp Gln Tyr Ala Asp Leu Phe Leu Ala Ala Lys Asn Leu Ser
 325 330 335

Asp Ala Ile Leu Leu Ser Asp Ile Leu Arg Val Asn Thr Glu Ile Thr
 340 345 350

Lys Ala Pro Leu Ser Ala Ser Met Ile Lys Arg Tyr Asp Glu His His
 355 360 365

Gln Asp Leu Thr Leu Leu Lys Ala Leu Val Arg Gln Gln Leu Pro Glu
 370 375 380

Lys Tyr Lys Glu Ile Phe Phe Asp Gln Ser Lys Asn Gly Tyr Ala Gly
 385 390 395 400

Tyr Ile Asp Gly Gly Ala Ser Gln Glu Glu Phe Tyr Lys Phe Ile Lys
 405 410 415

Pro Ile Leu Glu Lys Met Asp Gly Thr Glu Glu Leu Leu Val Lys Leu
 420 425 430

Asn Arg Glu Asp Leu Leu Arg Lys Gln Arg Thr Phe Asp Asn Gly Ser
 435 440 445

Ile Pro His Gln Ile His Leu Gly Glu Leu His Ala Ile Leu Arg Arg
 450 455 460

Gln Glu Asp Phe Tyr Pro Phe Leu Lys Asp Asn Arg Glu Lys Ile Glu
 465 470 475 480
 Lys Ile Leu Thr Phe Arg Ile Pro Tyr Tyr Val Gly Pro Leu Ala Arg
 485 490 495
 Gly Asn Ser Arg Phe Ala Trp Met Thr Arg Lys Ser Glu Glu Thr Ile
 500 505 510
 Thr Pro Trp Asn Phe Glu Glu Val Val Asp Lys Gly Ala Ser Ala Gln
 515 520 525
 Ser Phe Ile Glu Arg Met Thr Asn Phe Asp Lys Asn Leu Pro Asn Glu
 530 535 540
 Lys Val Leu Pro Lys His Ser Leu Leu Tyr Glu Tyr Phe Thr Val Tyr
 545 550 555 560
 Asn Glu Leu Thr Lys Val Lys Tyr Val Thr Glu Gly Met Arg Lys Pro
 565 570 575
 Ala Phe Leu Ser Gly Glu Gln Lys Lys Ala Ile Val Asp Leu Leu Phe
 580 585 590
 Lys Thr Asn Arg Lys Val Thr Val Lys Gln Leu Lys Glu Asp Tyr Phe
 595 600 605
 Lys Lys Ile Glu Cys Phe Asp Ser Val Glu Ile Ser Gly Val Glu Asp
 610 615 620
 Arg Phe Asn Ala Ser Leu Gly Thr Tyr His Asp Leu Leu Lys Ile Ile
 625 630 635 640
 Lys Asp Lys Asp Phe Leu Asp Asn Glu Glu Asn Glu Asp Ile Leu Glu
 645 650 655
 Asp Ile Val Leu Thr Leu Thr Leu Phe Glu Asp Arg Glu Met Ile Glu
 660 665 670
 Glu Arg Leu Lys Thr Tyr Ala His Leu Phe Asp Asp Lys Val Met Lys
 675 680 685
 Gln Leu Lys Arg Arg Arg Tyr Thr Gly Trp Gly Arg Leu Ser Arg Lys
 690 695 700
 Leu Ile Asn Gly Ile Arg Asp Lys Gln Ser Gly Lys Thr Ile Leu Asp
 705 710 715 720
 Phe Leu Lys Ser Asp Gly Phe Ala Asn Arg Asn Phe Met Gln Leu Ile
 725 730 735

Страница 33

His Asp Asp Ser Leu Thr Phe Lys Glu Asp Ile Gln Lys Ala Gln Val
 740 745 750
 Ser Gly Gln Gly Asp Ser Leu His Glu His Ile Ala Asn Leu Ala Gly
 755 760 765
 Ser Pro Ala Ile Lys Lys Gly Ile Leu Gln Thr Val Lys Val Val Asp
 770 775 780
 Glu Leu Val Lys Val Met Gly Arg His Lys Pro Glu Asn Ile Val Ile
 785 790 795 800
 Glu Met Ala Arg Glu Asn Gln Thr Thr Gln Lys Gly Gln Lys Asn Ser
 805 810 815
 Arg Glu Arg Met Lys Arg Ile Glu Glu Gly Ile Lys Glu Leu Gly Ser
 820 825 830
 Gln Ile Leu Lys Glu His Pro Val Glu Asn Thr Gln Leu Gln Asn Glu
 835 840 845
 Lys Leu Tyr Leu Tyr Tyr Leu Gln Asn Gly Arg Asp Met Tyr Val Asp
 850 855 860
 Gln Glu Leu Asp Ile Asn Arg Leu Ser Asp Tyr Asp Val Asp His Ile
 865 870 875 880
 Val Pro Gln Ser Phe Leu Lys Asp Asp Ser Ile Asp Asn Lys Val Leu
 885 890 895
 Thr Arg Ser Asp Lys Asn Arg Gly Lys Ser Asp Asn Val Pro Ser Glu
 900 905 910
 Glu Val Val Lys Lys Met Lys Asn Tyr Trp Arg Gln Leu Leu Asn Ala
 915 920 925
 Lys Leu Ile Thr Gln Arg Lys Phe Asp Asn Leu Thr Lys Ala Glu Arg
 930 935 940
 Gly Gly Leu Ser Glu Leu Asp Lys Ala Gly Phe Ile Lys Arg Gln Leu
 945 950 955 960
 Val Glu Thr Arg Gln Ile Thr Lys His Val Ala Gln Ile Leu Asp Ser
 965 970 975
 Arg Met Asn Thr Lys Tyr Asp Glu Asn Asp Lys Leu Ile Arg Glu Val
 980 985 990
 Lys Val Ile Thr Leu Lys Ser Lys Leu Val Ser Asp Phe Arg Lys Asp
 995 1000 1005

Phe Gln Phe Tyr Lys Val Arg Glu Ile Asn Asn Tyr His His Ala
 1010 1015 1020
 His Asp Ala Tyr Leu Asn Ala Val Val Gly Thr Ala Leu Ile Lys
 1025 1030 1035
 Lys Tyr Pro Lys Leu Glu Ser Glu Phe Val Tyr Gly Asp Tyr Lys
 1040 1045 1050
 Val Tyr Asp Val Arg Lys Met Ile Ala Lys Ser Glu Gln Glu Ile
 1055 1060 1065
 Gly Lys Ala Thr Ala Lys Tyr Phe Phe Tyr Ser Asn Ile Met Asn
 1070 1075 1080
 Phe Phe Lys Thr Glu Ile Thr Leu Ala Asn Gly Glu Ile Arg Lys
 1085 1090 1095
 Arg Pro Leu Ile Glu Thr Asn Gly Glu Thr Gly Glu Ile Val Trp
 1100 1105 1110
 Asp Lys Gly Arg Asp Phe Ala Thr Val Arg Lys Val Leu Ser Met
 1115 1120 1125
 Pro Gln Val Asn Ile Val Lys Lys Thr Glu Val Gln Thr Gly Gly
 1130 1135 1140
 Phe Ser Lys Glu Ser Ile Leu Pro Lys Arg Asn Ser Asp Lys Leu
 1145 1150 1155
 Ile Ala Arg Lys Lys Asp Trp Asp Pro Lys Lys Tyr Gly Gly Phe
 1160 1165 1170
 Asp Ser Pro Thr Val Ala Tyr Ser Val Leu Val Val Ala Lys Val
 1175 1180 1185
 Glu Lys Gly Lys Ser Lys Lys Leu Lys Ser Val Lys Glu Leu Leu
 1190 1195 1200
 Gly Ile Thr Ile Met Glu Arg Ser Ser Phe Glu Lys Asn Pro Ile
 1205 1210 1215
 Asp Phe Leu Glu Ala Lys Gly Tyr Lys Glu Val Lys Lys Asp Leu
 1220 1225 1230
 Ile Ile Lys Leu Pro Lys Tyr Ser Leu Phe Glu Leu Glu Asn Gly
 1235 1240 1245
 Arg Lys Arg Met Leu Ala Ser Ala Gly Glu Leu Gln Lys Gly Asn
 1250 1255 1260

Glu Leu Ala Leu Pro Ser Lys Tyr Val Asn Phe Leu Tyr Leu Ala
 1265 1270 1275

Ser His Tyr Glu Lys Leu Lys Gly Ser Pro Glu Asp Asn Glu Gln
 1280 1285 1290

Lys Gln Leu Phe Val Glu Gln His Lys His Tyr Leu Asp Glu Ile
 1295 1300 1305

Ile Glu Gln Ile Ser Glu Phe Ser Lys Arg Val Ile Leu Ala Asp
 1310 1315 1320

Ala Asn Leu Asp Lys Val Leu Ser Ala Tyr Asn Lys His Arg Asp
 1325 1330 1335

Lys Pro Ile Arg Glu Gln Ala Glu Asn Ile Ile His Leu Phe Thr
 1340 1345 1350

Leu Thr Asn Leu Gly Ala Pro Ala Ala Phe Lys Tyr Phe Asp Thr
 1355 1360 1365

Thr Ile Asp Arg Lys Arg Tyr Thr Ser Thr Lys Glu Val Leu Asp
 1370 1375 1380

Ala Thr Leu Ile His Gln Ser Ile Thr Gly Leu Tyr Glu Thr Arg
 1385 1390 1395

Ile Asp Leu Ser Gln Leu Gly Gly Asp Lys Arg Pro Ala Ala Thr
 1400 1405 1410

Lys Lys Ala Gly Gln Ala Lys Lys Lys Lys
 1415 1420

<210> 47
 <211> 483
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence

<220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 47
 Met Phe Leu Phe Leu Ser Leu Thr Ser Phe Leu Ser Ser Ser Arg Thr
 1 5 10 15

Leu Val Ser Lys Gly Glu Glu Asp Asn Met Ala Ile Ile Lys Glu Phe
 20 25 30

Met Arg Phe Lys Val His Met Glu Gly Ser Val Asn Gly His Glu Phe
 35 40 45

Glu Ile Glu Gly Glu Gly Glu Gly Arg Pro Tyr Glu Gly Thr Gln Thr
 50 55 60
 Ala Lys Leu Lys Val Thr Lys Gly Gly Pro Leu Pro Phe Ala Trp Asp
 65 70 75 80
 Ile Leu Ser Pro Gln Phe Met Tyr Gly Ser Lys Ala Tyr Val Lys His
 85 90 95
 Pro Ala Asp Ile Pro Asp Tyr Leu Lys Leu Ser Phe Pro Glu Gly Phe
 100 105 110
 Lys Trp Glu Arg Val Met Asn Phe Glu Asp Gly Gly Val Val Thr Val
 115 120 125
 Thr Gln Asp Ser Ser Leu Gln Asp Gly Glu Phe Ile Tyr Lys Val Lys
 130 135 140
 Leu Arg Gly Thr Asn Phe Pro Ser Asp Gly Pro Val Met Gln Lys Lys
 145 150 155 160
 Thr Met Gly Trp Glu Ala Ser Ser Glu Arg Met Tyr Pro Glu Asp Gly
 165 170 175
 Ala Leu Lys Gly Glu Ile Lys Gln Arg Leu Lys Leu Lys Asp Gly Gly
 180 185 190
 His Tyr Asp Ala Glu Val Lys Thr Thr Tyr Lys Ala Lys Lys Pro Val
 195 200 205
 Gln Leu Pro Gly Ala Tyr Asn Val Asn Ile Lys Leu Asp Ile Thr Ser
 210 215 220
 His Asn Glu Asp Tyr Thr Ile Val Glu Gln Tyr Glu Arg Ala Glu Gly
 225 230 235 240
 Arg His Ser Thr Gly Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Gly Ser Lys Gln
 245 250 255
 Leu Glu Glu Leu Leu Ser Thr Ser Phe Asp Ile Gln Phe Asn Asp Leu
 260 265 270
 Thr Leu Leu Glu Thr Ala Phe Thr His Thr Ser Tyr Ala Asn Glu His
 275 280 285
 Arg Leu Leu Asn Val Ser His Asn Glu Arg Leu Glu Phe Leu Gly Asp
 290 295 300
 Ala Val Leu Gln Leu Ile Ile Ser Glu Tyr Leu Phe Ala Lys Tyr Pro
 305 310 315 320

Lys Lys Thr Glu Gly Asp Met Ser Lys Leu Arg Ser Met Ile Val Arg
 325 330 335
 Glu Glu Ser Leu Ala Gly Phe Ser Arg Phe Cys Ser Phe Asp Ala Tyr
 340 345 350
 Ile Lys Leu Gly Lys Gly Glu Glu Lys Ser Gly Gly Arg Arg Arg Asp
 355 360 365
 Thr Ile Leu Gly Asp Leu Phe Glu Ala Phe Leu Gly Ala Leu Leu Leu
 370 375 380
 Asp Lys Gly Ile Asp Ala Val Arg Arg Phe Leu Lys Gln Val Met Ile
 385 390 395 400
 Pro Gln Val Glu Lys Gly Asn Phe Glu Arg Val Lys Asp Tyr Lys Thr
 405 410 415
 Cys Leu Gln Glu Phe Leu Gln Thr Lys Gly Asp Val Ala Ile Asp Tyr
 420 425 430
 Gln Val Ile Ser Glu Lys Gly Pro Ala His Ala Lys Gln Phe Glu Val
 435 440 445
 Ser Ile Val Val Asn Gly Ala Val Leu Ser Lys Gly Leu Gly Lys Ser
 450 455 460
 Lys Lys Leu Ala Glu Gln Asp Ala Ala Lys Asn Ala Leu Ala Gln Leu
 465 470 475 480
 Ser Glu Val

<210> 48
 <211> 483
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 48
 Met Lys Gln Leu Glu Glu Leu Leu Ser Thr Ser Phe Asp Ile Gln Phe
 1 5 10 15
 Asn Asp Leu Thr Leu Leu Glu Thr Ala Phe Thr His Thr Ser Tyr Ala
 20 25 30
 Asn Glu His Arg Leu Leu Asn Val Ser His Asn Glu Arg Leu Glu Phe
 35 40 45

Leu Gly Asp Ala Val Leu Gln Leu Ile Ile Ser Glu Tyr Leu Phe Ala
 50 55 60
 Lys Tyr Pro Lys Lys Thr Glu Gly Asp Met Ser Lys Leu Arg Ser Met
 65 70 75 80
 Ile Val Arg Glu Glu Ser Leu Ala Gly Phe Ser Arg Phe Cys Ser Phe
 85 90 95
 Asp Ala Tyr Ile Lys Leu Gly Lys Gly Glu Glu Lys Ser Gly Gly Arg
 100 105 110
 Arg Arg Asp Thr Ile Leu Gly Asp Leu Phe Glu Ala Phe Leu Gly Ala
 115 120 125
 Leu Leu Leu Asp Lys Gly Ile Asp Ala Val Arg Arg Phe Leu Lys Gln
 130 135 140
 Val Met Ile Pro Gln Val Glu Lys Gly Asn Phe Glu Arg Val Lys Asp
 145 150 155 160
 Tyr Lys Thr Cys Leu Gln Glu Phe Leu Gln Thr Lys Gly Asp Val Ala
 165 170 175
 Ile Asp Tyr Gln Val Ile Ser Glu Lys Gly Pro Ala His Ala Lys Gln
 180 185 190
 Phe Glu Val Ser Ile Val Val Asn Gly Ala Val Leu Ser Lys Gly Leu
 195 200 205
 Gly Lys Ser Lys Lys Leu Ala Glu Gln Asp Ala Ala Lys Asn Ala Leu
 210 215 220
 Ala Gln Leu Ser Glu Val Gly Ser Val Ser Lys Gly Glu Glu Asp Asn
 225 230 235 240
 Met Ala Ile Ile Lys Glu Phe Met Arg Phe Lys Val His Met Glu Gly
 245 250 255
 Ser Val Asn Gly His Glu Phe Glu Ile Glu Gly Glu Gly Glu Gly Arg
 260 265 270
 Pro Tyr Glu Gly Thr Gln Thr Ala Lys Leu Lys Val Thr Lys Gly Gly
 275 280 285
 Pro Leu Pro Phe Ala Trp Asp Ile Leu Ser Pro Gln Phe Met Tyr Gly
 290 295 300
 Ser Lys Ala Tyr Val Lys His Pro Ala Asp Ile Pro Asp Tyr Leu Lys
 305 310 315 320

Leu Ser Phe Pro Glu Gly Phe Lys Trp Glu Arg Val Met Asn Phe Glu
 325 330 335
 Asp Gly Gly Val Val Thr Val Thr Gln Asp Ser Ser Leu Gln Asp Gly
 340 345
 Glu Phe Ile Tyr Lys Val Lys Leu Arg Gly Thr Asn Phe Pro Ser Asp
 355 360 365
 Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Met Gly Trp Glu Ala Ser Ser Glu
 370 375 380
 Arg Met Tyr Pro Glu Asp Gly Ala Leu Lys Gly Glu Ile Lys Gln Arg
 385 390 400
 Leu Lys Leu Lys Asp Gly Gly His Tyr Asp Ala Glu Val Lys Thr Thr
 405 410 415
 Tyr Lys Ala Lys Lys Pro Val Gln Leu Pro Gly Ala Tyr Asn Val Asn
 420 425 430
 Ile Lys Leu Asp Ile Thr Ser His Asn Glu Asp Tyr Thr Ile Val Glu
 435 440 445
 Gln Tyr Glu Arg Ala Glu Gly Arg His Ser Thr Gly Gly Met Asp Glu
 450 455 460
 Leu Tyr Lys Lys Arg Pro Ala Ala Thr Lys Lys Ala Gly Gln Ala Lys
 465 470 475 480
 Lys Lys Lys

<210> 49
 <211> 1423
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 49
 Met Asp Tyr Lys Asp His Asp Gly Asp Tyr Lys Asp His Asp Ile Asp
 1 5 10 15

Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Met Ala Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val
 20 25 30

Gly Ile His Gly Val Pro Ala Ala Asp Lys Lys Tyr Ser Ile Gly Leu
 35 40 45

Ala Ile Gly Thr Asn Ser Val Gly Trp Ala Val Ile Thr Asp Glu Tyr
 Страница 40

1385	1390	1395	
Ile Asp Leu Ser Gln Leu Gly Gly Asp Lys Arg Pro Ala Ala Thr			
1400	1405	1410	
Lys Lys Ala Gly Gln Ala Lys Lys Lys Lys			
1415	1420		

<210> 50
 <211> 2012
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 50	gaatgctgcc ctcagaccgc cttcctccct gtccttgctc gtccaaggag aatgaggtct	60
	cactggtgga tttcggacta ccctgaggag ctggcactcg agggacaagg cccccacct	120
	gcccagctcc agcctctgat gagggtgagg agagagctac atgaggttgc taagaaagcc	180
	tcccctgaag gagaccacac agtgtgtgag gttggagtct cttagcagcg gttctgtgcc	240
	cccagggata gtctggctgt ccaggcactg ctcttgatat aaacaccacc tcctagtatt	300
	gaaaccatgc ccattctgcc tctctgtatg gaaaagagca tggggctggc ccgtgggggtg	360
	gtgtccactt taggccctgt gggagatcat gggaaaccac gcagtgggtc ataggctctc	420
	tcatttacta ctcacatcca ctctgtgaag aagcgattat gatctctcct ctagaaactc	480
	gtagagtccc atgtctgccg gctccagag cctgcactcc tccaccttg cttggctttg	540
	ctggggctag aggagctagg atgcacagca gctctgtgac cctttgtttg agaggaacag	600
	gaaaaccacc cttctctctg gccactgtg tcctcttctt gccctgccat ccccttctgt	660
	gaatgttaga cccatgggag cagctggtca gaggggacc cggcctgggg cccctaacc	720
	tatgtagcct cagtcttccc atcaggctct cagctcagcc tgagtgttga ggccccagtg	780
	gctgctctgg gggcctcctg agtttctcat ctgtgccct ccctccctgg cccaggtgaa	840
	ggtgtggttc cagaaccgga ggacaaagta caaacggcag aagctggagg aggaagggcc	900
	tgagtccgag cagaagaaga agggctccca tcacatcaac cggtgccgca ttgccacgaa	960
	gcaggccaat ggggaggaca tcgatgtcac ctccaatgac aagcttgcta gcggtgggca	1020
	accacaacc cacgagggca gagtgtgct tgctgtggc caggcccctg cgtgggcca	1080
	agctggactc tggccactcc ctggccaggc tttggggagg cctggagtca tggccccaca	1140
	gggcttgaag cccggggccg ccattgacag agggacaagc aatgggctgg ctgaggcctg	1200
	ggaccacttg gccttctcct cggagagcct gcctgcctgg gcgggcccgc ccgccaccgc	1260
	agcctcccag ctgctctccg tgtctccaat ctcccctttg ttttgatgca tttctgtttt	1320
	aatttatatt ccaggcacca ctgtagttaa gtgatccca gtgtcccct tcctatggg	1380

aataataaaa gtctctctct taatgacacg ggcattccagc tccagcccca gagcctgggg 1440
 tggtagattc cggctctgag ggccagtggg ggctggtaga gcaaacgcgt tcagggcctg 1500
 ggagcctggg gtgggtact ggtggagggg gtcaagggta attcattaac tcctctcttt 1560
 tgttggggga ccctggcttc tacctccagc tccacagcag gagaacagg ctagacatag 1620
 ggaaggcca tcctgtatct tgagggagga caggcccagg tctttcttaa cgtattgaga 1680
 ggtgggaatc aggccaggt agttcaatgg gagagggaga gtgcttcct ctgcctagag 1740
 actctggtgg cttctccagt tgaggagaaa ccagagaaa ggggaggatt ggggtctggg 1800
 ggaggaaca ccattcaca aggtgacgg ttccagtcg aagtcgtggg cccaccagga 1860
 tgctcacctg tccttgaga accgctggg aggttgagac tgcagagaca gggcttaagg 1920
 ctgagcctgc aaccagtccc cagtgactca gggcctctc agcccaagaa agagcaacgt 1980
 gccagggccc gctgagctct tgtgttcacc tg 2012

<210> 51
 <211> 1153
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 51
 Met Lys Arg Pro Ala Ala Thr Lys Lys Ala Gly Gln Ala Lys Lys Lys 1 5 10 15
 Lys Ser Asp Leu Val Leu Gly Leu Asp Ile Gly Ile Gly Ser Val Gly 20 25 30
 Val Gly Ile Leu Asn Lys Val Thr Gly Glu Ile Ile His Lys Asn Ser 35 40 45
 Arg Ile Phe Pro Ala Ala Gln Ala Glu Asn Asn Leu Val Arg Arg Thr 50 55 60
 Asn Arg Gln Gly Arg Arg Leu Ala Arg Arg Lys Lys His Arg Arg Val 65 70 75 80
 Arg Leu Asn Arg Leu Phe Glu Glu Ser Gly Leu Ile Thr Asp Phe Thr 85 90 95
 Lys Ile Ser Ile Asn Leu Asn Pro Tyr Gln Leu Arg Val Lys Gly Leu 100 105 110
 Thr Asp Glu Leu Ser Asn Glu Glu Leu Phe Ile Ala Leu Lys Asn Met 115 120 125
 Val Lys His Arg Gly Ile Ser Tyr Leu Asp Asp Ala Ser Asp Asp Gly 130 135 140

Страница 47

Asn Ser Ser Val Gly Asp Tyr Ala Gln Ile Val Lys Glu Asn Ser Lys
 145 150 155 160
 Gln Leu Glu Thr Lys Thr Pro Gly Gln Ile Gln Leu Glu Arg Tyr Gln
 165 170 175
 Thr Tyr Gly Gln Leu Arg Gly Asp Phe Thr Val Glu Lys Asp Gly Lys
 180 185 190
 Lys His Arg Leu Ile Asn Val Phe Pro Thr Ser Ala Tyr Arg Ser Glu
 195 200 205
 Ala Leu Arg Ile Leu Gln Thr Gln Gln Glu Phe Asn Pro Gln Ile Thr
 210 215 220
 Asp Glu Phe Ile Asn Arg Tyr Leu Glu Ile Leu Thr Gly Lys Arg Lys
 225 230 235 240
 Tyr Tyr His Gly Pro Gly Asn Glu Lys Ser Arg Thr Asp Tyr Gly Arg
 245 250 255
 Tyr Arg Thr Ser Gly Glu Thr Leu Asp Asn Ile Phe Gly Ile Leu Ile
 260 265 270
 Gly Lys Cys Thr Phe Tyr Pro Asp Glu Phe Arg Ala Ala Lys Ala Ser
 275 280 285
 Tyr Thr Ala Gln Glu Phe Asn Leu Leu Asn Asp Leu Asn Asn Leu Thr
 290 295 300
 Val Pro Thr Glu Thr Lys Lys Leu Ser Lys Glu Gln Lys Asn Gln Ile
 305 310 315 320
 Ile Asn Tyr Val Lys Asn Glu Lys Ala Met Gly Pro Ala Lys Leu Phe
 325 330 335
 Lys Tyr Ile Ala Lys Leu Leu Ser Cys Asp Val Ala Asp Ile Lys Gly
 340 345 350
 Tyr Arg Ile Asp Lys Ser Gly Lys Ala Glu Ile His Thr Phe Glu Ala
 355 360 365
 Tyr Arg Lys Met Lys Thr Leu Glu Thr Leu Asp Ile Glu Gln Met Asp
 370 375 380
 Arg Glu Thr Leu Asp Lys Leu Ala Tyr Val Leu Thr Leu Asn Thr Glu
 385 390 395 400
 Arg Glu Gly Ile Gln Glu Ala Leu Glu His Glu Phe Ala Asp Gly Ser
 405 410 415

Phe Ser Gln Lys Gln Val Asp Glu Leu Val Gln Phe Arg Lys Ala Asn
 420 425 430
 Ser Ser Ile Phe Gly Lys Gly Trp His Asn Phe Ser Val Lys Leu Met
 435 440 445
 Met Glu Leu Ile Pro Glu Leu Tyr Glu Thr Ser Glu Glu Gln Met Thr
 450 455 460
 Ile Leu Thr Arg Leu Gly Lys Gln Lys Thr Thr Ser Ser Ser Asn Lys
 465 470 475 480
 Thr Lys Tyr Ile Asp Glu Lys Leu Leu Thr Glu Glu Ile Tyr Asn Pro
 485 490 495
 Val Val Ala Lys Ser Val Arg Gln Ala Ile Lys Ile Val Asn Ala Ala
 500 505 510
 Ile Lys Glu Tyr Gly Asp Phe Asp Asn Ile Val Ile Glu Met Ala Arg
 515 520 525
 Glu Thr Asn Glu Asp Asp Glu Lys Lys Ala Ile Gln Lys Ile Gln Lys
 530 535
 Ala Asn Lys Asp Glu Lys Asp Ala Ala Met Leu Lys Ala Ala Asn Gln
 545 550 555 560
 Tyr Asn Gly Lys Ala Glu Leu Pro His Ser Val Phe His Gly His Lys
 565 570 575
 Gln Leu Ala Thr Lys Ile Arg Leu Trp His Gln Gln Gly Glu Arg Cys
 580 585 590
 Leu Tyr Thr Gly Lys Thr Ile Ser Ile His Asp Leu Ile Asn Asn Ser
 595 600 605
 Asn Gln Phe Glu Val Asp His Ile Leu Pro Leu Ser Ile Thr Phe Asp
 610 615 620
 Asp Ser Leu Ala Asn Lys Val Leu Val Tyr Ala Thr Ala Asn Gln Glu
 625 630 635 640
 Lys Gly Gln Arg Thr Pro Tyr Gln Ala Leu Asp Ser Met Asp Asp Ala
 645 650 655
 Trp Ser Phe Arg Glu Leu Lys Ala Phe Val Arg Glu Ser Lys Thr Leu
 660 665 670
 Ser Asn Lys Lys Lys Glu Tyr Leu Leu Thr Glu Glu Asp Ile Ser Lys
 675 680 685

Phe Asp Val Arg Lys Lys Phe Ile Glu Arg Asn Leu Val Asp Thr Arg
 690 695 700
 Tyr Ala Ser Arg Val Val Leu Asn Ala Leu Gln Glu His Phe Arg Ala
 705 710 715
 His Lys Ile Asp Thr Lys Val Ser Val Val Arg Gly Gln Phe Thr Ser
 725 730 735
 Gln Leu Arg Arg His Trp Gly Ile Glu Lys Thr Arg Asp Thr Tyr His
 740 745 750
 His His Ala Val Asp Ala Leu Ile Ile Ala Ala Ser Ser Gln Leu Asn
 755 760 765
 Leu Trp Lys Lys Gln Lys Asn Thr Leu Val Ser Tyr Ser Glu Asp Gln
 770 775 780
 Leu Leu Asp Ile Glu Thr Gly Glu Leu Ile Ser Asp Asp Glu Tyr Lys
 785 790 795 800
 Glu Ser Val Phe Lys Ala Pro Tyr Gln His Phe Val Asp Thr Leu Lys
 805 810 815
 Ser Lys Glu Phe Glu Asp Ser Ile Leu Phe Ser Tyr Gln Val Asp Ser
 820 825 830
 Lys Phe Asn Arg Lys Ile Ser Asp Ala Thr Ile Tyr Ala Thr Arg Gln
 835 840 845
 Ala Lys Val Gly Lys Asp Lys Ala Asp Glu Thr Tyr Val Leu Gly Lys
 850 855 860
 Ile Lys Asp Ile Tyr Thr Gln Asp Gly Tyr Asp Ala Phe Met Lys Ile
 865 870 875 880
 Tyr Lys Lys Asp Lys Ser Lys Phe Leu Met Tyr Arg His Asp Pro Gln
 885 890 895
 Thr Phe Glu Lys Val Ile Glu Pro Ile Leu Glu Asn Tyr Pro Asn Lys
 900 905 910
 Gln Ile Asn Glu Lys Gly Lys Glu Val Pro Cys Asn Pro Phe Leu Lys
 915 920 925
 Tyr Lys Glu Glu His Gly Tyr Ile Arg Lys Tyr Ser Lys Lys Gly Asn
 930 935 940
 Gly Pro Glu Ile Lys Ser Leu Lys Tyr Tyr Asp Ser Lys Leu Gly Asn
 945 950 955 960

His Ile Asp Ile Thr Pro Lys Asp Ser Asn Asn Lys Val Val Leu Gln
 965 970 975

Ser Val Ser Pro Trp Arg Ala Asp Val Tyr Phe Asn Lys Thr Thr Gly
 980 985 990

Lys Tyr Glu Ile Leu Gly Leu Lys Tyr Ala Asp Leu Gln Phe Glu Lys
 995 1000 1005

Gly Thr Gly Thr Tyr Lys Ile Ser Gln Glu Lys Tyr Asn Asp Ile
 1010 1015 1020

Lys Lys Lys Glu Gly Val Asp Ser Asp Ser Glu Phe Lys Phe Thr
 1025 1030 1035

Leu Tyr Lys Asn Asp Leu Leu Leu Val Lys Asp Thr Glu Thr Lys
 1040 1045 1050

Glu Gln Gln Leu Phe Arg Phe Leu Ser Arg Thr Met Pro Lys Gln
 1055 1060 1065

Lys His Tyr Val Glu Leu Lys Pro Tyr Asp Lys Gln Lys Phe Glu
 1070 1075 1080

Gly Gly Glu Ala Leu Ile Lys Val Leu Gly Asn Val Ala Asn Ser
 1085 1090 1095

Gly Gln Cys Lys Lys Gly Leu Gly Lys Ser Asn Ile Ser Ile Tyr
 1100 1105 1110

Lys Val Arg Thr Asp Val Leu Gly Asn Gln His Ile Ile Lys Asn
 1115 1120 1125

Glu Gly Asp Lys Pro Lys Leu Asp Phe Lys Arg Pro Ala Ala Thr
 1130 1135 1140

Lys Lys Ala Gly Gln Ala Lys Lys Lys Lys
 1145 1150

<210> 52
 <211> 340
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 52
 gagggcctat ttcccatgat tccttcatat ttgcatatac gatacaaggc tgtagagag 60
 ataattgga ttaatttgac tgtaaacaca aagatattag taaaaaatac gtgacgtaga 120

Страница 51

aagtaataat ttcttgggta gtttgcagtt ttaaaattat gttttaaaat ggactatcat 180
 atgcttaccg taacttgaaa gtatttcgat ttcttggcctt tatatatcctt gtggaagga 240
 cgaacaccg ttacttaaat cttgcagaag ctacaaagat aaggcttcat gccgaaatca 300
 acacctgtc attttatggc aggggtgttt cgttatttaa 340

<210> 53
 <211> 360
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<220>
 <221> modified_base
 <222> (288)..(317)
 <223> a, c, t, g, unknown or other

<400> 53
 gagggcctat ttcccatgat tccttcatat ttgcatatac gatacaaggc tgtagagag 60
 ataattgaa ttaatttgac tgtaacaca aagatattag tacaataac gtgacgtaga 120
 aagtaataat ttcttgggta gtttgcagtt ttaaaattat gttttaaaat ggactatcat 180
 atgcttaccg taacttgaaa gtatttcgat ttcttggcctt tatatatcctt gtggaagga 240
 cgaacaccg ggttttagag ctatgctgtt ttgaatggc ccaaacn nnnnnnnn 300
 nnnnnnnn nnnnnngt ttagagctat gctgtttga atggtccca aactttttt 360

<210> 54
 <211> 318
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<220>
 <221> modified_base
 <222> (250)..(269)
 <223> a, c, t, g, unknown or other

<400> 54
 gagggcctat ttcccatgat tccttcatat ttgcatatac gatacaaggc tgtagagag 60
 ataattgaa ttaatttgac tgtaacaca aagatattag tacaataac gtgacgtaga 120
 aagtaataat ttcttgggta gtttgcagtt ttaaaattat gttttaaaat ggactatcat 180
 atgcttaccg taacttgaaa gtatttcgat ttcttggcctt tatatatcctt gtggaagga 240
 cgaacaccn nnnnnnnn nnnnnnng ttttagagct agaatagca agttaaata 300
 aggctagtcc gttttttt 318

<210> 55
 <211> 325
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<220>
 <221> modified_base
 <222> (250)..(269)
 <223> a, c, t, g, unknown or other

<400> 55
 gagggcctat ttcccatgat tccttcatat ttgcatatac gatacaaggc tgtagagag 60
 ataattggaa ttaatttgac tgtaaacaca aagatattag tacaataac gtgacgtaga 120
 aagtaataat ttcttggtgta gtttgcagtt ttaaaattat gttttaaaat ggactatcat 180
 atgcttaccg taacttgaaa gtatttcgat ttcttggcctt tatatatcctt gtggaaagga 240
 cgaaacaccn nnnnnnnnnn nnnnnnnnng ttttagagct agaaatagca agttaaata 300
 aggctagtcc gttatcattt ttttt 325

<210> 56
 <211> 337
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<220>
 <221> modified_base
 <222> (250)..(269)
 <223> a, c, t, g, unknown or other

<400> 56
 gagggcctat ttcccatgat tccttcatat ttgcatatac gatacaaggc tgtagagag 60
 ataattggaa ttaatttgac tgtaaacaca aagatattag tacaataac gtgacgtaga 120
 aagtaataat ttcttggtgta gtttgcagtt ttaaaattat gttttaaaat ggactatcat 180
 atgcttaccg taacttgaaa gtatttcgat ttcttggcctt tatatatcctt gtggaaagga 240
 cgaaacaccn nnnnnnnnnn nnnnnnnnng ttttagagct agaaatagca agttaaata 300
 aggctagtcc gttatcaact tgaaaaagtg ttttttt 337

<210> 57
 <211> 352
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<220>
 <221> modified_base
 <222> (250)..(269)
 <223> a, c, t, g, unknown or other

<400> 57
 gagggcctat ttcccatgat tccttcatat ttgcatatac gatacaaggc tgtagagag 60
 ataattgga ttaatttgac tgtaaacaca aagatattag taaaaatac gtgacgtaga 120
 aagtaataat ttcttgggta gtttgacagt taaaattat gttttaaat ggactatcat 180
 atgcttaccg taactgaaa gtatttcgat ttcttggtt tatatatctt gtggaaggga 240
 cgaaacaccn nnnnnnnnn nnnnnnnng ttttagagct agaaatagca agttaaata 300
 aggctagtcc gttatcaact tgaaaagtgc gcaccgagtc ggtgcttttt tt 352

<210> 58
 <211> 5101
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 58
 cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc cccgccatt 60
 gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca 120
 atgggtggag tatttacggt aaactgccca cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc 180
 aagtacgcc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgccagta 240
 catgacctta tgggactttc ctacttgca gtacatctac gtattagtca tcgctattac 300
 catggtcgag gtgagcccca cgttctgctt cactctcccc atctcccc cctccccacc 360
 cccaattttg tatttattta ttttttaatt attttgtca gcgatggggg cggggggggg 420
 gggggggcgc gcgccaggcg gggcggggcg gggcgaggcg cggggcgggg cgaggcggag 480
 aggtgcggcg gcagccaatc agagcggcgc gctccgaaag tttcctttta tggcgaggcg 540
 gcggcggcgg cgccctata aaaagcgaag cgcgcggcgg gcgggagtcg ctgacgact 600
 gccttcgccc cgtgccccgc tccgccgccg cctcgcgccg cccgccccgg ctctgactga 660
 ccgcttact cccacagggt agcgggcggg acggcccttc tcctccgggc tgtaattagc 720
 tgagcaagag gtaagggttt aaggatggt tggttggtg ggtattaatg ttaattacc 780
 tggagcact gcctgaaatc acttttttc aggttgacc ggtgccacca tggactataa 840
 ggaccacgac ggagactaca aggatcatga tattgattac aaagacgat acgataagat 900
 ggccccaaag aagaagcggg aggtcggat ccacggagtc ccagcagccg acaagaagta 960
 cagcatcggc ctggacatcg gcaccaactc tgtgggctgg gccgtgatca ccgacgagta 1020

caaggtgcc	agcaagaaat	tcaaggtgct	gggcaacacc	gaccggcaca	gcatcaagaa	1080
gaacctgatc	ggagccctgc	tggtcgacag	cgcgaaaca	gccgaggcca	cccggctgaa	1140
gagaaccgcc	agaagaagat	acaccagacg	gaagaaccgg	atctgctatc	tgcaagagat	1200
cttcagcaac	gagatggcca	aggtggacga	cagcttcttc	cacagactgg	aagagtcttt	1260
cctggtggaa	gaggataaga	agcacgagcg	gcacccatc	ttcggcaaca	tcgtggacga	1320
ggtggcctac	cacgagaagt	acccaccat	ctaccacctg	agaaagaaac	tggtggacag	1380
caccgacaag	gccgacctgc	ggctgatcta	tctggccctg	gccacatga	tcaagtccg	1440
gggccacttc	ctgatcgagg	gcgacctgaa	ccccgacaac	agcgacgtgg	acaagctggt	1500
catccagctg	gtgcagacct	acaaccagct	gttcgaggaa	aaccccatca	acgccagcgg	1560
cgtaggacgc	aaggccatcc	tgctgcccag	actgagcaag	agcagacggc	tgaaaaatct	1620
gatcgcccag	ctgcccggcg	agaagaagaa	tgccctgttc	ggcaacctga	ttgccctgag	1680
cctgggctg	acccccaaact	tcaagagcaa	cttcgacctg	gccgaggatg	ccaaactgca	1740
gctgagcaag	gacacctacg	acgacgacct	ggacaacctg	ctggcccaga	tcggcgacca	1800
gtacgccgac	ctgtttctgg	ccgccaagaa	cctgtccgac	gccatcctgc	tgagcgacat	1860
cctgagagtg	aaccaggaga	tcaccaaggc	ccccctgagc	gcctctatga	tcaagagata	1920
cgacgagcac	caccaggacc	tgacctgct	gaaagctctc	gtgcccagc	agctgcctga	1980
gaagtacaaa	gagattttct	tcgaccagag	caagaacggc	tacgccggct	acattgacgg	2040
cgtagccagc	caggaagagt	tctacaagtt	catcaagccc	atcctggaaa	agatggacgg	2100
caccgaggaa	ctgctcgtga	agctgaacag	agaggacctg	ctgcccgaagc	agcggacctt	2160
cgacaacggc	agcatcccc	accagatcca	cctggggagag	ctgcacgcca	ttctgcggcg	2220
gcaggaagat	ttttaccat	tcctgaagga	caaccgggaa	aagatcgaga	agatcctgac	2280
cttccgcatc	ccctactacg	tgggccctct	ggccagggga	aacagcagat	tcgcttgat	2340
gaccgaaaag	agcagggaaa	ccatcacccc	ctggaacttc	gaggaagtgg	tggaacaagg	2400
cgcttccgcc	cagagcttca	tcgagcggat	gaccaacttc	gataagaacc	tgcccaacga	2460
gaaggtgctg	cccaagcaca	gcctgctgta	cgagtacttc	accgtgtata	acgagctgac	2520
caaagtgaaa	tacgtgaccg	agggaatgag	aaagcccgcc	ttcctgagcg	gcgagcagaa	2580
aaaggccatc	gtggacctgc	tggtcaagac	caaccggaaa	gtgacctgta	agcagctgaa	2640
agaggactac	ttcaagaaaa	tcgagtgtct	cgactccgtg	gaaatctccg	gcgtggaaga	2700
tcggttcaac	gcctccttgg	gcacatacca	cgatctgctg	aaaattatca	aggacaagga	2760
cttcctggac	aatgaggaaa	acgaggacat	tctggaagat	atcgtgctga	ccctgacact	2820
gtttgaggac	agagagatga	tcgaggaacg	gctgaaaacc	tatgccacc	tggtcgacga	2880
caaagtgatg	aagcagctga	agcggcggag	atacaccggc	tggggcaggc	tgagccggaa	2940
gctgatcaac	ggcatccggg	acaagcagtc	cggcaagaca	atcctggatt	tcctgaagtc	3000
cgacggcttc	gccaacagaa	acttcatgca	gctgatccac	gacgacagcc	tgaccttaa	3060

Страница 55

agaggacatc cagaaagccc aggtgtccgg ccagggcgat agcctgcacg agcacattgc 3120
 caatctggcc ggcagccccg ccattaagaa gggcatcctg cagacagtga aggtggtgga 3180
 cgagctcgtg aaagtgatgg gccggcaca gcccgagaac atcgtgatcg aaatggccag 3240
 agagaaccag accacccaga agggacagaa gaacagccgc gagagaatga agcggatcga 3300
 agagggcatc aaagagctgg gcagccagat cctgaaagaa caccccgtgg aaaacacca 3360
 gctgcagaac gagaagctgt acctgtacta cctgcagaat gggcgggata tgtactgga 3420
 ccaggaactg gacatcaacc ggctgtccga ctacgatgtg gaccatatcg tgcctcagag 3480
 ctttctgaag gacgactcca tcgacaaca ggtgctgacc agaagcgaca agaaccgggg 3540
 caagagcgac aacgtgccct ccgaagaggt cgtgaagaag atgaagaact actgpcggca 3600
 gctgtgaac gccaaagtga ttaccagag aaagtccgac aatctgacca aggccgagag 3660
 agggcgccctg agcgaactgg ataaggccgg cttcatcaag agacagctgg tggaaacccg 3720
 gcagatcaca aagcagctgg cacagatcct ggactcccgg atgaacacta agtacgacga 3780
 gaatgacaag ctgatccggg aagtgaaagt gatcacctg aagtccaagc tgggtgtccga 3840
 tttccggaag gatttccagt tttacaaagt gcgagatc aacaactacc accacgcca 3900
 cgacgcctac ctgaacgccg tcgtgggaac cgccctgatc aaaaagtacc ctaagctgga 3960
 aagcgagttc gtgtacggcg actacaaggt gtacgacgtg cggaagatga tcgccaagag 4020
 cgagcaggaa atcggcaagg ctaccgcaa gtacttctt tacagcaaca tcatgaactt 4080
 tttcaagacc gagattacc tggccaacgg cgagatccgg aagcggcctc tgatcgagac 4140
 aaacggcgaa accggggaga tcgtgtggga taaggccgg gattttgcca ccgtgpcgaa 4200
 agtgtgagc atgccccaa tgaatatcgt gaaaaagacc gaggtgcaga caggcggctt 4260
 cagcaaagag tctatcctgc ccaagaggaa cagcgataag ctgatcgcca gaaagaagga 4320
 ctgggaccct aagaagtacg gcggttcga cagccccacc gtggcctatt ctgtgctggt 4380
 ggtggccaaa gtggaagg gcaagtcaa gaaactgaag agtgtgaaag agctgctggg 4440
 gatcaccatc atggaagaa gcagcttcga gaagaatccc atcgacttc tggagccaa 4500
 gggctacaaa gaagtgaaaa aggacctgat catcaagctg cctaagtact ccctgttcga 4560
 gctggaaaac ggccggaaga gaatgctggc ctctgccggc gaactgcaga agggaaacga 4620
 actggccctg ccctccaaat atgtgaactt cctgtactcg gccagccact atgagaagct 4680
 gaagggctcc cccgaggata atgagcagaa acagctgttt gtggaacagc acaagcacta 4740
 cctggacgag atcatcgagc agatcagcga gttctccaag agagtgatcc tggccgacgc 4800
 taatctggac aaagtgctgt ccgctacaa caagcaccgg gataagccca tcagagagca 4860
 ggccgagaat atcatccacc tgtttaccct gaccaatctg ggagcccctg ccgcttcaa 4920
 gtactttgac accaccatcg accggaagag gtacaccagc accaaagagg tgctggacgc 4980
 caccctgatc caccagagca tcaccggcct gtacgagaca cggatcgacc tgtctcagct 5040
 gggagggcgc tttcttttct ttagcttgac cagctttctt agtagcagca ggacgcttta 5100

a 5101

<210> 59
 <211> 137
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(20)
 <223> a, c, t, g, unknown or other

<400> 59
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn gttttgtac tctcaagatt tagaaataaa tcttgcagaa 60
 gctacaaga taaggcttca tgccgaaatc aacaccctgt cattttatgg cagggtgttt 120
 tcgttattta atttttt 137

<210> 60
 <211> 123
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(20)
 <223> a, c, t, g, unknown or other

<400> 60
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn gttttgtac tctcagaat gcagaagcta caaagataag 60
 gcttcatgcc gaaatcaaca ccctgtcatt ttatggcagg gtgttttcgt tatttaattt 120
 ttt 123

<210> 61
 <211> 110
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(20)
 <223> a, c, t, g, unknown or other

<400> 61
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn gttttgtac tctcagaaat gcagaagcta caagataag 60
 gcttcatgcc gaaatcaaca ccctgtcatt ttatggcagg gtgttttttt 110

<210> 62
 <211> 137
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(20)
 <223> a, c, t, g, unknown or other

<400> 62
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn gttattgtac tctcaagatt tagaaataaa tcttgcaaa 60
 gctacaaga taaggcttca tgccgaaatc aacaccctgt cattttatgg cagggtgttt 120
 tcgttattta atttttt 137

<210> 63
 <211> 123
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(20)
 <223> a, c, t, g, unknown or other

<400> 63
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn gttattgtac tctcagaaat gcagaagcta caagataag 60
 gcttcatgcc gaaatcaaca ccctgtcatt ttatggcagg gtgttttcgt tatttaattt 120
 ttt 123

<210> 64
 <211> 110
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(20)


```

<223> a, c, t, g, unknown or other
<400> 64
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn gttattgtac tctcagaat gcagaagcta caaagataag      60
gcttcatgcc gaaatcaaca ccctgtcatt ttatggcagg gtgttttttt                110

<210> 65
<211> 137
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
      polynucleotide"

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(20)
<223> a, c, t, g, unknown or other

<400> 65
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn gttattgtac tctcaagatt tagaaataaa tcttgcaaaa      60
gctacaatga taaggcttca tgccgaaatc aacaccctgt cattttatgg cagggtgttt     120
tcggtatttta atttttt                                                    137

<210> 66
<211> 123
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
      polynucleotide"

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(20)
<223> a, c, t, g, unknown or other

<400> 66
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn gttattgtac tctcagaat gcagaagcta caatgataag      60
gcttcatgcc gaaatcaaca ccctgtcatt ttatggcagg gtgttttcgt tatttaattt     120
ttt                                                                      123

<210> 67
<211> 110
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
      polynucleotide"

<220>

```

```

<221> modified_base
<222> (1)..(20)
<223> a, c, t, g, unknown or other

<400> 67
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn gttattgtac tctcagaaat gcagaagcta caatgataag      60
gcttcatgcc gaaatcaaca ccctgtcatt ttatggcagg gtgttttttt                    110

<210> 68
<211> 107
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(20)
<223> a, c, t, g, unknown or other

<400> 68
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn gttttagagc tgtggaaca cagcgagtta aaataaggct      60
tagtccgtac tcaacttgaa aaggtggcac cgattcggtg ttttttt                    107

<210> 69
<211> 4263
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"

<400> 69
atgaaaaggc cggcggccac gaaaaaggcc ggccaggcaa aaaagaaaaa gaccaagccc      60
tacagcatcg gcctggacat cggcaccaat agcgtgggct gggccgtgac caccgacaac      120
tacaaggtgc ccagcaagaa aatgaaggct ctgggcaaca cctccaagaa gtacatcaag      180
aaaaacctgc tggcgctgct gctgttcgac agcggcatta cagccgaggg cagacggctg      240
aagagaaccg ccagacggcg gtacaccggc cggagaaca gaatcctgta tctgcaagag      300
atcttcagca ccgagatggc taccctggac gacgccttct tccagcggct ggacgacagc      360
ttcttgggtc ccgacgaca gcgggacagc aagtaccca tcttcggcaa cctggtggaa      420
gagaaggcct accacgacga gttccccacc atctaccacc tgagaaagta cctggccgac      480
agcaccaaga aggccgacct gagactggtg tatctggccc tggccacat gatcaagtac      540
cggggccact tcctgatcga gggcgagttc aacagcaaga acaacgacat ccagaagaac      600
ttcaggact tcctggacac ctacaacgcc atcttcgaga gcgacctgtc cctggaaaac      660
agcaagcagc tggaagagat cgtgaaggac aagatcagca agctggaaaa gaaggaccgc      720
atcctgaagc tgttccccgg cgagaagaac agcggaatct tcagcgagtt tctgaagctg      780

```

Страница 60

atcgtgggca accagggcca cttcagaaa tgcttcaacc tggacgagaa agccagcctg	840
cacttcagca aagagagcta cgacgaggac ctggaaccct tgctgggata tatcggcgac	900
gactacagcg acgtgttctt gaaggccaag aagctgtacg acgctatcct gctgagcggc	960
ttcctgaccg tgaccgacaa cgagacagag gccccactga gcagcgccat gattaagcgg	1020
tacaacgagc acaagagga tctggctctg ctgaaagagt acatccggaa catcagcctg	1080
aaaacctaca atgaggtggt caaggacgac accaagaacg gctacgccgg ctacatcgac	1140
ggcaagacca accaggaaga tttctatgtg tacctgaaga agctgctggc cgagttcgag	1200
ggggccgact actttctgga aaaaatcgac cgcgaggatt tcctgcggaa gcagcggacc	1260
ttcgacaacg gcagcatccc ctaccagatc catctgcagg aaatgcgggc catcctggac	1320
aagcaggcca agttctacc attcctggcc aagaacaag agcggatcga gaagatcctg	1380
accttccgca tcccttacta cgtgggccc ctggccagag gcaacagcga ttttgcctgg	1440
tccatccgga agcgaatga gaagatcacc ccctggaact tcgaggacgt gatcgacaaa	1500
gagtcacgag ccgaggcctt catcaaccgg atgaccagct tcgacctgta cctgcccgag	1560
gaaaaggtgc tgcccgaagca cagcctgctg tacgagacat tcaatgtgta taacgagctg	1620
accaaagtgc ggtttatcgc cgagtctatg cgggactacc agttcctgga ctccaagcag	1680
aaaaaggaca tcgtgcggct gtacttcaag gacaagcggg aagtgaccga taaggacatc	1740
atcgagtacc tgcacgccat ctacggctac gatggcatcg agctgaaggg catcgagaag	1800
cagttcaact ccagcctgag cacataccac gacctgctga acattatcaa cgacaaaaga	1860
tttctggagc actccagcaa cgaggccatc atcgaagaga tcatccacac cctgaccatc	1920
tttgaggacc gcgagatgat caagcagcgg ctgagcaagt tcgagaacat cttcgacaag	1980
agcgtgctga aaaagctgag cagacggcac tacaccggct ggggcaagct gagcgccaag	2040
ctgatcaacg gcatccggga cgagaagtcc ggcaacacaa tcctggacta cctgatcgac	2100
gacggcatca gcaaccggaa cttcatgcag ctgatccagc acgacgccct gagcttcaag	2160
aagaagatcc agaaggccca gatcatcggg gacgaggaca agggcaacat caaagaagtc	2220
gtgaagtccc tgcccggcag ccccgccatc aagaagggaa tcctgcagag catcaagatc	2280
gtggacgagc tcgtgaaagt gatgggaggc agaagaccg agagcatcgt ggtggaatg	2340
gctagagaga accagtacac caatcagggc aagagcaaca gccagcagag actgaagaga	2400
ctggaaaagt ccctgaaaga gctgggagc aagattctga aagagaatat ccctgccaag	2460
ctgtccaaga tcgacaacaa cgccctgagc aacgaccggc tgtacctgta ctacctgag	2520
aatggcaagg acatgtatac aggcgacgac ctggatatcg accgcctgag caactacgac	2580
atcgaccata ttatccccc ggcttctctg aaagacaaca gcattgacaa caaagtgctg	2640
gtgtcctccg ccagcaaccg cggcaagtcc gatgatgtgc ccagcctgga agtcgtgaaa	2700
aagagaaga ccttctggta tcagctgctg aaaagcaagc tgattagcca gaggaagttc	2760
gacaacctga csaaggccga gagaggcggc ctgagccctg aagataaggc cggcttcatc	2820

Страница 61

cagagacagc tgggtgaaac ccggcagatc accaagcacg tggccagact gctggatgag 2880
 aagtttaaca acaagaagga cgagaacaac cgggccgtgc ggaccgtgaa gatcatcacc 2940
 ctgaagtcca ccctggtgtc ccagttccgg aaggacttcg agctgtataa agtgcgag 3000
 atcaatgact ttcaccacgc ccacgacgcc tacctgaatg ccgtggtggc ttccgccctg 3060
 ctgaagaagt accctaagct ggaacccgag ttcgtgtacg gcgactaccc caagtacaac 3120
 tccttcagag agcgggaagtc cgccaccgag aagggtgtact tctactccaa catcatgaat 3180
 atctttaaga agtccatctc cctggccgat ggacagatga tcgagcggcc cctgatcgaa 3240
 gtgaacgaag agcagggcga gagcgtgtgg aacaaagaaa gcgacctggc caccgtgagg 3300
 cgggtgctga gttatcctca agtgaatgct gtgaagaagg tggagaaca gaaccacggc 3360
 ctggatcggg gcaagcccaa gggcctgttc aacccaacc tgtccagcaa gcctaagccc 3420
 aactccaacg agaatctcgt gggggccaaa gagtacctgg accctaagaa gtacggcgga 3480
 tacgccggca tctccaatag cttcaccgtg ctctgtgaagg gcacaatcga gaagggcgct 3540
 aagaaaaaga tcacaacgt gctggaattt caggggatct ctatcctgga ccggatcaac 3600
 taccggaagg ataagctgaa ctttctgctg gaaaaaggct acaaggacat tgagctgatt 3660
 atcgagctgc ctaagtactc cctgttcgaa ctgagcagc gctccagacg gatgctggcc 3720
 tccatcctgt ccaccaaca caagcggggc gagatccaca agggaaacca gatcttctctg 3780
 agccagaaat ttgtgaaact gctgtaccac gccaaagcga tctccaacac catcaatgag 3840
 aaccaccgga aatacgtgga aaaccacaag aaagagttg aggaactggt ctactacatc 3900
 ctggagttca acgagaacta tgtgggagcc aagaagaacg gcaaactgct gaactccgcc 3960
 ttccagagct ggacagaacca cagcatcgac gagctgtgca gctccttcat cggccctacc 4020
 ggcagcgagc ggaagggact gtttgagctg acctccagag gctctgccgc cgactttgag 4080
 ttctctggag tgaagatccc ccgtacaga gactacaccc cctctagtct gctgaaggac 4140
 gccaccctga tccaccagag cgtgaccggc ctgtacgaaa cccggatcga cctggctaag 4200
 ctgggagagg gaaagcgtcc tgctgtact aagaagctg gtcaagctaa gaaaaagaaa 4260
 taa 4263

<210> 70
 <211> 84
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: synthetic oligonucleotide"

<400> 70
 ggaaccattc ataacagcat agcaagttat aataaggcta gtccgttatc aacttgaaaa 60
 agtggcaccg agtcggtgct tttt 84

<210> 71
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"

 <400> 71
 gttatagagc tatgctgta tgaatgggcc caaac 36

 <210> 72
 <211> 84
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"

 <400> 72
 ggaaccattc aatacagcat agcaagtaa tataaggcta gtcggtatc aactgaaa 60
 agtggcaccg agtcggtgct tttt 84

 <210> 73
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"

 <400> 73
 gtattagagc tatgctgat tgaatgggcc caaac 36

 <210> 74
 <211> 103
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

 <220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(20)
 <223> a, c, t, g, unknown or other

 <400> 74
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn gtttagagc tagaaatagc aagttaaaat aaggctagtc 60
 cgttatcaac ttgaaaaagt gcaccgagt cggcgctttt ttt 103

 <210> 75
 <211> 103

```

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
      polynucleotide"

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(20)
<223> a, c, t, g, unknown or other

<400> 75
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn gtattagagc tagaaatagc aagttaatat aaggctagtc      60
cgttatcaac ttgaaaaagt ggcaccgagt cggtgctttt ttt                               103

<210> 76
<211> 123
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
      polynucleotide"

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(20)
<223> a, c, t, g, unknown or other

<400> 76
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn gtttagagc tatgctgttt tggaacaaa acagcatagc      60
aagttaaaat aaggctagtc cgttatcaac ttgaaaaagt ggcaccgagt cggtgctttt      120
ttt                                                                              123

<210> 77
<211> 123
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
      polynucleotide"

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(20)
<223> a, c, t, g, unknown or other

<400> 77
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn gtattagagc tatgctgtat tggaacaat acagcatagc      60
aagttaatat aaggctagtc cgttatcaac ttgaaaaagt ggcaccgagt cggtgctttt      120
ttt                                                                              123

```

<210> 78
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 78
 gtcacctcca atgactaggg

20

<210> 79
 <211> 984
 <212> PRT
 <213> Campylobacter jejuni

<400> 79
 Met Ala Arg Ile Leu Ala Phe Asp Ile Gly Ile Ser Ser Ile Gly Trp
 1 5 10 15
 Ala Phe Ser Glu Asn Asp Glu Leu Lys Asp Cys Gly Val Arg Ile Phe
 20 25 30
 Thr Lys Val Glu Asn Pro Lys Thr Gly Glu Ser Leu Ala Leu Pro Arg
 35 40 45
 Arg Leu Ala Arg Ser Ala Arg Lys Arg Leu Ala Arg Arg Lys Ala Arg
 50 55 60
 Leu Asn His Leu Lys His Leu Ile Ala Asn Glu Phe Lys Leu Asn Tyr
 65 70 75 80
 Glu Asp Tyr Gln Ser Phe Asp Glu Ser Leu Ala Lys Ala Tyr Lys Gly
 85 90 95
 Ser Leu Ile Ser Pro Tyr Glu Leu Arg Phe Arg Ala Leu Asn Glu Leu
 100 105 110
 Leu Ser Lys Gln Asp Phe Ala Arg Val Ile Leu His Ile Ala Lys Arg
 115 120 125
 Arg Gly Tyr Asp Asp Ile Lys Asn Ser Asp Asp Lys Glu Lys Gly Ala
 130 135 140
 Ile Leu Lys Ala Ile Lys Gln Asn Glu Glu Lys Leu Ala Asn Tyr Gln
 145 150 155 160
 Ser Val Gly Glu Tyr Leu Tyr Lys Glu Tyr Phe Gln Lys Phe Lys Glu
 165 170 175
 Asn Ser Lys Glu Phe Thr Asn Val Arg Asn Lys Lys Glu Ser Tyr Glu
 180 185 190
 Arg Cys Ile Ala Gln Ser Phe Leu Lys Asp Glu Leu Lys Leu Ile Phe
 195 200 205
 Lys Lys Gln Arg Glu Phe Gly Phe Ser Phe Ser Lys Lys Phe Glu Glu
 Страница 65

210		215		220											
Glu 225	Val	Leu	Ser	Val	Ala 230	Phe	Tyr	Lys	Arg	Ala 235	Leu	Lys	Asp	Phe	Ser 240
His	Leu	Val	Gly	Asn 245	Cys	Ser	Phe	Phe	Thr 250	Asp	Glu	Lys	Arg	Ala 255	Pro
Lys	Asn	Ser	Pro 260	Leu	Ala	Phe	Met	Phe 265	Val	Ala	Leu	Thr	Arg 270	Ile	Ile
Asn	Leu	Leu 275	Asn	Asn	Leu	Lys	Asn 280	Thr	Glu	Gly	Ile	Leu 285	Tyr	Thr	Lys
Asp	Asp 290	Leu	Asn	Ala	Leu	Leu 295	Asn	Glu	Val	Leu	Lys 300	Asn	Gly	Thr	Leu
Thr 305	Tyr	Lys	Gln	Thr	Lys 310	Lys	Leu	Leu	Gly	Leu 315	Ser	Asp	Asp	Tyr	Glu 320
Phe	Lys	Gly	Glu	Lys 325	Gly	Thr	Tyr	Phe	Ile 330	Glu	Phe	Lys	Lys	Tyr 335	Lys
Glu	Phe	Ile	Lys 340	Ala	Leu	Gly	Glu	His 345	Asn	Leu	Ser	Gln	Asp 350	Asp	Leu
Asn	Glu	Ile 355	Ala	Lys	Asp	Ile	Thr 360	Leu	Ile	Lys	Asp	Glu 365	Ile	Lys	Leu
Lys	Lys 370	Ala	Leu	Ala	Lys	Tyr 375	Asp	Leu	Asn	Gln	Asn 380	Gln	Ile	Asp	Ser
Leu 385	Ser	Lys	Leu	Glu	Phe 390	Lys	Asp	His	Leu	Asn 395	Ile	Ser	Phe	Lys	Ala 400
Leu	Lys	Leu	Val	Thr 405	Pro	Leu	Met	Leu	Glu 410	Gly	Lys	Lys	Tyr	Asp 415	Glu
Ala	Cys	Asn	Glu 420	Leu	Asn	Leu	Lys	Val 425	Ala	Ile	Asn	Glu	Asp 430	Lys	Lys
Asp	Phe	Leu 435	Pro	Ala	Phe	Asn	Glu 440	Thr	Tyr	Tyr	Lys	Asp 445	Glu	Val	Thr
Asn	Pro 450	Val	Val	Leu	Arg	Ala 455	Ile	Lys	Glu	Tyr	Arg 460	Lys	Val	Leu	Asn
Ala 465	Leu	Leu	Lys	Lys	Tyr 470	Gly	Lys	Val	His	Lys 475	Ile	Asn	Ile	Glu	Leu 480
Ala	Arg	Glu	Val	Gly	Lys	Asn	His	Ser	Gln	Arg	Ala	Lys	Ile	Glu	Lys

<400> 80
 tataatctca taagaaattt aaaaaggac taaaataaag agtttgcggg actctgcggg 60
 gttacaatcc cctaaaaccg cttttaaatt t 91

<210> 81
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"

<400> 81
 attttaccat aaagaaattt aaaaaggac taaaac 36

<210> 82
 <211> 95
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"

<220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(20)
 <223> a, c, u, g, unknown or other

<400> 82
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn guuuuagucc cgaaggac uaaaauaaag aguuugcggg 60
 acucugcggg guuacaaucc ccuaaaaccg cuuuu 95

<210> 83
 <211> 69
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"

<400> 83
 gucaccucca augacuagg guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60
 cguuuuuuuu 69

<210> 84
 <211> 69
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"

<400> 84
 gacaucgaug uccuccccau guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaa aaggcuaguc 60
 cguuuuuuu 69

<210> 85
 <211> 69
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"

<400> 85
 gaguccgagc agaagaagaa guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaa aaggcuaguc 60
 cguuuuuuu 69

<210> 86
 <211> 69
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"

<400> 86
 ggggccgaga uggguguuuc guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaa aaggcuaguc 60
 cguuuuuuu 69

<210> 87
 <211> 69
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"

<400> 87
 guggcgagag gggccgagau guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaa aaggcuaguc 60
 cguuuuuuu 69

<210> 88
 <211> 76
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"

<400> 88
 gucaccucca augacuaggg guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaa aaggcuaguc 60

cguuaucauu uuuuuu 76

 <210> 89
 <211> 76
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"

 <400> 89
 gacauCGaug uccucccCau guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaa uaggcuaguc 60
 cguuaucauu uuuuuu 76

 <210> 90
 <211> 76
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"

 <400> 90
 gaguccgagc agaagaaga guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaa uaggcuaguc 60
 cguuaucauu uuuuuu 76

 <210> 91
 <211> 76
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"

 <400> 91
 ggggccgaga ugggguguuc guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaa uaggcuaguc 60
 cguuaucauu uuuuuu 76

 <210> 92
 <211> 76
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"

 <400> 92
 guggcgagag gggccgagau guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaa uaggcuaguc 60
 cguuaucauu uuuuuu 76

 <210> 93

<211> 88
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"

 <400> 93
 gucaccucca augacuaggg guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60
 cguuaucaac uugaaaaagu guuuuuuu 88

 <210> 94
 <211> 88
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"

 <400> 94
 gacaucgaug uccuccccau guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60
 cguuaucaac uugaaaaagu guuuuuuu 88

 <210> 95
 <211> 88
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"

 <400> 95
 gaguccgagc agaagaagaa guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60
 cguuaucaac uugaaaaagu guuuuuuu 88

 <210> 96
 <211> 88
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"

 <400> 96
 ggggccgaga uuggguguuc guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60
 cguuaucaac uugaaaaagu guuuuuuu 88

 <210> 97
 <211> 88
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

```

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 97
guggcgagag gggccgagau guuuuagagc uagaaaauagc aaguuaaaaau aaggcuaguc      60
cguuaucaac uugaaaaaagu guuuuuuuu                                         88

<210> 98
<211> 103
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 98
gucaccucca augacuaggg guuuuagagc uagaaaauagc aaguuaaaaau aaggcuaguc      60
cguuaucaac uugaaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu                             103

<210> 99
<211> 103
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 99
gacaucgaug uccuccccau guuuuagagc uagaaaauagc aaguuaaaaau aaggcuaguc      60
cguuaucaac uugaaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu                             103

<210> 100
<211> 103
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 100
gaguccgagc agaagaagaa guuuuagagc uagaaaauagc aaguuaaaaau aaggcuaguc      60
cguuaucaac uugaaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu                             103

<210> 101
<211> 103
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

```

<400> 101
 ggggccgaga uuggguguuc guuuuagagc uagaaaauagc aaguuaaaa aaggcuaguc 60
 cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 103

<210> 102
 <211> 103
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"

<400> 102
 guggccgagag gggccgagau guuuuagagc uagaaaauagc aaguuaaaa aaggcuaguc 60
 cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu 103

<210> 103
 <211> 102
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polynucleotide"

<400> 103
 gttttagagc tatgctgttt tgaatggtcc caaacggaa gggcctgagt cgcagcagaa 60
 gaagaagttt tagagctatg ctgttttgaa tggccccaaa ac 102

<210> 104
 <211> 100
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 104
 cggaggacaa agtacaaacg gcagaagctg gaggaggaag ggcctgagtc cgagcagaag 60
 aagaagggt cccatcacat caaccggtgg cgcattgcc 100

<210> 105
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 105
 agctggagga ggaagggcct gagtccgagc agaagaagaa gggctcccac 50

<210> 106
 <211> 30
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

Страница 74

oligonucleotide"

<400> 106
gaguccgagc agaagaagaa guuuuagagc 30

<210> 107
<211> 49
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 107
agctggagga ggaagggcct gagtccgagc agaagagaag ggctcccat 49

<210> 108
<211> 53
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 108
ctggaggagg aagggcctga gtccgagcag aagaagaagg gctcccatca cat 53

<210> 109
<211> 52
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 109
ctggaggagg aagggcctga gtccgagcag aagagaaggg ctcccatcac at 52

<210> 110
<211> 54
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 110
ctggaggagg aagggcctga gtccgagcag aagaagaag ggctcccatc acat 54

<210> 111
<211> 50
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 111
ctggaggagg aagggcctga gtccgagcag aagaagggt cccatcacat 50

<210> 112
<211> 47
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 112
ctggaggagg aagggcctga gcccgagcag aagggtccc atcacat 47

<210> 113
<211> 66
<212> DNA

```

<213> Artificial Sequence
<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide"

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(20)
<223> a, c, t, g, unknown or other

<400> 113
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn guuuuagagc uagaauagc aaguuaaaau aaggctagtc 60
cguuuu 66

<210> 114
<211> 20
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 114
gaguccgagc agaagaaga 20

<210> 115
<211> 20
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 115
gacaucgaug uccucccau 20

<210> 116
<211> 20
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 116
gucaccucca augacuaggg 20

<210> 117
<211> 20

```

<212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"
 <400> 117
 auuggguguu cagggcagag 20

<210> 118
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"
 <400> 118
 guggcgagag gggccgagau 20

<210> 119
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"
 <400> 119
 ggggccgaga uuggguguuc 20

<210> 120
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"
 <400> 120
 gugccauag cuaaugcau 20

<210> 121
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"
 <400> 121
 guaccacca caggugccag 20

<210> 122
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"

 <400> 122
 gaaagccucu gggccaggaa 20

 <210> 123
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 123
 ctggaggagg aagggcctga gtccgagcag aagaagaagg gctcccat 48

 <210> 124
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"

 <400> 124
 gaguccgagc agaagaagau 20

 <210> 125
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"

 <400> 125
 gaguccgagc agaagaagua 20

 <210> 126
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Artificial sequence

 <220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial sequence: Synthetic oligonucleotide"

 <400> 126
 gaguccgagc agaagaacaa 20

 <210> 127
 <211> 20
 <212> RNA

<213> Artificial Sequence
 <220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"
 <400> 127
 gaguccgagc agaagaugaa 20

 <210> 128
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"
 <400> 128
 gaguccgagc agaaguagaa 20

 <210> 129
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"
 <400> 129
 gaguccgagc agaugaagaa 20

 <210> 130
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"
 <400> 130
 gaguccgagc acaagaagaa 20

 <210> 131
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"
 <400> 131
 gaguccgagg agaagaagaa 20

 <210> 132

<211> 20
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"

 <400> 132
 gaguccgugc agaagaagaa 20

 <210> 133
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"

 <400> 133
 gagucggagc agaagaagaa 20

 <210> 134
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"

 <400> 134
 gagaccgagc agaagaagaa 20

 <210> 135
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"

 <400> 135
 aatgacaagc ttgctagcgg tggg 24

 <210> 136
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"

 <400> 136
 aaaacggaag ggcctgagtc cgagcagaag aagaagttt 39

<210> 137
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"
 <400> 137
 aaacaggggc cgagattggg tggtcagggc agaggtttt 39

<210> 138
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"
 <400> 138
 aaaacggaag ggcctgagtc cgagcagaag aagaagtt 38

<210> 139
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"
 <400> 139
 aacggagga ggggcacaga tgagaaactc agggttttag 40

<210> 140
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 140
 agcccttctt cttctgctcg gactcaggcc cttcctcc 38

<210> 141
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 141
 caggagggga ggggcacaga tgagaaactc aggaggcccc 40

<210> 142
 <211> 80
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <221> source

Страница 81

```

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 142
ggcaatgcg caccggttga tgtgatggga gcccttctag gaggcccca gagcagccac      60
tggggcctca acactcaggc                                             80

<210> 143
<211> 98
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 143
ggacgaaaca ccggaacct tcaaaacagc atagcaagtt aaaataaggc tagtccgtta      60
tcaacttgaa aaagtggcac cgagtcggtg cttttttt                          98

<210> 144
<211> 186
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"

<400> 144
ggacgaaaca ccggtagtat taagtattgt tttatggctg ataaatttct tgaatttct      60
ccttgattat ttgttataaa agttataaaa taatcttggt ggaaccattc aaaacagcat    120
agcaagttaa aataaggcta gtccgttatc aacttgaaaa agtggcaccg agtcggtgct    180
tttttt                                             186

<210> 145
<211> 46
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(19)
<223> a, c, u, g, unknown or other

<400> 145
nnnnnnnnnn nnnnnnnng uuauuguacu cusaagauuu auuuuuu                    46

<210> 146
<211> 91
<212> RNA

```


<213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"

<400> 146
 guuacuuaaa ucuugcagaa gcuacaaaga uaaggcuuca ugccgaauc aacaccugu 60
 cauuuuuagg caggguuuu ucguuuuuu a 91

<210> 147
 <211> 70
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 147
 ttttctagtg ctgagtttct gtgactcctc tacattctac ttctctgtgt ttctgtatac 60
 tacctcctcc 70

<210> 148
 <211> 122
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 148
 ggaggaagg cctgagtccg agcagaagaa gaagggtcc catcacatca accggtggcg 60
 cattgccacg aagcaggcca atggggagga catcgatgtc acctccaatg actaggggtg 120
 gc 122

<210> 149
 <211> 48
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"

<220>
 <221> modified_base
 <222> (3)..(32)
 <223> a, c, u, g, unknown or other

<400> 149
 acnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnguuiuuga gcuaugcu 48

<210> 150
 <211> 67
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"

<220>

<221> source
 <223> /note="Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic oligonucleotide"

 <400> 150
 agcauagcaa guaaaaauaa ggctaguccg uuaucaacuu gaaaaagugg caccgagucg 60
 gugcuuu 67

 <210> 151
 <211> 62
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"

 <220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(20)
 <223> a, c, u, g, unknown or other

 <400> 151
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60
 cg 62

 <210> 152
 <211> 73
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"

 <400> 152
 tgaatgggcc caaacggaa gggcctgagt ccgagcagaa gaagaagttt tagagctatg 60
 ctgttttgaa tgg 73

 <210> 153
 <211> 99
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"

 <220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(20)
 <223> a, c, u, g, unknown or other

 <400> 153
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60
 сгуиаусаас иигааааагу гсасссгагу сгдигсии 99
 Страница 84

<210> 154
 <211> 127
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

 <400> 154
 guuuuuugac ucucaagauu uaaguaacug uacaacguua cuuaaaucuu gcagaagcua 60
 caagauaag gcuucaugcc gaaaucaaca cccugucauu uuauggcagg guguuuucgu 120
 uuuuuuaa 127

 <210> 155
 <211> 56
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"

 <220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(20)
 <223> a, c, t, g, unknown or other

 <400> 155
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn gttttgtac tctcaagatt taagtaactg tacaac 56

 <210> 156
 <211> 91
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"

 <400> 156
 gttacttaaa tcttcagaa gctacaaaga taaggcttca tgccgaaatc aacaccctgt 60
 cattttatgg cagggtgttt tcgttattta a 91

 <210> 157
 <211> 134
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

 <220>

```

<221> modified_base
<222> (1)..(20)
<223> a, c, t, g, unknown or other

<400> 157
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn gttttgtac tctcaagatt taaggaaact aaatcttgca      60
gaagctacaa agataaggct tcatgccgaa atcaacaccc tgcatttta tggcagggtg      120
ttttcgttat ttaa                                                         134

<210> 158
<211> 131
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
      polynucleotide"

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(20)
<223> a, c, t, g, unknown or other

<400> 158
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn gttttgtac tctcaagatt tagaaataaa tcttgcagaa      60
gctacaaga taaggcttca tgccgaaatc aacaccctgt cattttatgg cagggtgttt      120
tcgttattta a                                                             131

<210> 159
<211> 125
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
      polynucleotide"

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(20)
<223> a, c, t, g, unknown or other

<400> 159
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn gttttgtac tctcaagatg aaaatcttgc agaagctaca      60
aagataaggc ttcatgccga aatcaacacc ctgtcatttt atggcagggt gttttcgtta      120
ttaa                                                                       125

<210> 160
<211> 112
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

```

Страница 86

polynucleotide"

```

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(20)
<223> a, c, t, g, unknown or other

<400> 160
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn gttttgtac tctgaaaaga agctacaaag ataaggcttc      60
atgccgaaat caacaccctg tcattttatg gcagggtggtt ttcgttattt aa          112

<210> 161
<211> 107
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
      polynucleotide"

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(20)
<223> a, c, t, g, unknown or other

<400> 161
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn gttttgtac tgaaaagcta caagataag gcttcatgcc      60
gaaatcaaca ccctgtcatt ttatggcagg gtgttttcgt tatttaa          107

<210> 162
<211> 108
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
      polynucleotide"

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(20)
<223> a, c, t, g, unknown or other

<400> 162
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn gttttgtac tctcaagatt tagaaataaa tcttgcaaaa      60
gctacaaga taaggcttca tgccgaaatc aacaccctgt cattttat          108

<210> 163
<211> 86
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
      oligonucleotide"

```

Страница 87

```

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(20)
<223> a, c, t, g, unknown or other

<400> 163
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn gttttgtac tctcaagatt tagaaataaa tcttgcaaaa      60
gctacaaaga taaggcttca tgccga                                           86

<210> 164
<211> 79
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
      oligonucleotide"

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(20)
<223> a, c, t, g, unknown or other

<400> 164
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn gttttgtac tctcaagatt tagaaataaa tcttgcaaaa      60
gctacaaaga taaggcttc                                                    79

<210> 165
<211> 73
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial sequence: Synthetic
      oligonucleotide"

<220>
<221> modified_base
<222> (1)..(20)
<223> a, c, t, g, unknown or other

<400> 165
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn gttttgtac tctcaagatt tagaaataaa tcttgcaaaa      60
gctacaaaga taa                                                            73

<210> 166
<211> 125
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
      polynucleotide"

<400> 166
giiiiiaagucc siiiiiiaaaa uisiiiiiaugg uaaaaiiaia auisiaiaag aaiiiiiaaaa      60

```

agggacuaaa auaaagaguu ugcgggacuc ugcggggguua caauccscua aaaccgcuuu	120
uaaaa	125
<210> 167 <211> 91 <212> RNA <213> Artificial Sequence	
<220> <221> source <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"	
<400> 167	
guuacuuaaa ucuugcagaa gcuacaaaga uaaggcuuca ugccgaaauc aacaccugu	60
cauuuuauagg caggguuuu ucguuuuuu a	91
<210> 168 <211> 56 <212> RNA <213> Artificial Sequence	
<220> <221> source <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"	
<400> 168	
gggacucaac caagucauuc guuuuuguac ucucaagauu uaaguaacug uacaac	56
<210> 169 <211> 147 <212> RNA <213> Artificial Sequence	
<220> <221> source <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"	
<400> 169	
gggacucaac caagucauuc guuuuuguac ucucaagauu uaaguaacug uacaacguua	60
cuuuuuuuuu gcagaagcua caagauaag gcuucaugcc gaaaucaaca cccugucauu	120
uuauaggcagg guguuuucgu uuuuuua	147
<210> 170 <211> 70 <212> RNA <213> Artificial Sequence	
<220> <221> source <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"	
<400> 170	
cuugcagaag cuacaagau aaggcuucau gccgaaauca acaccuguc auuuuuaggc	60
aggguuuuu	70

<210> 171
 <211> 42
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"

 <400> 171
 gggacucaac caagucuuu guuuuuuguac ucucaagauu ua 42

 <210> 172
 <211> 112
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

 <400> 172
 gggacucaac caagucuuu guuuuuuguac ucucaagauu uacuugcaga agcuacaaaag 60
 auaaggcuuc augccgaaau caacaccug ucauuuuuauug gcaggguguu uu 112

 <210> 173
 <211> 116
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

 <400> 173
 gggacucaac caagucuuu guuuuuuguac ucucaagauu uagaacuug cagaagcuac 60
 aaagauaagg cucaugccg aaaucaacac ccugucuuuu uauggcaggg uguuuu 116

 <210> 174
 <211> 116
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

 <400> 174
 gggacucaac caagucuuu guuuuuuguac ucucaagauu uagaacuug cagaagcuac 60
 aaagauaagg cucaugccg aaaucaacac ccugucuuuu uauggcaggg uguuuu 116

 <210> 175
 <211> 102
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

 <400> 175
 gggacucaac caagucauuc guuuuuguag aaauacaaag auaaggcuuc augccgaaau 60
 caacacccug ucauuuuuug gcaggguguu uucguuuuu aa 102

 <210> 176
 <211> 102
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

 <400> 176
 gggacucaac caagucauuc guuuuuguag aaauacaaag auaaggcuuc augccgaaau 60
 caacacccug ucauuuuuug gcaggguguu uucguuuuu aa 102

 <210> 177
 <211> 57
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"

 <400> 177
 gggacucaac caagucauuc guuuuuguag aaauacaaag auaaggcuuc augccga 57

 <210> 178
 <211> 57
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"

 <400> 178
 gggacucaac caagucauuc guuuuuguag aaauacaaag auaaggcuuc augccga 57

 <210> 179
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"

 <400> 179
 gtgggtgtcac gctcgtcgtt tgg 23

<210> 180
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"

 <400> 180
 tccagtctat taattgttgc cgg 23

 <210> 181
 <211> 64
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <400> 181
 caagaggcctt gagtaggaga ggagtgccgc cgaggcgggg cggggcgggg cgtggagctg 60
 ggct 64

 <210> 182
 <211> 99
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"

 <220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(20)
 <223> a, c, u, g, unknown or other

 <400> 182
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn guauuagagc uagaaaauagc aaguuauau aaggcuaguc 60
 cguaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuu 99

 <210> 183
 <211> 119
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

 <220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(20)
 <223> a, c, u, g, unknown or other

 <400> 183
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn guuuuagagc uaugciguuu uggaacaaa acagcauagc 60

aaguuaaaau aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuu 119

<210> 184
 <211> 119
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<220>
 <221> modified_base
 <222> (1)..(20)
 <223> a, c, u, g, unknown or other

<400> 184
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn guauuagagc uaugciguau uggaacaau acagcauagc 60
 aaguuaauau aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuu 119

<210> 185
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 185
 tagcgggtaa gc 12

<210> 186
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 186
 tcggtgacat gt 12

<210> 187
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 187
 actcccgta gg 12

<210> 188
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 188
 actgctgtt aa 12

<210> 189
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 189
 acgtcgctg at 12

<210> 190 <211> 12 <212> DNA <213> Homo sapiens	
<400> 190 taggtcgacc ag	12
<210> 191 <211> 12 <212> DNA <213> Homo sapiens	
<400> 191 ggcgttaatg at	12
<210> 192 <211> 12 <212> DNA <213> Homo sapiens	
<400> 192 tgtcgcatgt ta	12
<210> 193 <211> 12 <212> DNA <213> Homo sapiens	
<400> 193 atggaaacgc at	12
<210> 194 <211> 12 <212> DNA <213> Homo sapiens	
<400> 194 gccgaattcc tc	12
<210> 195 <211> 12 <212> DNA <213> Homo sapiens	
<400> 195 gcatgtacg ga	12
<210> 196 <211> 12 <212> DNA <213> Homo sapiens	
<400> 196 cgg tactctt ac	12
<210> 197 <211> 12 <212> DNA	

Страница 94

<213> Homo sapiens	
<400> 197 gcctgtgccg ta	12
<210> 198 <211> 12 <212> DNA <213> Homo sapiens	
<400> 198 tacggtaagt cg	12
<210> 199 <211> 12 <212> DNA <213> Homo sapiens	
<400> 199 cacgaaatta cc	12
<210> 200 <211> 12 <212> DNA <213> Homo sapiens	
<400> 200 aaccaagata cg	12
<210> 201 <211> 12 <212> DNA <213> Homo sapiens	
<400> 201 gagtcgatac gc	12
<210> 202 <211> 12 <212> DNA <213> Homo sapiens	
<400> 202 gtctcacgat cg	12
<210> 203 <211> 12 <212> DNA <213> Homo sapiens	
<400> 203 tcgtcgggtg ca	12
<210> 204 <211> 12 <212> DNA <213> Homo sapiens	
<400> 204 actccgtagt ga	12

<210> 205 <211> 12 <212> DNA <213> Homo sapiens	
<400> 205 caggacgtcc gt	12
<210> 206 <211> 12 <212> DNA <213> Homo sapiens	
<400> 206 tcgtatccct ac	12
<210> 207 <211> 12 <212> DNA <213> Homo sapiens	
<400> 207 tttcaaggcc gg	12
<210> 208 <211> 12 <212> DNA <213> Homo sapiens	
<400> 208 cgccggtgga at	12
<210> 209 <211> 12 <212> DNA <213> Homo sapiens	
<400> 209 gaaccgtcc ta	12
<210> 210 <211> 12 <212> DNA <213> Homo sapiens	
<400> 210 gattcatcag cg	12
<210> 211 <211> 12 <212> DNA <213> Homo sapiens	
<400> 211 acaccgtct tc	12
<210> 212 <211> 12 <212> DNA <213> Homo sapiens	

Страница 96

<400> 212 atcgtgccct aa	12
<210> 213 <211> 12 <212> DNA <213> Homo sapiens	
<400> 213 gcgtcaatgt tc	12
<210> 214 <211> 12 <212> DNA <213> Homo sapiens	
<400> 214 ctccgtatct cg	12
<210> 215 <211> 12 <212> DNA <213> Homo sapiens	
<400> 215 ccgattcctt cg	12
<210> 216 <211> 12 <212> DNA <213> Homo sapiens	
<400> 216 tgcgctcca gt	12
<210> 217 <211> 12 <212> DNA <213> Homo sapiens	
<400> 217 taacgtcgga gc	12
<210> 218 <211> 12 <212> DNA <213> Homo sapiens	
<400> 218 aaggtcgccc at	12
<210> 219 <211> 12 <212> DNA <213> Homo sapiens	
<400> 219 gtcgggact at	12

<210> 220 <211> 12 <212> DNA <213> Homo sapiens	
<400> 220 ttcgagcgat tt	12
<210> 221 <211> 12 <212> DNA <213> Homo sapiens	
<400> 221 tgagtcgtcg ag	12
<210> 222 <211> 12 <212> DNA <213> Homo sapiens	
<400> 222 tttacgcaga gg	12
<210> 223 <211> 12 <212> DNA <213> Homo sapiens	
<400> 223 aggaagtatc gc	12
<210> 224 <211> 12 <212> DNA <213> Homo sapiens	
<400> 224 actcgatacc at	12
<210> 225 <211> 12 <212> DNA <213> Homo sapiens	
<400> 225 cgctacatag ca	12
<210> 226 <211> 12 <212> DNA <213> Homo sapiens	
<400> 226 ttcataaccg gc	12
<210> 227 <211> 12 <212> DNA <213> Homo sapiens	

<400> 227 ccaaacggtt aa	12
<210> 228 <211> 12 <212> DNA <213> Homo sapiens	
<400> 228 cgattccttc gt	12
<210> 229 <211> 12 <212> DNA <213> Homo sapiens	
<400> 229 cgtcatgaat aa	12
<210> 230 <211> 12 <212> DNA <213> Homo sapiens	
<400> 230 agtggcgatg ac	12
<210> 231 <211> 12 <212> DNA <213> Homo sapiens	
<400> 231 cccctacggc ac	12
<210> 232 <211> 12 <212> DNA <213> Homo sapiens	
<400> 232 gccaaccgac ac	12
<210> 233 <211> 12 <212> DNA <213> Homo sapiens	
<400> 233 tgggacaccg gt	12
<210> 234 <211> 12 <212> DNA <213> Homo sapiens	
<400> 234 ttgactgcgg cg	12
<210> 235	

Страница 99

<211> 12	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 235	
actatgcgta gg	12
<210> 236	
<211> 12	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 236	
tcacccaaag cg	12
<210> 237	
<211> 12	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 237	
gcaggacgtc cg	12
<210> 238	
<211> 12	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 238	
acaccgaaaa cg	12
<210> 239	
<211> 12	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 239	
cggtgtattg ag	12
<210> 240	
<211> 12	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 240	
cacgaggtat gc	12
<210> 241	
<211> 12	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 241	
taaagcgacc cg	12
<210> 242	
<211> 12	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 242	

Страница 100

cttagtcggc ca	12
<210> 243 <211> 12 <212> DNA <213> Homo sapiens	
<400> 243 cgaaaacgtg gc	12
<210> 244 <211> 12 <212> DNA <213> Homo sapiens	
<400> 244 cgtgccctga ac	12
<210> 245 <211> 12 <212> DNA <213> Homo sapiens	
<400> 245 tttaccatcg aa	12
<210> 246 <211> 12 <212> DNA <213> Homo sapiens	
<400> 246 cgtagccatg tt	12
<210> 247 <211> 12 <212> DNA <213> Homo sapiens	
<400> 247 cccaaacggt ta	12
<210> 248 <211> 12 <212> DNA <213> Homo sapiens	
<400> 248 gcgttatcag aa	12
<210> 249 <211> 12 <212> DNA <213> Homo sapiens	
<400> 249 tcgatggtaa ac	12
<210> 250 <211> 12	

<212> DNA <213> Homo sapiens	
<400> 250 cgactttttg ca	12
<210> 251 <211> 12 <212> DNA <213> Homo sapiens	
<400> 251 tcgacgactc ac	12
<210> 252 <211> 12 <212> DNA <213> Homo sapiens	
<400> 252 acgcgtcaga ta	12
<210> 253 <211> 12 <212> DNA <213> Homo sapiens	
<400> 253 cgtacggcac ag	12
<210> 254 <211> 12 <212> DNA <213> Homo sapiens	
<400> 254 ctatgccgtg ca	12
<210> 255 <211> 12 <212> DNA <213> Homo sapiens	
<400> 255 cgcgtcagat at	12
<210> 256 <211> 12 <212> DNA <213> Homo sapiens	
<400> 256 aagatcggta gc	12
<210> 257 <211> 12 <212> DNA <213> Homo sapiens	
<400> 257 cttcgcaagg ag	12

Страница 102

```

<210> 258
<211> 12
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 258
gtcgtggact ac 12

<210> 259
<211> 12
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 259
ggtcgtcatc aa 12

<210> 260
<211> 12
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 260
gttaacagcg tg 12

<210> 261
<211> 12
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 261
tagctaaccg tt 12

<210> 262
<211> 12
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 262
agtaaaggcg ct 12

<210> 263
<211> 12
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 263
ggtaatttcg tg 12

<210> 264
<211> 147
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

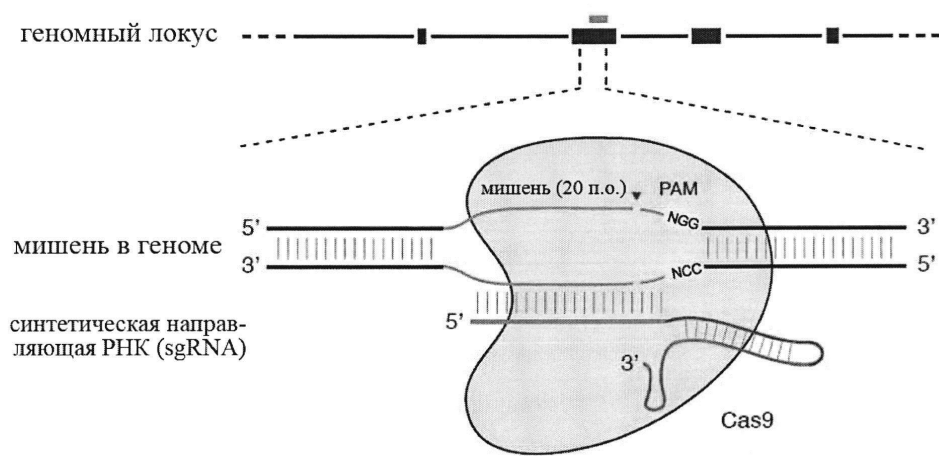
<220>
<221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"

<220>

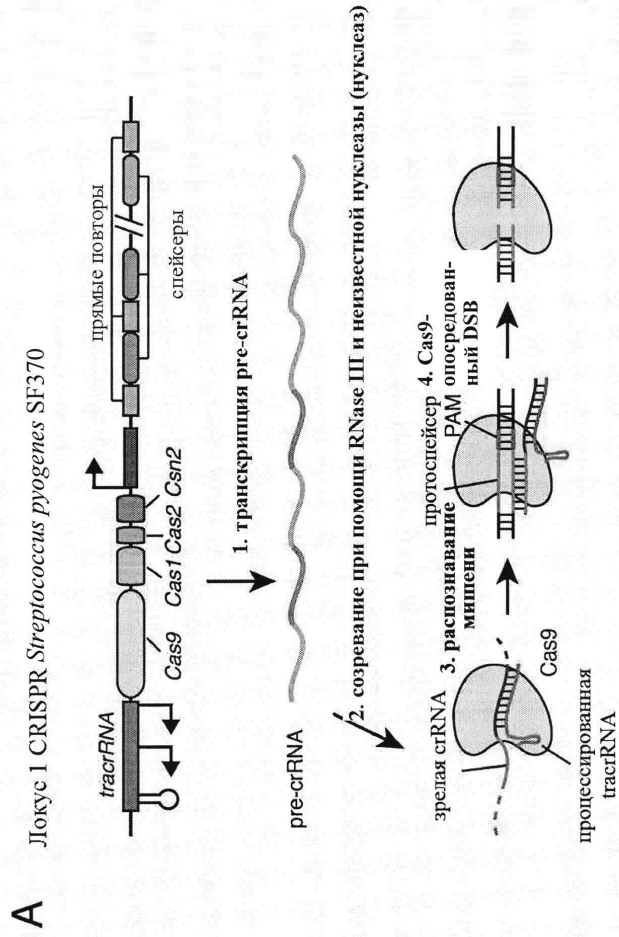
```

<221> modified_base
<222> (1)..(20)
<223> a, c, u, g, unknown or other

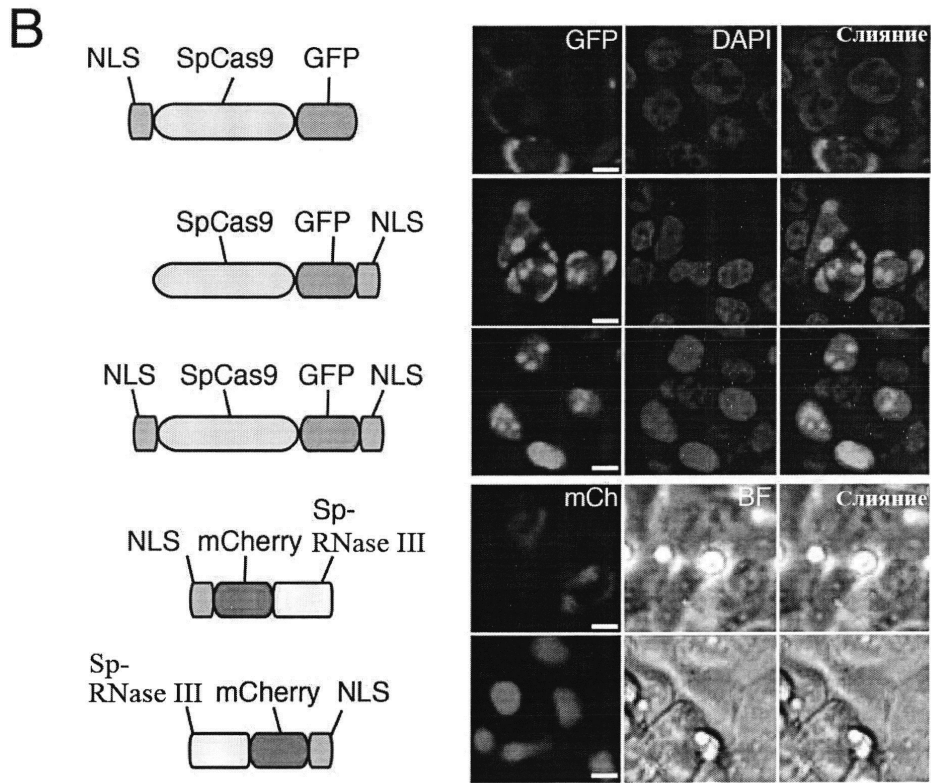
<400> 264
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn guuuuaguac uciguauuuu uagguaugag guagacgaaa 60
auuguacuua uaccuaaaau uacagaaucu acuaaaacaa ggcaaaaugc cguguuuuac 120
ucgucaacuu guuggcgaga uuuuuuuu 147



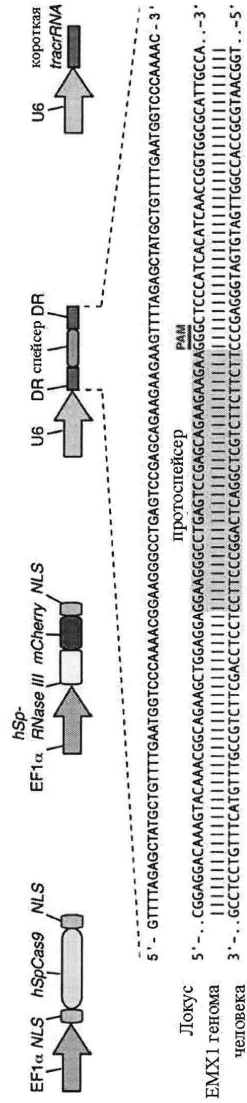
Фиг. 1



Фиг. 2А



Фиг. 2В

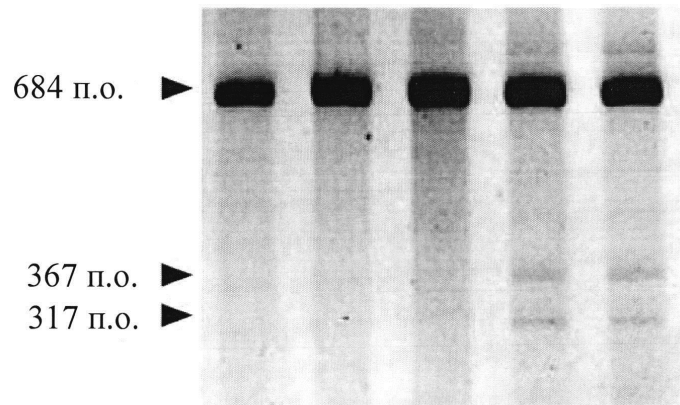


Фиг. 2С

5/44

D

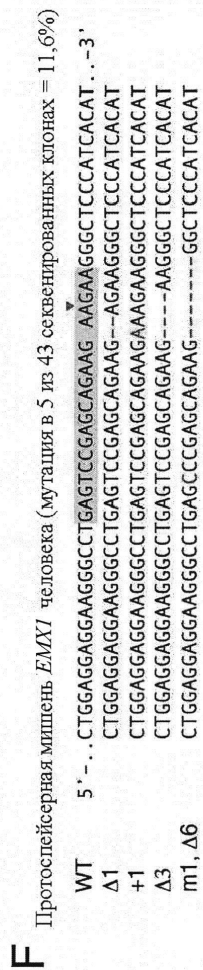
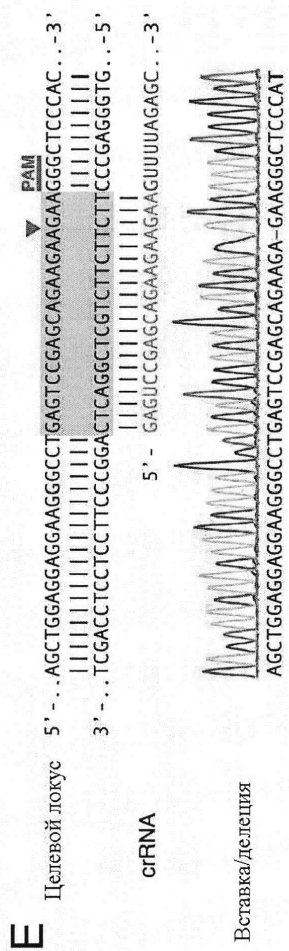
2xNLS-SpCas9	+	+	+	+	+
SpRNAse III	-	+	+	-	+
короткая tracrRNA	-	+	-	+	+
DR-EMX1-DR	+	-	+	+	+



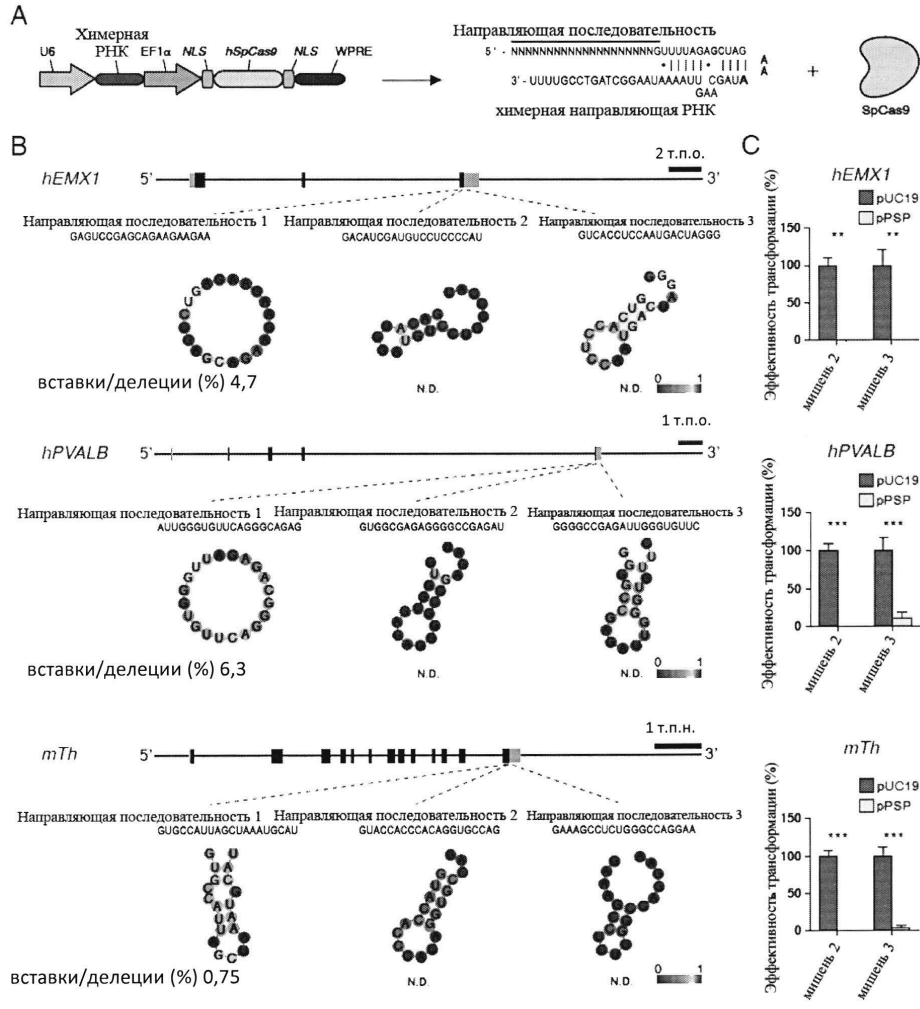
вставки/делеции (%)

4,7 5,0

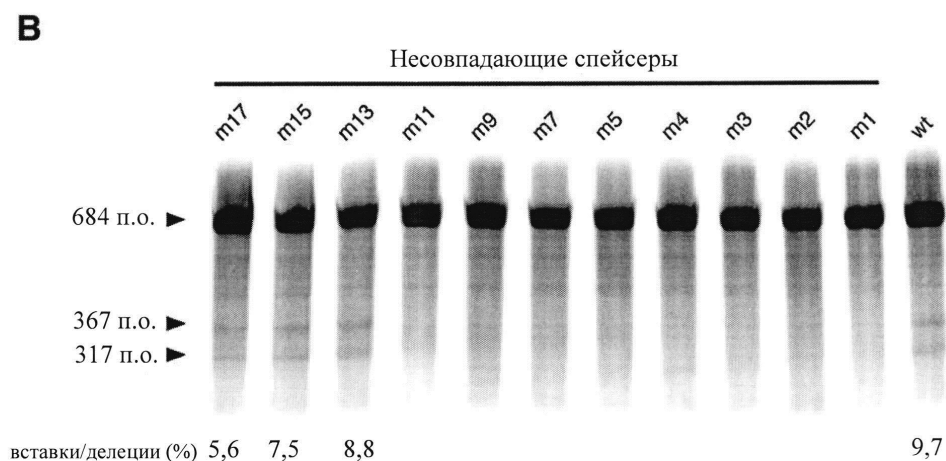
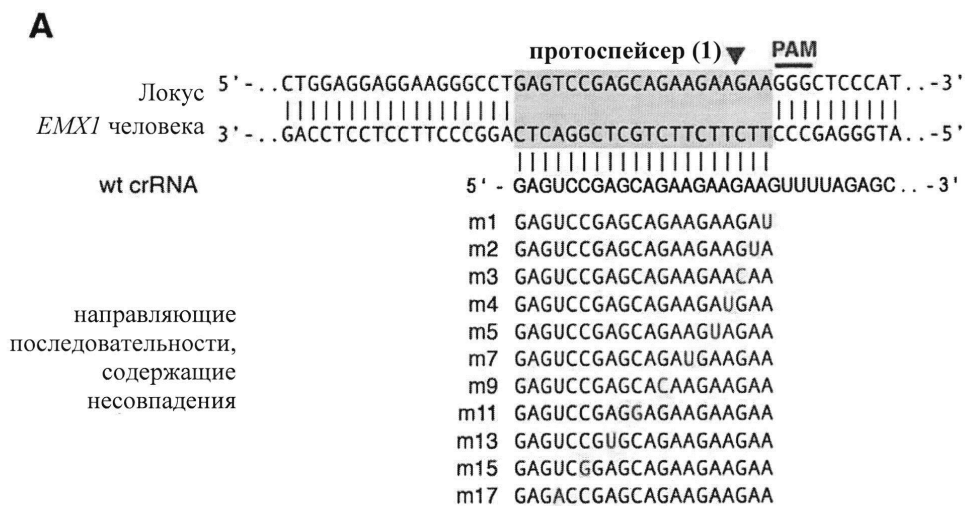
Фиг. 2D



Фиг. 2E-F

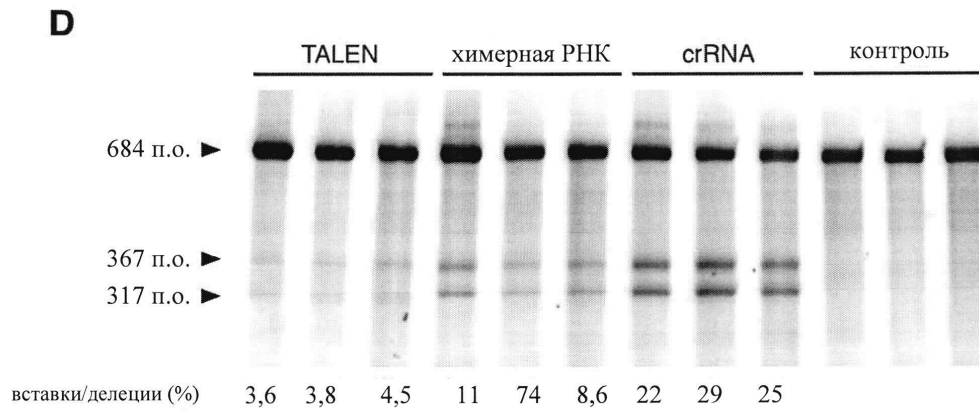


Фиг. 3А-С

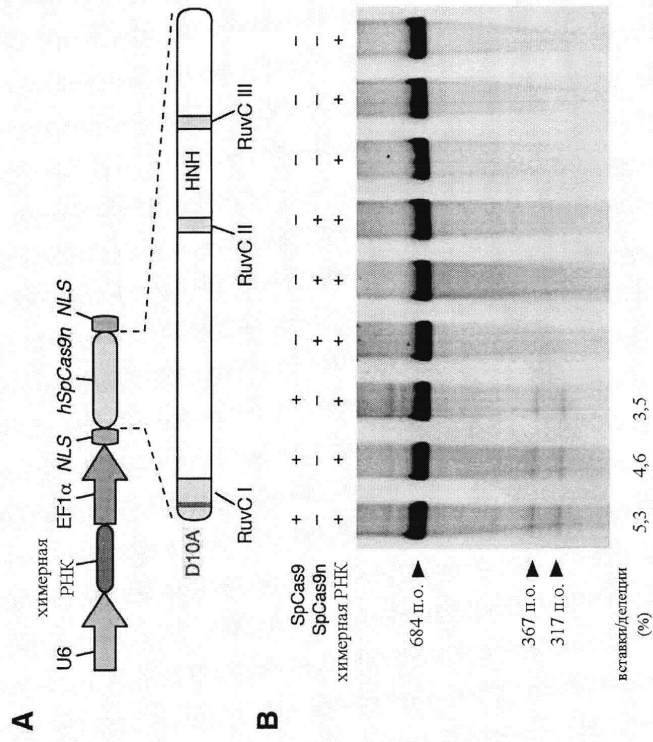


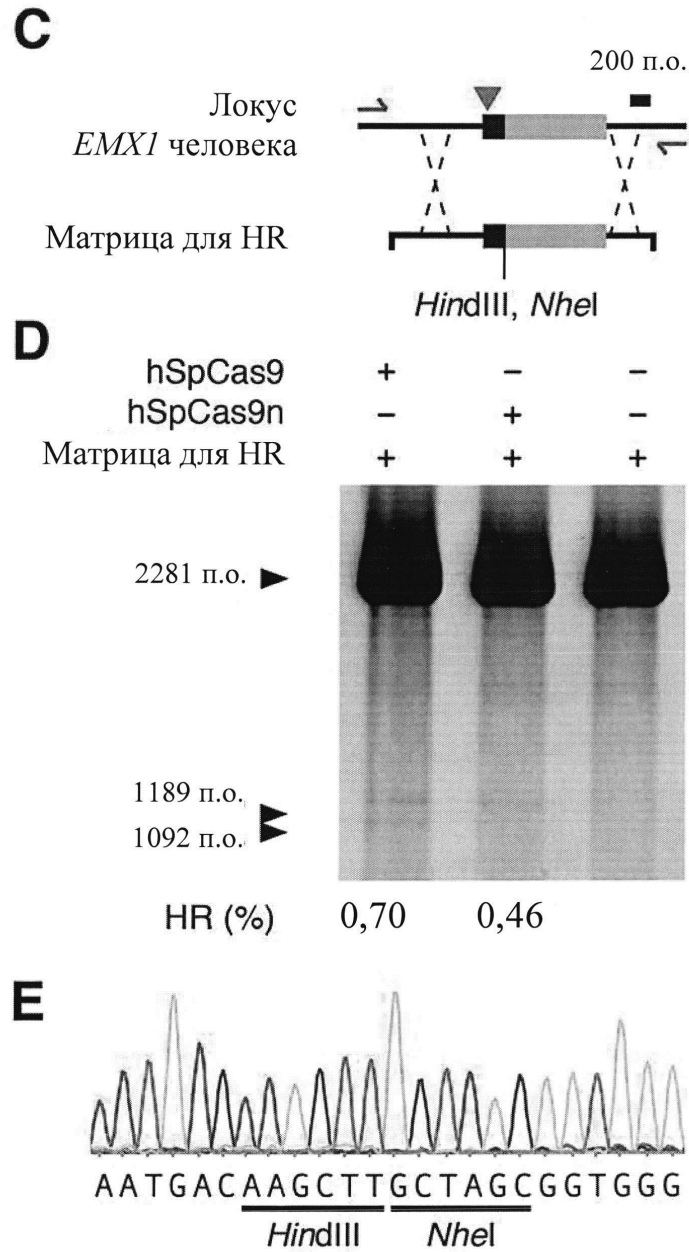
Фиг. 4А-С

9/44

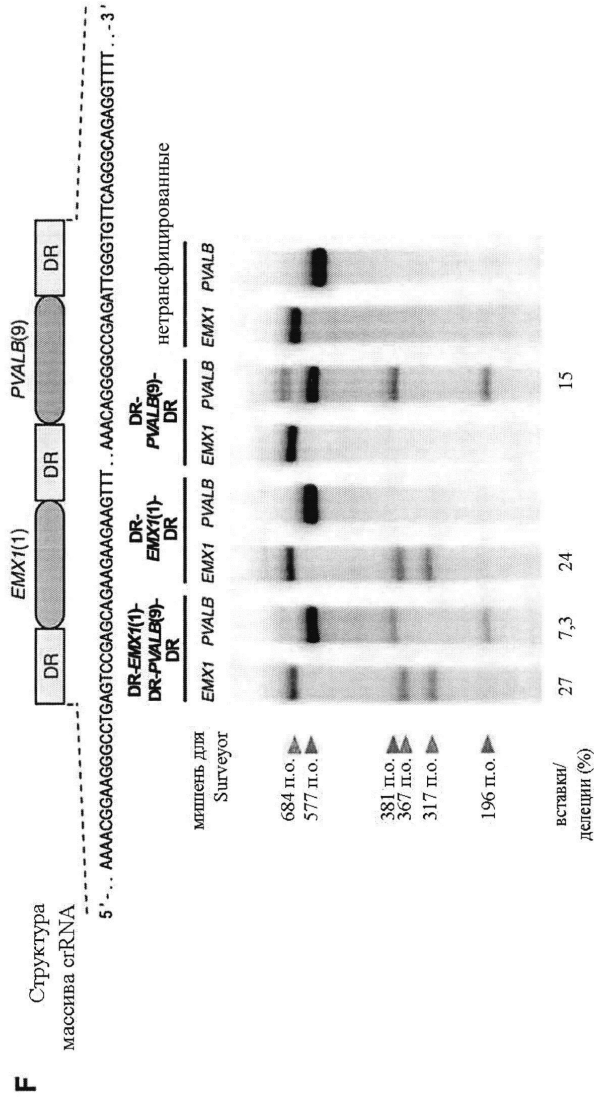


Фиг. 4D



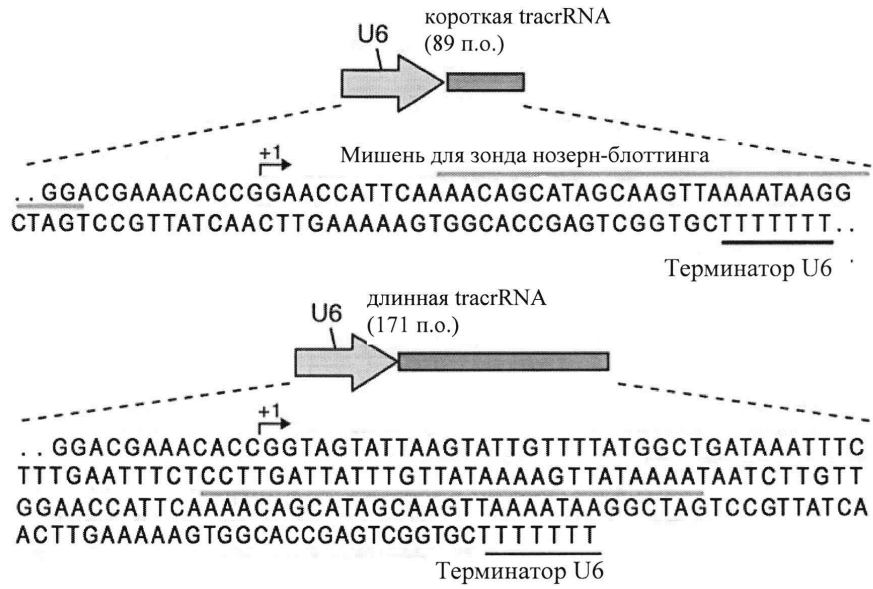


Фиг. 5C-E

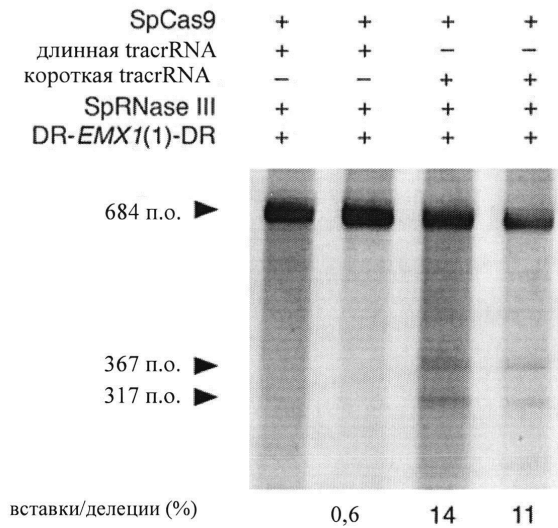


Фиг. 5F

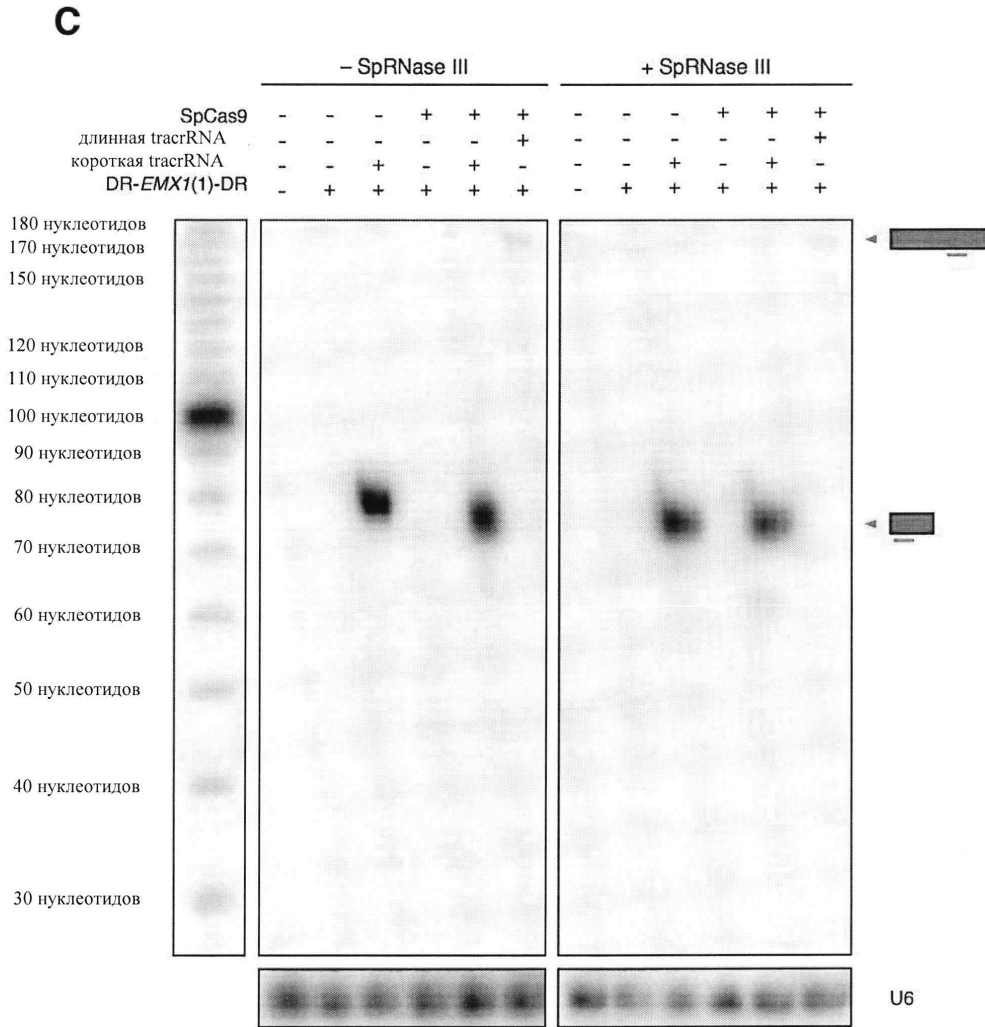
A



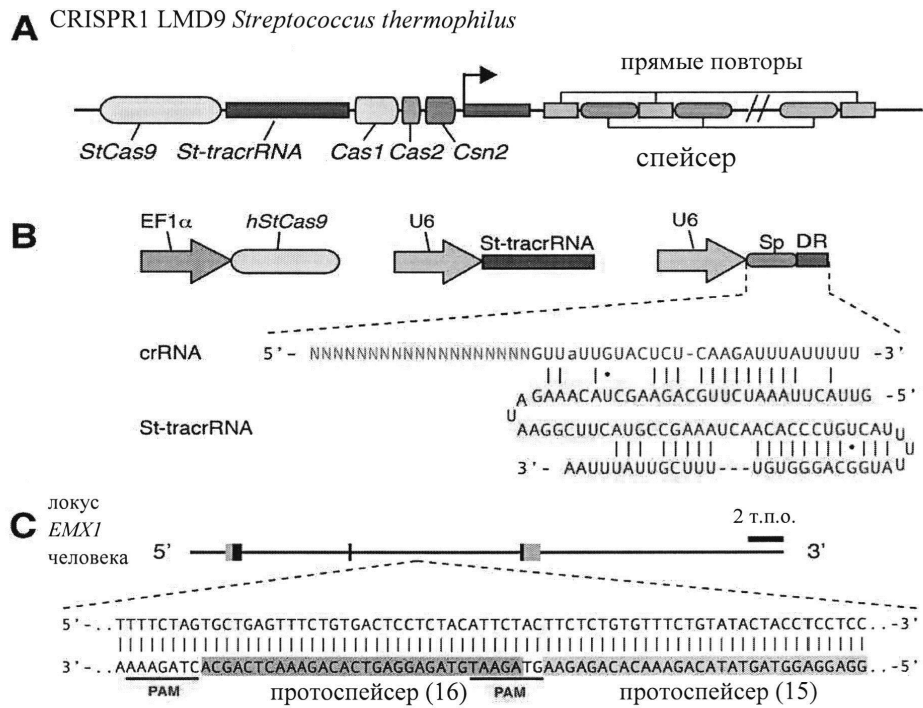
B



Фиг. 6А-В



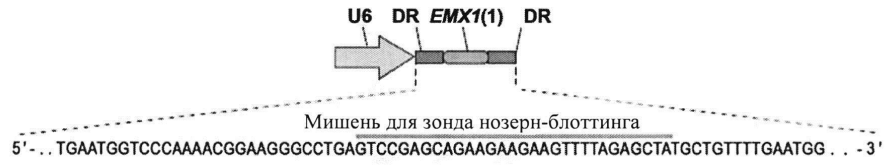
Фиг. 6С



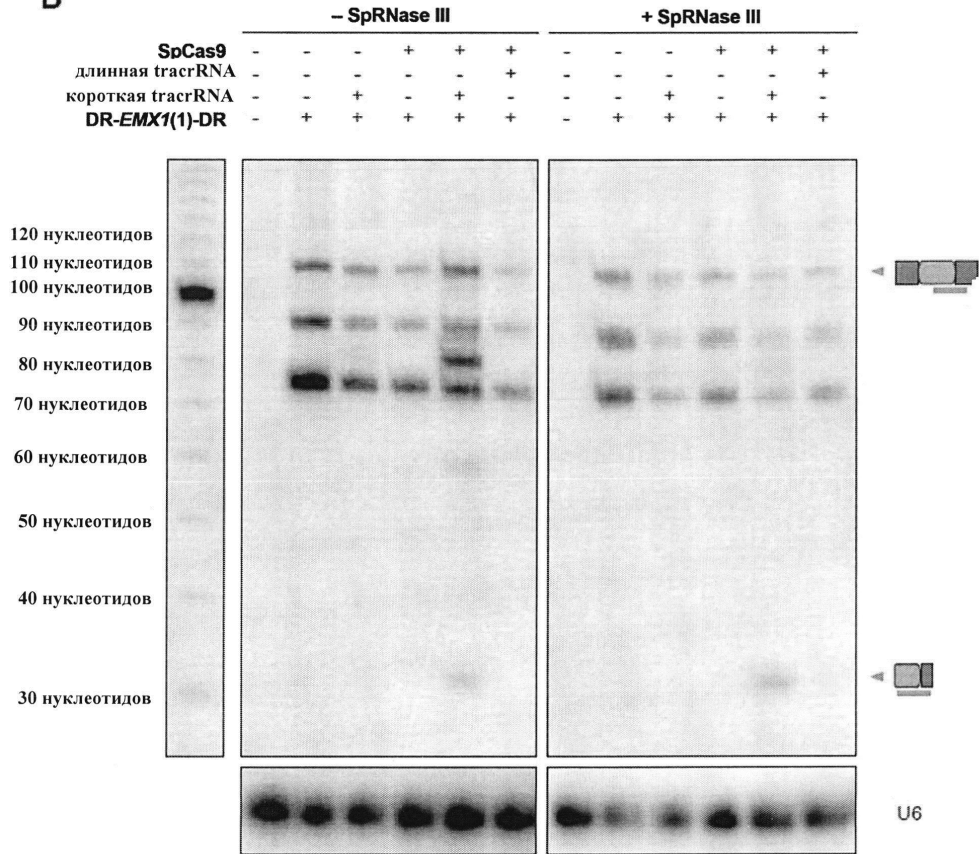
Фиг. 7А-С

19/44

A

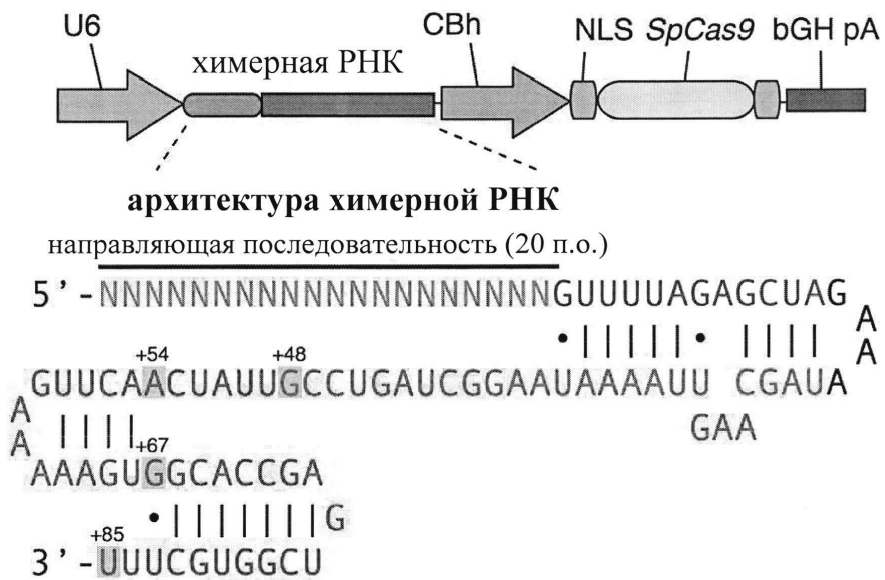


B

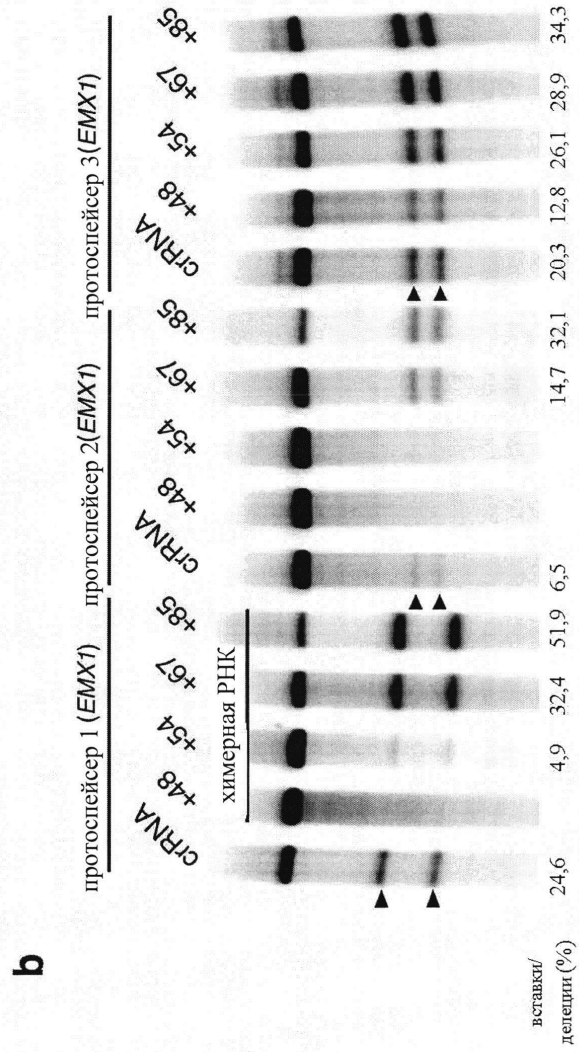


Фиг. 9А-В

a

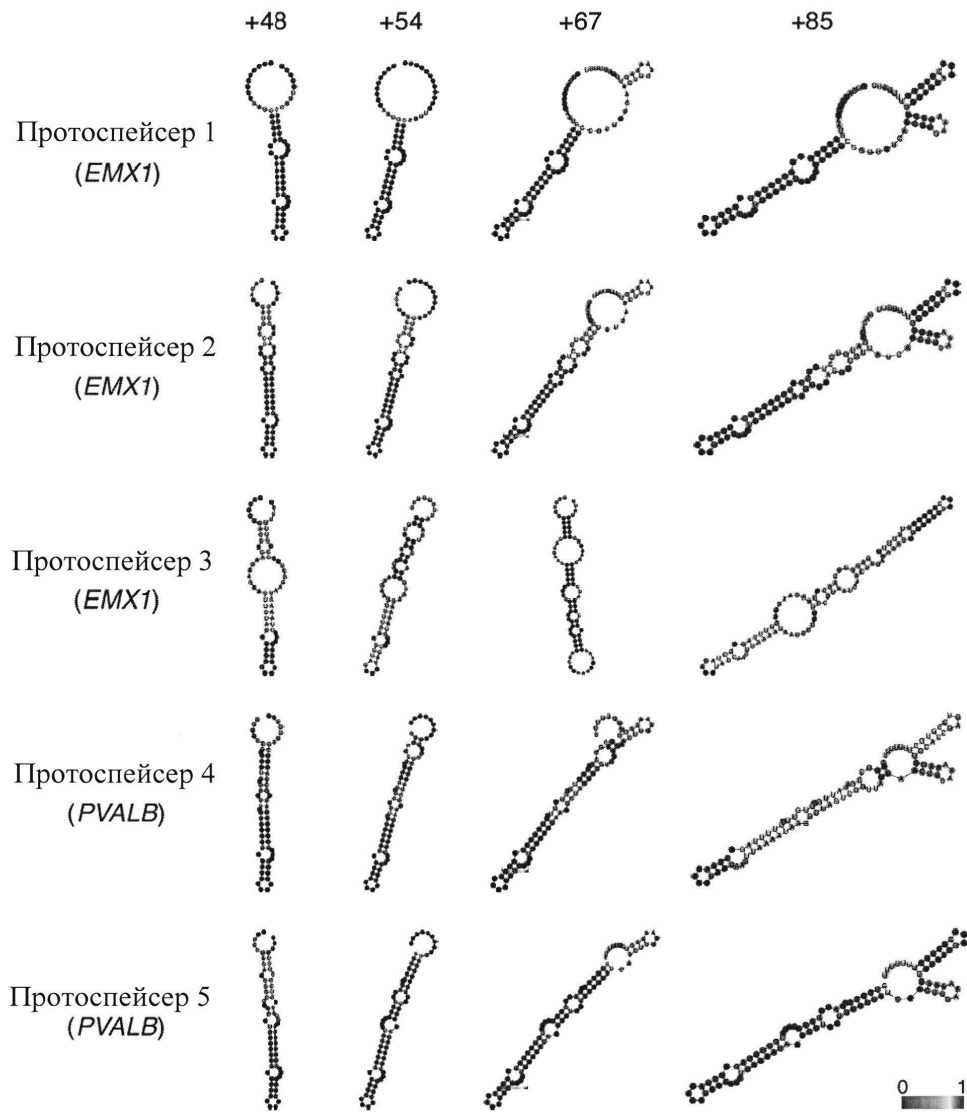


Фиг. 10А

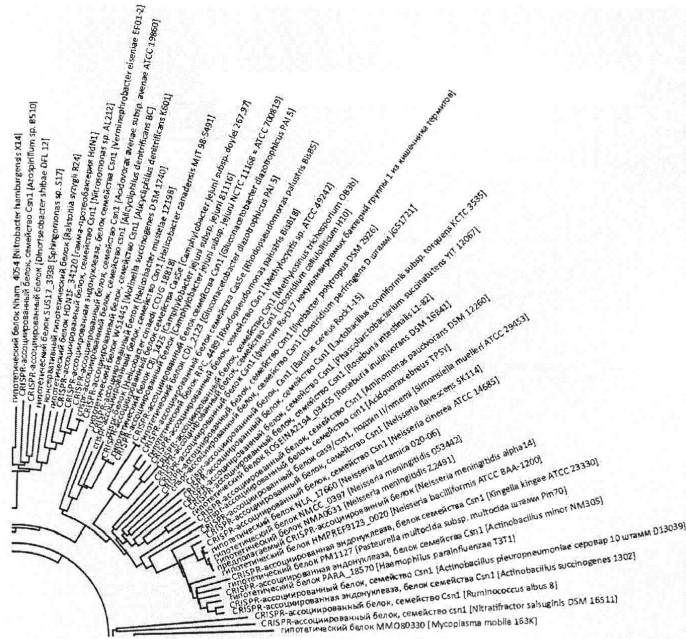


Фиг. 10В

24/44



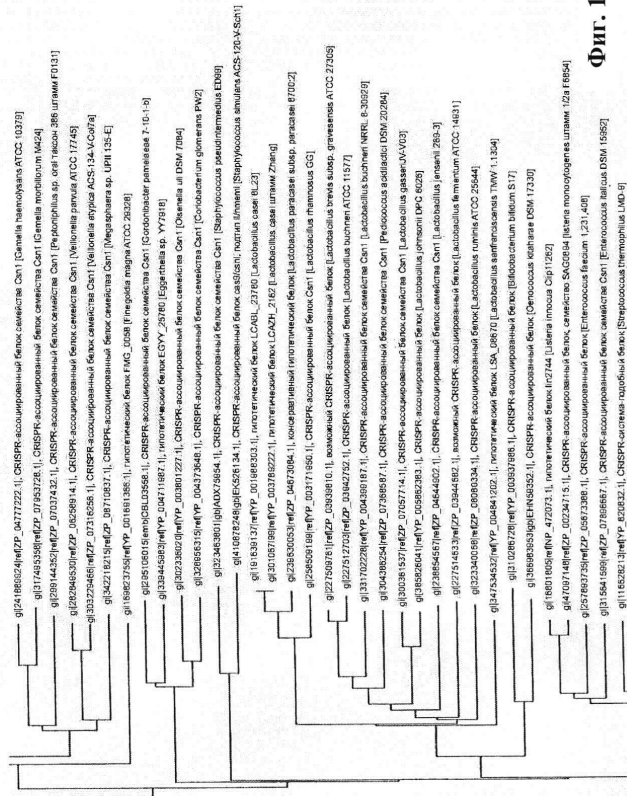
Фиг. 12



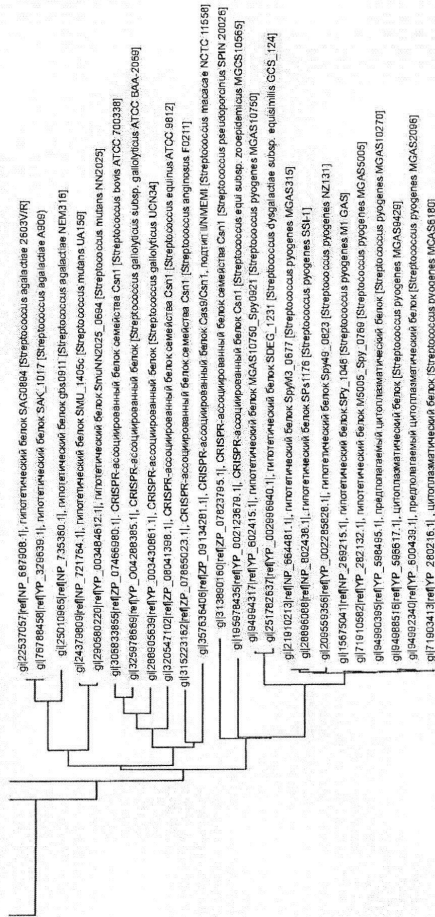
Фиг. 13В



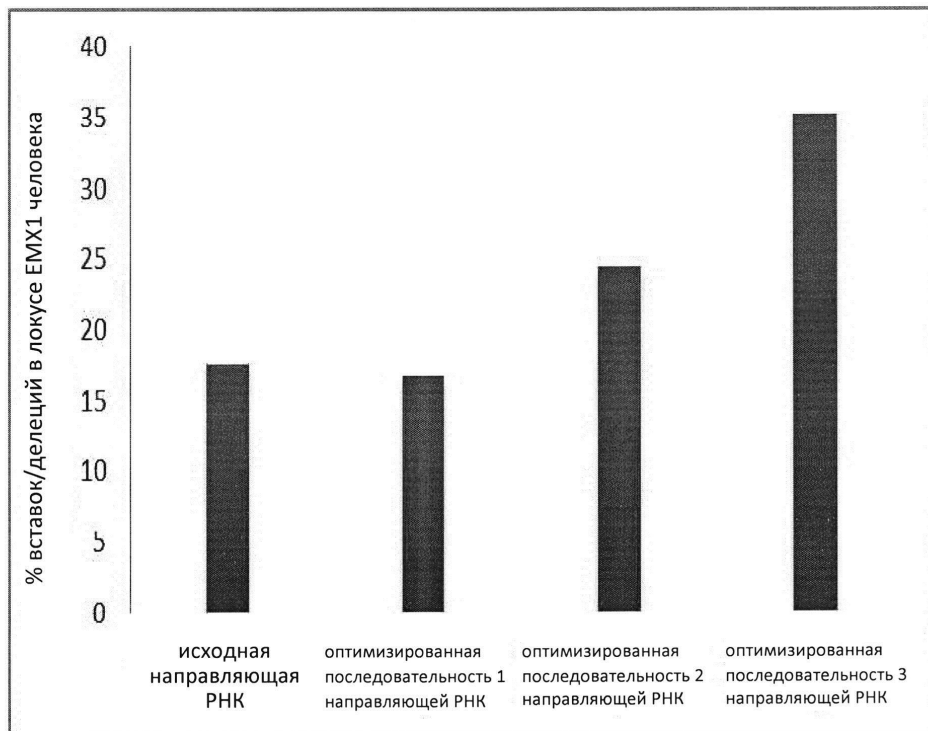
Фиг. 14С



Фиг. 14Е

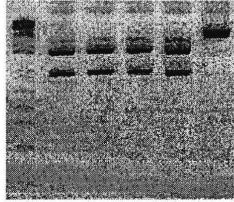


Фиг. 14F



Фиг. 15

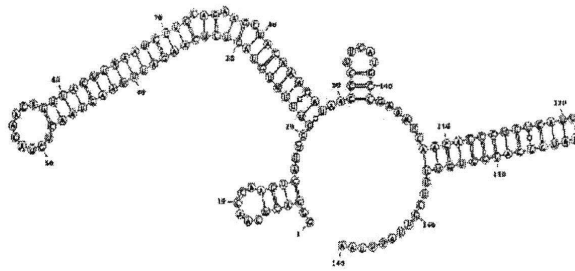
Тест St1Cas9 лэддер 1 2 3 4 5



Дорожка 1: полная tracrRNA+ полный spacer_DR

полная tracrRNA GUUACUUAAAUCUUGCAGAAAGCUACAAGAUAAAGGCUUCAUGCCGAAAUCAACACCCUGUCAUUUUUUGGCAGGGUGUUUCGUUAL

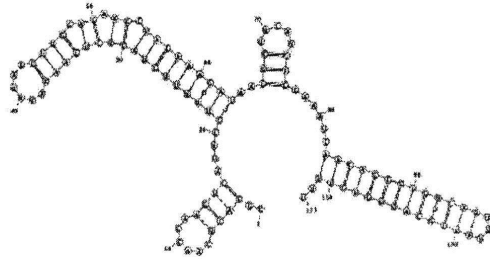
полный spacer_DR GGGACUCAACCAAGUCAUUCGUUUUUGUACUCUCAAGAUUUAAAGUAACUGUACAAC



Дорожка 2: зрелая tracrRNA+ зрелый spacer_DR

зрелая tracrRNA : CUUGCAGAAAGCUACAAGAUAAAGGCUUCAUGCCGAAAUCAACACCCUGUCAUUUUUUGGCAGGGUGUUUU

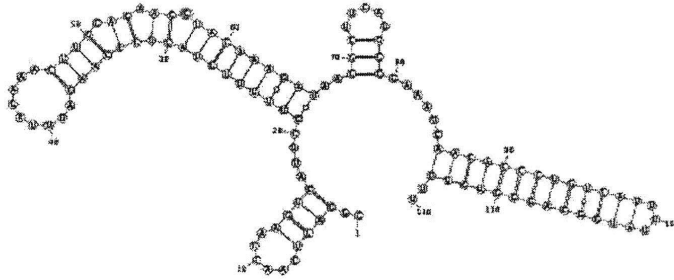
зрелый spacer_DR GGGACUCAACCAAGUCAUUCGUUUUUGUACUCUCAAGAUUUUA



Фиг. 18А

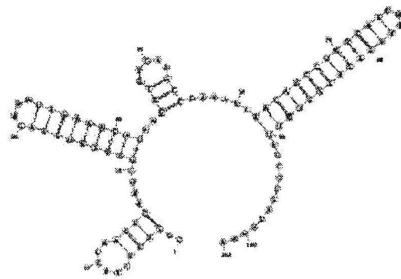
Дорожка 3: структура 1 химерной направляющей РНК (1-22 DR, 12-81 tracrRNA)

последовательность: **GGGACUCAAACCAAGUCAUUCGCUUUUUUGUACUCCUCACAGAUUUAGAAACUUGCAGAAAGCUACAAAGAUAAAGGCUUCAUGCCGAAAUCAACACCCUGUCAUUUUUAUGGCAGGGUGUUU**



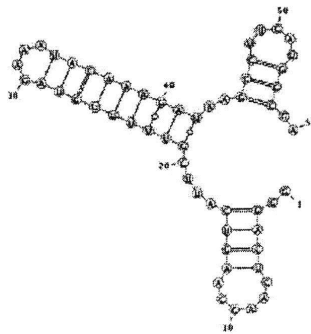
Дорожка 4: структура 2 химерной направляющей РНК (1-9 DR, 20-91 tracrRNA)

последовательность: **CCGACUCAAACCAAGUCAUUCGCUUUUUUGUACUCCUCACAGAUUUAGAAACUUGCAGAAAGCUACAAAGAUAAAGGCUUCAUGCCGAAAUCAACACCCUGUCAUUUUUAUGGCAGGGUGUUU**



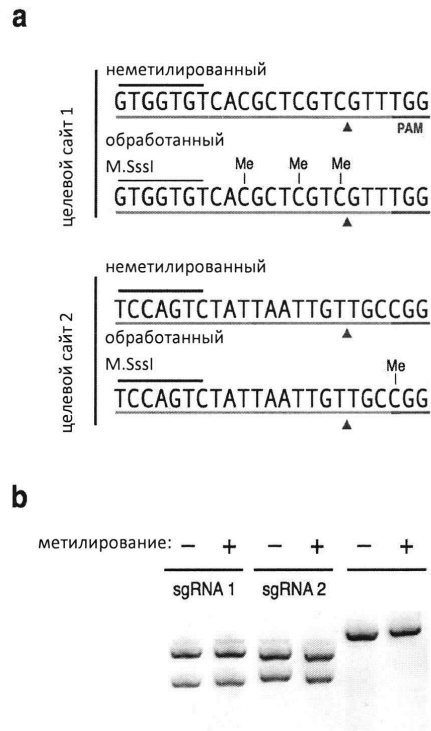
Дорожка 5: структура 3 химерной направляющей РНК (1-9 DR, 20-46 tracrRNA)

последовательность: **CCGACUCAAACCAAGUCAUUCGCUUUUUUGUACUCCUCACAGAUUUAGAAACUUGCAGAAAGCUACAAAGAUAAAGGCUUCAUGCCGAAAUCAACACCCUGUCAUUUUUAUGGCAGGGUGUUU**

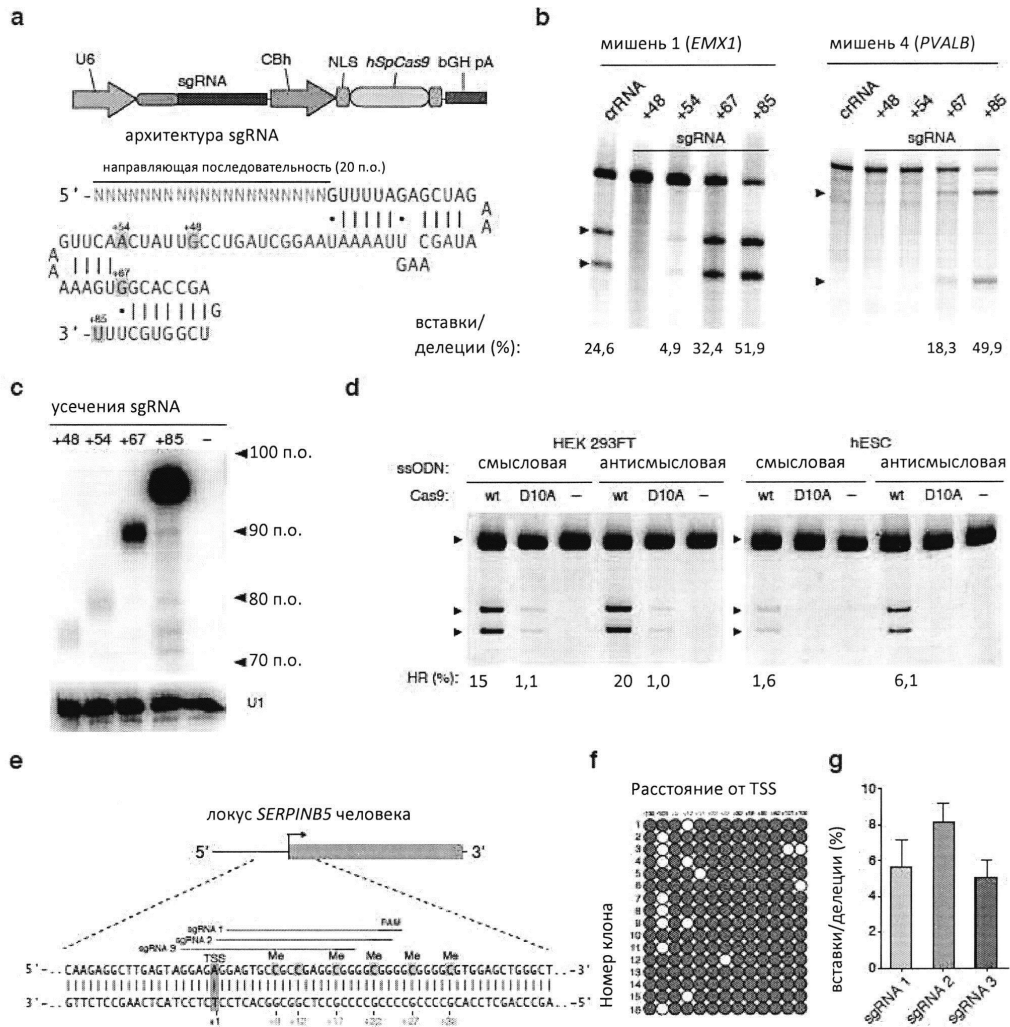


Фиг. 18В

40/44



Фиг. 19А-В



Фиг. 20А-Г

