

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 201692510 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2017.06.30

(22) Дата подачи заявки  
2015.06.16

(51) Int. Cl. C12N 15/63 (2006.01)  
C12N 15/79 (2006.01)  
C12N 15/85 (2006.01)  
C12N 15/861 (2006.01)  
C12N 9/16 (2006.01)

(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ ЭКСПРЕССИИ РНК-ПРОВОДНИКОВ CRISPR С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРОМОТОРА H1

(31) 62/012,802

(32) 2014.06.16

(33) US

(86) PCT/US2015/035964

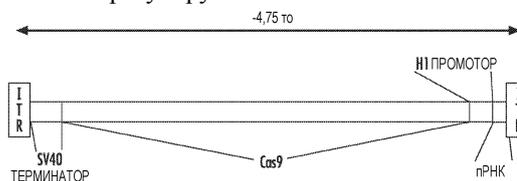
(87) WO 2015/195621 2015.12.23

(71) Заявитель:  
ДЗЕ ДЖОНС ХОПКИНС  
ЮНИВЕРСИТИ (US)

(72) Изобретатель:  
Ранганатан Винок, Зэк Дональд (US)

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

(57) Раскрытый в настоящее время объект изобретения предоставляет композиции и способы для экспрессии РНК-проводников CRISPR с использованием промотора H1. Конкретно, предоставлены композиции и способы для применения промотора H1 для экспрессии РНК-проводника (пРНК) CRISPR с измененной специфичностью 5'-нуклеотида, а также применение последовательности промотора H1 в качестве двунаправленного промотора для одновременной экспрессии нуклеазы Cas9 и пРНК. Также предоставлены композиции и способы для экспрессии и регуляции экспрессии пРНК in vivo посредством использования рибозимов РНК и регулируемых аптазимов.



A1

201692510

201692510

A1

КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ ЭКСПРЕССИИ РНК-ПРОВОДНИКОВ CRISPR С  
ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРОМОТОРА H1

Описание

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

По данной заявке испрашивается приоритет в соответствии с Предварительной Заявкой США № 62/012,802, поданной 16 июня 2014 г., которая полностью включена в данное описание посредством ссылки.

ВКЛЮЧЕНИЕ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ МАТЕРИАЛОВ, ПРЕДСТАВЛЕННЫХ В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ

Данная заявка содержит список последовательностей. Он был представлен в электронном виде через EFS-Web как текстовый файл ASCII, озаглавленный "111232-00401\_ST25.txt". Список последовательностей имеет размер 14827 байт, и был создан 2 июня 2015 г. Он, таким образом, полностью включен в данное описание посредством ссылки.

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Кластерные короткие палиндромные повторы, разделенные регулярными промежутками (CRISPR), вместе с cas (CRISPR-ассоциированными) генами содержат адаптивную иммунную систему, которая обеспечивает приобретенную резистентность против инвазивных чужеродных нуклеиновых кислот у бактерий и архей (Barrangou et al. (2007) *Science* 315:1709-12). CRISPR состоит из матриц коротких консервативных повторных последовательностей, разделенных уникальными переменными последовательностями ДНК, близкими по размеру, именуемыми спейсерами, которые часто происходят из фага или ДНК плазмиды (Barrangou et al. (2007) *Science* 315:1709-12; Bolotin et al. (2005) *Microbiology* 151:2551-61; Mojica et al. (2005) *J. Mol. Evol.* 60:174-82). Система CRISPR-Cas функционирует посредством приобретения коротких фрагментов чужеродной ДНК (спейсеров), которые внедряются в область CRISPR и обеспечивают иммунитет против последующих воздействий фагов и плазмид, которые несут совпадающие последовательности (Barrangou et al. (2007) *Science*

315:1709-12; Brouns et al. (2008) *Science* 321:960-64). Именно эта интерференция/иммунитет CRISPR-Cas делает возможным crPНК-опосредованный сайленсинг чужеродных нуклеиновых кислот (Horvath & Barrangou (2010) *Science* 327:167-70; Deveau et al. (2010) *Annu. Rev. Microbiol.* 64:475-93; Marraffini & Sontheimer (2010) *Nat. Rev. Genet.* 11:181-90; Bhaya et al. (2011) *Annu. Rev. Genet.* 45:273-97; Wiedenheft et al. (2012) *Nature* 482:331-338).

Применение конструкций CRISPR, действие которых основано на нуклеазной активности белка Cas9 (Makarova et al. (2011) *Nat. Rev. Microbiol.* 9:467-77), в сочетании с синтетической PНК-проводником (ПPНК) недавно радикально изменило инженерию генома, обеспечивая беспрецедентную манипуляцию с последовательностями ДНК. Конструкции CRISPR/Cas9 можно просто и быстро синтезировать и их можно мультиплексировать. Однако, несмотря на относительную простоту их синтеза, CRISPR имели технологические ограничения, связанные с их доступом к пространству генома, способному к нацеливанию, который является функцией как свойств самого Cas9, так и синтеза его ПPНК.

Расщепление системой CRISPR требует комплементарного спаривания оснований ПPНК с 20-нуклеотидной последовательностью ДНК и обязательным мотивом, прилегающим к протоспейсеру (PAM), коротким нуклеотидным мотивом, обнаруженным на 3'-конце по отношению к сайту-мишени (Jinek et al. (2012) *Science* 337: 816-821). Теоретически, можно, сделать мишенью любую уникальную последовательность N<sub>20</sub>-PAM в геноме, используя технологию CRISPR. Специфичность связывания ДНК последовательности PAM, которая варьирует в зависимости от вида происхождения используемого специфичного Cas9, представляет одно ограничение. В настоящее время, наименее ограничивающим и наиболее часто применяемым является белок Cas9 из *S. pyogenes*, который распознает последовательность NGG, и, таким образом, любая уникальная 21-нуклеотидная последовательность в геноме с последующими двумя гуанозиновыми нуклеотидами (N<sub>20</sub>NGG) может быть сделана мишенью. Расширение доступного пространства для нацеливания, налагаемое белковым компонентом, ограничено открытием и применением новых белков Cas9 с измененными требованиями к PAM (Cong et al. (2013)

*Science* 339: 819–823; Houet al. (2013) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 110(39):15644–9), или рассматриваемым поколением новых вариантов Cas9, полученных посредством мутагенеза или направленной эволюции.

Второе технологическое ограничение системы CRISPR возникает в результате экспрессии пРНК, инициируемой по 5'-гуанозинового нуклеотида. Применение промоторов класса III РНК-полимеразы типа III было особенно подвержено экспрессии пРНК, поскольку эти короткие некодирующие транскрипты имеют четко определенные концы, и все необходимые элементы для транскрипции, с исключением 1+ нуклеотида, содержатся в области, восходящей от промотора. Однако, поскольку обычно используемый промотор U6 требует гуанозинового нуклеотида, чтобы инициировать транскрипцию, применение промотора дополнительно затруднило сайты для геномного направленного воздействия на GN<sub>19</sub>NGG (Maliet al. (2013) *Science* 339:823–826; Dinget al. (2013) *Клетка Stem Cell* 12:393–394). Альтернативные подходы, такие как *in vitro* транскрипция посредством промоторов T7, T3, или SP6, также требовали бы инициирования гуанозинового нуклеотида (нуклеотидов) (Adhya et al. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:147–151; Melton et al. (1984) *Nucleic Acids Res.* 12:7035–7056; Pleiss et al. (1998) *RNA* 4:1313–1317).

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

При практической реализации настоящего изобретения будут типовым образом использоваться, если не указано иначе, общепринятые технологии клеточной биологии, культивирования клеток, молекулярной биологии, трансгенной биологии, микробиологии, технологии рекомбинантных нуклеиновых кислот (например, ДНК), иммунологии и РНК-интерференции (РНКи), которые находятся в объеме квалификации в данной области. Неограничивающие описания некоторых из этих технологий можно найти в следующих публикациях: Ausubel, F., et al., (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, *Current Protocols in Immunology*, *Current Protocols in Protein Science*, и *Current Protocols in Cell Biology*, all John Wiley & Sons, N.Y., издание Декабрь 2008 г.; Sambrook, Russell, и Sambrook, *Molecular*

*Cloning. A Laboratory Manual*, 3<sup>rd</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 2001; Harlow, E. и Lane, D., *Antibodies-A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1988; Freshney, R. I., "Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique", 5th ed., John Wiley & Sons, Hoboken, N.J., 2005. Неограниченную информацию, касающуюся терапевтических средств и человеческих заболеваний можно найти в Goodman and Gilman's *Pharmacological Basis of Therapeutics*, 11th Ed., McGraw Hill, 2005, Katzung, B. (ed.) *Basic and Clinical Pharmacology*, McGraw-Hill/Appleton & Lange 10<sup>th</sup> ed. (2006) или 11-е издание (Июль 2009). Неограниченную информацию, касающуюся генов и генетических нарушений, можно найти в McKusick, V. A.: *Mendelian Inheritance in Man. A Catalog of Human Genes and Genetic Disorders*. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 1998 (12th edition) или более недавней базе данных он-лайн: *Online Mendelian Inheritance in Man*, OMIM<sup>TM</sup>. McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, Md.) и National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine (Bethesda, Md.), как от 1 мая 2010 г., доступной на World Wide Web: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/> и в *Online Mendelian Inheritance in Animals (OMIA)*, базе данных генов, наследственных заболеваний и признаков у видов животных (отличных от человека и мыши), доступной на World Wide Web: <http://omia.angis.org.au/contact.shtml>. Все патенты, патентные заявки и другие публикации (например, научные статьи, книги, вебсайты и базы данных), указанные в настоящем описании, полностью включены в него посредством ссылки. В случае конфликта между описанием и любой из включенных ссылок, описание (включая любые его изменения, которые могут быть основаны на включенной ссылке), должно быть приоритетным. В настоящем описании используют стандартные принятые в данной области значения терминов, если не указано иначе. В настоящем описании применяют стандартные сокращения для различных терминов.

Раскрытый в настоящее время объект изобретения

предоставляет композиции и способы для экспрессии РНК-проводников CRISPR с использованием промотора H1. Раскрытый в настоящее время объект изобретения предоставляет не встречающуюся в природе систему CRISPR-Cas, содержащую один или несколько векторов, содержащих: а) промотор H1, функционально связанный с, по меньшей мере, одной последовательностью, кодирующей РНК-проводник (пРНК) системы CRISPR-Cas, где пРНК гибридизируется с последовательностью-мишенью молекулы ДНК в клетке, и, где молекула ДНК кодирует один или несколько генных продуктов, экспрессируемых в клетке; и б) регуляторный элемент, способный функционировать в клетке, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей белок Cas9, где компоненты (а) и (б) располагаются на одинаковых или различных векторах системы, где пРНК направленно действует на последовательность-мишень и гибридизируется с ней, и белок Cas9 расщепляет молекулу ДНК для изменения экспрессии одного или нескольких генных продуктов. В нескольких аспектах, последовательность-мишень содержит нуклеотидную последовательность AN<sub>19</sub>NGG, GN<sub>19</sub>NGG, CN<sub>19</sub>NGG или TN<sub>19</sub>NGG. В нескольких аспектах, клетка представляет собой эукариотическую клетку. В нескольких аспектах, эукариотическая клетка представляет собой клетку млекопитающего или человеческую клетку. В нескольких аспектах, эукариотическая клетка представляет собой фоторецепторную клетку сетчатки. В нескольких аспектах, белок Cas9 представляет собой кодон, оптимизированный для экспрессии в клетке. В нескольких аспектах, белок Cas9 представляет собой белок Cas9 Типа-II. В нескольких аспектах, экспрессия одного или нескольких генных продуктов снижается. В нескольких аспектах, один или несколько генных продуктов представляют собой родопсин. В нескольких аспектах, система упакована в единичную частицу адено-ассоциированного вируса (AAV).

В нескольких аспектах, раскрытый в настоящее время объект изобретения предоставляет не встречающуюся в природе систему CRISPR-Cas, содержащую один или несколько векторов, содержащих: а) промотор H1, функционально связанный с, по меньшей мере,

одной последовательностью, кодирующей РНК-проводник (пРНК) системы CRISPR-Cas, где пРНК гибридизируется с последовательностью-мишенью молекулы ДНК в эукариотической клетке, и, где молекула ДНК кодирует один или несколько генных продуктов, экспрессируемых в эукариотической клетке; и b) регуляторный элемент, способный функционировать в эукариотической клетке, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей белок Cas9 Типа-II, где компоненты (a) и (b) располагаются на одинаковых или различных векторах системы, посредством чего пРНК направленно действует на последовательность-мишень и гибридизируется с ней, и белок Cas9 расщепляет молекулу ДНК, и посредством чего экспрессия одного или нескольких генных продуктов изменяется. В одном другом аспекте, последовательность-мишень содержит нуклеотидную последовательность AN<sub>19</sub>NGG, GN<sub>19</sub>NGG, CN<sub>19</sub>NGG или TN<sub>19</sub>NGG. В одном другом аспекте, белок Cas9 представляет собой кодон, оптимизированный для экспрессии в клетке. В еще одном другом аспекте, белок Cas9 представляет собой кодон, оптимизированный для экспрессии в эукариотической клетке. В дополнительном аспекте, эукариотическая клетка представляет собой клетку млекопитающего или человеческую клетку. В одном другом аспекте, экспрессия одного или нескольких генных продуктов снижается.

Раскрытый в настоящее время объект изобретения также предоставляет способ изменения экспрессии одного или нескольких генных продуктов в клетке, где клетка содержит молекулу ДНК, кодирующую один или несколько генных продуктов, способ, включающий в себя введение в клетку не встречающейся в природе системы CRISPR-Cas, содержащей один или несколько векторов, содержащих: a) промотор H1, функционально связанный с, по меньшей мере, одной последовательностью, кодирующей РНК-проводник (пРНК) системы CRISPR-Cas, где пРНК гибридизируется с последовательностью-мишенью молекулы ДНК; и b) регуляторный элемент, способный функционировать в клетке, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей белок Cas9,

где компоненты (a) и (b) располагаются на одинаковых или

различных векторах системы, где пРНК направленно действует на последовательность-мишень и гибридизируется с ней, и белок Cas9 расщепляет молекулу ДНК для изменения экспрессии одного или нескольких генных продуктов. В нескольких аспектах, последовательность-мишень содержит нуклеотидную последовательность AN<sub>19</sub>NGG, GN<sub>19</sub>NGG, CN<sub>19</sub>NGG или TN<sub>19</sub>NGG. В нескольких аспектах, клетка представляет собой эукариотическую клетку. В нескольких аспектах, эукариотическая клетка представляет собой клетку млекопитающего или человеческую клетку. В нескольких аспектах, эукариотическая клетка представляет собой фоторецепторную клетку сетчатки. В нескольких аспектах, белок Cas9 представляет собой кодон, оптимизированный для экспрессии в клетке. В нескольких аспектах, белок Cas9 представляет собой белок Cas9 Типа-II. В нескольких аспектах, экспрессия одного или нескольких генных продуктов снижается. В нескольких аспектах, один или несколько генных продуктов представляют собой родопсин. В нескольких аспектах, система упакована в единичную частицу адено-ассоциированного вируса (AAV).

В нескольких аспектах, раскрытый в настоящее время объект изобретения предоставляет способ изменения экспрессии одного или нескольких генных продуктов в эукариотической клетке, где клетка содержит молекулу ДНК, кодирующую один или несколько генных продуктов, способ, включающий в себя введение в клетку не встречающейся в природе системы CRISPR-Cas, содержащей один или несколько векторов, содержащих: а) промотор H1, функционально связанный с, по меньшей мере, одной последовательностью, кодирующей РНК-проводник (пРНК) системы CRISPR-Cas, где пРНК гибридизируется с последовательностью-мишенью молекулы ДНК; и б) регуляторный элемент, способный функционировать в эукариотической клетке, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей белок Cas9 Типа-II, где компоненты (а) и (б) располагаются на одинаковых или различных векторах системы, посредством чего пРНК направленно действует на последовательность-мишень и гибридизируется с ней, и белок Cas9 расщепляет молекулу ДНК, и посредством чего экспрессия одного

или нескольких генных продуктов изменяется. В одном другом аспекте, последовательность-мишень содержит нуклеотидную последовательность AN<sub>19</sub>NGG, GN<sub>19</sub>NGG, CN<sub>19</sub>NGG или TN<sub>19</sub>NGG. В одном другом аспекте, белок Cas9 представляет собой кодон, оптимизированный для экспрессии в клетке. В еще одном другом аспекте, белок Cas9 представляет собой кодон, оптимизированный для экспрессии в эукариотической клетке. В дополнительном аспекте, эукариотическая клетка представляет собой клетку млекопитающего или человеческую клетку. В одном другом аспекте, экспрессия одного или нескольких генных продуктов снижается.

Раскрытый в настоящее время объект изобретения также предоставляет не встречающуюся в природе систему CRISPR-Cas, содержащую вектор, содержащий двунаправленный промотор H1, где двунаправленный промотор H1 содержит: а) контрольные элементы, которые обеспечивают транскрипцию в одном направлении, по меньшей мере, одной нуклеотидной последовательности, кодирующей РНК-проводник (пРНК) системы CRISPR-Cas, где пРНК гибридизируется с последовательностью-мишенью молекулы ДНК в клетке, и, где молекула ДНК кодирует один или несколько генных продуктов, экспрессируемых в клетке; и б) контрольные элементы, которые обеспечивают транскрипцию в противоположном направлении нуклеотидной последовательности, кодирующей белок Cas9, где пРНК направленно действует на последовательность-мишень и гибридизируется с ней, и белок Cas9 расщепляет молекулу ДНК для изменения экспрессии одного или нескольких генных продуктов. В нескольких аспектах, последовательность-мишень содержит нуклеотидную последовательность AN<sub>19</sub>NGG, GN<sub>19</sub>NGG, CN<sub>19</sub>NGG или TN<sub>19</sub>NGG. В нескольких аспектах, клетка представляет собой эукариотическую клетку. В нескольких аспектах, эукариотическая клетка представляет собой клетку млекопитающего или человеческую клетку. В нескольких аспектах, эукариотическая клетка представляет собой фоторецепторную клетку сетчатки. В нескольких аспектах, белок Cas9 представляет собой кодон, оптимизированный для экспрессии в клетке. В нескольких аспектах, белок Cas9 представляет собой белок Cas9 Типа-II. В нескольких аспектах, экспрессия одного или нескольких генных продуктов снижается. В

нескольких аспектах, один или несколько генных продуктов представляют собой родопсин. В нескольких аспектах, система упакована в единичную частицу адено-ассоциированного вируса (AAV).

В нескольких вариантах осуществления, раскрытый в настоящее время объект изобретения предоставляет не встречающуюся в природе систему CRISPR-Cas, содержащую вектор, содержащий двунаправленный промотор H1, где двунаправленный промотор H1 содержит: а) контрольные элементы, которые обеспечивают транскрипцию в одном направлении, по меньшей мере, одной нуклеотидной последовательности, кодирующей РНК-проводник (пРНК) системы CRISPR-Cas, где пРНК гибридизируется с последовательностью-мишенью молекулы ДНК в эукариотической клетке, и, где молекула ДНК кодирует один или несколько генных продуктов, экспрессируемых в эукариотической клетке; и б) контрольные элементы, которые обеспечивают транскрипцию в противоположном направлении нуклеотидной последовательности, кодирующей белок Cas9 Типа-II, посредством чего пРНК направленно действует на последовательность-мишень и гибридизируется с нею, и белок Cas9 расщепляет молекулу ДНК, и, посредством чего экспрессия одного или нескольких генных продуктов изменяется. В одном другом аспекте, последовательность-мишень содержит нуклеотидную последовательность AN<sub>19</sub>NGG, GN<sub>19</sub>NGG, CN<sub>19</sub>NGG или TN<sub>19</sub>NGG. В еще одном другом аспекте, белок Cas9 представляет собой кодон, оптимизированный для экспрессии в эукариотической клетке. В дополнительном аспекте, эукариотическая клетка представляет собой клетку млекопитающего или человеческую клетку. В одном другом аспекте, экспрессия одного или нескольких генных продуктов снижается.

Раскрытый в настоящее время объект изобретения также предоставляет способ изменения экспрессии одного или нескольких генных продуктов в клетке, где клетка содержит молекулу ДНК, кодирующую один или несколько генных продуктов, способ, включающий в себя введение в клетку не встречающейся в природе системы CRISPR-Cas, содержащей вектор, содержащий двунаправленный промотор H1, где двунаправленный промотор H1

содержит: а) контрольные элементы, которые обеспечивают транскрипцию в одном направлении, по меньшей мере, одной нуклеотидной последовательности, кодирующей РНК-проводник (пРНК) системы CRISPR-Cas, где пРНК гибридизируется с последовательностью-мишенью молекулы ДНК; и б) контрольные элементы, которые обеспечивают транскрипцию в противоположном направлении нуклеотидной последовательности, кодирующей белок Cas9, где пРНК направленно действует на последовательность-мишень и гибридизируется с ней, и белок Cas9 расщепляет молекулу ДНК для изменения экспрессии одного или нескольких генных продуктов в клетке. В нескольких аспектах, последовательность-мишень содержит нуклеотидную последовательность AN<sub>19</sub>NGG, GN<sub>19</sub>NGG, CN<sub>19</sub>NGG или TN<sub>19</sub>NGG. В нескольких аспектах, клетка представляет собой эукариотическую клетку. В нескольких аспектах, эукариотическая клетка представляет собой клетку млекопитающего или человеческую клетку. В нескольких аспектах, эукариотическая клетка представляет собой фоторецепторную клетку сетчатки. В нескольких аспектах, белок Cas9 представляет собой кодон, оптимизированный для экспрессии в клетке. В нескольких аспектах, белок Cas9 представляет собой белок Cas9 Типа-II. В нескольких аспектах, экспрессия одного или нескольких генных продуктов снижается. В нескольких аспектах, один или несколько генных продуктов представляют собой родопсин. В нескольких аспектах, система упакована в единичную частицу адено-ассоциированного вируса (AAV).

Раскрытый в настоящее время объект изобретения также предоставляет способ изменения экспрессии одного или нескольких генных продуктов в эукариотической клетке, где клетка содержит молекулу ДНК, кодирующую один или несколько генных продуктов, способ, включающий в себя введение в клетку не встречающейся в природе системы CRISPR-Cas, содержащей вектор, содержащий двунаправленный промотор H1, где двунаправленный промотор H1 содержит: а) контрольные элементы, которые обеспечивают транскрипцию в одном направлении, по меньшей мере, одной нуклеотидной последовательности, кодирующей РНК-проводник (пРНК) системы CRISPR-Cas, где пРНК гибридизируется с

последовательностью-мишенью молекулы ДНК; и b) контрольные элементы, которые обеспечивают транскрипцию в противоположном направлении нуклеотидной последовательности, кодирующей белок Cas9 Типа-II, посредством чего пРНК направленно действует на последовательность-мишень и гибридизируется с нею, и белок Cas9 расщепляет молекулу ДНК, и посредством чего экспрессия одного или нескольких генных продуктов изменяется. В одном другом аспекте, последовательность-мишень содержит нуклеотидную последовательность AN<sub>19</sub>NGG, GN<sub>19</sub>NGG, CN<sub>19</sub>NGG или TN<sub>19</sub>NGG. В еще одном другом аспекте, белок Cas9 представляет собой кодон, оптимизированный для экспрессии в эукариотической клетке. В дополнительном аспекте, эукариотическая клетка представляет собой клетку млекопитающего или человеческую клетку. В одном другом аспекте, экспрессия одного или нескольких генных продуктов снижается.

Раскрытый в настоящее время объект изобретения также предоставляет аптамер-регулируемый рибозим, содержащий: а) цис-действующий рибозим типа головки молотка, содержащий каталитический центр и дуплексные области спирали I, спирали II и спирали III, выходящие из него, где каждая из дуплексной области спирали II и дуплексной области спирали III содержит петлевую область напротив каталитического центра, и, где дуплексная область спирали II содержит аптамер, который связывается с лигандом; b) нуклеотидную последовательность, кодирующую РНК-проводник (пРНК) системы CRISPR-Cas, где пРНК гибридизируется с последовательностью-мишенью молекулы ДНК в эукариотической клетке, и, где молекула ДНК кодирует один или несколько генных продуктов, экспрессируемых в эукариотической клетке, где нуклеотидная последовательность содержит 5'-конец и 3'-конец, и где 5'-конец нуклеотидной последовательности непосредственно связан с дуплексной областью спирали III; где связывание лиганда с аптамером производит конформационное изменение в рибозиме, таким образом, что рибозим претерпевает саморасщепление между 5'-концом нуклеотидной последовательности и дуплексной областью спирали III, посредством чего продуцируется

пРНК. Также предоставлена экспрессирующая конструкция, содержащая: (i) кодирующую последовательность, которая, при транскрипции в РНК, продуцирует аптамер-регулируемый рибозим; и (ii) одну или несколько транскрипционных регуляторных последовательностей, которые регулируют транскрипцию РНК в эукариотической клетке. Также предоставлена эукариотическая клетка, содержащая экспрессирующую конструкцию. Также предоставлен способ изменения экспрессии одного или нескольких генных продуктов в эукариотической клетке, где клетка содержит молекулу ДНК, кодирующую один или несколько генных продуктов, способ, включающий в себя введение экспрессирующей конструкции в клетку и контактирование клетки с лигандом в количестве, которое изменяет активность рибозима, в частности, где клетка находится в млекопитающем или человеческом субъекте. В одном аспекте, лиганд представляет собой теофиллин.

Раскрытый в настоящее время объект изобретения также предоставляет способ лечения глазного нейродегенеративного заболевания у субъекта, нуждающегося в таком лечении, способ, включающий в себя: (a) предоставление не встречающейся в природе системы CRISPR-Cas, содержащей один или несколько векторов, содержащих: i) промотор H1, функционально связанный с, по меньшей мере, одной последовательностью, кодирующей РНК-проводник (пРНК) системы CRISPR-Cas, где пРНК гибридизируется с последовательностью-мишенью молекулы ДНК в клетке субъекта, и, где молекула ДНК кодирует один или несколько генных продуктов, экспрессируемых в клетке; и ii) регуляторный элемент, способный функционировать в клетке, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей белок Cas9, где компоненты (i) и (ii) располагаются на одинаковых или различных векторах системы, где пРНК направленно действует на последовательность-мишень и гибридизируется с ней, и белок Cas9 расщепляет молекулу ДНК для изменения экспрессии одного или нескольких генных продуктов; и (b) введение субъекту эффективного количества системы. В нескольких аспектах, у субъекта наблюдают дисфункцию и/или смерть фоторецепторных клеток сетчатки. В нескольких аспектах, глазное нейродегенеративное заболевание выбирают из группы,

состоящей из глаукомы, дегенерации сетчатки, и возрастной дегенерации желтого пятна. В нескольких аспектах, глазное нейродегенеративное заболевание представляет собой пигментную дистрофию сетчатки (RP). В нескольких аспектах, клетка представляет собой фоторецепторную клетку сетчатки. В нескольких аспектах, один или несколько генных продуктов представляют собой родопсин. В нескольких аспектах, промотор H1 является двунаправленным. В нескольких аспектах, система упакована в единичную частицу адено-ассоциированного вируса (AAV) перед введением субъекту. В нескольких аспектах, введение субъекту происходит посредством субретинальной инъекции. В нескольких аспектах, субъект представляет собой человека. В нескольких аспектах, белок Cas9 представляет собой белок Cas9 Типа-II. В нескольких аспектах, последовательность-мишень содержит нуклеотидную последовательность AN<sub>19</sub>NGG, GN<sub>19</sub>NGG, CN<sub>19</sub>NGG или TN<sub>19</sub>NGG. В нескольких аспектах, белок Cas9 представляет собой кодон, оптимизированный для экспрессии в клетке. В нескольких аспектах, раскрытый в настоящее время способ дополнительно включает в себя введение экспрессирующей конструкции и лиганда в количестве, которое изменяет активность рибозима. В нескольких аспектах, лиганд представляет собой теофиллин.

Некоторые аспекты раскрытого в настоящее время объекта изобретения, устанавливаются выше в настоящем описании, которые отражают полностью или частично раскрытый в настоящее время объект изобретения, другие аспекты станут очевидными по мере раскрытия описания, взятые в связи с сопровождающими Примерами и Чертежами, как наилучшим образом описано ниже.

#### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ**

Описав, таким образом, раскрытый в настоящее время объект изобретения в общих чертах, теперь будет сделана ссылка на сопровождающие Чертежи, которые необязательно нарисованы в масштабе, и на которых:

ФИГ. 1А, ФИГ. 1В, ФИГ. 1С и ФИГ. 1D показывают оценку способности направлять целенаправленное действие CRISPR через синтез пРНК из промотора H1. Схематическая иллюстрация, изображающая пРНК-экспрессирующие конструкции, показана на ФИГ.

1А. Выше, промотор U6 экспрессирует только пРНК с +1 гуанозиновым нуклеотидом; ниже, промотор H1 может управлять экспрессией пРНК, инициируемой на любом из двух пуриновых (аденозине или гуанозине) нуклеотидов. Ниже, показано динамическое изображение белка Cas9 с пРНК, нацеленной на геномную последовательность AN<sub>19</sub>NGG (показанная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 30). Указано расположение +1 А. Схема в общих чертах анализа направленного на eGFP разрушения показана на ФИГ. 1В. Флуоресценция eGFP нарушается посредством направленного действия CRISPR с последующим подверженным ошибкам NHEJ-опосредованным восстановлением, приводящему к мутациям со сдвигом рамки считывания, которые нарушают кодирующую последовательность, что приводит к потере флуоресценции. ФИГ. 1С показывает микроскопическое изображение, демонстрирующее успешное нацеливание CRISPR посредством пРНК, экспрессируемых U6 или промотора H1. Клетки H7 ES окрашивали и колонии визуализировали, чтобы показать ядра (слева, фиолетовый), флуоресценцию eGFP (середина, зеленый), и совмещенные изображения (справа), показывая области мозаичности флуоресценции GFP в колонии. Справа показана количественная оценка потери флуоресценции eGFP посредством проточной цитометрии для соответствующих конструкций. Ниже приведено более высокое увеличение колонии H7, на которую направленно действует экспрессированная H1 пРНК, показывающее мозаичность экспрессии. Масштабная линейка, 50 мкм. Основанная на аналитическом тесте Surveyor количественная оценка частоты NHEJ показана на ФИГ. 1D. Изображение геля в Биоанализаторе, отображающее контроль (первая дорожка), U6-экспрессируемую пРНК (вторая дорожка), H1-экспрессируемую пРНК (третья дорожка) и маркер (четвертая дорожка). % индел (рассчитанный по соотношению неразрезанных (u) к разрезанным (c) полосам) указан ниже;

ФИГ. 2 показывает анализ методом Surveyor и количественную оценку NHEJ в клетках HEK-293. Выше показано схематическое изображение eGFP со стрелками, указывающими на сайты для нацеливания. Сайты-мишени на цепи плюс показаны с указанием

вправо, и мишени цепи минус показаны с указанием влево; синие стрелки показывают пРНК промотора H1, а оранжевые стрелки показывают пРНК промотора U6. Ниже показан гель из Биоанализатора из аналитического теста Surveyor. Координаты сайта-мишени приведены выше и рассчитанный % индел указан ниже;

ФИГ. 3А, ФИГ. 3В, и ФИГ. 3С показывают направленную и гомологичную рекомбинацию в локусе AAVS1. Результаты анализа Surveyor для трех пРНК, экспрессируемых промотором H1 (AAVS1-1a через -1-3a), трех пРНК, экспрессируемых промотором U6 (AAVS-1-1 через -1-3), и контрольной ненацеленной пРНК, показаны на ФИГ. 3А. ФИГ. 3В показывает схематическое изображение нацеливающего донорного вектора AAVS-1 (выше показан локус AAVS1 (меченный "AAVS1")) и визуализацию клеток колонии GFP-положительных клеток H7 ES после электропорации с использованием пРНК H1::AAVS1-3a и нацеливающего вектора AAVS-1. Секвенирование по Сенгеру целевой области соединения, указывающее на корректную интеграцию посредством гомологичной рекомбинации, показано на ФИГ. 3С (показанная последовательность представляет собой SEQ ID NO:31);

ФИГ. 4А, ФИГ. 4В, ФИГ. 4С, и ФИГ. 4D показывают результаты биоинформационного анализа сайтов GN<sub>19</sub>NGG и AN<sub>19</sub>NGG в геноме. График Circos, изображающий частоту сайтов CRISPR в человеческом геноме, показан на ФИГ. 4А. Внешний круг отображает идеограммы человеческих хромосом. При движении внутрь, частота сайтов CRISPR, GN<sub>19</sub>NGG (оранжевый), AN<sub>19</sub>NGG (синий) и RN<sub>19</sub>NGG (пурпурный), указана вдоль хромосом. Внутри круга нанесена плотность экзонов человека (черный), и локусов болезни OMIM (синий). Частота и расстояние между сайтами CRISPR в геноме показаны на ФИГ. 4В. Показан диаграммный график частоты и расстояний примыкающих сайтов GN<sub>19</sub>NGG (оранжевый), AN<sub>19</sub>NGG (синий) в геноме. Средние и медианные значения вставлены в график, включающий сайты RN<sub>19</sub>NGG. ФИГ. 4С показывает диаграммный график количественной оценки частоты сайта GN<sub>19</sub>NGG в сравнении с AN<sub>19</sub>NGG в генах человека (слева) или локусах болезни OMIM (справа). ФИГ. 4D показывает диаграммный график количественной оценки частоты GN<sub>19</sub>NGG в сравнении с AN<sub>19</sub>NGG в шести геномах: человека, коровы, мыши, крысы, курицы и данио;

ФИГ. 5А, ФИГ. 5В, ФИГ. 5С, ФИГ. 5D, ФИГ. 5Е, и ФИГ. 5F показывают результаты биоинформационного анализа сайтов GN<sub>19</sub>NGG и AN<sub>19</sub>NGG в геноме. Показаны три панели, изображающие плотность каждого из сайтов ПРНК в геноме человека: GN<sub>19</sub>NGG (ФИГ. 5А), AN<sub>19</sub>NGG (ФИГ. 5В), и RN<sub>19</sub>NGG (ФИГ. 5С). Внутри каждого графика, плотность сайтов CRISPR нанесена вдоль каждой хромосомы. Полупрозрачное наложение (оранжевое, синее или пурпурное) представляет собой кривую плотности, рассчитанную как гладкая гауссова функция влияния. Пунктирная линия указывает 35 по; в качестве эталона, в среднем, сайты нацеливания TALEN оценивают как имеющие место через каждые 35 пар оснований и сайты ZFN встречаются через каждую пару сотен пар оснований (Sander et al. (2011) *Nature Methods* 8:67-69; Cermak et al. (2011) *Nucleic Acids Res.* 39(12):e82). Диаграммный график кумулятивной средней плотности нацеливания CRISPR на человеческую хромосому, показан на ФИГ. 5D. GN<sub>19</sub>NGG (оранжевый), AN<sub>19</sub>NGG (синий), и RN<sub>19</sub>NGG (пурпурный) указывают соответствующие сайты CRISPR. Пунктирная линия показывает эталонные 35 по. ФИГ. 5Е показывает частоту и расстояние между примыкающими сайтами CRISPR в геноме. Показан диаграммный график частоты и расстояний примыкающих сайтов GN<sub>19</sub>NGG (оранжевый) и AN<sub>19</sub>NGG (синий) в геноме. Средние и медианные значения вставлены в график. SeqLogo всех сайтов GN<sub>19</sub>NGG (вверху слева), AN<sub>19</sub>NGG (вверху справа) и RN<sub>19</sub>NGG (внизу) в геноме человека показаны на ФИГ. 5F;

ФИГ. 6А, ФИГ. 6В, ФИГ. 6С, ФИГ. 6D, ФИГ. 6Е, и ФИГ. 6F показывают содержание АТ/ГС в геноме и частоту сайта CRISPR: процент АТ (синий) или ГС (оранжевый) указан для геномов человека, коровы, мыши, крысы, курицы и данио (ФИГ. 6А). Указана частота сайтов GN<sub>19</sub>NGG (оранжевый) и AN<sub>19</sub>NGG (синий), нормализованная по содержанию АТ/ГС (ФИГ. 6В). Частота сайта CRISPR по цепи для сайтов GN<sub>19</sub>NGG (слева), AN<sub>19</sub>NGG (середина) и RN<sub>19</sub>NGG (справа) показана на ФИГ. 6С. Плюс цепь (левый столбик) указан сине-голубым цветом, и минус цепь (правый столбик) указан пурпурно-красным цветом. Частота сайтов GN<sub>19</sub>NGG (оранжевый) и AN<sub>19</sub>NGG (синий) у *дрозофилы*, *C. elegans* и *S. cerevisiae* указана на ФИГ. 6D. ФИГ. 6Е показывает процентное содержание АТ (синий)

или GC (оранжевый), и ФИГ. 6F показывает нормализованную частоту сайтов CRISPR;

ФИГ. 7A, ФИГ. 7B, ФИГ. 7C, и ФИГ. 7D показывают направленное действие CRISPR на AN<sub>19</sub>NGG в эндогенном гене (MERTK) в клетках H7 ES. Схематичная диаграмма локуса MERTK и различных белковых доменов показана на ФИГ. 7A. Сайт-мишень в экзоне 2 показан ниже в более крупном масштабе, указывая на сайт-мишень AN<sub>19</sub>NGG для CRISPR (показанная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 32). Количественная оценка направленного действия CRISPR на экзон 2 посредством аналитического теста Surveyor показана на ФИГ. 7B. Сайт CRISPR в экзоне 2 изображен выше, с различными праймерами (стрелки), применяемыми в аналитическом тесте Surveyor; как F1:R1, так и F2:R2 заполняют сайт-мишень, в то время как контрольный продукт ПЦР, F3:R3, находится как раз вне сайта-мишени. Гель из аналитического теста Surveyor показан ниже вместе с тремя контрольными продуктами, показанными слева, и направленное действие показано справа. Ниже в % указана индел-частота. ФИГ. 7C показывает секвенирование по Сенгеру мутантных линий. Клональные линии изолировали и секвенировали, показывая, что данное направленное действие CRISPR на сайты AN<sub>19</sub>NGG приводило к мутагенезу в этой области. Выравненные хроматограммы показывают 6 уникальных мутаций, которые были клонированы (wt является SEQ ID NO: 33; Δ12 является SEQ ID NO:34; Δ1 является SEQ ID NO:35; Δ2,+2 является SEQ ID NO:36; Δ6 является SEQ ID NO:37; Δ7 является SEQ ID NO:38). ФИГ. 7D показывает результаты анализа методом вестерн-блоттинга для экспрессии Mertk в H7-производных клетках RPE. Дорожки 1, 3, и 4 указывают на линии с выключением и дорожка 2 показывает экспрессию из гетерозиготной линии;

ФИГ. 8A, ФИГ. 8B, ФИГ. 8C и ФИГ. 8D показывает анализ нецелевых совпадений, индуцированных в целевом и нецелевых сайтах посредством U6- или H1-экспрессированных пРНК. кРВ-ПЦР анализ уровней экспрессии пРНК в VEGFA T1 от титрующих количеств либо промотора H1 (синий) или промотора U6 (оранжевый) показан на ФИГ. 8A. Целевой и нецелевой анализ VEGFA T1 показан на ФИГ.

8В. Анализ Surveyor показан слева, и последовательности-мишени показаны справа с ошибочными спариваниями, указанными красным цветом (T1, SEQ ID NO:20; OT1-3, SEQ ID NO:21; OT1-4, SEQ ID NO:22; OT1-6, SEQ ID NO:23; OT1-11, SEQ ID NO:24). ФИГ. 8С идентична ФИГ. 8В с мишенью VEGFA T3 (VEGFA T3, SEQ ID NO:25; OT3-1, SEQ ID NO:26; OT3-2, SEQ ID NO:27; OT3-4, SEQ ID NO:28; OT3-18, SEQ ID NO:29). Отношение целевой специфичности к нецелевой специфичности VEGFA T1 показано на ФИГ. 8D. Показано отношение целевой мутагенез/нецелевой мутагенез между промотором H1 (синий) или промотором U6 (оранжевой). Значения ниже пунктирной линии при 1,0 указывают на более высокий нецелевой мутагенез, чем целевой мутагенез. Для всех частей, целевые и нецелевые сайты помечены, как в Fu et al. ((2013) *Nat. Biotechnol.* 31(9):822-6) и Cho et al. ((2014) *Genome Research* 24:132-141);

ФИГ. 9А и ФИГ. 9В показывают свойства промотора U6 в сравнении с промотором H1 при экспрессии пРНК для направленного действия CRISPR. Верхняя диаграмма на ФИГ. 9А показывает эндогенный человеческий промотор U6 и сайт начала транскрипции (SEQ ID NO: 39). Нижняя диаграмма на ФИГ. 9А показывает применение промотора U6 для управления пРНК с различными +1 нуклеотидами. Поскольку для U6 требуется G для инициации (вверху слева), панели, которые начинаются с А (вверху справа), С (внизу слева) или Т (внизу справа) будут, вероятно, иницировать первый нисходящий G, ведущий к усеченной пРНК (U6:GN19NGG является SEQ ID NO:40; U6:AN19NGG является SEQ ID NO:41; U6:CN19NGG является SEQ ID NO:42; U6:TN19NGG является SEQ ID NO:43). Верхняя диаграмма на ФИГ. 9В показывает эндогенный человеческий промотор H1 и сайт начала транскрипции (SEQ ID NO: 44). Нижняя диаграмма на ФИГ. 9В показывает применение промотора H1 для управления пРНК с различными +1 нуклеотидами. H1 может иницировать с использованием G (вверху слева) или А (вверху справа), приводя к полноразмерным пРНК. Также, сообщалось, что H1 обеспечивает инициацию транскрипции по С и Т нуклеотидам, которая могла бы обеспечить полноразмерные транскрипты для любого +1 нуклеотида по нисходящей от промотора H1 (H1:GN19NGG является SEQ ID NO:

45; H1:AN19NGG является SEQ ID NO: 46; H1:CN19NGG является SEQ ID NO: 47; H1:TN19NGG является SEQ ID NO: 48);

ФИГ. 10А, ФИГ. 10В, ФИГ. 10С, ФИГ. 10D, и ФИГ. 10Е показывают применение промотора H1 в качестве двунаправленного промотора для одновременной экспрессии белка Cas9 и РНК-проводника. Показан двунаправленный промотор H1, экспрессирующий Cas9 как транскрипт rol II в левую сторону (минус цепь), и РНК-проводник как транскрипт rol III в правую сторону (плюс цепь) (ФИГ. 10А). Суммарная кассета экспрессии содержит приблизительно 4,4 то. ФИГ. 10В показывает конструкцию, применяемую для тестирования способности направлять CRISPR-опосредованное расщепление от конструкции с двунаправленным H1. Двунаправленную конструкцию, используя нацеливание пРНК на eGFP, клонировали в плазмиду и экспрессировали в человеческих стволовых клетках, экспрессирующих GFP. Потеря GFP обнаруживается визуально (средняя панель, наконечники стрелок), указывая на успешную экспрессию и направленное действие на GFP, обусловленное экспрессирующей конструкцией (ФИГ. 10С). Успешное нацеливание CRISPR также показано посредством анализа Surveyor с присутствием двух полос на дорожках 2, и 3 (ФИГ. 10D). Конструкция CRISPR с использованием двунаправленного промотора H1 для генерации компактной нацеливающей кассеты из ~4,75 то, которая находится в интервале упаковки адено-ассоциированного вируса, показана на ФИГ. 10Е. SV40 терминатор показан оранжевым цветом, и конструкция фланкирована последовательностями обращенных терминальных повторов (ITR), требуемыми для получения вируса;

ФИГ. 11А, ФИГ. 11В, и ФИГ. 11С показывают рибозим типа головки молотка для генерации 5'-конца РНК-проводника. Изображение 5'-цис-рибозима типа головки молотка (SEQ ID NO: 49) и пРНК (SEQ ID NO: 50) показано на ФИГ. 11А. Указаны последовательности рибозима типа головки молотка, и указаны нуклеотиды, важные для катализа (решающие - красным цветом, важные - оранжевым цветом). Положение расщепления указано стрелкой. При расщеплении рибозимом (нижнее), результирующая

пРНК высвобождается, без ограничения доступа к любому нуклеотиду в заново образованном 5'-положении. Конструкции для экспрессии головка молотка-пРНК показаны на ФИГ. 11В. Промотор, обычно, промотор *pol III* как U6, H1 или T7, может применяться для экспрессии 5'-цис-рибозима типа головки молотка, который после саморасщепления будет высвобождать пРНК. Нацеливание на два локуса показано с использованием аналитического теста Surveyor (NH1= SEQ ID NO: 51; NH2=SEQ ID NO: 52), с успешным расщеплением (стрелки) под действием 5'-цис-рибозима типа головки молотка (ФИГ. 11С);

ФИГ. 12 показывает регулируемую конструкцию CRISPR, с использованием аптазимов для процессинга пРНК в присутствии специфичных аптамеров. В частности, ФИГ. 12 изображает теофиллиновый аптамер (оранжевый), гибридизированный с спиралью II рибозима типа головки молотка с образованием теофиллинового аптазима, который представляет собой 5' пРНК (синий). Связывание теофиллина стабилизирует спираль II, которая затем обеспечивает саморасщепление головки молотка и освобождение пРНК (SEQ ID NO:50). пРНК, наряду с Cas9, теперь способна нацеливать расщепление посредством системы CRISPR. Рибозим типа головки молотка, SEQ ID NO:55;

ФИГ. 13 показывает организацию генома H1РНК и локуса PARP-2. Выше показано изображение гена PARP-2 (синий), транскрибируемого в правом направлении, и гена H1РНК, (оранжевый), транскрибируемого в левом направлении, нарисованное в масштабе. Ниже представлена увеличенная область области промотора для обоих генов;

ФИГ. 14 показывает репортер eGFP для активности *pol II H1*. Последовательность человеческого промотора H1 ориентирована с *pol II* транскрипцией eGFP в правую сторону. Три компонента, подлежащие оптимизации, указаны курсивом;

ФИГ. 15 показывает экспрессию репортера eGFP. Верхние панели показывают эндогенный промотор H1, нижние панели показывают экспрессию с использованием последовательности Козака;

ФИГ. 16А и ФИГ. 16В показывают двунаправленную экспрессию Cas9 и пРНК. Схематическая диаграмма двунаправленной нацеливающей конструкции показана на ФИГ. 16А. Сравнение расщепления по двум различным локусам, с использованием стандартной двухвекторной доставки (дорожки 2 и 5) или доставки одной нацеливающей плазмиды (дорожки 3 и 6) показано на ФИГ. 16В. % геномной модификации, определенный посредством анализа T7EI, указан ниже каждой дорожки;

ФИГ. 17 показывает локус родопсина у мышей с включенным hRho:GFP. Выше указано, что соответствующие мышинные и человеческие последовательности указаны выше схемы промоторной области rho к концу 3'UTR (вычерчено в масштабе). Ниже, укрупненная область показывает расположение P23 и пРНК, показано ниже (наконечник стрелки);

ФИГ. 18А, ФИГ. 18В, и ФИГ. 18С показывают специфичное нацеливание на аллель P23H *in vivo*. ФИГ. 18А показывает нацеливание на P23 (WT(C57BL/6J, SEQ ID NO:56; P23H(CCC-CAC), SEQ ID NO:57; WT(CAST/EiJ), SEQ ID NO:58). ФИГ. 18В показывает секвенирование родопсина из двух штаммов мышей дикого типа; SNP указан стрелкой (C57BL/6J последовательность ДНК, SEQ ID NO:56; C57BL/6J последовательность белка, SEQ ID NO:59; CAST/EiJ<sup>+/+</sup> последовательность ДНК, SEQ ID NO:58; CAST/EiJ<sup>+/+</sup> последовательность белка, SEQ ID NO:59). ФИГ. 18С показывает схему скрещивания P23H: P23H гомозиготную мышь (черная) скрещивают с WT Cast (белая) и результирующие гетерозиготные потомки (серые) будут подвергаться лечению посредством субретинальной доставки AAV5; и

ФИГ. 19 показывает аллель-специфичное нацеленное действие на локус родопсина. Показано сравнение расщепления аллеля C57BL/6J(P23H) с единственным несовпадением оснований (Cast). % геномной модификации, определенный посредством теста T7EI, указан ниже.

Файл патента или заявки содержит, по меньшей мере, один чертеж, выполненный в цвете. Копии данного патента или публикации патентной заявки с цветными чертежами будут

представлены Патентным Офисом по запросу и с оплатой необходимой пошлины.

#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Раскрытый в настоящее время объект изобретения теперь будет описан более полно в данном документе со ссылкой на сопровождающие чертежи, на которых показаны некоторые, но не все варианты осуществления раскрытого в настоящее время объекта изобретения. Подобные цифры относятся к подобным элементам во всем описании. Раскрытый в настоящее время объект изобретения может быть реализован во многих различных формах и не должен рассматриваться как ограниченный вариантами осуществления, приведенными в данном описании; в большей степени, эти варианты осуществления предоставлены таким образом, чтобы данное раскрытие соответствовало применимым требованиям законодательства. Несомненно, многие модификации и другие варианты осуществления раскрытого в настоящее время объекта изобретения, приведенные в настоящем описании, придут на ум специалисту в области, к которой относится раскрытый в настоящее время объект изобретения, имея благоприятный эффект от использования идей, представленных в изложенных выше описаниях и ассоциированных Чертежах. Следовательно, нужно понимать, что раскрытый в настоящее время объект изобретения не будет ограничиваться конкретными раскрытыми вариантами осуществления, и, что модификации и другие варианты осуществления подразумевают находящимися в пределах объема притязаний прилагаемой формулы изобретения.

Технологии геномного редактирования, такие как цинк-пальцевые нуклеазы (ZFN) (Porteus, и Baltimore (2003) *Science* 300: 763; Milleret al. (2007)*Nat. Biotechnol.* 25:778-785; Sanderet al. (2011) *Nature Methods* 8:67-69; Woodet al. (2011)*Science* 333:307) и подобные активатору транскрипции эффекторы нуклеаз (TALEN) (Woodet al. (2011) *Science* 333:307; Bochet al. (2009) *Science* 326:1509-1512; Moscou and Bogdanove (2009)*Science* 326:1501; Christianet al. (2010)*Genetics* 186:757-761; Milleret al. (2011)*Nat. Biotechnol.* 29:143-148; Zhanget al. (2011)*Nat. Biotechnol.* 29:149-153; Reyon et al.

(2012) *Nat. Biotechnol.* 30:460-465) расширили возможности генерировать целенаправленные модификации генома и предлагают потенциал для коррекции мутаций, связанных с заболеваниями, с высокой точностью. Будучи эффективными, эти технологии затруднены практическими ограничениями, так как и ZFN и пары TALEN требуют синтеза крупных и уникальных распознающих белков для данного сайта ДНК-мишени. Несколько групп недавно сообщили о высокоэффективном редактировании генома посредством применения конструированной системы CRISPR/Cas9 типа II, которая позволяет избежать эти ключевые ограничения (Cong et al. (2013) *Science* 339:819-823; Jinek et al. (2013) *eLife* 2:e00471; Mali et al. (2013) *Science* 339:823-826; Cho et al. (2013) *Nat. Biotechnol.* 31:230-232; Hwang et al. (2013) *Nat. Biotechnol.* 31:227-229). В отличие от ZFN и TALEN, получение которых занимает относительно много времени и является трудоемким, конструкции CRISPR, действие которых основано на нуклеазной активности белка Cas9 в сочетании с синтетической РНК-проводником (пРНК), являются простыми и быстрыми для синтеза и могут быть мультиплексированы. Однако, несмотря на относительную простоту их синтеза, CRISPR имеют технологические ограничения, связанные с их доступом в пространство целевого генома, который является функцией как самого Cas9, так и синтеза его пРНК.

Расщепление посредством системы CRISPR требует спаривания оснований пРНК в комплементарном режиме с 20-нуклеотидной последовательностью ДНК и необходимым мотивом, прилегающим к протоспейсеру (PAM), коротким нуклеотидным мотивом, обнаруженным в положении 3' к сайту-мишени (Jinek et al. (2012) *Science* 337: 816-821). Теоретически, используя технологию CRISPR, можно сделать мишенью любую уникальную последовательность N<sub>20</sub>-PAM в геноме. Специфичность связывания с ДНК последовательностью PAM, которая варьирует в зависимости от происхождения вида конкретного использования Cas9, предоставляет одно ограничение. В настоящее время, наименее ограничивающий и наиболее часто применяемый белок Cas9 происходит из *S. pyogenes*, который распознает последовательность NGG, и таким образом, любую уникальную 21-нуклеотидную последовательность в геноме,

сопровождаемую двумя гуанозиновыми нуклеотидами ( $N_{20}NGG$ ) можно сделать мишенью. Расширение доступного пространства для целенаправленного действия, заданное белковым компонентом, ограничено открытием и применением новых белков Cas9 с измененными требованиями к PAM (Cong et al. (2013) *Science* 339: 819-823; Houet al. (2013) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 110(39):15644-9), или сопутствующим поколением новых вариантов Cas9, полученным посредством мутагенеза или направленной эволюции. Второе технологическое затруднение системы CRISPR является результатом экспрессии пРНК, иницируемой по 5'-гуанозинового нуклеотида. Применение промоторов класса III РНК-полимераз типа III оказалось особенно подверженным экспрессии пРНК, поскольку эти короткие некодирующие транскрипты имеют точно определенные концы, и все необходимые элементы для транскрипции, за исключением 1+ нуклеотида, содержатся в восходящей от промотора области. Однако, так как обычно используемый промотор U6 требует гуанозинового нуклеотида для инициации транскрипции, применение промотора U6 дополнительно сделало затрудненными геномные сайты для нацеливания для  $GN_{19}NGG$  (Maliet al. (2013) *Science* 339:823-826; Dinget al. (2013) *Cell Стебель Cell* 12:393-394). При альтернативных подходах, таких как транскрипция *in vitro* под действием промоторов T7, T3 или SP6, также требовала бы иницирующих гуанозиновых нуклеотида (нуклеотидов) (Adhya et al. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:147-151; Melton et al. (1984) *Nucleic Acids Res.* 12:7035-7056; Pleiss et al. (1998) *RNA* 4:1313-1317).

Раскрытый в настоящее время объект изобретения относится к открытию того, что применение промотора H1 для экспрессии РНК-проводника (пРНК или кпРНК) более, чем в два раза увеличивает точность действия системы CRISPR/Cas9 во многих геномах вследствие измененной специфичности 5'-нуклеотида. Способность экспрессировать и модифицировать эндогенные гены с использованием промотора H1 для экспрессии пРНК может быть использована для целенаправленного действия на оба геномных сайта,  $AN_{19}NGG$  и  $GN_{19}NGG$ . Сайты  $AN_{19}NGG$  встречаются на 15% более часто, чем сайты  $GN_{19}NGG$  в геноме человека и увеличение

пространства для целенаправленного действия также обогащается в человеческих генах и локусах, ответственных за заболевание. Соответственно, раскрытый в настоящее время объект изобретения увеличивает многосторонность технологии CRISPR, удваивая более, чем в два раза, пространство для целенаправленного действия в геноме человека и других видах эукариотов. Более того, эта модификация обеспечивает нацеливание с более высоким разрешением в геноме человека, чем ранее существующие технологии CRISPR, TALEN или Цинковые пальцы.

Раскрытый в настоящее время объект изобретения также относится к открытию того, что применение последовательности промотора H1 в качестве двунаправленного промотора для одновременной экспрессии Cas9 и пРНК обеспечивает генерацию компактных и полностью функциональных кассет экспрессии, которые могут быть вставлены и доставлены посредством вирусных векторов.

Раскрытый в настоящее время объект изобретения также относится к применению РНК-рибозимов и регулируемых аптазимов для экспрессии и регуляции экспрессии пРНК *in vivo*.

I. ЭКСПРЕССИЯ РНК-ПРОВОДНИКОВ CRISPR С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРОМОТОРА H1.

#### A. Композиции

В нескольких вариантах осуществления, раскрытый в настоящее время объект изобретения предоставляет не встречающуюся в природе систему CRISPR-Cas, содержащую один или несколько векторов, содержащих: а) промотор H1, функционально связанный с, по меньшей мере, одной последовательностью кодирующей РНК-проводник (пРНК) системы CRISPR-Cas, где пРНК гибридизируется с последовательностью-мишенью молекулы ДНК в клетке, и, где молекула ДНК кодирует один или несколько генных продуктов, экспрессируемых в клетке; и б) регуляторный элемент, способный функционировать в клетке, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей белок Cas9, где компоненты (а) и (б) располагаются на одинаковых или различных векторах системы, где пРНК направленно действует на последовательность-мишень и гибридизируется с нею, и белок Cas9 расщепляет молекулу ДНК для изменения экспрессии одного или нескольких генных продуктов.

В нескольких вариантах осуществления, раскрытый в настоящее время объект изобретения предоставляет не встречающуюся в природе систему CRISPR-Cas, содержащую один или несколько векторов, содержащих: а) промотор H1, функционально связанный с, по меньшей мере, одной последовательностью, кодирующей РНК-проводник (пРНК) системы CRISPR-Cas, где пРНК гибридизируется с последовательностью-мишенью молекулы ДНК в эукариотической клетке, и, где молекула ДНК кодирует один или несколько генных продуктов, экспрессируемых в эукариотической клетке; и б) регуляторный элемент, способный функционировать в эукариотической клетке, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей белок Cas9 Типа-II, где компоненты (а) и (б) располагаются на одинаковых или различных векторах системы, посредством чего пРНК направленно действует на последовательность-мишень и гибридизируется с ней, и белок Cas9 расщепляет молекулу ДНК, и посредством чего экспрессия одного или нескольких генных продуктов изменяется. В одном аспекте, последовательность-мишень может представлять собой последовательность-мишень, которая начинается с любого нуклеотида, например, N<sub>20</sub>NGG. В нескольких вариантах осуществления, последовательность-мишень содержит нуклеотидную последовательность AN<sub>19</sub>NGG. В нескольких вариантах осуществления, последовательность-мишень содержит нуклеотидную последовательность GN<sub>19</sub>NGG. В нескольких вариантах осуществления, последовательность-мишень содержит нуклеотидную последовательность CN<sub>19</sub>NGG. В нескольких вариантах осуществления, последовательность-мишень содержит нуклеотидную последовательность TN<sub>19</sub>NGG. В нескольких вариантах осуществления, последовательность-мишень содержит нуклеотидную последовательность AN<sub>19</sub>NGG или GN<sub>19</sub>NGG. В одном другом аспекте, белок Cas9 представляет собой кодон, оптимизированный для экспрессии в клетке. В одном другом аспекте, белок Cas9 представляет собой кодон, оптимизированный для экспрессии в эукариотической клетке. В дополнительном аспекте, эукариотическая клетка представляет собой клетку млекопитающего или человеческую клетку. В еще одном другом аспекте, экспрессия

одного или нескольких генных продуктов снижается.

Раскрытый в настоящее время объект изобретения также предоставляет не встречающуюся в природе систему CRISPR-Cas, содержащую вектор, содержащий двунаправленный промотор H1, где двунаправленный промотор H1 содержит: а) контрольные элементы, которые обеспечивают транскрипцию в одном направлении, по меньшей мере, одной нуклеотидной последовательности, кодирующей РНК-проводник (пРНК) системы CRISPR-Cas, где пРНК гибридизируется с последовательностью-мишенью молекулы ДНК в эукариотической клетке, и, где молекула ДНК кодирует один или несколько генных продуктов, экспрессируемых в эукариотической клетке; и б) контрольные элементы, которые обеспечивают транскрипцию в противоположном направлении нуклеотидной последовательности, кодирующей белок Cas9 Типа-II, посредством чего пРНК направленно действует на последовательность-мишень и гибридизируется с ней, и белок Cas9 расщепляет молекулу ДНК, и, посредством чего экспрессия одного или нескольких генных продуктов изменяется. В одном аспекте, последовательность-мишень может представлять собой последовательность-мишень которая начинается с любого нуклеотида, например, N<sub>20</sub>NGG. В нескольких вариантах осуществления, последовательность-мишень содержит нуклеотидную последовательность AN<sub>19</sub>NGG. В нескольких вариантах осуществления, последовательность-мишень содержит нуклеотидную последовательность GN<sub>19</sub>NGG. В нескольких вариантах осуществления, последовательность-мишень содержит нуклеотидную последовательность CN<sub>19</sub>NGG. В нескольких вариантах осуществления, последовательность-мишень содержит нуклеотидную последовательность TN<sub>19</sub>NGG. В нескольких вариантах осуществления, последовательность-мишень содержит нуклеотидную последовательность AN<sub>19</sub>NGG или GN<sub>19</sub>NGG. В одном другом аспекте, белок Cas9 представляет собой кодон, оптимизированный для экспрессии в клетке. В одном другом аспекте, белок Cas9 представляет собой кодон, оптимизированный для экспрессии в эукариотической клетке. В дополнительном аспекте, эукариотическая клетка представляет собой клетку млекопитающего или человеческую клетку. В еще одном другом аспекте, экспрессия

одного или нескольких генных продуктов снижается.

В нескольких вариантах осуществления, комплекс CRISPR содержит одну или несколько последовательностей ядерной локализации, обладающие достаточной силой, чтобы управлять накоплением комплекса CRISPR в обнаруживаемом количестве в ядре клетки (например, эукариотической клетки). Без ограничения какой-либо теорией, полагают, что последовательность ядерной локализации не является необходимой для активности комплекса CRISPR в эукариотах, но включение таких последовательностей увеличивает активность системы, особенно, в отношении направленного действия на молекулы нуклеиновой кислоты в ядре. В нескольких вариантах осуществления, CRISPR фермент представляет собой фермент системы CRISPR типа II. В нескольких вариантах осуществления, фермент CRISPR представляет собой фермент Cas9. В нескольких вариантах осуществления, фермент Cas9 представляет собой Cas9 из *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, или *S. thermophilus*, и может включать мутированный Cas9, полученный из этих организмов. Фермент может представлять собой гомолог или ортолог Cas9.

В целом, и на протяжении всего данного описания, термин "вектор" относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной к переносу еще одной нуклеиновой кислоты, с которой она была связана. Векторы включают, но не ограничиваются перечисленным, молекулы нуклеиновой кислоты, которые являются одноцепочечными, двухцепочечными или частично двухцепочечными; молекулы нуклеиновой кислоты, которые содержат один или несколько свободных концов, не содержат свободных концов (например, кольцевые); молекулы нуклеиновой кислоты, которые содержат ДНК, РНК или их обеих; и другие разновидности полинуклеотидов, известные в данной области. Один тип вектора представляет собой "плазмиду", которая относится к петле кольцевой двухцепочечной ДНК, в которую могут быть вставлены дополнительные сегменты ДНК, таким образом, как посредством стандартных технологий молекулярного клонирования. Еще одним типом вектора является вирусный вектор, где последовательности ДНК или РНК вирусного происхождения присутствуют в векторе для упаковки в вирус (например, ретровирусы, ретровирусы с дефективной репликацией,

аденовирусы, аденовирусы с дефективной репликацией и аденоассоциированные вирусы). Вирусные векторы также включают полинуклеотиды, которые несет вирус для трансфекции в клетку-хозяина.

Некоторые векторы имеют способность к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую они вводятся (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальную точку начала репликации и эписомные векторы млекопитающих). Другие векторы (например, неэписомные векторы млекопитающих) интегрируются в геном клетки-хозяина при введении в клетку-хозяина, и, таким образом, они реплицируются наряду с геномом хозяина. Более того, некоторые векторы имеют способность направлять экспрессию генов, с которыми они функционально связаны. Такие векторы называются в данном описании "векторами экспрессии". Обычные векторы экспрессии, имеющие применение в технологиях рекомбинантных ДНК часто находятся в форме плазмид.

Векторы рекомбинантной экспрессии могут содержать нуклеиновую кислоту раскрытого в настоящее время объекта изобретения в форме, подходящей для экспрессии нуклеиновой кислоты в клетке-хозяине, которая означает, что векторы рекомбинантной экспрессии включают один или несколько регуляторных элементов, которые могут быть выбраны, исходя из клеток-хозяев, предназначенных для использования при экспрессии, которые являются функционально связанными с последовательностью нуклеиновой кислоты, подлежащей экспрессии.

В пределах термина вектор рекомбинантной экспрессии, подразумевают, что выражение "функционально связанные" означает то, что нуклеотидная последовательность, представляющая интерес, связана с регуляторным элементом (элементами) таким образом, который обеспечивает экспрессию нуклеотидной последовательности (например, в системе транскрипции/трансляции *in vitro* или в клетке-хозяине, когда вектор вводят в клетку-хозяина).

Подразумевают, что термин "регуляторный элемент" включает промоторы, энхансеры, внутренние сайты связывания рибосомы (IRES), и другие контрольные элементы экспрессии (например, сигналы терминации транскрипции, такие как сигналы

полиаденилирования и поли-U последовательности). Такие регуляторные элементы описаны, например, в Goeddel (1990) *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, Calif. Регуляторные элементы включают такие элементы, которые направляют конститутивную экспрессию нуклеотидной последовательности во многих типах клеток-хозяев, и элементы, которые направляют экспрессию нуклеотидной последовательности только в некоторых клетках (например, тканеспецифичные регуляторные последовательности). Тканеспецифичный промотор может направлять экспрессию прежде всего в желательной ткани, представляющей интерес, такой как мышца, нейрон, кость, кожа, кровь, конкретные органы (например, печень, поджелудочная железа), или в конкретных типах клеток (например, лимфоцитах). Регуляторные элементы могут также направлять экспрессию зависимым от времени способ, таким как способ, зависимый от клеточного цикла или зависимый от стадии развития, который может также являться или не являться специфичным для ткани или клеточного типа.

В нескольких вариантах осуществления, вектор содержит один или несколько промоторов *pol III*, один или несколько промоторов *pol II*, один или несколько промоторов *pol I* или их комбинации. Примеры промоторов *pol III* включают, но не ограничиваются перечисленным, U6 и промотор H1s. Примеры промоторов *pol II* включают, но не ограничиваются перечисленным, ретровирусный промотор LTR вируса саркомы Рауса (RSV) (необязательно с энхансером RSV), промотор цитомегаловируса (CMV) (необязательно с энхансером CMV) (например, Boshart et al. (1985) *Cell* 41:521-530), промотор SV40, промотор дигидрофолатредуктазы, промотор  $\beta$ -актина, промотор фосфоглицеринкиназы (PGK) и промотор EF1 $\alpha$ .

Также термином "регуляторный элемент" охватываются энхансерные элементы, такие как WPRE; энхансеры CMV; сегмент R-U5' в LTR из HTLV-I (Takebe et al. (1988) *Mol. Cell. Biol.* 8:466-472); энхансер SV40; и интронная последовательность между экзонами 2 и 3 кроличьего  $\beta$ -глобина (O'Hare et al. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78(3):1527-31). Квалифицированные

специалисты в области поймут, что конструкция вектора экспрессии может зависеть от таких факторов, как выбор клетки-хозяина для трансформации, желательный уровень экспрессии и т.д. Вектор может вводиться в клетки-хозяева, чтобы, таким образом, продуцировать транскрипты, белки или пептиды, включая гибридные белки или пептиды, кодируемые нуклеиновыми кислотами, как описано в данном документе (например, кластерные короткие палиндромные повторы, разделенные регулярными промежутками (CRISPR) транскрипты, белки, ферменты, их мутантные формы, их гибридные белки и т.д.). Преимущественные векторы включают лентивирусы и адено-ассоциированные вирусы, и типы таких векторов также могут выбираться для направленного действия на конкретные типы клеток.

Термины "полинуклеотид", "нуклеотид", "нуклеотидная последовательность", "нуклеиновая кислота" и "олигонуклеотид" используют взаимозаменяемо. Они относятся к полимерной форме нуклеотидов любой длины, либо дезоксирибонуклеотидам или рибонуклеотидам, или их аналогам. Полинуклеотиды могут иметь любую трехмерную структуру и могут выполнять любую функцию, известную или неизвестную. Далее следуют неограничивающие примеры полинуклеотидов: кодирующие или не кодирующие области гена или фрагмента гена, локусы (локус), определенные в результате анализа связывания, экзоны, интроны, информационная РНК (иРНК), транспортная РНК, рибосомальная РНК, короткая интерферирующая РНК (киРНК), короткая шпилечная РНК (кшРНК), микро-РНК (миРНК), рибозимы, кДНК, рекомбинантные полинуклеотиды, разветвленные полинуклеотиды, плазмиды, векторы, изолированная ДНК с любой последовательностью, изолированная РНК с любой последовательностью, зонды на основе нуклеиновой кислоты и праймеры. Полинуклеотид может содержать один или несколько модифицированных нуклеотидов, таких как метилированные нуклеотиды и нуклеотидные аналоги. Если присутствуют, модификации нуклеотидной структуры могут придаваться до или после сборки полимера. Последовательность нуклеотидов может прерываться ненуклеотидными компонентами. Полинуклеотид может быть дополнительно модифицирован после полимеризации, таким

образом, как посредством конъюгации с компонентом, несущим метку.

В аспектах раскрытого в настоящее время объекта изобретения термины "химерная РНК", "химерная РНК-проводник", "РНК-проводник", "одиночная РНК-проводник" и "синтетическая РНК-проводник" используют взаимозаменяемо и относят к полинуклеотидной последовательности, содержащей последовательность-проводник. Термин "последовательность-проводник" относится к последовательности из приблизительно 20 по в РНК-проводнике, которая обозначает сайт-мишень, и может использоваться взаимозаменяемо с терминами "проводник" или "спейсер".

Как применяют в настоящем описании, термин "дикий тип" представляет собой термин в области, понятный квалифицированным специалистам, и означает типовую форму организма, штамма, гена или характеристики в том виде, как она встречается в природе, что отличает ее от мутантных или вариантных форм.

Как применяют в настоящем описании, термин "вариант" следует принимать как означающий проявление качественных характеристик, которые имеют профиль, который отличается от того профиля, который встречается в природе.

Термины "не встречающийся в природе" или "сконструированный" используют взаимозаменяемо и указывают на участие человеческих рук. Термины, когда их относят к молекулам нуклеиновой кислоты или полипептидам, означают, что молекула нуклеиновой кислоты или полипептид, не содержат по существу, по меньшей мере, одного другого компонента, с которым они естественным образом ассоциированы в природе, и обнаруживаемого в природе.

"Комплементарность" относится к способности нуклеиновой кислоты образовывать водородные связи (связь) с еще одной последовательностью нуклеиновой кислоты по традиционной модели Уотсона-Крика или при использовании других нетрадиционных типов. Процент комплементарности показывает процентную долю остатков в молекуле нуклеиновой кислоты, которые могут образовывать водородные связи (например, спаривание оснований по Уотсону-

Крику) со второй последовательностью нуклеиновой кислоты (например, 5, 6, 7, 8, 9, 10 из 10 являются на 50%, 60%, 70%, 80%, 90% и 100% комплементарными). "Совершенно комплементарные" означает, что все примыкающие остатки последовательности нуклеиновой кислоты будут образовывать водородные связи с таким же числом примыкающих остатков во второй последовательности нуклеиновой кислоты. "Комплементарные по существу", как применяют в настоящем описании, относится к степени комплементарности, которая составляет, по меньшей мере, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, или 100% на протяжении области из 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50 или более нуклеотидов, или относится к двум нуклеиновым кислотам, которые гибридизируются в строгих условиях.

Как применяют в настоящем описании, "строгие условия" для гибридизации относятся к условиям, при которых нуклеиновая кислота, имеющая комплементарность с последовательностью-мишенью, преобладающим образом гибридизируется с последовательностью-мишенью, и по существу не гибридизируется с последовательностями, не являющимися мишенями. Строгие условия, обычно являются зависимыми от последовательности, и варьируют в зависимости от ряда факторов. Как правило, чем длиннее последовательность, тем выше температура, при которой последовательность специфически гибридизируется со своей последовательностью-мишенью. Неограничивающие примеры строгих условий подробно описаны в Tijssen (1993), *Laboratory Techniques In Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization With Nucleic Acid Probes Part 1, Second Chapter "Overview of principles of hybridization and strategy nucleic acid probe assay"*, Elsevier, N.Y.

"Гибридизация" относится к реакции, в которой один или несколько полинуклеотидов взаимодействуют с образованием комплекса, который стабилизируется посредством образования водородных связей между основаниями нуклеотидных остатков. Образование водородной связи может происходить посредством спаривания оснований по Уотсону-Крику, связывания по Хугстейну

или любым другим специфичным для последовательности образом. Комплекс может содержать две цепи, образующие дуплексную структуру, три или более цепей, образующих многоцепочечный комплекс, единственную самогибридирующуюся цепь или любую их комбинацию. Реакция гибридизации может составлять стадию более масштабного процесса, такого как инициация ПЦР, или расщепление полинуклеотида ферментом. Последовательность, способную к гибридизации с данной последовательностью, называют "комплементом" данной последовательности.

Как применяют в настоящем описании, "экспрессия" относится к процессу, посредством которого полинуклеотид транскрибируется из матрицы ДНК (таким образом, как в мРНК или другой РНК-транскрипт), и/или процессу, посредством которого транскрибированная мРНК в последующем транслируется в пептиды, полипептиды, или белки. Транскрипты и кодируемые полипептиды можно обобщенно называть "генным продуктом". Если полинуклеотид происходит из геномной ДНК, экспрессия может включать сплайсинг мРНК в эукариотической клетке.

Термины "полипептид", "пептид" и "белок" используют в данном описании взаимозаменяемо для обозначения полимеров аминокислот любой длины. Полимер может быть линейным или разветвленным, он может содержать модифицированные аминокислоты, и он может прерываться не-аминокислотами. Термины также охватывают аминокислотный полимер, который был модифицирован; посредством, например, образования дисульфидной связи, гликозилирования, липидирования, ацетилирования, фосфорилирования, или любой другой манипуляции, такой как конъюгация с компонентом, содержащим метку.

Как применяют в настоящем описании, термин "аминокислота" включает природные и/или неприродные или синтетические аминокислоты, включая глицин и как D, так и L оптические изомеры, и аминокислотные аналоги и пептидомиметики.

При практической реализации настоящего раскрытого в настоящее время объекта изобретения используют, если не указано иначе, традиционные методы иммунологии, биохимии, химии, молекулярной биологии, микробиологии, клеточной биологии,

геномики и рекомбинантных ДНК, которые находятся в объеме квалификации в данной области (Sambrook, Fritsch и Maniatis (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edition; Ausubel et al., eds. (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*); MacPherson et al., eds. (1995) *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.): PCR 2: A Practical Approach); Harlow и Дорожка, eds. (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*; Freshney, ed. (1987) *Animal Cell Culture*).

Некоторые аспекты раскрытого в настоящее время объекта изобретения относятся к векторным системам, содержащим один или несколько векторов, или самим векторам. Векторы могут быть сконструированы для экспрессии транскриптов CRISPR (например, транскриптов нуклеиновой кислоты, белков или ферментов в прокариотических или эукариотических клетках. Например, транскрипты CRISPR могут экспрессироваться в бактериальных клетках, таких как *Escherichia coli*, клетки насекомых (с использованием бакуловирусов векторов экспрессии), клетки дрожжей или клетки млекопитающих. Подходящие клетки-хозяева обсуждаются дополнительно в Goeddel (1990) *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, Calif. Альтернативно, вектор рекомбинантной экспрессии может транскрибироваться и транслироваться *in vitro*, например, с использованием регуляторной последовательности промотора T7 и T7 полимеразы.

Векторы могут вводиться и распространяться в прокариотах. В нескольких вариантах осуществления, прокариот применяют для амплификации копий вектора, подлежащего введению в эукариотическую клетку, или в качестве промежуточного вектора при получении вектора, подлежащего введению в эукариотическую клетку (например, амплификации плазмиды как части системы упаковки вирусного вектора). В нескольких вариантах осуществления, прокариота используют для амплификации копий вектора и экспрессии одной или нескольких нуклеиновых кислот, таким образом, чтобы обеспечить источник одного или нескольких белков для доставки в клетку-хозяина или организм хозяина. Экспрессию белков в прокариотах наиболее часто осуществляют в

*Escherichia coli* с использованием векторов, содержащих конститутивные или индуцируемые промоторы, направляющие экспрессию либо гибридных или негибридных белков.

Гибридные векторы добавляют ряд аминокислот к белку, кодируемому с их участием, таким образом, как к амино-концу рекомбинантного белка. Такие гибридные векторы могут служить для выполнения одной или нескольких целей, таких как: (i) увеличить экспрессию рекомбинантного белка; (ii) увеличить растворимость рекомбинантного белка; и (iii) способствовать очистке рекомбинантного белка, действуя в качестве лиганда при аффинной очистке. Часто, в гибридных векторах экспрессии, сайт протеолитического расщепления вводят в месте соединения гибридного фрагмента и рекомбинантного белка, чтобы обеспечить отделение рекомбинантного белка от гибридного фрагмента вслед за очисткой гибридного белка. Такие ферменты, и их когнатные последовательности распознавания, включают Фактор Ха, тромбин и энтерокиназу. Пример гибридных векторов экспрессии включают pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith and Johnson (1988) *Gene* 67: 31-40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, Mass.) и pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, N.J.) которые гибридируют глутатион-S-трансферазу (GST), белок, связывающий мальтозу Е, или белок А, соответственно, с целевым рекомбинантным белком.

Примеры подходящих индуцируемых негибридных векторов экспрессии *E. coli* включают pTrc (Amrann et al. (1988) *Gene* 69:301-315) и pET 11d (Studier et al. (1990) *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, Calif.).

В нескольких вариантах осуществления, вектор представляет собой вектор экспрессии дрожжей. Примеры векторов для экспрессии у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* включают pYepSec1 (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, San Diego, Calif.), и picZ (InVitrogen Corp, San Diego, Calif.).

В нескольких вариантах осуществления, вектор способен управлять экспрессией одной или нескольких последовательностей в

клетках млекопитающих, с использованием вектора экспрессии млекопитающих. Примеры векторов экспрессии млекопитающих включают pCDM8 (Seed(1987) *Nature* 329: 840) и pMT2PC (Kaufman et al. (1987) *EMBO J.*6: 187-195). При использовании в клетках млекопитающих, контрольные функции вектора экспрессии обычно обеспечиваются одним или несколькими регуляторными элементами. Например, обычно используемые промоторы происходят из полиомы, аденовируса 2, цитомегаловируса, вируса обезьян 40 и других, раскрытых в данном описании и известных в данной области. Для других подходящих систем экспрессии как для прокариотических, так и эукариотических клеток см., например, Главы 16 и 17 из Sambrook et al.(1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

В нескольких вариантах осуществления, рекомбинантный вектор экспрессии млекопитающих способен направлять экспрессию нуклеиновой кислоты преимущественно в конкретном типе клеток (например, тканеспецифичные регуляторные элементы применяют для экспрессии нуклеиновой кислоты). Тканеспецифичные регуляторные элементы являются известными в данной области. Неограничивающие примеры подходящих тканеспецифичных промоторов включают альбуминовый промотор (специфичный для печени; Pinkert et al. (1987) *Genes Dev.* 1: 268-277), лимфоид-специфичные промоторы (Calame and Eaton(1988) *Adv. Immunol.* 43: 235-275), в частности, промоторы Т-клеточных рецепторов (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 (например, нейрофиламентозный промотор; Byrne and Ruddle (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 5473-5477), промоторы, специфичные для поджелудочной железы (Edlund et al. (1985) *Science* 230: 912-916), и промоторы, специфичные для молочной железы (например, промотор молочной сыворотки; Патент США № 4,873,316 и Опубликованная Европейская заявка № 264,166). Также охватываются промоторы, регулируемые на стадиях развития, например, мышинные hox-промоторы (Kessel and

Gruss (1990) *Science* 249: 374-379) и промотор  $\alpha$ -фетопротеина (Campes and Tilghman (1989) *Genes Dev.* 3: 537-546).

В нескольких вариантах осуществления, регуляторный элемент является функционально связанным с одним или несколькими элементами системы CRISPR таким образом, чтобы управлять экспрессией одного или нескольких элементов системы CRISPR. В целом, CRISPR (кластерные короткие палиндромные повторы, разделенные регулярными промежутками), также известные как SPIDR (спейсерные рассеянные прямые повторы), составляют семейство ДНК-локусов, которые обычно являются специфичными для конкретного бактериального вида. Локус CRISPR содержит четко выраженный класс рассеянных коротких повторов последовательностей (SSR), которые были распознаны у *E. coli* (Ishino et al. (1987) *J. Bacteriol.*, 169:5429-5433; и Nakata et al. (1989) *J. Bacteriol.*, 171:3553-3556), и ассоциированные гены. Аналогичные рассеянные SSR были идентифицированы у *Haloferax mediterranei*, *Streptococcus pyogenes*, *Anabaena* и *Mycobacterium tuberculosis* (Groenen et al. (1993) *Mol. Microbiol.*, 10:1057-1065; Hoe et al. (1999) *Emerg. Infect. Dis.*, 5:254-263; Masepohl et al. (1996) *Biochim. Biophys. Acta* 1307:26-30; и Mojica et al. (1995) *Mol. Microbiol.*, 17:85-93). Локусы CRISPR обычно отличаются от других SSR по структуре повторов, которые получили название коротких повторов с регулярными промежутками (SRSR) (Janssen et al. (2002) *OMICS J. Integ. Biol.*, 6:23-33; и Mojica et al. (2000) *Mol. Microbiol.*, 36:244-246). In general, повторы представляют собой короткие элементы, которые существуют в кластерах, которые имеют регулярные промежутки в виде уникальных промежуточных последовательностей с по существу постоянной длиной (Mojica et al. (2000) *Mol. Microbiol.*, 36:244-246). Несмотря на то, что повторные последовательности являются в высокой степени консервативными в ряду штаммов, число рассеянных повторов и последовательностей спейсерных областей обычно отличаются от штамма к штамму (van Embden et al. (2000) *J. Bacteriol.*, 182:2393-2401). Локусы CRISPR были идентифицированы у более, чем

40 прокариотов (например, Jansen et al. (2002) *Mol. Microbiol.*, 43:1565-1575; и Mojica et al. (2005) *J. Mol. Evol.* 60:174-82) включающих, но не ограниченных перечисленными, *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*, *Myrococcus*, *Campylobacter*, *Wolinella*, *Acinetobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Legionella*, *Methylococcus*, *Pasteurella*, *Photobacterium*, *Salmonella*, *Xanthomonas*, *Yersinia*, *Treponema* и *Thermotoga*.

В общем случае, "система CRISPR" относится обобщенно к транскриптам и другим элементам, вовлеченным в экспрессию или направляющим активность CRISPR-ассоциированных ("Cas") генов, включая последовательности, кодирующие ген Cas, последовательность-проводник (также называемой "спейсером" в контексте эндогенной системы CRISPR), или другим последовательностям и транскриптам из локуса CRISPR. В нескольких вариантах осуществления, один или несколько элементов системы CRISPR происходят из системы CRISPR типа I, типа II или типа III. В нескольких вариантах осуществления, один или несколько элементов системы CRISPR происходят из конкретного организма, содержащего эндогенную систему CRISPR, такого как *Streptococcus pyogenes*. В целом, система CRISPR характеризуется элементами, которые инициируют образование комплекса CRISPR в сайте последовательности-мишени (также называемого протоспейсером в контексте эндогенной системы CRISPR).

В контексте образования комплекса CRISPR, "последовательность-мишень" относится к последовательности, для которой последовательность-проводник конструируется так, чтобы иметь комплементарность, где гибридизация между последовательностью-мишенью и последовательностью-проводником инициирует образование комплекса CRISPR. Полная

комплементарность требуется необязательно, при условии, что имеется достаточная комплементарность, чтобы вызвать гибридизацию и инициировать образование комплекса CRISPR. Последовательность-мишень может содержать любой полинуклеотид, такой как полинуклеотиды ДНК или РНК. В нескольких вариантах осуществления, последовательность-мишень расположена в ядре или цитоплазме клетки. В нескольких вариантах осуществления, последовательность-мишень может находиться внутри органеллы эукариотической клетки, например, митохондрии или хлоропласте. Последовательность или матрицу, которая может применяться для рекомбинации в намеченном локусе, содержащем последовательности-мишени называют "матрицей редактирования" или "полинуклеотидом редактирования" или "последовательностью редактирования". В аспектах раскрытого в настоящее время объекта изобретения, экзогенный матричный полинуклеотид может называться матрицей редактирования. В аспекте раскрытого в настоящее время объекта изобретения рекомбинация является гомологичной рекомбинацией.

В нескольких вариантах осуществления, вектор содержит один или несколько сайтов-вставок, таких как последовательность распознавания рестрикционной эндонуклеазы (также называемый как "сайт клонирования"). В нескольких вариантах осуществления, один или несколько сайтов-вставок (например, в количестве приблизительно или более чем приблизительно равном 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более сайтов-вставок) расположены по восходящей и/или нисходящей от одного или нескольких элементов последовательности одного или нескольких векторов. Когда используют множество различных последовательностей-проводников, одиночная экспрессирующая конструкция может применяться для нацеливания активности CRISPR на множество различных, соответствующих последовательностей-мишеней внутри клетки. Например, одиночный вектор может содержать приблизительно или более, чем приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 или более последовательностей-проводников. В нескольких вариантах осуществления, могут быть предоставлены приблизительно или более, чем приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более таких векторов, содержащих последовательность-проводник, и

необязательно доставляемых в клетку.

В нескольких вариантах осуществления, вектор содержит регуляторный элемент, функционально связанный с последовательностью, кодирующей фермент, кодирующей фермент CRISPR, такой как белок Cas. Неограничивающие примеры белков Cas включают Cas1, Cas1B, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8, Cas9 (также известные как Csn1 и Csx12), Cas10, Csy1, Csy2, Csy3, Cse1, 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 версии. Эти ферменты являются известными; например, аминокислотную последовательность белка Cas9 из *S. pyogenes* можно обнаружить в базе данных SwissProt под учетным номером Q99ZW2. В нескольких вариантах осуществления, немодифицированный фермент CRISPR имеет активность по расщеплению ДНК, такой как Cas9. В нескольких вариантах осуществления фермент CRISPR представляет собой Cas9, и может представлять собой Cas9 из *S. pyogenes* или *S. pneumoniae*.

В нескольких вариантах осуществления, фермент CRISPR направляет расщепление одной или обеих цепей в расположении последовательности-мишени, таким образом, как внутри последовательности-мишени и/или внутри комплемента последовательности-мишень. В нескольких вариантах осуществления, фермент CRISPR направляет расщепление одной или обеих цепей в 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 последовательности-мишени. В нескольких вариантах осуществления, вектор кодирует фермент CRISPR, который претерпевает мутацию по отношению к соответствующему ферменту дикого типа таким образом, что мутированный фермент CRISPR неспособен расщеплять одну или обе цепи целевого полинуклеотида, содержащего последовательность-мишень.

В нескольких вариантах осуществления, кодирующая фермент последовательность, кодирующая фермент CRISPR, представляет собой кодон, оптимизированный для экспрессии в конкретных

клетках, таких как эукариотические клетки. Эукариотическая клетки могут быть клетками конкретного организма или полученными из конкретного организма, такого как млекопитающее, включая, но не ограничиваясь перечисленным, человека, мышь, крысу, кролика, собаку или примата, не являющегося человеком. В целом, оптимизация кодона относится к процессу модификации последовательности нуклеиновой кислоты для усиленной экспрессии в клетках-хозяевах, представляющих интерес, посредством замены, по меньшей мере, одного кодона (например, приблизительно или более, чем приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 50 или более кодонов) нативной последовательности кодонами, которые более часто или наиболее часто используются в генах такой клетк-хозяина при поддержании нативной аминокислотной последовательности. Различные виды проявляют конкретный сдвиг для некоторых кодонов конкретной аминокислоты. Сдвиг кодона (различия в частоте использования кодона между организмами) часто коррелирует с эффективностью трансляции матричной РНК (мРНК), которая, как полагают, в свою очередь зависит, среди прочего, от свойств транслируемых кодонов и доступности молекул конкретной транспортной РНК (тРНК). Преобладание избранных тРНК в клетке обычно является отражением кодонов, используемых наиболее часто при синтезе пептидов. Соответственно, гены могут быть адаптированы для оптимальной генной экспрессии в данном организме на основании оптимизации кодона. Таблицы частоты использования кодонов являются легкодоступными, например, в "Базе данных частоты использования кодонов", и эти таблицы могут быть адаптированы несколькими способами. См. Nakamura et al. (2000) *Nucl. Acids Res.* 28:292. Компьютерные алгоритмы для кодона, оптимизирующего конкретную последовательность для экспрессии в конкретной клетке-хозяине, также являются доступными, такие как Gene Forge (Aptagen; Jacobus, Pa.). В нескольких вариантах осуществления, один или несколько кодонов (например, 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 конкретной аминокислоты.

В общем случае, последовательность-проводник представляет собой любую полинуклеотидную последовательность, имеющую достаточную комплементарность с целевой полинуклеотидной последовательностью для гибридизации с последовательностью-мишенью и направления специфичного для последовательности связывания комплекса CRISPR к последовательности-мишени. В нескольких вариантах осуществления, степень комплементарности между последовательностью-проводником и ее соответствующей последовательностью-мишенью, 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 может быть определено с применением любого подходящего алгоритма для выравнивания последовательностей, неограничивающие примеры которого включают алгоритм Смита-Уотермана, алгоритм Нидлмана-Вунша, алгоритмы на основе преобразования Барроуза-Уилера (например, алгоритм выравнивания Барроуза-Уилера), ClustalW, Clustal X, BLAT, Novoalign (Novocraft Technologies, ELAND (Illumina, San Diego, Calif.), SOAP (доступный на [soap.genomics.org.cn](http://soap.genomics.org.cn)), и Maq (доступный на [maq.sourceforge.net](http://maq.sourceforge.net)). В нескольких вариантах осуществления, последовательность-проводник содержит 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 по длине. В нескольких вариантах осуществления, последовательность-проводник содержит менее, чем приблизительно 75, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 12 или менее нуклеотидов по длине.

Способность последовательности-проводника направлять специфичное для последовательности связывание комплекса CRISPR с последовательностью-мишенью можно оценить посредством любого подходящего анализа. Например, компоненты системы CRISPR, достаточные для образования комплекса CRISPR, включающего последовательность-проводник, подлежащую тестированию, могут быть предоставлены для клетки-хозяина, имеющей соответствующую последовательность-мишень, таким образом, как посредством

трансфекции с использованием векторов, кодирующих компоненты последовательности CRISPR, с последующей оценкой преимущественного расщепления в последовательности-мишени, как посредством аналитического теста Surveyor, описанного в данном документе. Аналогично, расщепление целевой полинуклеотидной последовательности можно оценивать в пробирке посредством предоставления последовательности-мишени, компонентов комплекса CRISPR, включающих последовательность-проводник, подлежащую тестированию, и контрольную последовательность-проводник, отличающуюся от тестируемой последовательности-проводника, и сравнения связывания или степени расщепления в последовательности-мишени между реакциями для тестируемой и контрольной последовательностей-проводников. Другие тесты являются возможными, и могут применяться специалистами в данной области.

Последовательность-проводник может быть выбрана для направленного действия на любую последовательность-мишень. В нескольких вариантах осуществления, последовательность-мишень представляет собой последовательность в геноме клетки. Иллюстративные последовательности-мишени включают такие последовательности, которые являются уникальными в целевом геноме.

В нескольких вариантах осуществления, фермент CRISPR является частью гибридного белка, содержащего один или несколько гетерологичных белковых доменов (например, приблизительно или более, чем приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более доменов в добавление к ферменту CRISPR). Гибридный белок фермента CRISPR может содержать любую дополнительную белковую последовательность, и, необязательно, линкерную последовательность между любыми двумя доменами. Примеры белковых доменов, которые могут гибридизироваться с ферментом CRISPR, включают без ограничения, эпитопные метки, репортерного гена последовательности и белковые домены, имеющие одну или несколько из следующих активностей: метилазную активность, деметилазную активность, активность активации транскрипции, активность подавления транскрипции, активность фактора высвобождения

транскрипции, активность модификации гистона, активность расщепления РНК и активность связывания нуклеиновой кислоты. Неограничивающие примеры эпитопных меток включают гистидиновые (His) метки, V5 метки, FLAG метки, метки гемагглютинаина гриппа (HA) метки, Мус метки, VSV-G метки и тиоредоксиновые (Trx) метки. Примеры репортерных генов включают, но не ограничиваются перечисленным, глутатион-5-трансферазу (GST), пероксидазу хрена (HRP), хлорамфеникол ацетилтрансферазу (CAT) бета-галактозидазу, бета-глюкуронидазу, люциферазу, зеленый флуоресцентный белок (GFP), HcRed, DsRed, циановый флуоресцентный белок (CFP), желтый флуоресцентный белок (YFP), и аутофлуоресцентные белки, включающие синий флуоресцентный белок (BFP). Фермент CRISPR может быть гибридизирован с геной последовательностью, кодирующей белок или фрагмент белка, который связывается с молекулами ДНК или связывается с другими клеточными молекулами, включающими, но не ограничиваясь перечисленным, белок, связывающий мальтозу (MBP), S-метку, Lex A гибриды ДНК-связывающего домена (DBD), гибриды GAL4A ДНК-связывающего домена, и гибриды белка VP16 вируса простого герпеса (HSV). Дополнительные домены, которые могут образовывать часть гибридного белка, содержащего фермент CRISPR, описаны в US20110059502, включенном в настоящее описание посредством ссылки. В нескольких вариантах осуществления, меченый фермент CRISPR используют для идентификации расположения последовательности-мишени.

В аспекте раскрытого в настоящее время объекта изобретения, ген-репортер, который включает, но не ограничивается перечисленным, глутатион-5-трансферазу (GST), пероксидазу хрена (HRP), хлорамфеникол ацетилтрансферазу (CAT) бета-галактозидазу, бета-глюкуронидазу, люциферазу, зеленый флуоресцентный белок (GFP), HcRed, DsRed, циановый флуоресцентный белок (CFP), желтый флуоресцентный белок (YFP), и аутофлуоресцентные белки, включающие синий флуоресцентный белок (BFP), может вводиться в клетку, чтобы кодировать генный продукт, который служит в качестве маркера, по средством которого измеряют изменение или модификацию экспрессии генного продукта. В дополнительном

варианте осуществления раскрытого в настоящее время объекта изобретения, молекула ДНК, кодирующая генный продукт, может вводиться в клетку посредством вектора. В предпочтительном варианте осуществления раскрытого в настоящее время объекта изобретения генным продуктом является люцифераза. В дополнительном варианте осуществления раскрытого в настоящее время объекта изобретения экспрессия генного продукта снижается.

В целом, варианты осуществления промотора раскрытого в настоящее время объекта изобретения содержат: 1) полный промотор Pol III, который включает TATA-бокс, элемент проксимальной последовательности (PSE), и элемент дистальной последовательности (DSE); и 2) второй основной промотор Pol III, который включает PSE и TATA-бокс, гибридизированные с 5'-концом DSE в обращенной ориентации. TATA-бокс, который называют по его нуклеотидной последовательности, является основной детерминантой специфичности Pol III. Он обычно расположен в положении между нт. -23 и -30 относительно транскрибируемой последовательности, и является первичной детерминантой начала транскрибируемой последовательности. PSE обычно расположен между нт. -45 и -66. DSE усиливает активность основного промотора Pol III. В промоторе H1, между PSE и DSE не существует пробела.

Двунаправленные промоторы состоят из: 1) полного, традиционного, однонаправленного промотора Pol III, который содержит 3 внешних контрольных элемента: DSE, PSE, и TATA-бокс; и 2) второго основного промотора Pol III, который включает PSE и TATA-бокс, гибридизированный с 5'-концом DSE в обратной ориентации. TATA-бокс, который распознается белком, связывающим TATA, является незаменимым для мобилизации Pol III к области промотора. Связывание TATA-связывающего белка с TATA-боксом стабилизируется посредством взаимодействия SNAPc с PSE. Вместе, эти элементы корректно позиционируют Pol III, таким образом, что может транскрибировать экспрессированную последовательность. DSE также является незаменимым для полной активности промотора Pol III (Murphy et al. (1992) *Mol. Cell Biol.* 12:3247-3261; Mittal et al. (1996) *Mol. Cell Biol.* 16:1955-1965; Ford and Hernandez (1997)

*J. Biol. Chem.*, 272:16048-16055; Ford et al. (1998) *Genes, Dev.*, 12:3528-3540; Novde et al. (2002) *Genes Dev.* 16:2772-2777). Транскрипция увеличивается до 100-кратного увеличения посредством взаимодействия факторов транскрипции Oct-1 и/или SBF/Staf с их мотивами в пределах DSE (Kunkel и Nixon (1998) *Nucl. Acid Res.*, 26:1536-1543). Поскольку основные промоторы с прямой и обратной ориентацией направляют транскрипцию последовательностей на противоположных цепях каркасов двухцепочечной ДНК, положительная цепь обратно ориентированного основного промотора прикрепляется к 5'-концу отрицательной цепи DSE. Транскрипты, экспрессируемые под управлением промотора H1, терминируются неразрушенной последовательности из 4 или 5 Т'.

В промоторе H1, DSE является прилегающим к PSE и TATA-бокс (Myslinski et al. (2001) *Nucl. Acid Res.* 29:2502-2509). Чтобы минимизировать повтор последовательности, этому промотору придается двунаправленность посредством создания гибридного промотора, в котором транскрипция в обратном направлении управляется посредством прикрепления PSE и TATA-бокс полученных из Промотора U6. Чтобы облегчить построение двунаправленного промотора H1, небольшая спейсерная последовательность может также быть вставлена между обратно ориентированным основным промотором и DSE.

#### *В. Способы*

В нескольких вариантах осуществления, раскрытый в настоящее время объект изобретения также предоставляет способ изменения экспрессии одного или нескольких генных продуктов в клетке, где клетка содержит молекулу ДНК, кодирующую один или несколько генных продуктов, способ, включающий в себя введение в клетку не встречающейся в природе системы CRISPR-Cas, содержащей один или несколько векторов, содержащих: а) промотор H1, функционально связанный с, по меньшей мере, одной последовательностью кодирующей РНК-проводник (пРНК) системы CRISPR-Cas, где пРНК гибридизируется с последовательностью-мишенью молекулы ДНК; и б) регуляторный элемент, способный функционировать в клетке, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей белок Cas9, где компоненты (а) и (б) располагаются на

одинаковых или различных векторах системы, где пРНК направленно действует на последовательность-мишень и гибридизируется с нею, и белок Cas9 расщепляет молекулу ДНК для изменения экспрессии одного или нескольких генных продуктов.

В нескольких вариантах осуществления, раскрытый в настоящее время объект изобретения также предоставляет способ изменения экспрессии одного или нескольких генных продуктов в эукариотической клетке, где клетка содержит молекулу ДНК, кодирующую один или несколько генных продуктов, способ, включающий в себя введение в клетку не встречающейся в природе системы CRISPR-Cas, содержащей один или несколько векторов, содержащих: а) промотор H1, функционально связанный с, по меньшей мере, одной последовательностью, кодирующей РНК-проводник (пРНК) системы CRISPR-Cas, где пРНК гибридизируется с последовательностью-мишенью молекулы ДНК; и б) регуляторный элемент, способный функционировать в эукариотической клетке, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей белок Cas9 Типа-II, где компоненты (а) и (б) располагаются на одинаковых или различных векторах системы, посредством чего пРНК направленно действует на последовательность-мишень и гибридизируется с нею, и белок Cas9 расщепляет молекулу ДНК, и посредством чего экспрессия одного или нескольких генных продуктов изменяется. В одном аспекте, последовательность-мишень может являться последовательностью-мишенью, которая начинается с любого нуклеотида, например, N<sub>20</sub>NGG. В нескольких вариантах осуществления, последовательность-мишень содержит нуклеотидную последовательность AN<sub>19</sub>NGG. В нескольких вариантах осуществления, последовательность-мишень содержит нуклеотидную последовательность GN<sub>19</sub>NGG. В нескольких вариантах осуществления, последовательность-мишень содержит нуклеотидную последовательность CN<sub>19</sub>NGG. В нескольких вариантах осуществления, последовательность-мишень содержит нуклеотидную последовательность TN<sub>19</sub>NGG. В нескольких вариантах осуществления, последовательность-мишень содержит нуклеотидную последовательность AN<sub>19</sub>NGG или GN<sub>19</sub>NGG. В одном другом аспекте, белок Cas9 представляет собой кодон, оптимизированный для

экспрессии в клетке. В еще одном другом аспекте, белок Cas9 представляет собой кодон, оптимизированный для экспрессии в эукариотической клетке. В дополнительном аспекте, эукариотическая клетка представляет собой клетку млекопитающего или человеческую клетку. В одном другом аспекте, экспрессия одного или нескольких генных продуктов снижается.

Раскрытый в настоящее время объект изобретения также предоставляет способ изменения экспрессии одного или нескольких генных продуктов в эукариотической клетке, где клетка содержит молекулу ДНК, кодирующую один или несколько генных продуктов, способ, включающий в себя введение в клетку не встречающейся в природе системы CRISPR-Cas, содержащей вектор, содержащий двунаправленный промотор H1, где двунаправленный промотор H1 содержит: а) контрольные элементы, которые обеспечивают транскрипцию в одном направлении, по меньшей мере, одной нуклеотидной последовательности, кодирующей РНК-проводник (пРНК) системы CRISPR-Cas, где пРНК гибридизируется с последовательностью-мишенью молекулы ДНК; и б) контрольные элементы, которые обеспечивают транскрипцию в противоположном направлении нуклеотидной последовательности, кодирующей белок Cas9 Типа-II, посредством чего пРНК направленно действует на последовательность-мишень и гибридизируется с ней, и белок Cas9 расщепляет молекулу ДНК, и посредством чего экспрессия одного или нескольких генных продуктов изменяется. В одном аспекте, последовательность-мишень может представлять собой последовательность-мишень, которая начинается с любого нуклеотида, например, N<sub>20</sub>NGG. В нескольких вариантах осуществления, последовательность-мишень содержит нуклеотидную последовательность AN<sub>19</sub>NGG. В нескольких вариантах осуществления, последовательность-мишень содержит нуклеотидную последовательность GN<sub>19</sub>NGG. В нескольких вариантах осуществления, последовательность-мишень содержит нуклеотидную последовательность CN<sub>19</sub>NGG. В нескольких вариантах осуществления, последовательность-мишень содержит нуклеотидную последовательность TN<sub>19</sub>NGG. В одном другом аспекте, последовательность-мишень содержит нуклеотидную

последовательность AN<sub>19</sub>NGG или GN<sub>19</sub>NGG. В одном другом аспекте, белок Cas9 представляет собой кодон, оптимизированный для экспрессии в клетке. В еще одном другом аспекте, белок Cas9 представляет собой кодон, оптимизированный для экспрессии в эукариотической клетке. В дополнительном аспекте, эукариотическая клетка представляет собой клетку млекопитающего или человеческую клетку. В одном другом аспекте, экспрессия одного или нескольких генных продуктов снижается.

В нескольких аспектах, раскрытый в настоящее время объект изобретения предоставляет способы, включающие в себя доставку одного или нескольких полинуклеотидов, таких как один или несколько векторов, описанных в данном документе, один или несколько их транскриптов и/или один из белков, транскрибируемых из них, в клетку-хозяина. В нескольких аспектах, раскрытый в настоящее время объект изобретения дополнительно предоставляет клетки, продуцируемые такими способами, и организмы (такие как животные, растения или грибки), содержащие такие клетки или продуцируемые из них. В нескольких вариантах осуществления, фермент CRISPR в комбинации с (и необязательно в комплексе с) последовательностью-проводником доставляют в клетку. Традиционные методы генного переноса на вирусной и невирусной основе могут применяться для введения нуклеиновых кислот в клетки млекопитающих или ткани-мишени. Такие методы могут применяться для введения нуклеиновых кислот, кодирующих компоненты системы CRISPR в клетках культуры, или в организме хозяина. Невирусные системы доставки векторов включают ДНК-плазмиды, РНК (например, транскрипт вектора, описанного в данном документе), "оголенную" нуклеиновую кислоту и нуклеиновую кислоту в комплексе со средством доставки, таким как липосома. Вирусные системы доставки векторов включают ДНК- и РНК-вирусы, которые имеют либо эписомные или интегрированные геномы после доставки в клетку. Обзор процедур генной терапии, см. Anderson (1992) *Science* 256:808-813; Nabel and Felgner (1993) *TIBTECH* 11:211-217; Mitani and Caskey (1993) *TIBTECH* 11:162-166; Dillon (1993) *TIBTECH* 11:167-175; Miller (1992) *Nature* 357:455-460; Van Brunt

(1998) *Biotechnology* 6(10): 1149-1154; Vigne (1995) *Restorative Neurology and Neuroscience* 8:35-36; Kremer and Perricaudet (1995) *British Medical Bulletin* 51(1):31-44; Haddada et al. (1995) *Current Topics in Microbiology and Immunology*. Doerfler and Bohm (eds); и Yu et al. (1994) *Gene Therapy* 1:13-26.

Способы невирусной доставки нуклеиновых кислот включают липофекцию, нуклеофекцию, микроинъекцию, биолистики, вирусомы, липосомы, иммунолипосомы, конъюгаты поликатион или липид:нуклеиновая кислота, "оголенную" ДНК, искусственные вирионы и усиленный средством захват ДНК. Липофекция описана, например, в Патентах США №№ 5,049,386, 4,946,787; и 4,897,355) и реагенты для липофекции поставляются промышленно (например, Transfectam™ и Lipofectin™). Катионные и нейтральные липиды, которые являются подходящими для эффективной рецептор-распознающей липофекции полинуклеотидов включают такие липиды из Felgner, WO 91/17424; WO 91/16024. Доставка может осуществляться в клетки (например, введение *in vitro* или *ex vivo*) или ткани-мишени (например, введение *in vivo* введени).

Получение комплексов липид:нуклеиновая кислота, включающих липосомы с направленным действием, такие как иммунолипидные комплексы, является хорошо известным специалистам в данной области (например, Crystal (1995) *Science* 270:404-410; Blaese et al. (1995) *Cancer Gene Ther.* 2:291-297; Behr et al. (1994) *Bioconjugate Chem.* 5:382-389; Remy et al. (1994) *Bioconjugate Chem.* 5:647-654; Gao et al. (1995) *Gene Therapy* 2:710-722; Ahmad et al. (1992) *Cancer Res.* 52:4817-4820; Патенты США №№ 4,186,183, 4,217,344, 4,235,871, 4,261,975, 4,485,054, 4,501,728, 4,774,085, 4,837,028 и 4,946,787).

Применение систем на основе вирусных РНК или ДНК для доставки нуклеиновых кислот имеет преимущество в виде быстро развивающихся процессов для направленного действия вируса на конкретные клетки в организме и перемещения вирусной полезной нагрузки к ядру. Вирусные векторы могут вводиться непосредственно пациентам (*in vivo*) или они могут применяться для обработки клеток *in vitro*, и модифицированные клетки могут

необязательно вводиться пациентам (*ex vivo*). Традиционные системы на вирусной основе могут включать ретровирусные, лентивирусные, аденовирусные, из адено-ассоциированных вирусов и вируса простого герпеса векторы для переноса генов. Интеграция в геном хозяина является возможной посредством способов переноса генов с использованием ретровирусов, лентивирусов и адено-ассоциированных вирусов, часто приводя к долговременной экспрессии внедренного трансгена. Дополнительно, во многих различных типах клеток тканей-мишеней наблюдали высокие эффективности трансдукции.

Тропизм ретровируса может изменяться посредством введения чужеродных белков оболочки, расширяющего потенциальную целевую популяцию клеток-мишеней. Лентивирусные векторы представляют собой ретровирусные векторы, которые способны к трансдукции или инфицированию неделящихся клеток и обычно продуцируют высокие вирусные титры. Выбор ретровирусной системы переноса генов будет, следовательно, зависеть от ткани-мишени. Ретровирусные векторы составлены из *cis*-действующих длинных терминальных повторов со способностью упаковывать вплоть до 6-10 то чужеродной последовательности. Минимальные *cis*-действующие LTR являются достаточными для репликации и упаковки векторов, которые затем используются для интеграции терапевтического гена в клетку-мишень для обеспечения перманентной экспрессии трансгена. Широко применяемые ретровирусные векторы включают такие векторы на основе вируса лейкемии мышей (MuLV), вируса лейкоза гиббонов (GaLV), вируса иммунодефицита обезьян (SIV), вируса иммунодефицита человека (HIV), и их комбинации (например, Buchscher et al. (1992)*J. Virol.* 66:2731-2739; Johann et al. (1992)*J. Virol.* 66:1635-1640; Sommerfelt et al. (1990)*J. Virol.* 64:58-59; Wilson et al. (1989)*J. Virol.* 63:2374-2378; Miller et al. (1991)*J. Virol.* 65:2220-2224; PCT/US94/05700). В применениях, где временная экспрессия является предпочтительной, могут применяться системы на аденовирусной основе. Векторы на аденовирусной основе обладают способностью к очень высокой эффективности трансдукции во многих клеточных типах и не требуют деления клеток. С использованием таких векторов, были получены

высокий титр и уровни экспрессии. Такой вектор может быть получен в больших количествах в относительно простой системе. Векторы из адено-ассоциированных вирусов ("AAV") также могут применяться для трансдукции клеток с использованием целевых нуклеиновых кислот, например, при получении *in vitro* нуклеиновых кислот и пептидов, и для процедур генной терапии *in vivo* и *ex vivo* (например, West et al. (1987) *Virology* 160:38-47; Патент США № 4,797,368; WO 93/24641; Kotin (1994) *Human Gene Therapy* 5:793-801; Muzyczka (1994) *J. Clin. Invest.* 94:1351. Построение рекомбинантных векторов AAV описано в ряде публикаций, включая Патент США № 5,173,414; Tratschin et al. (1985) *Mol. Cell. Biol.* 5:3251-3260; Tratschin et al. (1984) *Mol. Cell. Biol.* 4:2072-2081; Hermonat and Muzyczka (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81:6466-6470; и Samulski et al. (1989) *J. Virol.* 63:03822-3828.

Упаковывающие клетки обычно применяют для образования вирусных частиц, которые способны инфицировать клетку-хозяина. Такие клетки включают клетки 293, которые упаковывают аденовирус, и  $\psi$ -клетки или клетки RA317, которые упаковывают ретровирус. Вирусные векторы, применяемые в генной терапии, обычно генерируют, получая клеточную линию, которая упаковывает вектор нуклеиновой кислоты в вирусную частицу. Векторы обычно содержат минимальные вирусные последовательности, требуемые для упаковки и последующей интеграции в хозяина, причем другие вирусные последовательности заменяют на кассету экспрессии для полинуклеотида (полинуклеотидов), подлежащих экспрессии. Утерянные вирусные функции обычно поставляют в процессе посредством упаковки клеточной линии. Например, векторы AAV, применяемые в генной терапии, обычно обладают только последовательностями ITR из генома AAV, которые требуются для упаковки и интеграции в геном хозяина. Вирусную ДНК упаковывают в клеточную линию, которая содержит хелперную плазмиду, кодирующую другие гены AAV, а именно, гер и сар, но при отсутствии последовательностей ITR. Клеточная линия также может быть инфицирована с использованием аденовируса в качестве хелпера. Вирус-хелпер инициирует репликацию вектора AAV и

экспрессию генов AAV из хелперной плазмиды. Хелперную плазмиду не упаковывают в значительных количествах вследствие отсутствия последовательностей ITR. Загрязнение аденовирусом может быть снижено посредством, например, тепловой обработки, к которой аденовирус является более чувствительным, чем AAV. Дополнительные методы доставки нуклеиновых кислот в клетки известны специалистам в данной области. См., например, US20030087817, включенный в настоящее описание посредством ссылки.

В нескольких вариантах осуществления, клетку-хозяина временно или не временно трансфицируют одним или несколькими векторами, описанными в данном документе. В нескольких вариантах осуществления, клетку трансфицируют в том виде, в котором она естественным образом присутствует в субъекте. В нескольких вариантах осуществления, клетку, которую трансфицируют берут из субъекта. В нескольких вариантах осуществления, клетку получают из клеток, взятых у субъекта, таких как клеточная линия. В данной области известно большое разнообразие клеточных линий для культуры тканей. Примеры клеточных линий включают, но не ограничиваются перечисленным, C8161, CCRF-CEM, MOLT, mIMCD-3, NHDF, HeLa-S3, Huh1, Huh4, Huh7, HUVEC, HASMC, HEK<sub>h</sub>, HEK<sub>a</sub>, MiaPaCell, Panel, 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, Юркат, J45,01, LRMB, Bcl-1, BC-3, IC21, DLD2, Raw264,7, NRK, NRK-52E, MRC5, MEF, Нер G2, HeLa B, HeLa T4, COS, COS-1, COS-6, COS-M6A, BS-C-1 эпителия почек обезьяны, BALB/3T3 фибробластов мышинных эмбрионов, 3T3 Swiss, 3T3-L1, 132-d5 человеческие эмбриональные фибробласты; 10,1 мышинные фибробласты, 293-T, 3T3, 721, 9L, A2780, A2780ADR, A2780cis, A172, A20, A253, A431, A-549, ALC, B16, B35, BCP-1 cells, 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, JY клетки, K562 клетки, Ku812, KCL22, KG1, KYO1, LNCap, Ma-MeI 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, OPCN/OPCT линии клеток, Peer, PNT-1A/PNT 2, RenCa, RIN-5F, RMA/RMAS, Saos-2 клетки, Sf-9, SkBr3, T2, T-47D, T84, THP1 клетка line, U373, U87, U937, VCaP, клетки Веро, WM39, WT-49, X63, YAC-1, YAR и их трансгенные разновидности. Клеточные линии являются доступными из различных источников, известных специалистам в данной области (см., например, Американскую Коллекцию типовых культур (ATCC) (Manassus, Va.)). В нескольких вариантах осуществления, клетку, трансфицированную одним или несколько векторов, описанных в данном документе, применяют для установления новой клеточной линии, содержащей одну или несколько производных от вектора последовательностей. В нескольких вариантах осуществления, клетка, временно трансфицированная с использованием компонентов системы CRISPR, описанных в данном документе (таким образом, как посредством временной трансфекции одного или нескольких векторов, или трансфекции с использованием РНК), и модифицированная через активность комплекса CRISPR, применяется для установления новой клеточной линии, содержащей клетки, содержащих модификацию, но не имеющих любой другой экзогенной последовательности. В нескольких вариантах осуществления, клетки временно или не временно трансфицируют с использованием одного или нескольких векторов, описанных в данном документе, или клеточные линии, полученные из таких клеток, применяют при оценке одного или нескольких тестируемых соединений.

В нескольких вариантах осуществления, один или несколько векторов, описанных в данном документе, применяют для получения не являющихся людьми трансгенных животных. В нескольких вариантах осуществления, трансгенное животное является млекопитающим, таким как мышь, крыса или кролик. В некоторых вариантах осуществления, организм или субъект представляет собой растение. Способы получения трансгенных животных известны в

данной области, и, как правило, начинаются со способа трансфекции клетки, такого как описан в данном документе.

В одном аспекте, раскрытый в настоящее время объект изобретения предоставляет способы модификации целевого полинуклеотида в эукариотической клетке, которая может находиться *in vivo*, *ex vivo* или *in vitro*. В нескольких вариантах осуществления, способ включает в себя забор образцов клеток или популяций клеток из человека или животного, не являющегося человеком, и модификацию клетки или клеток. Культивирование может происходить на любой стадии *ex vivo*. Клетка или клетки даже могут быть повторно введены животному, не являющемуся человеком.

В одном аспекте, раскрытый в настоящее время объект изобретения предоставляет способы модификации целевого полинуклеотида в эукариотической клетке. В нескольких вариантах осуществления, способ включает в себя обеспечение комплекса CRISPR для связывания с целевым полинуклеотидом, чтобы воздействовать на расщепление целевого полинуклеотида, таким образом, модифицируя целевой полинуклеотид, где комплекс CRISPR содержит фермент CRISPR в комплексе с последовательностью-проводником, гибридизированной с последовательностью-мишенью в целевом полинуклеотиде.

В одном аспекте, раскрытый в настоящее время объект изобретения предоставляет способ модификации экспрессии полинуклеотида в эукариотической клетке. В нескольких вариантах осуществления, способ включает в себя обеспечение комплекса CRISPR для связывания с полинуклеотидом, таким образом, что связывание приводит к увеличенной или уменьшенной экспрессии полинуклеотида; где комплекс CRISPR содержит фермент CRISPR в комплексе с последовательностью-проводником, гибридизированной с последовательностью-мишенью в полинуклеотиде.

В одном аспекте, раскрытый в настоящее время объект изобретения предоставляет способы применения одного или нескольких элементов системы CRISPR. Комплекс CRISPR раскрытого в настоящее время объекта изобретения предоставляет эффективное средство для модификации целевого полинуклеотида. Комплекс

CRISPR раскрытого в настоящее время объекта изобретения обладает широким разнообразием применимости, включая модификацию (например, делецию, вставку, транслокацию, инактивацию, активацию) целевого полинуклеотида в множестве типов клеток. Как таковой, комплекс CRISPR раскрытого в настоящее время объекта изобретения имеет широкий спектр применений в, например, генной терапии, скрининге лекарственных средств, диагностике и прогнозировании заболеваний. Иллюстративный комплекс CRISPR содержит фермент CRISPR в комплексе с последовательностью-проводником, гибридизированной с последовательностью-мишенью внутри целевого полинуклеотида.

Целевой полинуклеотид комплекса CRISPR может представлять собой любой полинуклеотид, эндогенный или экзогенный по отношению к эукариотической клеткой. Например, целевой полинуклеотид может являться полинуклеотидом, находящимся в ядре эукариотической клетки. Целевой полинуклеотид может представлять собой последовательность, кодирующую генный продукт (например, белок), или некодирующую последовательность (например, регуляторный полинуклеотид или бесполезную ДНК). Без ограничения какой-либо теорией, полагают, что последовательность-мишень должна быть ассоциирована с PAM (мотивом, прилегающим к протоспейсеру); который представляет собой короткую последовательность, распознаваемую комплексом CRISPR. Точные требования к последовательности и длине для PAM различаются в зависимости от используемого фермента CRISPR, но PAM обычно представляют собой последовательности из 2-5 пар оснований, примыкающих к протоспейсеру (то есть, последовательности-мишени). Примеры последовательностей PAM приведены в разделе примеров ниже, и квалифицированный специалист сможет идентифицировать дополнительные последовательности PAM для применения вместе с данным ферментом CRISPR.

Примеры целевых полинуклеотидов включают последовательность, ассоциированную с сигнальным биохимическим путем, например, геном или полинуклеотидом, ассоциированным с сигнальным биохимическим путем. Примеры целевых полинуклеотидов включают ассоциированный с заболеванием ген или полинуклеотид.

Термин "ассоциированный с заболеванием" ген или полинуклеотид относится к любому гену или полинуклеотиду, который выдает на выходе продукты транскрипции или трансляции на аномальном уровне или в аномальной форме в клетках, полученных из пораженных заболеванием тканей в сравнении с тканями или клеткам контроля без заболевания. Он может относиться к гену, который становится экспрессированным на аномально высоком уровне; он может относиться к гену, который становится экспрессированным на аномально низком уровне, где измененная экспрессия коррелирует с наличием и/или прогрессированием заболевания. Ассоциированный с заболеванием ген также относится к гену, обладающему мутацией (мутациями) или генетической вариацией, которая непосредственно отвечает или находится в неравновесном сцеплении с геном (генами), которые являются ответственными за этиологию заболевания. Транскрибированные или транслированные продукты могут быть известными или неизвестными, и могут находиться на нормальном или аномальном уровне.

Варианты осуществления раскрытого в настоящее время объекта изобретения также относятся к способам и композициям, относящимся к инактивации генов, амплификации генов и репарации конкретных мутаций, ассоциированных с нестабильностью повторов в ДНК и неврологическими расстройствами (Robert D. Wells, Tetsuo Ashizawa, *Genetic Instabilities and Neurological Diseases*, Second Edition, Academic Press, Oct. 13, 2011-Medical). Было обнаружено, что конкретные аспекты тандемных повторных последовательностей являются ответственными за более, чем двадцать заболеваний человека (McIvor et al. (2010) *RNA Biol.* 7(5):551-8). Система CRISPR-Cas может быть приспособлена для коррекции этих дефектов геномной нестабильности.

В еще одном другом аспекте раскрытого в настоящее время объекта изобретения, система CRISPR-Cas может применяться для коррекции дефектов глаза, которые возникают в результате нескольких генетических мутаций, дополнительно описанных в Traboulsi, ed. (2012) *Genetic Diseases of Eye*, Second Edition, Oxford University Press.

Некоторые дополнительные аспекты раскрытого в настоящее

время объекта изобретения относятся к коррекции дефектов, ассоциированных с широким кругом генетических заболеваний. Например, генетические заболевания мозга могут включать, но не ограничены перечисленными, аденолейкодистрофию, агенез мозолистого тела, синдром Экарди, болезнь Альперса, болезнь Альцгеймера, синдром Барта, болезнь Баттена, CADASIL, мозжечковая дегенерация, болезнь Фабри, болезнь Герстманна-Штреусслера-Шейнкера, болезнь Хантингтона и другие расстройства, связанные с триплетными повторами, болезнь Ли, синдром Леш-Нихана, болезнь Менкеса, митохондриальная миопатия и кольпоцефалия NINDS.

В нескольких вариантах осуществления, состояние может представлять собой неоплазию. В нескольких вариантах осуществления, состояние может представлять собой возрастную дегенерацию желтого пятна. В нескольких вариантах осуществления, состояние может представлять собой шизофреническое расстройство. В нескольких вариантах осуществления, состояние может представлять собой расстройство, связанное с тринуклеотидными повторами. В нескольких вариантах осуществления, состояние может представлять собой синдром ломкой X-хромосомы. В нескольких вариантах осуществления, состояние может представлять собой расстройство, относящееся к секретазе. В нескольких вариантах осуществления, состояние может представлять собой расстройство, относящееся к прионам. В нескольких вариантах осуществления, состояние может представлять собой ALS. В нескольких вариантах осуществления, состояние может представлять собой наркозависимость. В нескольких вариантах осуществления, состояние может представлять собой аутизм. В нескольких вариантах осуществления, состояние может представлять собой болезнь Альцгеймера. В нескольких вариантах осуществления, состояние может представлять собой воспаление. В нескольких вариантах осуществления, состояние может представлять собой болезнь Паркинсона.

Примеры белков, ассоциированных с болезнью Паркинсона включают, но не ограничены перечисленными,  $\alpha$ -синуклеин, DJ-1,

LRRK2, PINK1, Паркин, UCHL1, Синфилин-1, и NURR1.

Примеры белков, относящихся к зависимости, могут включать, например, АВАТ.

Примеры белков, относящихся к воспалению, могут включать, например, моноцитарный хемоаттрактантный белок-1 (MCP1), кодируемый геном Ccr2, С-С хемокиновый рецептор типа 5 (CCR5) кодируемый геном Ccr5, IgG рецептор IIB (FCGR2b, также называемый CD32), кодируемый геном Fcgr2b, или белок Fc эpsilon R1g (FCER1g), кодируемый геном Fcer1g.

Примеры белков, ассоциированных с сердечно-сосудистыми заболеваниями, могут включать, например, IL1B (интерлейкин 1, бета), XDH (ксантиндегидрогеназу), TP53 (опухольный белок p53), PTGIS (простагландин 12 (простациклин) синтазу), MB (миоглобин), IL4 (интерлейкин 4), ANGPT1 (ангиопоэтин 1), ABCG8 (АТФ-связывающую кассету, подсемейство G (WCOBПАДЕНИЕ), член 8), или CTSK (катепсин К).

Примеры белков, ассоциированных с болезнью Альцгеймера, могут включать, например, белок рецептора липопротеинов очень низкой плотности (VLDLR), кодируемый геном VLDLR, убиквитин-подобный модификатор фермента 1 (UBA1), кодируемый геном UBA1, или белок каталитической субъединицы NEDD8-активирующего фермента E1 (UBE1C) кодируемый геном UBA3.

Примеры белков, ассоциированных с расстройствами аутистического спектра могут включать, например, ассоциированный с бензодиазепиновым рецептором (периферическим) белок 1 (BZRAP1), кодируемый геном BZRAP1, белок 2-член семейства AF4/FMR2 (AFF2), кодируемый геном AFF2 (также называемый MFR2), гомолог 1 белка аутосомной умственной отсталости, связанной с ломкой X-хромосомой (FXR1), кодируемый геном FXR1, или гомолог 2 белка аутосомной умственной отсталости (FXR2), кодируемый геном FXR2.

Примеры белков, ассоциированных с дегенерацией желтого пятна, могут включать, например, АТФ-связывающую кассету, белок 4-член подсемейства А (ABC1) 4 (ABCA4), кодируемый геном ABCR, белок аполипопротеина Е (APOE), кодируемый геном APOE, или белок Лиганда 2 хемокина (С-С мотив) (CCL2), кодируемый геном CCL2.

Примеры белков, ассоциированных с шизофренией, могут

включать NRG1, ErbB4, CPLX1, TRH1, TRH2, NRXN1, GSK3A, BDNF, DISC1, GSK3B, и их комбинации.

Примеры белков, вовлеченных в подавление опухолей могут включать, например, ATM (мутированный при телеангиоэктатической атаксии), ATR (относящийся к телеангиоэктатической атаксии и Rad3), EGFR (рецептор эпидермального фактора роста), ERBB2 (v-erb-b2 гомолог 2 вирусного онкогена эритробластной лейкемии), ERBB3 (v-erb-b2 гомолог 3 вирусного онкогена эритробластной лейкемии), ERBB4 (v-erb-b2 гомолог 4 вирусного онкогена эритробластной лейкемии), Notch 1, Notch 2, Notch 3 или Notch 4.

Примеры белков, ассоциированных нарушениями секретазы могут включать PSENEN (гомолог 2 энхансера пресенилина (*C. elegans*)), CTSB (катепсин В), PSEN1 (пресенилин 1), APP (амилоид бета (A4) белок-предшественник), APH1B (передней глотки дефектный 1 гомолог В (*C. elegans*)), PSEN2 (пресенилин 2 (болезнь Альцгеймера 4)), или BACE1 (бета-сайт APP-расщепляющий фермент 1), например.

Примеры белков, ассоциированных с амиотрофическим боковым склерозом, могут включать SOD1 (супероксиддисмутаза 1), ALS2 (амиотрофический боковой склероз 2), FUS (гибридный в саркоме), TARDBP (ДНК-связывающий белок TAR), VAGFA (фактор А роста сосудистого эпителия), VAGFB (фактор В роста сосудистого эпителия), и VAGFC (фактор С роста сосудистого эпителия) и любую их комбинацию.

Примеры белков, ассоциированных с прионными заболеваниями могут включать SOD1 (супероксиддисмутаза 1), ALS2 (бокового амиотрофического склероза 2), FUS (гибридный в саркоме), TARDBP (ДНК-связывающий белок TAR), VAGFA (фактор А роста сосудистого эпителия), VAGFB (фактор В роста сосудистого эпителия), и VAGFC (фактор С роста сосудистого эпителия) и любую их комбинацию.

Примеры белков, относящихся к нейродегенеративным состояниям при прионных заболеваниях могут включать, например, A2M (Альфа-2-Макроглобулин), AATF (фактор транскрипции антагонизирующий к апоптозу), ACPH (простатическую кислую фосфатазу), ACTA2 (актин альфа 2 гладкой мускулатуры аорты), ADAM22 (домен ADAM металлопептидазы), ADORA3 (рецептор аденозина А3), или ADRA1D

(Альфа-1D адренергический рецептор для Альфа-1D адренорецептора).

Примеры белков, ассоциированных с иммунодефицитом могут включать, например, A2M [альфа-2-макроглобулин]; AANAT [арилалкиламин-N-ацетилтрансферазу]; ABCA1 [АТФ-связывающую кассету, подсемейство А (ABC1), член 1]; ABCA2 [АТФ-связывающую кассету, подсемейство А (ABC1), член 2]; или ABCA3 [АТФ-связывающую кассету, подсемейство А (ABC1), член 3].

Примеры белков, ассоциированных с нарушениями тринуклеотидных повторов включают, например, AR (андрогеновый рецептор), FMR1 (синдром умственной отсталости, сцепленный с ломкой хромосомой X 1), HTT (хантингтин), или DMPK (протеинкиназа миотонической дистрофии), FXN (фратаксин), ATXN2 (атаксин 2).

Примеры белков, ассоциированных с нарушениями нейротрансмиссии, включают, например, SST (соматостатин), NOS1 (синтазу оксида азота 1 (нейрональную)), ADRA2A (адренергический, альфа-2A-, рецептор), ADRA2C (адренергический, альфа-2C-, рецептор), TACR1 (тахикининовый рецептор 1), или HTR2c (5-гидрокситриптаминовый (серотониновый) рецептор 2C).

Примеры последовательностей, ассоциированных с нарушениями нервно-психического развития включают, например, A2BP1 (атаксин 2-связывающий белок 1), AADAT (аминоадипатаминотрансферазу), AANAT (арилалкиламин-N-ацетилтрансферазу), ABAT (4-аминобутират-аминотрансферазу), ABCA1 (АТФ-связывающую кассету, подсемейство А (ABC1), член 1), или ABCA13 (АТФ-связывающую кассету, подсемейство А (ABC1), член 13).

Дополнительные примеры предпочтительных состояний, поддающихся лечению с использованием настоящей системы, могут быть выбраны и включают: синдром Экарди-Гутьереса; болезнь Александера; синдром Аллана-Херндона-Дадли; расстройства, относящиеся к POLG; альфа-маннозидоз (Типа II и III); синдром Альстрема; синдром Энджелмена; атаксию-телеангиэктазию; нейрональный цероидлипофусциноз; бета-талассемию; двустороннюю оптическую атрофию и (Детскую) оптическую атрофию Типа 1; ретинобластому (двустороннюю); болезнь Канавана;

Цереброокулофациоскелетный синдром 1 (COFS1);  
Церебротендинальный ксантоматоз; синдром Корнелии де Ланге;  
расстройства, относящиеся к MAPT; генетические проионные  
заболевания; синдром Драве; семейную болезнь Альцгеймера с  
ранним началом; атаксию Фридрейха [FRDA]; синдром Фринса;  
фукозидоз; врожденную мышечную дистрофию Фукуяма;  
галактосиалидоз; болезнь Гоше; органическую ацидемию;  
гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз; синдром прогерии Хатчинсона-  
Гилфорда; муколипидоз II; детскую болезнь накопления сиаловой  
кислоты; PLA2G6-ассоциированную нейродегенерацию; синдром  
Жервелла-Ланге-Нильсена; атриовентрикулярный буллезный  
эпидермоз; болезнь Хантингтона; болезнь Краббе (Детскую);  
митохондриальный ДНК-ассоциированный синдром Лейга и NARP;  
синдром Леша-Найхана; LIS1-ассоциированную лиссэнцефалию; Лоу  
синдром; болезнь мочи с запахом кленового сиропа; синдром  
удвоения MECP2; относящиеся к ATR7A нарушения транспорта меди;  
относящаяся к LAMA2 мышечная дистрофия; дефицит арилсульфатазы  
A; мукополисахаридоз Типа I, II или III; расстройства биогенза  
пероксисом, спектр синдрома Цельвегера; нейродегенерация с  
расстройствами накопления железа в мозге; дефицит кислой  
сфингомиелиназы; болезнь Ниманна-Пика Типа C; глициновая  
энцефалопатия; относящиеся к ARX нарушения; нарушения цикла  
образования мочевины; относящий к COL1A 1/2 незавершенный  
остеогенез; синдромы делеции митохондриальной ДНК; относящиеся к  
RPLP1 расстройства; синдром Перри; синдром Фелан-МакДермид;  
гликогеноз Типа II (болезнь Помпе) (Детскую); расстройства,  
относящиеся к MAPT; расстройства, относящиеся к MECP2;  
анкилозирующую точечную эпифизарную дисплазию Типа 1; синдром  
Робертса; болезнь Сандхоффа; болезнь Шиндлера-Типа 1;  
аденозиндезаминазную недостаточность; синдром Смита-Лемли-  
Опитца; спинальную мышечную атрофию, детскую спинально-  
церебеллярную атаксию; недостаточность гексозаминидазы A;  
танатофорную дисплазию Типа 1; расстройства, относящиеся к  
коллагену Типа VI; синдром Уше Типа I; врожденную мышечную  
дистрофию; синдром Вольфа-Хиршхорна; дефицит лизосомной кислой  
липазы; и пигментную ксеродерму.

## II. РНК-РИБОЗИМЫ И РЕГУЛИРУЕМЫЕ АПТАЗИМЫ ДЛЯ ЭКСПРЕССИИ И РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ пРНК *IN VIVO*.

Раскрытый в настоящее время объект изобретения также относится к применению РНК-рибозимов и регулируемых аптазимов для экспрессии и регуляции экспрессии пРНК *in vivo*, конкретно, применению 5'-рибозима типа головки молотка для цис-процессинга РНК-проводников со специфичностью к нерестриктированному 1-му нуклеотиду и регуляции *in vivo* функции пРНК посредством РНК-аптазимов.

Соответственно, раскрытый в настоящее время объект изобретения также предоставляет аптамер-регулируемый рибозим, содержащий: а) цис-действующий рибозим типа головки молотка, содержащий каталитический центр и дуплексные области спирали I, спирали II и спирали III, выходящие из него, где каждая из дуплексной области спирали II и дуплексной области спирали III содержит петлевую область напротив каталитического центра, и, где дуплексная область спирали II содержит аптамер, который связывается с лигандом; б) нуклеотидную последовательность, кодирующую РНК-проводник (пРНК) системы CRISPR-Cas, где пРНК гибридизируется с последовательностью-мишенью молекулы ДНК в эукариотической клетке, и, где молекула ДНК кодирует один или несколько генных продуктов, экспрессируемых в эукариотической клетке, где нуклеотидная последовательность содержит 5'-конец и 3'-конец, и, где 5'-конец нуклеотидной последовательности непосредственно связан с дуплексной областью спирали III; где связывание лиганда с аптамером производит конформационное изменение в рибозиме, таким образом, что рибозим претерпевает саморасщепление между 5'-концом нуклеотидной последовательности и дуплексной областью спирали III, посредством чего получают пРНК. Также предоставлена экспрессирующая конструкция, содержащая: (i) кодирующую последовательность, которая, при транскрипции в РНК, продуцирует аптамер-регулируемый рибозим; и (ii) один или несколько транскрипционных регуляторных последовательностей, которые регулируют транскрипцию РНК в эукариотической клетке. Также предоставлена эукариотическая клетка, содержащая

экспрессирующую конструкцию. Также предоставлен способ изменения экспрессии одного или нескольких генных продуктов в эукариотической клетке, где клетка содержит молекулу ДНК, кодирующую один или несколько генных продуктов, способ, включающий в себя введение экспрессирующей конструкции в клетку и контактирование клетки с лигандом в количестве, которое изменяет активность рибозима, в частности, где клетка находится в млекопитающем или человеческом субъекте. В одном аспекте, лиганд представляет собой теофиллин.

Рибозимы представляют собой молекулы РНК, которые катализируют разнообразные химические реакции, такие как саморасщепление или лигирование (Long и Uhlenbeck (1993) *FASEB J.* 7:25-30). Различные встречающиеся в природе рибозимы были идентифицированы в вирусах, вироидах и простейших. Одна из первых каталитических РНК была обнаружена в сателлитной РНК вироида кольцевой пятнистости табака (sTRSV) (De la Pena et al. (2003) *EMBO J.* 22: 5561-70). Было показано, что *in vivo* этот патогенный вирион участвует в цис- и саморасщеплении во время репликации. Со времени открытия первого рибозима, различные классы природных рибозимов, включая "шпильку" и рибозим типа головки молотка, были идентифицированы и подробно охарактеризованы.

Рибозим типа головки молотка (hRz) является одним из наиболее подробно исследованных рибозимов (Long and Uhlenbeck (1993) *Faseb J.* 7: 25-30; Pley et al. (1994) *Nature* 372:68-74; Hammann et al. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 5503-8; Blount and Uhlenbeck (2005) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 34:415-40). Он состоит из трех спиральных областей, которые сходятся в высококонсервативном каталитическом центре из одиннадцати нуклеотидов (nts) (Khvorova et al. (2003) *Nat. Struct. Biol.* 10:708-12; Salehi-Ashtiani and Szostak (2001) *Nature* 414: 82-4). Расщепление является специфичным по отношению к последовательности и целенаправленно затрагивает триплет 5'-NUX-3', где N является любым основанием, U представляет собой урацил, и X является любым основанием, за исключением гуанина.

Оптимальным NUX для эффективного и быстрого расщепления является GUC. Расщепление рибозимом катализируется, когда 2'-гидроксильная группа из X, находящаяся непосредственно рядом с 3' сайта расщепления, депротонируется. Этот нуклеофил затем атакует неустойчивый фосфат и, посредством пентакоординированного тригонального бипирамидального переходного состояния, продуцирует 5'- и 3'-продукт (Blount and Uhlenbeck (2005) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 34:415-40).

Постулируют, что фолдинг hRz в активную конформацию проходит через события двойного связывания дивалентного иона. Событие связывания с высокой аффинностью происходит при 500 мкМ и регламентирует первый набор третичных взаимодействий. Второе низкоаффинное добавление иона происходит при 10 мМ и реструктурирует ориентации стебля hRz, таким образом, что спираль I раскладывается от спирали III и взаимодействует со спиралью II (Hamann et al. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 5503-8). HRz с консервативными каталитическими центрами, которые не поддерживают специфичные петли стебля называют минимальные рибозимы типа головки молотка (mhRz). В то время как mhRz являются активными при высоких концентрациях дивалентных ионов (10 мМ), при низких концентрациях mhRz являются эффективно инертными (De la Pena et al. (2003) *EMBO J.*, 22: 5561-70; Khvorova et al. (2003) *Nat. Struct. Biol.* 10:708-12). Кристаллические структуры природных hRz отображают "Y"-образную молекулу, которая имеет две из петель стебля, взаимодействующих как "целующиеся петли" (Pley et al. (1994) *Nature.* 372:68-74). Предполагают, что эти третичные взаимодействия между неспаренными основаниями в петлях стебля стабилизируют каталитически активную конформацию и избегают условий с высоким содержанием дивалентного иона. Исследователи продемонстрировали восстановленную в условиях *in vitro* каталитическую активность при биологически уместных концентрациях дивалентных ионов, между 100 и 500 мкМ, посредством повторного включения петель в конструкции mhRz (De la Pena et al. (2003) *EMBO J.* 22: 5561-70; Khvorova et al. (2003) *Nat. Struct. Biol.* 10:708-12; Canny et al. (2004) *J. Am. Chem. Soc.* 126: 10848-9; Penedo et al. (2004)

*RNA* 10: 880-8; Saksmerprome et al. (2004) *RNA* 10:1916-24; Weinberg и Rossi (2005) *FEBS Lett.* 579:1619-24). Посредством выявления правил конструирования для каталитической активности *in vivo*, hRz в настоящее время рассматривают как эффективные регуляторы экспрессии генов.

Соответственно, рибозим типа головки молотка содержит центральную часть, три стебля, которые выходят из центра. Термины "Стебель" и "спираль" могут применяться в данном описании взаимозаменяемо. Соответственно, три стебля, выходящие из центральной части называют в данном документе как стебель I, стебель II и стебель III (или спираль I, спираль II и спираль III), и, по меньшей мере, одна петля, которая расположена на противоположном конце стебля из центральной части. В вариантах осуществления цис-действующих рибозимов, рибозим содержит две петли, одну, расположенную на конце стебля II (или спирали II), и другую, расположенную на конце стебля III (или спирали III).

Как применяют в настоящем описании, "цис-расщепляющий рибозим типа головки молотка" представляет собой рибозим типа головки молотка который, перед расщеплением, состоит из единственного полинуклеотида. Цис-расщепляющий рибозим типа головки молотка способен расщеплять сам себя.

Стебель (или спираль) представляет собой мотив нуклеиновой кислоты, который выходит из центральной части рибозима, по меньшей мере, часть которого является двухцепочечной. В некоторых вариантах осуществления, существует петля на противоположном конце стебля от центральной части рибозима, и эта петля соединяет две цепи двухцепочечного стебля. В некоторых вариантах осуществления, стебель содержит от 2 до 20 комплементарных пар оснований. В некоторых вариантах осуществления, стебель содержит 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9 комплементарных пар оснований.

В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, 30% нуклеотидов в стебле являются частью комплементарной пары оснований. Остальные пары оснований могут представлять собой несогласующиеся, некомплементарные пары оснований, или могут быть частью выпетливания. В некоторых вариантах осуществления,

по меньшей мере, 40% нуклеотидов в стебле являются частью комплементарной пары оснований. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, 50% нуклеотидов в стебле являются частью комплементарной пары оснований. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, 60% нуклеотидов в стебле являются частью комплементарной пары оснований. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, 70% нуклеотидов в стебле являются частью комплементарной пары оснований. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, 80% нуклеотидов в стебле являются частью комплементарной пары оснований. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, 90% нуклеотидов в стебле являются частью комплементарной пары оснований. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, 95% нуклеотидов в стебле являются частью комплементарной пары оснований. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, 99% нуклеотидов в стебле являются частью комплементарной пары оснований. В некоторых вариантах осуществления, 100% нуклеотидов в стебле являются частью комплементарной пары оснований.

Петля представляет собой последовательность нуклеотидов, которая не является спаренной с еще одной цепью и расположена на удаленном конце стебля, который находится напротив центральной части. В некоторых вариантах осуществления, петля имеет длину между 1 и 20 нуклеотидами. В некоторых вариантах осуществления, петля имеет длину между 2 и 10 нуклеотидами. В некоторых вариантах осуществления, петля имеет длину между 3 и 8 нуклеотидами. Петля нумеруется в соответствии со стеблем, к которому она присоединена. Следовательно, петля I расположена на конце стебля I напротив центральной части, петля II расположена на конце стебля II напротив центральной части, и петля III расположена на конце стебля III напротив центральной части.

Как применяют в настоящем описании, а "стебель/петля" относится к полному стеблю (или спирали), наряду с любыми выпетливаниями внутри такого стебля, и петли на конце стебля. Например, стебель/петля II включает стебель II, включающий любые выпетливания внутри стебля II, и петлю II. Если в стебле отсутствует петля, то стебель/петля относится к стеблю, наряду с

любыми выпетливаниями внутри такого стебля. Как применяют в настоящем описании, "петля" представляет собой последовательность нуклеотидов, которая не является спаренной с еще одной цепью, и является фланкированной по обеим сторонам последовательностями двухцепочечной нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления, петля расположена внутри стебля. Когда выпетливание расположена внутри стебля, нуклеотиды выпетливания считают частью стебля. В некоторых вариантах осуществления, рибозим типа головки молотка содержит более одного выпетливания. В некоторых вариантах осуществления, выпетливание внутри стебля расположено на расстоянии двух пар оснований от центральной части. В некоторых вариантах осуществления, одна или обе цепи стебля содержат выпетливание.

Как применяют в настоящем описании, нуклеотидная последовательность, кодирующая пРНК системы CRISPR-Cas, содержит 5'-конец и 3'-конец, и 5'-конец нуклеотидной последовательности непосредственно связан с дуплексной областью спирали III. "Непосредственно связан" означает, что петля, относительно активной структуры рибозима в отсутствие аптамера, прерывается только по одной фосфодиэфирной связи остова между двумя остатками петли, причем фосфодиэфирная связь остова заменяется на фосфодиэфирные связи с 5'- и 3'-концами аптамера. В активной форме аптамер-регулируемого рибозима, 5'- и 3'-остатки домена передачи информации спарены по основаниям друг с другом с образованием дуплексной области, чтобы сохранить структуру иным образом прерванной петли.

"Лиганд" или "анализируемое вещество" или их грамматические эквиваленты в данном описании предусматривают обозначение для любых молекулы или соединения, подлежащих обнаружению, и то, что они могут взаимодействовать с аптамером, подлежащим конструированию и/или выбранному, как описано здесь. Подходящие лиганды или анализируемые вещества включают, но не ограничиваются перечисленными, небольшие химические молекулы, такие как химикаты из окружающей среды или имеющие клиническое происхождение, загрязнители или биомолекулы, включающие, но не

ограниченные перечисленными, пестициды, инсектициды, токсины, терапевтические лекарственные средства и наркотики, гормоны, антибиотики, антитела, органические материалы и т.д. Подходящие биомолекулы включают, но не ограничиваются перечисленным, белки (включающие ферменты, иммуноглобулины и гликопротеины), нуклеиновые кислоты, липиды, лектины, углеводы, гормоны, цельные клетки (включающие прокариотические (такие как патогенные бактерии) и эукариотические клетки, включающие опухолевые клетки млекопитающих), вирусы, споры и т.д. Иллюстративные анализируемые вещества, которые являются белками, включают, но не ограничиваются перечисленными, ферменты; лекарственные средства; клетки; антитела; антигены; антигены и рецепторы клеточной мембраны (невральные, гормональные, питательные и рецепторы поверхности клетки) или их природные лиганды.

Рибозим типа головки молотка (hRz) представляет собой мотив РНК, который способен поддерживать либо в транс- или в цис-конфигурации расщепление фосфодиэфирной связи. Цис-действующий рибозим типа головки молотка (chRz) является каталитической РНК, которая претерпевает саморасщепление своего собственного остова с получением двух продуктов РНК. Цис-действующий рибозимы типа головки молотка содержат три спаренные по основаниям стебля и высоко консервативную центральную часть из остатков, требующихся для расщепления. Реакция расщепления протекает посредством атаки 2'-гидроксильного кислорода каталитического участка цитозина на атоме фосфора, присоединенного к 3'-углерода того же остатка. Это разрушает фосфатный остов сахара и производит 2',3'-циклический фосфат.

Минимальная последовательность головки молотка, которая требуется для реакции саморасщепления, включает приблизительно 13 консервативных или инвариантных "сердцевинных" нуклеотидов, большинство из которых не вовлечено в образование канонических пар оснований Уотсона-Крика. Центральная область фланкирована стеблями I, II и III, которые, как правило, состоят из канонических пар оснований Уотсона-Крика, но иным образом не ограничены по отношению к последовательности.

Специфичность расщепления транс-действующего рибозима типа

головки молотка (thRz) управляется гибридизирующими плечами рибозима, которые отжигаются с субстратом комплементарным образом, и направляют расщепление неустойчивой фосфодиэфирной связи. Эта активность специфически направляется, чтобы проявляться после третьего нуклеотида триплета расщепления.

Представленный, раскрытый в настоящее время объект изобретения предоставляет аптамер-регулируемые транс-действующие рибозимы типа головки молотка и аптамер-регулируемые цис-действующие рибозимы типа головки молотка. Субъектные аптамер-регулируемые thRz и chRz представляют собой разносторонний класс рибозимов, которые могут быть легко сконструированы, чтобы быть восприимчивыми к разнообразным лигандам, и являются применимыми во многих приложениях. Например, аптамер-регулируемые thRz и chRzs могут быть сконструированы для модуляции активности целевых генов лиганд-зависимым образом, и, следовательно, являются применимыми для модуляции экспрессии эндогенных или гетерологичных генов.

Домен рибозима (также именуемый здесь эффекторным доменом) может иметь, по меньшей мере, два конформационных состояния, состояние "выключено" и состояние "включено", которое определяют по его уровню активности (скорость реакции, например) для либо прохождения саморасщепления в случае chRz, или расщепления последовательности-мишени в случае thRz. Эффекторные домены раскрытого в настоящее время объекта изобретения могут переключаться между их конформационными состояниями "включено" и "выключено" в ответ на связывание лиганда с доменом аптамера. Аптамер-регулируемые рибозимы раскрытого в настоящее время объекта изобретения, следовательно, действуют в качестве переключателя, чья активность изменяется в сторону "включено" и "выключено" в ответ на связывание лиганда. В некоторых вариантах осуществления, функция домена рибозима сильно зависит от присутствия или отсутствия лиганда, или может показывать большую зависимость типа доза-ответ от концентрации лиганда, доступного для связывания с доменом аптамера.

Выбор лиганда, с которым связывается аптамер, и, следовательно, посредством которого регулируется рибозим,

является очень широким. В некоторых случаях, лиганд представляет собой небольшую молекулу, имеющую молекулярную массу менее 2500 а.е.м. Просто для иллюстрации, эти молекулы могут представлять собой природные или не встречающиеся в природе молекулы, включающие пептиды, малые органические молекулы (включающие лекарственные средства и некоторые метаболиты и интермедиаты, кофакторы и т.д.) и ионы металлов. Иллюстративные лиганды, которые связываются с аптамером включают без ограничения, малые молекулы, такие как лекарственные средства, метаболиты, интермедиаты, кофакторы, аналоги переходного состояния, ионы, металлы, нуклеиновые кислоты и токсины. Аптамеры могут также связывать природные и синтетические полимеры, включающие белки, пептиды, нуклеиновые кислоты, полисахариды, гликопротеины, гормоны, рецепторы и поверхности клеток, такие как клеточные стенки и клеточные мембраны. Связывание лиганда с аптамером, который обычно является РНК, изменяет спаривание оснований с доменом передачи информации, который переносится в виде структурного изменения в домене рибозима и изменяет его способность опосредовать расщепление фосфодиэфирной связи (либо саморасщепление или расщепление последовательности-мишени). Следовательно, связывание лиганда воздействует на способность эффекторного домена опосредовать, например, инактивацию гена, транскрипцию, трансляцию или иным образом препятствовать нормальной активности гена-мишени или мРНК.

Аптамер наиболее типично получают посредством селекции *in vitro* по связыванию с целевой молекулой. Однако селекция аптамера *in vivo* также является возможной. Аптамеры имеют специфичные области связывания, которые способны образовывать комплексы с предназначенной целевой молекулой в окружении, где другие вещества в таком же окружении, не образуют комплекса с нуклеиновой кислотой. Специфичность связывания определяют с позиций сравнительных констант диссоциации ( $K_d$ ) аптамера для его лиганда в сравнении с константой диссоциации аптамера для других веществ в окружении или неродственных молекул в общем случае. Лигандом является объект, который связывается с аптамером с более высокой аффинностью, чем с неродственным материалом.

Обычно,  $K_d$  для аптамера по отношению к его лиганду будет составлять, по меньшей мере, приблизительно в 10 раз меньше, чем  $K_d$  для аптамера с неродственным материалом или сопровождающим материалом в окружении. Даже более предпочтительно,  $K_d$  будет составлять, по меньшей мере, приблизительно в 50 раз меньше, более предпочтительно, по меньшей мере, приблизительно в 100 раз меньше, и наиболее предпочтительно, по меньшей мере, приблизительно в 200 раз меньше. Аптамер обычно будет иметь длину между приблизительно 10 и приблизительно 300 нуклеотидами по длине. В более общем случае, аптамер будет иметь длину между приблизительно 30 и приблизительно 100 нуклеотидами.

Можно легко получить аптамеры, которые связываются с самыми разнообразными молекулами. Каждая из этих молекул может применяться в качестве модулятора ассоциированного рибозима, с использованием способов раскрытого в настоящее время объекта изобретения. Например, было показано, что органические молекулы, нуклеотиды, аминокислоты, полипептиды, элементы мишеней на поверхностях клеток, ионы, металлы, соли, сахараиды, все являются подходящими для выделения аптамеров, которые могут специфически связываться с соответствующим лигандом. Например, органические красители, такие как Hoechst 33258 успешно применялись как целевые лиганды для селекций аптамеров *in vitro* (Werstuck и Green (1998) *Science* 282:296-298). Другие малые органические молекулы, как допамин, теофиллин, сульфородамин В и целлобиоза, также применялись в качестве лигандов при выделении аптамеров. Аптамеры также были выделены для антибиотиков, таких как канамицин А, ливидомицин, тобрамицин, неомицин В, виомицин, хлорамфеникол и стрептомицин. Обзор аптамеров, которые распознают малые молекулы, см. Famulok (1999) *Science* 9:324-9.

В некоторых вариантах осуществления, лиганд аптамера аптамер-регулируемого рибозима раскрытого в настоящее время объекта изобретения представляет собой проникающую в клетку, малую органическую молекулу. Малые органические молекулы, которые не имеют общего ингибирующего эффекта на трансляцию являются предпочтительными в качестве лигандов. Малая молекула предпочтительно также проявляет устойчивость *in vivo*,

достаточную для достижения желательного уровня ингибирования трансляции. Молекулы также могут быть подвергнуты скринингу для идентификации таких молекул, которые являются биодоступными после, например, перорального введения. В некоторых вариантах осуществления раскрытого в настоящее время объекта изобретения, лиганд является нетоксичным. Лиганд необязательно может являться лекарством, включающим, например, стероид. Однако, в нескольких способах управления экспрессией гена, является предпочтительным, чтобы лиганд был фармакологически инертным. В нескольких вариантах осуществления, лиганд представляет собой полипептид, чье присутствие в клетке является показателем заболевания или патологического состояния. В других вариантах осуществления, лиганд для аптамера является антибиотиком, таким как хлорамфеникол. В альтернативном варианте осуществления, лиганд аптамера является органическим красителем, таким как краситель 33258 от Hoeschst. В еще одном другом варианте осуществления, лиганд может представлять собой ион металла. В конкретном варианте осуществления, домен аптамера аптамер-регулируемой нуклеиновой кислоты реагирует на связывание с кофеином.

Аптамеры обычно разрабатывают для связывания с конкретными лигандами, используя известные технологии селекции *in vivo* или *in vitro* (наиболее типично, *in vitro*) известные как SELEX (Ellington et al. (1990) *Nature* 346, 818-22; и Tuerk et al. (1990) *Science* 249, 505-10). Способы получения аптамеров также описаны, например, в Патенте США № 5,582,981; Публикации PCT № WO 00/20040; Патенте США № 5,270,163; Lorsch and Szostak (1994) *Biochemistry* 33:973; Mannironi et al. (1997) *Biochemistry* 36:9726; Blind(1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96:3606-3610; Huizenga and Szostak (1995) *Biochemistry* 34:656-665; Публикации PCT №№. WO 99/54506, WO 99/27133, WO 97/42317 и Патенте США № 5,756,291.

В целом, в их наиболее основной форме, технологии селекции *in vitro* для идентификации аптамеров включают сначала подготовку крупного пула олигонуклеотидов желательной длины, которые содержат, по меньшей мере, некоторую область, которая является рандомизированной или мутагенизированной. Например, обычный

олигонуклеотидный пул для селекции аптамеров может содержать область из 20-100 рандомизированных нуклеотидов, фланкированных по обоим концам областью длиной приблизительно 15-25 нуклеотидов с определенной последовательностью, применимой для связывания праймеров ПЦР. Олигонуклеотидный пул амплифицировали, используя стандартные технологии ПЦР, хотя могут использоваться любые средства, которые обеспечат достоверную, эффективную амплификацию выбранных последовательностей нуклеиновых кислот. Пул ДНК затем транскрибируют *in vitro* с получением РНК-транскриптов. РНК-транскрипты затем могут быть подвергнуты аффинной хроматографии, хотя может использоваться любой протокол, который обеспечит селекцию нуклеиновых кислот на основании их способности специфически связываться с еще одной молекулой (например, белком или любой молекулой-мишенью). В случае аффинной хроматографии, транскрипты в наиболее типичном случае пропускают через колонку или приводят в контакт с магнитными шариками или т.п., на которых был иммобилизован целевой лиганд. Молекулы РНК в пуле, которые связываются с лигандом, удерживаются на колонке или шарике, в то время как несвязывающиеся последовательности вымываются. Молекулы РНК, которые связываются с лигандом затем обратно транскрибируют и амплифицируют повторно посредством ПЦР (обычно после элюирования). Отобранные последовательности пула затем пропускают через еще один раунд такого же типа селекции. В типичном случае, последовательности пула пропускают через всего от приблизительно трех до десяти итеративных раундов процедуры селекции. кДНК затем амплифицируют, клонируют и секвенируют, используя стандартные методики для идентификации последовательности молекул РНК, которые способны действовать в качестве аптамеров для целевого лиганда. Как только последовательность аптамера успешно идентифицирована, аптамер может быть дополнительно оптимизирован посредством выполнения дополнительных раундов селекции, начиная с пула олигонуклеотидов, содержащих мутагенизированную последовательность аптамера. Для применения в настоящем, раскрытом в настоящее время объекте изобретения, аптамер

предпочтительно отбирают по связыванию с лигандом в присутствии концентраций солей и температур, которые имитируют нормальные физиологические условия.

В целом, можно выбрать подходящий лиганд, безотносительно того, является ли аптамер еще доступным. В большинстве случаев, рядовой специалист в данной области может получить аптамер, который связывается с выбранным лигандом. Уникальная природа процесса селекции *in vitro* позволяет проводить выделение подходящего аптамера, который связывается с желательным лигандом, несмотря на полный недостаток знаний предшествующего уровня, касающихся того какой тип структуры может связываться с желательным лигандом.

Для аптамера, являющегося подходящим для применения в настоящем, раскрытом в настоящее время объекте изобретения, аффинность связывания аптамера для лиганда должна быть достаточно высокой, и структура, образованная аптамером при связывании с его лигандом, должна быть достаточно значительной, чтобы переключать аптамер-регулируемый рибозим раскрытого в настоящее время объекта изобретения между состояниями "включено" и "выключено" или настроить функциональный уровень аптамер-регулируемого рибозима.

Константа ассоциации для аптамера и ассоциированного лиганда предпочтительно является такой, чтобы лиганд функционировал для связывания с аптамером и имел желательный эффект при концентрации лиганда, полученной при введении лиганда. Для применения *in vivo*, например, константа ассоциации должна быть такой, чтобы связывание происходило при значительно более низкой концентрации лиганда, которая может быть достигнута в сыворотке или другой ткани. Предпочтительно, чтобы требуемая концентрация лиганда для применения *in vivo* была также ниже той концентрации, которая могла бы оказывать нежелательные воздействия на организм.

Соответственно, некоторые варианты осуществления предоставляют способы конструирования и отбора аптамеров или доменов аптамеров, которые являются восприимчивыми к одному или нескольким предварительно выбранным или предварительно

определенным лигандам. Конкретные аптамер-регулируемые рибозимы также могут быть "настроены" таким образом, что их характеристики переключения более или менее являются чувствительными к связыванию с лигандом. Аптамер-регулируемые рибозимы также могут быть "настроены" таким образом, что аффинность связывания домена аптамера является более или менее чувствительной к его лиганду. Например, термодинамические свойства образования внутримолекулярного дуплекса и других 2- и 3-мерных структурах в аптамер-регулируемых рибозимах могут быть изменены таким образом, что домен аптамера является более или менее подверженным связыванию с лигандом, т.е., так, чтоб это могло проявляться в константе диссоциации ( $K_d$ ) или других кинетических параметрах (таких как константы скоростей  $K_{on}$  и  $K_{off}$ ). Альтернативно, аллостерические изменения в домене рибозима могут быть более или менее восприимчивыми к связыванию с лигандом при изменениях гибридизации и других внутримолекулярных взаимодействиях, которые могут воздействовать на 2- и 3-мерные структуры домена рибозима. Передовые стратегии конструирования для изменения термодинамических свойств структур нуклеиновых кислот являются хорошо известными в данной области. Например, увеличенная комплементарность спаривания нуклеиновых кислот может увеличивать стабильность домена рибозима или домена аптамера.

### III. СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Раскрытый в настоящее время объект изобретения также предоставляет способы лечения нейродегенеративных заболеваний, расстройств или состояний. В нескольких вариантах осуществления, раскрытый в настоящее время объект изобретения предоставляет способ лечения глазного нейродегенеративного заболевания у субъекта, нуждающегося в таком лечении, способ, включающий в себя: (a) предоставление не встречающейся в природе системы CRISPR-Cas, содержащей один или несколько векторов, содержащих: i) промотор H1, функционально связанный с, по меньшей мере, одной последовательностью, кодирующей РНК-проводник (пРНК) системы CRISPR-Cas, где пРНК гибридизируется с последовательностью-мишенью молекулы ДНК в клетке субъекта, и,

где молекула ДНК кодирует один или несколько генных продуктов, экспрессируемых в клетке; и ii) регуляторный элемент, способный функционировать в клетке, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей белок Cas9, где компоненты (i) и (ii) располагаются на одинаковых или различных векторах системы, где пРНК направленно действует на последовательность-мишень и гибридизируется с ней, и белок Cas9 расщепляет молекулу ДНК для изменения экспрессии одного или нескольких генных продуктов; и (b) введение субъекту эффективного количества системы.

Под термином "нейродегенеративное заболевание, расстройство или состояние" подразумевают заболевание, расстройство или состояние (включая нейропатию), ассоциированные с дегенерацией или дисфункцией нейронов или других нервных клеток, таких как фоторецепторные клетки сетчатки. Нейродегенеративное заболевание, расстройство или состояние может представлять собой любое заболевание, расстройство или состояние, при котором может иметь место сниженная функция или дисфункция нейронов, или потеря нейронов или других нервных клеток.

Такие заболевания, расстройства или состояния включают, но не ограничиваются перечисленными, глаукому, и нейродегенеративные заболевания, расстройства или состояния нервной системы, как таковые или ассоциированные с амиотрофическим боковым склерозом (ALS), невралгией тройничного нерва, глоссофарингеальной невралгией, параличом Белла, тяжелой миастенией, мышечной дистрофией, прогрессирующей мышечной атрофией, первичным боковым склерозом (PLS), псевдобульбарным синдромом, прогрессирующим бульбарным параличом, спинальной мышечной атрофией, наследственной мышечной атрофией, синдромами позвоночных дисков, шейным спондилезом, поражениями нервных сплетений, компрессионный деструктивным синдромом верхней апертуры грудной клетки, периферическими нейропатиями, порфирией, болезнью Альцгеймера, болезнью Хантингтона, болезнью Паркинсона, заболеваниями, обусловленными болезнью Паркинсона, множественной системной атрофией, прогрессирующим надъядерным параличом, корково-базальной дегенерацией, деменцией с тельцами Леви, лобно-височной деменцией, демиелинизирующими болезнями,

синдромом Гийена-Барре, рассеянным склерозом, болезнью Шарко-Мари-Тута, прионными заболеваниями, болезнью Крейцфельда-Якоба, синдромом Герстманна-Штреусслера-Шейнкера (GSS), фатальной семейной бессонницей (FFI), губкообразной энцефалопатией крупного рогатого скота (BSE), болезнью Пика, эпилепсией и деменциальным комплексом при СПИД.

Другими нейродегенеративными заболеваниями, нарушениями или состояниями нервной системы, как таковыми или ассоциированными с алкоголизмом, являются болезнь Александра, болезнь Альпера, телеангиоэктатическая атаксия, болезнь Баттена (также известная как болезнь Шпильмайера-Фогта-Съогрена-Баттена), болезнь Канавана, синдром Коккейна, диабетическая нейропатия, лобно-височная лобарная дегенерация, ВИЧ-ассоциированная деменция, болезнь Кеннеди, болезнь Краббе, нейроборрелиоз, болезнь Мачадо-Джозефа (спиноцеребеллярная атаксия типа 3), влажная или сухая дегенерация желтого пятна, болезнь Ниманна-Пика, болезнь Пелицеуса-Мерцбахера, дегенеративные заболевания фоторецепторов, такие как пигментная дистрофия сетчатки и ассоциированные заболевания, болезнь Рефсума, болезнь Сандгоффа, болезнь Шильдера, подострая комбинированная дегенерация спинного мозга, вторичная по отношению к пернициозной анемии, (также известная как болезнь Баттена), спинально-церебеллярная атаксия (множество типов с переменными характеристиками), болезнь Стила-Ричардсона-Ольшевского и сухотка спинного мозга.

Примеры относящейся к глазам нейродегенерации включают, но не ограничиваются перечисленными, глаукому, решетчатую дистрофию, пигментную дистрофию сетчатки, возрастную дегенерацию желтого пятна (AMD), дегенерацию фоторецепторов, ассоциированную с влажной или сухой AMD, другие дегенерации сетчатки, такие как пигментная дистрофия сетчатки (RP), друзы зрительного нерва, оптическая нейропатия и неврит зрительного нерва, такой как неврит зрительного нерва, являющийся результатом рассеянного склероза. В нескольких вариантах осуществления, глазное нейродегенеративное заболевание выбирают из группы, состоящей из глаукомы, дегенерации сетчатки и возрастной дегенерации желтого пятна. В нескольких вариантах осуществления, глазное

нейродегенеративное заболевание представляет собой пигментную дистрофию сетчатки (RP).

Неограничивающие примеры различных типов глаукомы, которые могут предупреждаться или подвергаться лечению в соответствии с раскрытым в настоящее время объектом изобретения, включают первичную глаукому (также известную как первичная открытоугольная глаукома), хроническую открытоугольную глаукому, хроническую простую глаукому, и глаукому симплекс), глаукому низкого наполнения, первичную закрытоугольную глаукому (также известную как первичная закрытоугольная глаукома, узкоугольная глаукома, глаукома с блоком зрачка и острая застойная глаукома), острую закрытоугольную глаукому, хроническую закрытоугольную глаукому, интермиттирующую закрытоугольную глаукому, хроническую открытоугольную глаукому, пигментную глаукому, эксфолиативную глаукому (также известную как псевдоэксфолиативная глаукома или капсулированная глаукома), развивающуюся глаукому (например, первичную врожденную глаукому и детскую глаукому), вторичную глаукому (например, воспалительную глаукому (например, увеит и гетерохромный иридоциклит Фукса)), факогенную глаукому (например, закрытоугольную глаукому со зрелой катарактой, фактоанафилактическую глаукому, вторичную по отношению к разрыву мембраны хрусталика, факолитическую глаукому, обусловленную факотоксической блокировкой решетчатой структуры и сублюксацию линзы), глаукому, являющуюся следствием внутриглазного кровотечения (например, гифему и гемолитическую глаукому, также известную как эритрокластическая глаукома), травматическую глаукому (например, глаукому с угловым смещением, травматическую рецессию на угле передней камеры, послеоперационную глаукому, афакический зрачковый блок, и глаукому, вызванную блоком ресничного тела), неоваскулярную глаукому, глаукому, индуцированную лекарственным препаратом (например, глаукому индуцированную кортикостероидами и альфа-химотрипсиновую глаукому), токсическую глаукому и глаукому, ассоциированную с внутриглазными опухолями, отслоениями сетчатки, тяжелым химическим ожогом глаза и атрофией радужки. В некоторых вариантах осуществления, нейродегенеративное заболевание,

расстройство или состояние представляет собой заболевание, расстройство или состояние, которое не является ассоциированным с избыточным ангиогенезом, например, глаукому, которая не является неоваскулярной глаукомой.

Как применяют в настоящем описании, термин "расстройство" в общем случае относится к любому состоянию, которое могло бы получить благоприятный эффект в результате лечения с использованием соединения против одной из идентифицированных мишеней или одного из путей, включающему заболевание, расстройство или состояние, которое может подвергаться лечению посредством эффективного количества соединения против одной из идентифицированных мишеней или одного из путей, или его фармацевтически приемлемой соли.

Как применяют в настоящем описании, термин "лечение" может включать купирование, облегчение состояния, ингибирование прогрессирования, предотвращение или снижение вероятности заболевания, расстройства или состояния, к которым применяют такой термин, или одного или нескольких симптомов или проявлений такого заболевания, расстройства или состояния (например, заболевания или расстройства, которое вызывает дисфункцию и/или смерть фоторецепторных клеток сетчатки). В нескольких вариантах осуществления, лечение снижает дисфункцию и/или смерть фоторецепторных клеток сетчатки. Например, лечение может снижать дисфункцию и/или смерть фоторецепторных клеток сетчатки, по меньшей мере, на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 33%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 66%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более в сравнении с дисфункцией и/или смертью фоторецепторных клеток сетчатки в субъекте перед прохождением лечения или у субъекта, который не подвергался лечению. В нескольких вариантах осуществления, лечение полностью ингибирует дисфункцию и/или смерть фоторецепторных клеток сетчатки у субъекта. Как применяют в настоящем описании, "фоторецепторная клетка сетчатки" представляет собой специализированный тип нейрона, обнаруженный в сетчатке, который способен к фотопреобразованию. В нескольких вариантах

осуществления, по меньшей мере, один генный продукт представляет собой родопсин.

В нескольких вариантах осуществления, система упакована в единичную частицу адено-ассоциированного вируса (AAV) перед введением субъекту. В нескольких вариантах осуществления, введение субъекту происходит посредством субретинальной инъекции. Лечение, введение, или терапия могут быть последовательными или периодическими. Последовательное лечение, введение или терапия относятся к лечению, по меньшей мере, на ежедневной основе, без прерывания лечения на один или несколько дней. Периодическое лечение или введение, или лечение или введение периодическим образом, относятся к лечению, которое не является последовательным, но, скорее, циклическим по природе. Лечение согласно раскрытым в настоящее время способам может приводить к полному ослаблению симптомов или излечению от заболевания, расстройства или состояния или частичному устранению одного или нескольких симптомов заболевания, расстройства или состояния, и может быть временным или перманентным. Термин "лечение" также предназначен для охвата профилактики, терапии и излечения.

Термин "эффективное количество" или "терапевтически эффективное количество" относится к количеству средства, которое является достаточным для получения благоприятных или желательных результатов. Терапевтически эффективное количество может варьировать в зависимости от одного или нескольких из: субъекта и болезненного состояния, подлежащего лечению, массы тела и возраста субъекта, тяжести болезненного состояния, способа введения и т.п., которые могут быть легко определены рядовым специалистом в области. Термин также применим к дозе, которая обеспечит изображение для обнаружения посредством любого из методов визуализации, описанных здесь. Конкретная доза может варьировать в зависимости от одного или нескольких из: выбранного конкретного средства, режима последующего дозирования, независимо от того вводится ли она в комбинации с другими соединениям, временным режимом введения, ткани, и физической системы доставки, в которой она переносится.

Термины "субъект" и "пациент" применяют здесь взаимозаменяемо. Субъект, подвергаемый раскрытым в настоящее время способам в их многих вариантах осуществления желательно является человеческим субъектом, несмотря на то, что следует понимать, что способы, описанные здесь, являются эффективными по отношению ко всем видам позвоночных, которые подразумевают включенными в термин "субъект". Соответственно, "субъект" может включать человеческого субъекта в медицинских целях, таким образом, как для лечения существующего состояния или заболевания или профилактического лечения для предотвращения наступления состояния или заболевания или животного субъекта для медицинских, ветеринарных целей, или целей развития. Подходящие животные субъекты включают млекопитающих, включающих, но не ограниченных перечисленными, приматов, например, людей, обезьян, человекообразных обезьян и т.п.; бычьих, например, коров, волов и т.п.; овечьих, например, овец и т.п.; козьих, например, коз и т.п.; свиных, например, свиней, хряков и т.п.; конских, например, лошадей, ослов, зебр и т.п.; кошачьих, включающих диких и домашних кошек; песьих, включающих собак; зайцеобразных, включающих кроликов, зайцев и т.п.; и грызунов, включающих мышей, крыс и т.п. Животное может представлять собой трансгенное животное. В нескольких вариантах осуществления, субъект представляет собой человека, включая, но не ограничиваясь перечисленными, эмбрионов, новорожденных, детей, молодых и взрослых субъектов. Дополнительно, "субъект" может включать пациента страдающего от состояния или заболевания или с подозрением на наличие состояния или заболевания.

#### IV. ОБЩИЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Несмотря на то, что в данном описании используются конкретные термины, их применяют только в общем и описательном смысле, а не с целью ограничения. Если не определено иным образом, все технические и научные термины, применяемые в данном описании, имеют такое же значение, какое обычно является понятным специалистам в области, к которой представленный в настоящее время принадлежит описанный объект изобретения.

Следуя устоявшемуся соглашению для патентного закона, термины "a", "an" и "the" относятся к "одному или нескольким", когда их применяют в данной заявке, включая формулу изобретения. Таким образом, например, ссылка на "субъект" включает множество субъектов, если по контексту в явной форме не имеется в виду противоположное (например, множество субъектов) и так далее.

На протяжении данного описания и формулы изобретения, термины "содержат", "содержит" и "содержащий" используют в неисключающем смысле, за исключением тех случаев, когда по контексту требуется иное. Аналогично, термин "включают" и его грамматические варианты подразумеваются как неограничивающие, таким образом, что перечисление объектов в списке не является исключением других подобных объектов, которые могут заменять или дополнять перечисленные объекты.

Для целей данного описания и прилагаемой формулы изобретения, если не указано иначе, все числа, выражающие количества, размера, измерения, пропорции, формы, составы, параметры, процентные доли, параметры, количества, характеристики и другие числовые значения, используемые в описании и формуле изобретения, следует понимать как подвергшиеся модификации во всех случаях, посредством термина "приблизительно" даже, несмотря на то, что термин "приблизительно" может появляться вместе со значением не явным образом, количеством или интервалом. Соответственно, если не указано противоположное, числовые параметры, приведенные в следующем описании и приложенной формуле изобретения, не являются и не должны являться точными, но могут быть приближительными и/или больше или меньше по желанию, отражая допуски, факторы преобразования, округление, ошибку измерения и т.п. и другие факторы, известные специалистам в данной области в зависимости от желательного свойства, предположительно получаемого посредством раскрытого в настоящее время объекта изобретения. Например, термин "приблизительно", когда он относится к значению может считаться охватывающим вариации, в нескольких вариантах осуществления,  $\pm 100\%$  в нескольких вариантах

осуществления  $\pm 50\%$ , в нескольких вариантах осуществления  $\pm 20\%$ , в нескольких вариантах осуществления  $\pm 10\%$ , в нескольких вариантах осуществления  $\pm 5\%$ , в нескольких вариантах осуществления  $\pm 1\%$ , в нескольких вариантах осуществления  $\pm 0,5\%$ , и в нескольких вариантах осуществления  $\pm 0,1\%$  от установленного количества, так как такие вариации являются соответствующими выполнению раскрытых способов или использованию раскрытых композиций.

Дополнительно, термин "приблизительно", когда применяется в связи с одним или несколькими числами или числовыми интервалами, следует понимать, как относящийся ко всем таким числам, включая все числа в интервале и модификации такого интервала посредством расширения границ выше и ниже приведенных числовых значений. Приведение числовых интервалов посредством крайних значений включает все числа, например, целые числа, включая их доли, входящие в пределы такого интервала (например, перечисление от 1 до 5 включает 1, 2, 3, 4, и 5, а также их доли, например, 1,5, 2,25, 3,75, 4,1 и т.п.) и любой интервал в пределах данного интервала.

#### ПРИМЕРЫ

Следующие Примеры были включены, чтобы обеспечить руководство для рядового специалиста в данной области по практической реализации представительных вариантов осуществления раскрытого в настоящее время объекта изобретения. С учетом настоящего раскрытия и общего уровня квалификации в области, имеющие такую квалификацию, смогут понять, что следующие Примеры предназначены только для иллюстративных целей, и то, что многочисленные изменения, модификации и исправления могут использоваться без отступления от объема раскрытого в настоящее время объекта изобретения. Описания синтезов и конкретные примеры, которые следуют ниже, предназначены только для целей иллюстрации, и не должны рассматриваться как ограничивающие любым образом получение соединений раскрытия посредством других методов.

#### ПРИМЕР 1

## Методы

*Построение плазмиды:* Для генерации H1 пРНК-экспрессирующих конструкций (см. Таблицы 1, 2 и 3 ниже), перекрывающиеся олигонуклеотиды собирали, чтобы создать промотор H1, гибридизированный с матрицей пРНК из 76 по и сигналом терминации pol III. Между промотором H1 и матрицей пРНК, вводили сайт BamHI, чтобы обеспечить вставку нацеливающей последовательности. Последовательность H1::матрица пРНК::терминатор pol III затем ТОРО-клонировали в pCR4-Blunt (Invitrogen, Carlsbad, CA), и верифицировали секвенированием; результирующий вектор находится в обратной ориентации (см. ниже). Для генерации различных пРНК, используемых в данном исследовании, перекрывающиеся олигонуклеотиды отжигали и амплифицировали посредством ПЦР, используя двухстадийную амплификацию с ДНК-полимеразой Phusion Flash (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL), и последовательно очищали, используя Модифицированные Карбоксилатом Магнитные шарики Sera-Mag (Thermo Fisher Scientific), смешанные с 2X объемом 25% ПЭГ и 1,5M NaCl. Очищенные продукты ПЦР затем ресуспендировали в H<sub>2</sub>O и количественно оценивали, используя NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific). пРНК-экспрессирующие конструкции генерировали, используя Gibson Assembly (New England Biolabs, Ipswich, MA) (Gibson et al. (2009) *Nature Methods* 6:343-345) с небольшими модификациями для либо AflII-обработанной плазмиды (#41824, Addgene, Cambridge MA) для экспрессии U6, или обработки плазмиды BamHI, описанной здесь для экспрессии H1. Общий объем реакции снижался от 20 мкл до 2мкл.

*Культура клеток:* hESC линия H7 и клетки IMR-90 iPS (WiCell, Madison WI) поддерживали посредством клонального распространения на Matrigel с пониженным фактором роста (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) в среде mTeSR1 (Стебель CellTechnologies, Vancouver, BC), в инкубаторе с 10% CO<sub>2</sub>/5% O<sub>2</sub> согласно ранее описанным протоколам (Walker et al. (2010) *Nat. Commun.* 1:71; Maruott et al. (2013) *Stem Cells Translational Medicine* 2:341-354). Для пассирования, колонии hESC сначала инкубировали с 5 мкМ блеббистатином (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) в mTeSR1, и

затем собирали через 5-10 мин после обработки аккутазой (Sigma-Aldrich). Сгустки клеток осторожно диссоциировали в суспензию одиночных клеток и гранулировали центрифугированием. Затем, hPSCs ресуспендировали в mTeSR1 с блеббистатином и высевали на чашки при приблизительно 1000-1500 клеток/см<sup>2</sup>. Через два дня после пассирования, среду заменяли на mTeSR1 (без блеббистатина) и замену проводили ежедневно.

Линию 293T человеческих эмбриональных клеток почек (HEK) (Life Technologies, Grand Island, NY) поддерживали при 37°C с 5% CO<sub>2</sub>/20% O<sub>2</sub> в модифицированной Дульбекко среде Игла (DMEM) (Invitrogen), дополненной 10% фетальной бычьей сывороткой (Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY) и 2 mM GlutaMAX (Invitrogen).

*Направленное воздействие на гены клеток H7:* Клетки hESC культивировали в 10 мкМ ингибиторе Rho Kinase (DDD00033325, EMDMillipore, Billerica, MA) 24 ч перед электропорацией. Электропорацию выполняли, используя набор Neon (Invitrogen), в соответствии с инструкцией производителя. Вкратце, в день электропорации, hESC обрабатывали аккутазой (Sigma-Aldrich) в течение 1-2 мин до лифтинга колоний. Важно отметить, что колонии не были диссоциированными в суспензию одиночных клеток. После сбора колоний, влажные гранулы выдерживали на льду в течение 15 мин, и затем ресуспендировали в буфере для электропорации, содержащем плазмиды с направленным действием на гены. Параметры электропорации были следующими: напряжение: 1400 мс; интервал: 30 мс; 1 импульс. После электропорации, колонии клеток медленно перенесли в среду tomTeSR1, содержащую 10 мкМ ингибитора Rho Kinase, и затем выдерживали при комнатной температуре в течение 20 мин перед засеваем на чашки, покрытые Matrigel и дополнительно культивировали.

Для анализа клонально полученных колоний, электропорированные hESC выращивали до субконфлюентности, пассировали, как описано в предыдущем параграфе, и засевали в чашки при плотности, равной 500 клеток на 35-мм чашку. Впоследствии, одиночные колонии выделяли посредством сбора

вручную и дополнительно культивировали.

Для трансфекции клеток 293T ~100000 клеток/лунку высевали в 24-луночные планшеты (Falcon, Corning, NY) за 24 часа до трансфекции. Клетки трансфицировали в четырех повторных экспериментах, используя реагент Липофектамин LTXPlust (Invitrogen) в соответствии с протоколом, рекомендованным изготовителем. Для каждой лунки 24-луночного планшета, 400 нг плазмиды Cas9 и 200 нг плазмиды пРНК смешивали с 0,5мкл реагента плюс и 1,5мкл реагента Липофектамин LTX.

*Генерация конститутивно экспрессированных линий GFP ESC:*  
 Линию человеческих клеток H7 ESC (WiCell) поддерживали в среде mTeSR1 (Стебель Cell Technologies) на субстрате Matrigel. Перед пассированием клеток, клетки подвергали короткой предобработке с блеббистатином (>5 мин) для увеличения жизнеспособности клеток, обрабатывали аккутазой в течение 7 мин, растирали до суспензии одиночных клеток, гасили с использованием равного объема mTesR, гранулировали при 80 x g в течение 5 мин и ресуспендировали в mTesR, содержащей блеббистатин.  $1 \times 10^6$  клеток гранулировали, среду осторожно удаляли, и клетки помещали на лед в течение 10-15 мин. 10 мкг донорного вектора AAV-CAGGSEGFP (#22212, Addgene), имеющего гомологию к безопасному локусу AAVS1, плюс 5 мкг каждого из hAAVS1 1R+L TALEN (#35431 и 35432, Addgene) (Hockemeyer et al. (2009) *Nat. Biotechnol.* 27: 851-857; Sanjana et al. (2012) *Nature Protocols* 7: 171-192) в R-буфере электропорировали с использованием тип наконечника 100 мкл, используя систему для трансфекции Neon (Life Technologies) со следующими параметрами: 1500 В, 20 мс импульс и 1 импульс. Клетки затем аккуратно добавляли к 1 мл среды и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин и затем помещали на чашки с диаметром 35 мм покрытые Matrigel, содержащий mTeSR и 5 мкМ блеббистатина. Через 2 дня, клетки высевали при плотности, равной  $1 \times 10^4$ , после чего стабильные клональные сублинии отбирали вручную с использованием оборудованного флуоресцентной приставкой Nikon TS100 эпифлуоресцентного микроскопа.

*Аналитический тест Surveyor и анализ методом секвенирования*

*для геномной модификации:* Для анализа методом Surveyor, геномную ДНК экстрагировали посредством ресуспендирования клеток в растворе QuickExtract (Epicentre, Madison, WI), инкубируя при 65°C в течение 15 мин, и затем при 98°C в течение 10 мин. Раствор экстракта очищали, используя DNA Clean и Concentrator (Zymo Research, Irvine, CA) и количественно оценивали посредством NanoDrop (Thermo Fisher Scientific). Геномную область, окружающую сайты-мишени для CRISPR, амплифицировали из 100 нг геномной ДНК, используя ДНК-полимеразу Phusion (New England Biolabs). Множество независимых реакций ПЦР объединяли и очищали, используя спин-колонку Qiagen MinElute, следуя протоколу изготовителя (Qiagen, Valencia, CA). Объем 8мкл, содержащий 400 нг продукта ПЦР в 12,5 мМ Tris-HCl (pH 8.8), 62,5 мМ KCl и 1,875 мМ MgCl<sub>2</sub>, денатурировали и медленно повторно отжигали для обеспечения образования гетеродуплексов: 95°C в течение 10 мин, от 95°C до 85°C с быстрым линейным изменением при -1,0°C/сек, 85°C в течение 1 сек, от 85°C до 75°C с быстрым линейным изменением при -1,0°C/сек, 75°C в течение 1 сек, от 75°C до 65°C с быстрым линейным изменением при -1,0°C/сек, 65°C в течение 1 сек, от 65°C до 55°C с быстрым линейным изменением при -1,0°C/сек, 55°C в течение 1 сек, от 55°C до 45°C с быстрым линейным изменением при -1,0°C/сек, 45°C в течение 1 сек, от 45°C до 35°C с быстрым линейным изменением при -1,0°C/сек, 35°C в течение 1 сек, от 35°C до 25°C с быстрым линейным изменением при -1,0°C/сек, и затем выдерживали при 4°C. 1 мкл Энхансера Surveyor и 1мкл Нуклеазы Surveyor (Transgenomic, Omaha, NE) добавляли к каждой реакционной смеси, инкубировали при 42°C в течение 60 мин, после чего, 1мкл раствора для остановки добавляли в реакционную смесь. 1 мкл реакционной смеси количественно измеряли на Биоанализаторе 2100, используя чип ДНК 1000 (Agilent, Santa Clara, CA). Для анализа геля, 2 мкл 6X загрузочного буфера (New England Biolabs) добавляли к оставшейся реакционной смеси и загружали на гель с 3% агарозой, содержащий бромид этидия. Гели визуализировали на системе для визуализации Gel Logic 200

(Kodak, Rochester, NY), и количественно оценивали, используя ImageJ v. 1,46. Частоты NHEJ рассчитывали, используя выведенное биномиальное уравнение:

$$\% \text{ геной модификации} = 1 - \sqrt{1 - \frac{(a+b)}{(a+b+c)}} \times 100$$

где значения "a" и "b" равны интегрированной площади расщепленных фрагментов после вычитания фона и "c" равно интегрированной площади нерасщепленного продукта ПЦР после вычитания фона (Guschinet al. (2010) *Methods in Molecular Biology* 649: 247-256).

*Проточная цитометрия:* После обработки блебистатином, субконфлюентные колонии hESC собирали посредством обработки аккутазой, диссоциировали в суспензию одиночных клеток и гранулировали. Клетки затем ресуспендировали в растворе Live Cell (Invitrogen), содержащем рубиновый краситель Vybrant DyeCycle (Invitrogen) и анализировали на проточном цитометре Accuri C6 (BD Biosciences).

*Количественная кПЦР в режиме реального времени:* клетки 293T высевали при 250000 клеток/лунку в 12-луночные планшеты (Falcon) за 24 часа перед трансфекцией. Клетки трансфицировали в трех повторных экспериментах, используя Липофектамин LTX с Реагентом Плюс (Invitrogen) в соответствии с протоколом, рекомендованным изготовителем с 6-дозовым титрованием пРНК-плазмиды: 0 нг, 31,25 нг, 62,5 нг, 125 нг, 250 нг или 500 нг в каждой лунке. Через 48 часов после трансфекции, общую РНК выделяли, используя RNeasy RLT (Qiagen, Crawley, UK), и очищали, используя Direct-zol RNA MiniPrep (Zymo). 500 нг общей РНК обрабатывали dsДНКазой (ArticZymes; Plymouth Meeting, PA USA) для удаления загрязнений остаточной геномной ДНК и обратно транскрибировали в реакционной смеси объемом 20 мкл, используя обратную транскриптазу Superscript III (Invitrogen), следуя рекомендациям изготовителя. Для каждой реакции, 0,1 мкМ следующих олигонуклеотидов применяли для запуска каждой реакции; каркас пРНК-

CTTCGATGTTCGACTCGAGTCAAAAAGCACCGACTCGGTGCCAC (SEQ ID NO:1),

U6 snРНК-AAAATATGGAACGCTTCACGAATTTG (SEQ ID NO:2). Подчеркнутая последовательность каркаса обозначает последовательность якоря, добавленную для стабильности транскрипт. Каждую реакцию кПЦР проводили в ПЦР-системе BioradCFX 96 в режиме реального времени в объеме 10 мкл, используя SsoAdvanced™ Universal SYBR®Green Supermix (Biorad), содержащий 250 нМ олигонуклеотидных праймеров и 1 микролитр продукта RT реакции при разведении 1:15, из полученног выше. Реакции проводили в течение 40 циклов с денатурацией при 95°C, температурой отжига 54°C и стадиями расширения при 60°C. Следующие праймеры применяли для обнаружения РНК-проводника и эталонного гена, соответственно: Flfor-GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAA (SEQ ID NO:3) и РНК-проводники caffrev-AAGCACCGACTCGGTGCCAC (SEQ ID NO:4) и U6snRNAF-CTCGCTTCGGCAGCACATATACT (SEQ ID NO:5) и U6snRNARev-ACGCTTCACGAATTTGCGTGTC (SEQ ID NO:6). Относительную нормализованную экспрессию для каждого образца РНК-проводника и s.e.m, рассчитывали, используя управляющее программное обеспечение интегрированного CFX от Biorad.

**Биоинформатика:** Чтобы определить все поенциальные сайты CRISPR в геноме человека, применяли специальный Perlscript для поиска обеих цепей и наличией перекрывания 23-мерных последовательностей сайтов GN<sub>19</sub>NGG или AN<sub>19</sub>NGG для CRISPR. Чтобы рассчитать значения среднего и медианного расстояния, предсказанный сайт разрезания для CRISPR сначала определяли, как находящийся между третьим и четвертым основаниями последовательности PAM. После сортировки последовательностей, затем рассчитывали все расстояния между всеми примыкающими пРНК в геноме. Эти данные импортировали в R для расчета средних и медианных статистических значений, и для нанесения данных на график. Для расчета средней плотности разрезанные пРНК сайты группировали через геном и рассчитывали частоту распространения. Эти данные вносили в R, используя пакет ggplot2 или Circos для генерации кольцевого графического изображения (Krzywinski et al. (2009) *Genome Research* 19:1639-1645). Чтобы рассчитать распространенность в человеческих генах или в локусе

заболевания, утилиты IntersectBED от BEDTools (Quinlan и Hall (2010) *Bioinformatics* 26:841-842) применяли для нахождения распространенности перекрытий либо с файлом RefSeq BED извлеченного из UCSC Genome Browser или файлом BED из OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM. Институт Генетической Медицины Мак-Кусика-Натанса, Университет Джон Хопкинса (Baltimore, MD), 2013). Геномы, используемые в данном исследовании, представляли собой геномы человека (hg19), мыши (mm10), крысы (rn5), коровы (bosTau7), курицы (galGal4), данио (dr7), дрозофилы (dm3), *C. elegans* (cel0), и *S. cerevisiae* (sacCer3).

Table 1. Нацеливающие последовательности пРНК и свойства - eGFP нацеливающая конструкция, показывающая координаты eGFP, пРНК промотор, 5'-нуклеотид, нацеливающую цепь, РАМ мотив, содержание GC, Tm, и термодинамическую стабильность

Конструкция	Промотор	5'-нуклеотид	Цепь	РАМ	GC* (%)	Tm* (°C)	Стабильность 3' (ккал/моль) ( $\Delta G$ )**
GFP_213-191	U6	G	-	GGG	65	68,0	7,9
GFP_a214-192	H1	A	-	AGG	65	66,0	7,6
GFP_219-197	U6	G	-	AGG	65	69,4	11,1
GFP_285-307	U6	G	+	AGG	55	63,8	7,0
GFP_a292-314	H1	A	+	CGG	45	57,3	8,1
GFP_315-293	U6	G	-	TGG	55	62,8	6,7
GFP_360-382	U6	G	+	AGG	60	67,0	8,2
GFP_361-383	U6	G	+	GGG	55	64,8	7,0
GFP_583-561	U6	G	-	GGG	80	78,9	8,6
GFP_a584-562	H1	A	-	GGG	75	76,9	9,8
GFP_612-590	U6	G	-	CGG	55	57,6	6,4
GFP_a676_698	H1	A	+	CGG	70	72,5	6,1
GFP_705_683	U6	G	-	CGG	60	63,0	7,8

\* рассчитано исходя из 20 по последовательности-мишени

\*\* рассчитано для 3'-нуклеотидов на основании значений гибридизации ДНК:ДНК

Таблица 2. Нацеливающие последовательности пРНК и свойства - нацеливающие последовательности AAVS-1, показывающие промотор пРНК, 5'-нуклеотид, нацеливающую цепь, РАМ мотив, содержание GC, Tm, термодинамическую стабильность

Конструкция	Промотор	5' – нуклеотид	Цепь	PAM	GC* (%)	Tm* (°C)	Стабильность 3' (ккал/моль) ( $\Delta G$ ) **
AAVS1-g1	U6	G	+	GGG	70	67.3	6,7
AAVS1-g2	U6	G	+	TGG	65	64,7	7,8
AAVS1-g3	U6	G	–	GGG	60	65,5	10.9
AAVS1-a1	H1	A	–	CGG	45	54.3	6,0
AAVS1-a2	H1	A	–	TGG	60	65,5	12,4
AAVS1-a3	H1	A	–	CGG	45	55.3	8,2

Таблица 3. Нацеливающие последовательности пРНК и свойства – последовательность конструкций пРНК из 20 оснований, нацеливающих конструкций eGFP

Конструкция	Мишень CRISPR	SEQ ID NO:
GFP 213-191	5'GCACTGCACGCCGTAGGTCA-3'	7
GFP a214-192	5'-AGCACTGCACGCCGTAGGTCA-3'	8
GFP 219-197	5'-GCTGAAGCACTGCACGCCGT-3'	9
GFP 285-307	5'-GGGCGCACCATCTTCTTCA-3'	10
GFP a292-314	5'-ACCATCTTCTTCAAGGACGA-3'	11
GFP 315-293	5'-GCCGTCGTCCTTGAAGAAGA-3'	12
GFP 360-382	5'-GGTGAACCGCATCGAGCTGA-3'	13
GFP 361-383	5'-GTGAACCGCATCGAGCTGAA-3'	14
GFP 583-561	5'-GCACGGGGCCGTCGCCGATG-3'	15
GFP a584-562	5'-AGCACGGGGCCGTCGCCGAT-3'	16
GFP 612-590	5'-GGTGCTCAGGTAGTGGTTGT-3'	17
GFP a676 698	5'-ACCGCCGCCGGGATCACTCT-3'	18
GFP 705 683	5'-GTCCATGCCGAGAGTGATCC-3'	19

Результаты Чтобы расширить существующие ограничения направленного действия CRISPR/Cas9, тестировали может ли, в качестве альтернативного промотора вместо U6 применяться pol III H1 (Baer et al. (1990) *Nucleic Acids Res.* 18:97-103). Поскольку H1 может экспрессировать транскрипты с пурином (нуклеотид R), расположенным в +1 положении, была выдвинута гипотеза, что наряду с *S. pyogenes* Cas9, пространство направленного действия CRISPR может быть расширено посредством обеспечения расщепления по обоим сайтам AN<sub>19</sub>NGG и GN<sub>19</sub>NGG (ФИГ. 1A). Для демонстрации сайт-специфичного расщепления посредством пРНК экспрессируемых H1, был разработан анализ репортера для измерения CRISPR-опосредованного расщепления гена-мишени GFP, интегрированного в локус AAVS-1 человеческих эмбриональных стволовых клеток линии H7 (hESC; ФИГ. 1B) (Hockemeyer et al. (2009) *Nat. Biotechnol.* 27:851-857). Потерю флуоресценции GFP вследствие разрушения кодирующей последовательности измеряли в качестве показателя частоты подверженного ошибкам негомولوجичного соединения концов (NHEJ); важно отметить, что анализ может недооценить NHEJ, так как мутации внутри рамки или индел-мутации, которые не нарушают

флуоресценцию GFP, не могут быть обнаружены (ФИГ. 1В и ФИГ. 1С). Клетки Н7 электропорировали с использованием эквимлярных количеств Cas9, и экспрессию плазмид пРНК и клетки визуализировали на предмет флуоресценции GFP после образования колонии. В отличие от электропорации отрицательного контроля, все тестируемые конструкции пРНК из U6 и промотора Н1, показывали мозаичную потерю сигналов GFP в клетках, претерпевающих направленную мутацию (ФИГ. 1С и непоказанные данные). Количественное определение общего числа клеток с использованием красителей для ядер позволило провести анализ флуоресценции GFP на клеточной основе посредством проточной цитометрии. Несмотря на то, что 100% конструкций приводило к NHEJ, как демонстрируется потерей флуоресценции GFP, интервал эффективностей изменялся для обеих конструкций U6 и Н1 (ФИГ. 1С, справа и данные не показаны). При экспрессии пРНК из либо промотора U6 или промотора Н1, данное демонстрирует, что мутагенез гена GFP может происходить в сайтах GN<sub>19</sub>NGG или AN<sub>19</sub>NGG, соответственно.

Для подтверждения и расширения этих результатов на еще одну клеточную линию, GFP-экспрессирующая линия клеток HEK-293, экспрессирующая GFP в том же самом локусе, была подвергнута направленному действию конструкций пРНК, как описано выше. Посредством анализа Surveyor (Qiu et al. (2004) *BioTechniques* 36:702-707), был обнаружен интервал эффективностей редактирования, который варьировал для типа промотора и положения для направленного действия (ФИГ. 1D и ФИГ. 2). Используя немодифицированные IMR90.4-индуцированные плюрипотентные клетки (hiPSC), также подтверждали способность к модификации эндогенного гена посредством направленного действия на локус AAVS-1 в интронной области гена PPP1R12C. Направленное расщепление под действием пРНК, управляемых Н1 и U6, наблюдали со сравнимыми эффективностями при измерениях посредством аналитического теста Surveyor (ФИГ. 3А, ФИГ. 3В, и ФИГ. 3С).

Чтобы определить потенциальное увеличение пространства для направленного действия, проводили биоинформационный анализ для оценки доступных сайтов для CRISPR в геноме человека. В то время

как можно предсказать, что сайты AN<sub>19</sub>NGG будут встречаться приблизительно с той же частотой, что и сайты GN<sub>19</sub>NGG, было обнаружено, что в действительности они на 15% являются более распространенными (ФИГ. 4А, ФИГ. 4В, ФИГ. 4С, ФИГ. 4D, ФИГ. 5А, ФИГ. 5В, ФИГ. 5С, ФИГ. 5D, ФИГ. 5Е, и ФИГ. 5F); таким образом, изменяя специфичность от GN<sub>19</sub>NGG до RN<sub>19</sub>NGG более чем в два раза увеличивает число доступных сайтов (приблизительно 115% увеличения). С несколькими исключениями (chr16, chr17, chr19, chr20, и chr22), AN<sub>19</sub>NGG сайты присутствуют при более высоких частотах, чем сайты GN<sub>19</sub>NGG на каждой хромосоме. Чтобы сравнить средние полногеномные плотности нацеливания, средние расстояния между соседними сайтами для CRISPR в геноме рассчитывали для GN<sub>19</sub>NGG (59 по), AN<sub>19</sub>NGG (47 по), и RN<sub>19</sub>NGG сайты (26 по) (ФИГ. 4В). Дополнительно, AN<sub>19</sub>NGG сайты были даже более обогащены в подходящих областях для направленного действия в геноме человека. Было обнаружено 20% увеличение сайтов AN<sub>19</sub>NGG в генах человека, и 21% увеличение в локусах заболевания, полученные из базы данных OMIM. (ФИГ. 4С). Было также исследовано 1165 генов мРНК из генома человека, и было обнаружено, что 221 из этих генов может быть подвергнут направленному действию через один или несколько сайтов AN<sub>19</sub>NGG, но не через сайт GN<sub>19</sub>NGG (данные не показаны). Учитывая то, что эффективность гомологичной рекомбинации отрицательно коррелирует с увеличением расстояния от разрезаемых сайтов, увеличение сайтов для нацеливания CRISPR при применении промотора H1 должно способствовать более точному геномному нацеливанию и коррекции мутации (Ran et al. (2013) *Cell*16:1380-1389).

По мере того, как технология CRISPR все больше и больше применяется для геномной инженерии у широкого ряда модельных организмов, было определено потенциальное воздействие применения промотора H1 в других геномах. Этот анализ выполняли на 5 других геномах позвоночных, которые имели высокое сохранение по промотору H1 (Мышь; Крыса; Курица; Корова; и Данио). Во всех случаях было обнаружено более высокое число сайтов AN<sub>19</sub>NGG в сравнении с сайтами GN<sub>19</sub>NGG: +9% Корова; +14% Курица; +19% Крыса; +21% Мышь; и +32% Данио (ФИГ. 4С). Одно объяснение для

этого распространения может быть за счет более высокого содержания АТ (ФИГ. 6А, ФИГ. 6В, ФИГ. 6С, ФИГ. 6D, ФИГ. 6Е, и ФИГ. 6F). В геноме человека, нормализация распространенностей сайтов  $GN_{19}NGG$  и  $AN_{19}NGG$  по содержанию АТ приводит частоты почти к равенству, хотя это недействительно для всех геномов (ФИГ. 6А и ФИГ. 6F). Тем не менее, это демонстрирует применимость использования промотора H1, который более, чем в два раза увеличивает доступное в настоящее время пространство для нацеливания CRISPR в геноме человека, и аналогично во всех других тестируемых геномах.

Далее демонстрировали способность целенаправленно действовать на сайт  $AN_{19}NGG$  в эндогенном гене с использованием конструкции промотора H1. Используя клетки H7, второй экзон локуса MERTK, гена вовлеченного в фагоцитоз в пигментном эпителии сетчатки и макрофагах, и который в случаях когда мутация вызывает дегенерацию сетчатки, подвергался направленному воздействию (D'Cruz et al. (2000) *Human Molecular Genetics* 9:645-651) (ФИГ. 7А и ФИГ. 7В). Для оценки общей эффективности направленного действия, ДНК собирали из популяции клеток, которые электропорировали, и проводили аналитический тест Surveyor. Область, окружающую сайты-мишени амплифицировали с использованием двух независимых реакций ПЦР и рассчитывали 9,5% и 9,7% индел-частоту (ФИГ. 7В). Далее, 42 случайно выбранных клона изолировали и тестировали на предмет мутации посредством анализа Surveyor (данные не показаны). Секвенирование показало, что 7/42 (16,7%) скрытых мутаций, кластеризованных в 3-4 нуклеотидах по восходящей от целевого сайта PAM. 6/7 клонов имели уникальные мутации (1 клон был лишним) и 3 из них являлись биаллельными мутациями со сдвигом рамки, приводящими к предсказанному нулевому аллелю MERTK, что подтверждалось посредством анализа методом вестерн-блоттинга (ФИГ. 7С и ФИГ. 7D). Взятые вместе, эти результаты демонстрируют способность эффективно направленно воздействовать на сайт  $AN_{19}NGG$ , расположенный в эндогенном локусе.

Поскольку частота распространения нецелевых мутаций с использованием системы CRISPR-Cas9 становится предметом

беспокойства, исследовали, как применение промотора H1 может воздействовать на нецелевое воздействие, используя описанные выше конструкции GFP пРНК в качестве модельной системы. Анализ Surveyor применяли для исследования трех геномных локусов, которые на основе биоинформационного анализа были предсказаны, как сайты нецелевого действия (GFP\_11-33, GFP\_219-197, и GFP\_315-293). Две из этих конструкций (GFP\_219-197, и GFP\_315-293) являлись сайтами-мишенями GN<sub>19</sub>NGG, позволяя проводить экспрессию с использованием обоих промоторов. Один (GFP\_11-33), сайт AN<sub>19</sub>NGG, экспрессировали из промотора U6 посредством прикрепления 5'-G нуклеотида. Во всех трех исследованных нецелевых локусах, любое нецелевое расщепление было невозможно обнаружить (данные не показаны). Однако, отсутствие обнаруживаемых нецелевых результатов может быть следствием первоначального выбора мишеней GFP пРНК, в которых сайты были отобраны на основании низкой гомологии с другими геномными локусами. Таким образом, было обосновано, что более серьезной проблемой было бы сравнение экспрессии пРНК из промотора H1 и промотора U6 в сайтах для нацеливания, специфически известных, как вызывающие высокие уровни нецелевых совпадений (Fu et al. (2013) *Nat. Biotechnol.* 31:822-826; Pattanayaket al. (2013) *Nat. Biotechnol.* 31(9):839-43; Cho et al. (2014) *Genome Research* 24:132-141). Кроме того, 5'-нуклеотидная гибкость промотора H1 позволяла проводить прямое сравнение идентичных пРНК, нацеленных на сайты GN<sub>19</sub>NGG между промотором U6 и промотором H1. Тестировали два сайта, о которых ранее сообщалось Fu et al. (2013): сайт 1 VEGFA (T1) и сайт 3 VEGFA (T3) (Таблица 4, ФИГ. 8А, ФИГ. 8В, ФИГ. 8С, и ФИГ. 8D) ((Fu et al. (2013) *Nat. Biotechnol.* 31:822-826; Cho et al. (2014) *Genome Research* 24:132-141). Так как было показано, что увеличенные концентрации пРНК и Cas9 приводят к увеличенным нецелевым совпадениям ((Fu et al. (2013) *Nat. Biotechnol.* 31:822-826; Pattanayak et al. (2013) *Nat. Biotechnol.* 31(9):839-43; Hsuet al. (2013) *Nat. Biotechnol.* 31(9):827-32), было обосновано, что более низкий уровень экспрессии пРНК от промотора H1 (Bodenet al. (2003) *Nucleic Acids Res.* 31:5033-5038; Anet al. (2006) *Molecular Therapy*:

*Journal of American Society of Gene Therapy* 14:494-504; Makinen et al. (2006) *Journal of Gene Medicine* 8:433-44) может также снижать нецелевые воздействия. Используя кРВ-ПЦР, тестировали относительные уровни пРНК VEGFA T1 из промотора H1 и промотора U6, подтверждая ожидаемый пониженный уровень экспрессии от промотора H1 (ФИГ. 8А). Для сайта VEGFA T1 тестировали эффективность разрезания в целевых локусах, а также четырех нецелевых локусах. В сравнении с промотором U6, разрезание в целевых локусах было сравнимым или немного сниженным; однако, пРНК, экспрессированные промотором H1 были заметно более сдержанными в исследованных нецелевых локусах, указывая на более высокую специфичность (Нецелевой 1: 8% в сравнении с 25%; Нецелевой 2: неопределимо в сравнении с 20%; и Нецелевой 4: 9% в сравнении с 26%) (Таблица 4, ФИГ. 8А, ФИГ. 8В, ФИГ. 8С, и ФИГ. 8D). В сайте VEGFA T3, было обнаружено равное нацеливание между двумя промоторными конструкциями (26%), но снова более низкие уровни нецелевого разрезания наблюдали для промотора H1 (Таблица 4, ФИГ. 8А, ФИГ. 8В, ФИГ. 8С, и ФИГ. 8D). В то время, как необходимо провести дополнительные исследования пРНК, экспрессируемых промоторами H1 и U6, данные предполагают возможно более высокую специфичность для пРНК, экспрессируемых H1.

Дополнительное относящееся к нецелевому действию преимущество от применения подхода с использованием промотора H1 относится к недавно описанному и перспективному подходу с использованием совместного нецелевого никирования с использованием D10A мутанта Cas9, чтобы смягчить потенциальные нецелевые эффекты ((Ran et al. (2013) *Cell* 6:1380-1389; Mali et al. (2013) *Nat. Biotechnol.* 31(9):833-8). Этот подход имеет строгие потребности при нацеливании, так как он требует идентификации двух фланкирующих сайтов CRISPR, ориентированных на противоположных цепях, и в интервале приблизительно 20 по от сайта разрезания (Ran et al. (2013) *Cell* 154(6):1380-9). Можно было бы ожидать, что дополнительная плотность нацеливания, предоставляемая применением промотора H1, будет способствовать идентификации подходящих фланкирующих сайтов.

Накопленные очевидные доказательства для нацеливания Cas9 *S. pyogenes* *in vitro* и *in vivo* указывают на то, что распознавание Cas9:пРНК распространяется на все 20 пар оснований сайта нацеливания. Сначала, при тестировании  $>10^{12}$  различающихся вариантов на специфичность пРНК *in vitro*, в одном исследовании обнаружили, что +1 нуклеотид играет роль при распознавании мишени. Кроме того, расчеты позиционной специфичности на основании этих данных показали, что 5' нуклеотид имеет большее значение при распознавании мишени, чем его 3'-сосед, указывая на то, что модель "с посевом" для специфичности CRISPR может излишне упрощать вклад PAM-проксимальных нуклеотидов (Pattanayak et al. (2013) *Nat. Biotechnol.* 31(9):839-4328). Во-вторых, при альтернативных применениях, таких как интерференция CRISPR (CRISPRi), которая перенацеливает систему CRISPR для транскрипционной репрессии, было обнаружено, что 5'-усечения в пРНК значительно снижают репрессию, а 5'-удлинения с несовпадающими нуклеотидами - такими как несовпадающие основания G для экспрессии U6 - также снижают эффективность репрессии, предполагая, что обе длины (20 нт) и 5'-нуклеотидный контекст являются важными для правильного нацеливания Cas9 (Ran et al. (2013) *Cell* 154(6):1380-9; Mali et al. (2013) *Nat. Biotechnol.* 31(9):833-8; Larson et al. (2013) *Nature Protocols* 8:2180-2196; Qiet al. (2013) *Cell* 152:1173-1183; Shan et al. (2013) *Nat. Biotechnol.* 31:686-688). Окончательно, данные кристаллической структуры дополнительно подтверждают экспериментальные данные и важное значение 5'-нуклеотида в Cas9, поскольку значительные контакты осуществляются с 5'-нуклеотидом пРНК и 3'-концом целевой DNA (Jinek et al. (2014) *Science* 343:6176); Nishimasu et al. (2014) *Cell* 156:935-949).

Было показано, что для увеличенного пространства нацеливания, применение альтернативных белков Cas9 является эффективным, как у *N. meningitidis* и *S. thermophiles* (Houet et al. (2013) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 110(39):15644-9; Esvelt et al. (2013) *Nature Methods* 10(11):1116-21). Однако, несмотря на потенциал этих альтернативных белков, сообщалось об ограничениях по PAM из систем другого типа II, которые имели более строгие

требования (данные не показаны; Cong et al. (2013) *Science* 339:819-823; Hou et al. (2013) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 110(39):15644-9). Напротив, можно было бы ожидать, что модифицированная экспрессия пРНК посредством применения промотора H1 в значительной степени расширит спектр нацеливания с любым белком Cas9, безотносительно различий в PAM. Когда количественно измеряли соответствующие мишени пРНК для ортологичных белков Cas9 (AN<sub>23</sub>NNNNGATT в сравнении с GN<sub>23</sub>NNNNGATT для *N. meningitidis* и AN<sub>17</sub>NNAGAAW в сравнении с N<sub>17</sub>NNAGAAW для *S. thermophilus*), было обнаружено 64% и 69% увеличение сайтов пРНК с 5'-А нуклеотидом, указывая на еще более высокое расширение пространства для нацеливания посредством применения промотора H1 с альтернативными белками Cas9 (Таблица 5). Как предложили для растений, применение различных промоторов может расширить частоту сайтов для CRISPR. В то время как промотор U6 ограничен 5'-гуанозиновым нуклеотидом, промотор U3 из риса затруднен 5'-аленозиновым нуклеотидом, дополнительно на первый план выдвигается потребность в различных промоторах в различных системах для увеличения пространства нацеливания (Shanet al. (2013) *Nat. Biotechnol.* 31:686-688). Удобным является то, что исключительное применение промотора H1 может быть эффективно использовано для направленного действия на сайты AN<sub>19</sub>NGG и GN<sub>19</sub>NGG (и возможно сайты CN<sub>19</sub>NGG или TN<sub>19</sub>NGG (Tuschl (2002) *Nat. Biotechnol.*, 20: 446-448)) посредством единственной промоторной системы (ФИГ. 9А и ФИГ. 9В). Это в свою очередь может использоваться для расширения пространства для нацеливания как применяемых в настоящее время, так и будущих вариантов Cas9 с измененными сайтами рестрикции.

С увеличенным нацеливанием CRISPR посредством рационального выбора сайтов, улучшенными вариантами Cas9, оптимизированной архитектурой пРНК, или дополнительными кофакторами, вероятно, будет получено увеличение специфичности для всей нацеливающей последовательности, делая более важной идентичность 5'-нуклеотида. В качестве инструмента исследования, это позволит проводить больше манипуляций с геномом, минимизируя в тоже время искажающие мутации, и, для будущих клинических применений,

высокие плотности нацеливания в сочетании с высокоточным распознаванием мишени будут первостепенными для доставки безопасных и эффективных терапевтических средств.

Таблица 4. Частота индел-мутаций, индуцированных в целевых и нецелевых сайтах посредством пРНК, экспрессированных U6 или H1

Мишень	Промотор	Непроцессированная мишень	Частота индел мутации (%)	Seq ID NO:
VEGFA-T1	U6	GGGTGGGGGAGTTTGCTCctGG	24	20
VEGFA-T1	H1	GGGTGGGGGAGTTTGCTCctGG	16	20
OT1-3	U6	GG <b>AT</b> GGAGGGAGTTTGCTCctGG	25	21
OT1-3	H1	GG <b>AT</b> GGAGGGAGTTTGCTCctGG	8	21
OT1-4	U6	GGG <b>A</b> GGGTGGAGTTTGCTCctGG	20	22
OT1-4	H1	GGG <b>A</b> GGGTGGAGTTTGCTCctGG	Не определено	22
OT1-6	U6	<b>CGGGG</b> AGGGAGTTTGCTCctGG	Не определено	23
OT1-6	H1	<b>CGGGG</b> AGGGAGTTTGCTCctGG	Не определено	23
OT1-11	U6	GGG <b>G</b> AGGGGAAGTTTGCTCctGG	26	24
OT1-11	H1	GGG <b>G</b> AGGGGAAGTTTGCTCctGG	9	24
VEGFA-T3	U6	GGTGAGTGAGTGTGTGCGTgtGG	26	25
VEGFA-T3	H1	GGTGAGTGAGTGTGTGCGTgtGG	26	25
OT3-1	U6	GGTGAGTGAGTGTGTGTGTGaGG	20	26
OT3-2	H1	<b>AG</b> TGAGTGAGTGTGTGTGTGaGG	13	27
OT3-4	U6	<b>GCT</b> GAGTGAGTGT <b>AT</b> GCGTgtGG	16	28
OT3-4	H1	<b>GCT</b> GAGTGAGTGT <b>AT</b> GCGTgtGG	11	28
OT3-18	U6	<b>TGTGGG</b> TGAGTGTGTGCGTGaGG	Не определено	29
OT3-18	H1	<b>TGTGGG</b> TGAGTGTGTGCGTGaGG	Не определено	29

Таблица 5. Биоинформационный анализ альтернативных сайтов в геноме человека для целенаправленного действия Cas9. Столбцы при движении слева направо показывают вид происхождения Cas9, сайт-мишень CRISPR, частоту распространенности в немаскированном геноме человека, и частоту распространенности в повторно-маскированном геноме человека. Процентное увеличение указано после соответствующих значений жирным шрифтом.

Cas9	Сайт-мишень	Частота	Частота
		(немаскированная)	(маскированная)
<i>S. pyogenes</i>	GN <sub>19</sub> NGG	69,041,571	33,076,776
	AN <sub>19</sub> NGG	81,077,137 <b>(17%)</b>	37,795,743 <b>(14%)</b>
<i>N. meningitidis</i>	GN <sub>23</sub> NNNNGATT	4,055,280	3,227,027
	AN <sub>23</sub> NNNNGATT	6,942,105 <b>(71%)</b>	1,966,548 <b>(64%)</b>
<i>T. thermophilus</i>	GN <sub>17</sub> NNAGAAW	5,400,222	2,723,164
	AN <sub>17</sub> NNAGAAW	10,383,453 <b>(92%)</b>	4,593,021 <b>(69%)</b>

#### Обсуждение

Увеличение пространства нацеливания для CRISPR и снижение потенциала для нецелевых эффектов имеют важные последствия для геномной инженерии. Было показано, что для увеличенного пространства нацеливания применение альтернативных белков Cas9

является эффективным, как у *S. thermophilus* (NNAGAAW) и *N. meningitides* (NNNNGATT), хотя на данный момент изложенные ограничения PAM из других систем типа II имеют более строгие требования и, следовательно, снижают доступное для нацеливания пространство для последовательности, когда применяются по отдельности (данные не показаны и Cong et al. (2013) *Science* 339:819-823; Houet al. (2013) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 110(39):15644-9). Напротив, ожидают, что модифицированная экспрессия пРНК посредством применения промотора H1 значительно расширит спектр нацеливания с любым белком Cas9. У растений, в то время как промотор U6 ограничен 5'-гуанозинным нуклеотидом, промотор U3 из риса затруднен 5'-аленозинным нуклеотидом. Как недавно предположили, применение обоих промоторов могло бы расширить частоту сайтов CRISPR в геномах растений (Shan et al. (2013) *Nat. Biotechnol.* 31:686-688). Удобным является то, что исключительное применение промотора H1 может быть эффективно использовано для направленного действия на сайты AN<sub>19</sub>NGG и GN<sub>19</sub>NGG в геномах позвоночных посредством единственной промоторной системы. Это в свою очередь может использоваться для расширения пространства для нацеливания как применяемых в настоящее время, так и будущих вариантов Cas9 с измененными сайтами рестрикции.

Аналогично с использованием технологий ZFN или TALEN, одним походом для уменьшения потенциальных нецелевых эффектов могло бы быть использование совместного нецелевого никирования с использованием мутанта Cas9 (D10A) (Mali et al. (2013) *Nat. Biotechnol.* 31(9):833-8; Ran et al. (2013) *Cell* 154(6):1380-9). Это требует идентификации двух фланкирующих сайтов CRISPR на противоположных цепях, и можно было бы ожидать, что дополнительная плотность нацеливания, предоставляемая сайтами AN<sub>19</sub>NGG усилит данный подход. Дополнительное преимущество перед промотором U6 может также состоять в уменьшении ложного расщепления; поскольку несколько групп сообщали, что увеличенные концентрации пРНК и Cas9 коррелируют с увеличением склонности к нецелевым мутациям (Pattanayak et al. (2013) *Nat. Biotechnol.* 31(9):839-43; Hsu et al. (2013) *Nat. Biotechnol.*, 31(9):827-32; Fu et al. (2013) *Nat. Biotechnol.* 31(9):822-6),

более низкий уровень экспрессии, предоставляемый промотором H1, может приводить к пониженному нецелевому разрезанию. Дополнительно, Pattanayak *et al.* сообщали, что распознавание Cas9:пРНК распространяется полностью на 20 пар оснований сайта для нацеливания (Pattanayak *et al.* (2013) *Nat. Biotechnol.* 31(9):839-43). При тестировании  $>10^{12}$  различающихся вариантов на специфичность пРНК, авторы обнаружили, что +1 нуклеотид способствовал распознаванию мишени, указывая на то, что модель "с посевом" (PAM-проксимальные нуклеотиды) для специфичности CRISPR является поверхностно упрощенной. С увеличенным нацеливанием CRISPR посредством рационального выбора сайтов, улучшенными вариантами Cas9, оптимизированной архитектурой пРНК, или дополнительными кофакторами, вероятно, будет получено увеличение специфичности для всей нацеливаемой последовательности из 23 по, уделяя большее значение идентичности 5'-нуклеотида. В качестве инструмента исследования, это позволит проводить больше манипуляций с геномом, минимизируя в тоже время искажающие мутации, и, для будущих клинических применений, высокие плотности нацеливания в сочетании с высокоточным распознаванием мишени будут первостепенными для доставки безопасных и эффективных терапевтических средств.

#### ПРИМЕР 2

ФИГ. 10А, ФИГ. 10В, ФИГ. 10С, ФИГ. 10D, и ФИГ. 10Е показывают применение промотора H1 в качестве двунаправленного промотора для одновременной экспрессии белка Cas9 и РНК-проводника. Показан двунаправленный промотор H1, экспрессирующий Cas9 как транскрипт rol II влево (минус цепь), и РНК-проводник как транскрипт rol III вправо (плюс цепь). Общая экспрессия кассеты составляет приблизительно 4,4 то (ФИГ. 10А). Для тестирования способности направлять CRISPR-опосредованное расщепление из двунаправленной конструкции H1, двунаправленную конструкцию, используя пРНК-нацеливающий eGFP, клонировали в плазмиду и экспрессировали в стволовых клетках человека, экспрессирующих GFP (ФИГ. 10В). Потеря GFP обнаруживалась визуально (ФИГ. 10С; средняя панель, обозначения стрелками), указывая на успешную экспрессию и нацеливание GFP, обусловленное

экспрессирующей конструкцией. Успешное нацеливание CRISPR было также показано посредством анализа Surveyor с присутствием двух полос на дорожках 2 и 3 (ФИГ. 10D). Двухнаправленная конструкция CRISPR с использованием промотора H1 для генерации компактной нацеливающей кассеты из ~4,75 о, которая находится внутри интервала упаковки адено-ассоциированного вируса (ФИГ. 10E). Терминатор SV40 показана оранжевым цветом, и конструкция фланкируется последовательностями обращенного терминального повтора (ITR), требуемыми для получения вируса.

#### Методы

*Построение плазмиды:* Для генерации двухнаправленной H1 конструкции, человеческий кодон-оптимизированный ген Cas9 и терминатор SV40 гибридизировали с промотором H1 из 230 по (SEQ ID NO:54), где транскрипт pol II является эндогенно обнаруживаемым (минус цепь). Между промотором H1 и каркасом пРНК, был сконструирован сайт AvrII, чтобы обеспечить вставку нацеливающей последовательности. Терминаторную последовательность SV40[rev]::hcas9[rev]::H1::каркас пРНК::pol III затем клонировали в вектор NdeI/XbaI digest pUC19. Для генерации различных пРНК, используемых в данном исследовании, перекрывающиеся олигонуклеотиды отжигали, и амплифицировали посредством ПЦР используя двустадийную амплификацию с ДНК-полимеразой Phusion Flash (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL), и последовательно очищали, используя Модифицированные карбоксилатом магнитные шарики Sera-Mag (Thermo Fisher Scientific), смешанные с 2X объемом 25% ПЭГ и 1,5M NaCl. Очищенные продукты ПЦР затем ресуспендировали в H<sub>2</sub>O и количественно измеряли, используя NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific). пРНК-экспрессирующие конструкции генерировали, используя Gibson Assembly (New England Biolabs, Ipswich, MA) (Gibson et al. (2009) *Nature Methods* 6:343-345) с небольшими модификациями. Общий объем реакции снижался от 20мкл до 2мкл.

*Культура клеток:* Линию клеток H7 hESC и iPS IMR-90 (WiCell, Madison WI) поддерживали посредством клонального распространения на Matrigel с пониженным содержанием фактора роста (BD

Biosciences, Franklin Lakes, NJ) в среде mTeSR1 (Stem Cell Technologies, Vancouver, BC), в инкубаторе с 10% CO<sub>2</sub>/5% O<sub>2</sub> в соответствии с ранее описанными протоколами (Walker et al. (2010) *Nat. Commun.* 1:71; Maruotti et al. (2013) *Stem Cells Translational Medicine* 2:341-354). Для пассирования, колонии hESC сначала инкубировали с 5 мкМ блебистатина (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) в mTeSR1, а затем собирали через 5-10 мин обработки аккутазой (Sigma-Aldrich). Сгустки клеток осторожно диссоциировали в суспензию одиночных клеток и гранулировали центрифугированием. Затем, hPSCs ресуспендировали в mTeSR1 с блебистатином и высевали на чашки при приблизительно 1000-1500 клеток/см<sup>2</sup>. Через два дня после пассирования, среду заменяли на mTeSR1 (без блебистатина) и замену производили ежедневно.

Линию человеческих эмбриональных клеток почек (HEK) (Life Technologies, Grand Island, NY), 293T, поддерживали при 37°C с 5% CO<sub>2</sub>/20% O<sub>2</sub> в модифицированной Дульбекко среде Игла (DMEM) (Invitrogen), дополненной 10% фетальной бычьей сывороткой (Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY) и 2 мМ GlutaMAX (Invitrogen).

*Направленное воздействие на гены клеток H7:* клетки hESC культивировали в 10 мкМ ингибитора Rho Kinase (DDD00033325, EMD Millipore, Billerica, MA) за 24 ч перед электропорацией. Электропорацию проводили, используя набор Neon (Invitrogen), в соответствии с инструкцией производителя. Вкратце, в день электропорации, hESC обрабатывали аккутазой (Sigma-Aldrich) в течение 1-2 мин до лифтинга колоний. Важно отметить, что колонии не диссоциировали в суспензию одиночных клеток. После сбора колоний, влажные гранулы выдерживали на льду в течение 15 мин, и затем ресуспендировали в буфере для электропорации, содержащем плазмиду с направленным воздействием на гены. Параметры электропорации были следующими: напряжение: 1400 мс; интервал: 30 мс; 1 импульс. После электропорации, колонии клеток медленно переносили в среду mTeSR1, содержащей 10 мкМ ингибитора Rho Kinase, и затем выдерживали при комнатной температуре в течение 20 мин перед помещением на покрытые Matrigel чашки и

дополнительно культивировали.

Для анализа клонально полученных колоний, электропорированные hESC выращивали до субконфлюентности, пассировали, как описано в предыдущем параграфе и высевали на чашки при плотности, равной 500 клеток на чашку с диаметром 35 мм. Впоследствии, одиночные колонии изолировали посредством ручного пикирования и дополнительно культивировали.

*Генерация конститутивно экспрессируемых линий GFP ESC:* Линию H7 человеческих ESC (WiCell) поддерживали в среде mTeSR1 (Stem Cell Technologies) на субстрате Matrigel. Перед пассированием клеток, клетки подвергали короткой предобработке с блеббистатином (>5 мин) для увеличения жизнеспособности клеток, обрабатывали аккутазой в течение 7 мин, растирали до суспензии одиночных клеток, гасили с использованием равного объема mTesR, гранулировали при 80хg в течение 5 мин и ресуспендировали в mTesR, содержащей блеббистатин.  $1 \times 10^6$  клеток гранулировали, среду осторожно удаляли, и клетки помещали на лед в течение 10-15 мин. 10мкг донорного вектора AAV-CAGGSEGFP (#22212, Addgene), имеющего гомологию с безопасным локусом AAVS1, плюс 5мкг каждого из hAAVS1 1R+L TALENs (#35431 и 35432, Addgene) (Hockemeyer et al. (2009) *Nat. Biotechnol.* 27: 851-857; Sanjana et al. (2012) *Nature Protocols* 7: 171-192) в R-буфере электропорировали с использованием типа наконечника 100 мкл, используя систему Neon для трансфекции (Life Technologies) со следующими параметрами: 1500 В, импульс 20 мс и 1 импульс. Клетки затем осторожно добавляли в 1 мл среды и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин и затем помещали на чашки с диаметром 35 мм, покрытые Matrigel, содержащие mTeSR и 5мкМ блеббистатина. Через 2 дня, клетки высевали при плотности, равной  $1 \times 10^4$ , после чего стабильные клональные сублинии отбирали вручную, используя эпифлуоресцентный микроскоп, оборудованный флуоресцентной приставкой Nikon TS100.

*Аналитический тест Surveyor и анализ методом секвенирования модификации генома:* Для проведения анализа методом Surveyor, геномную ДНК экстрагировали посредством ресуспендирования клеток

в растворе QuickExtract (Epicentre, Madison, WI), инкубируя при 65°C в течение 15 мин, и затем при 98°C в течение 10 мин. Раствор экстракта очищали используя DNA Clean и Concentrator (Zymo Research, Irvine, CA) и количественно оценивали посредством NanoDrop (Thermo Fisher Scientific). Геномную область, окружающую сайты-мишени для CRISPR, амплифицировали из 100 нг геномной ДНК, используя ДНК-полимеразу Phusion (New England Biolabs). Множество независимых реакционных смесей ПЦР объединяли и очищали, используя спин-колонку Qiagen MinElute, следуя протоколу изготовителя (Qiagen, Valencia, CA). Объем 8 мкл, содержащий 400 нг продукта ПЦР в 12,5 мМ Tris-HCl (pH 8,8), 62,5 мМ KCl и 1,875 мМ MgCl<sub>2</sub> денатурировали и медленно повторно отжигали для обеспечения образования гетеродуплексов: 95°C в течение 10 мин, от 95°C до 85°C с быстрым линейным изменением при -1,0°C/сек, 85°C в течение 1 сек, от 85°C до 75°C с быстрым линейным изменением при -1,0°C/сек, 75°C в течение 1 сек, от 75°C до 65°C с быстрым линейным изменением при -1,0°C/сек, 65°C в течение 1 сек, от 65°C до 55°C с быстрым линейным изменением при -1,0°C/сек, 55°C в течение 1 сек, от 55°C до 45°C с быстрым линейным изменением при -1,0°C/сек, 45°C в течение 1 сек, от 45°C to 35°C с быстрым линейным изменением при -1,0°C/сек, 35°C в течение 1 сек, от 35°C до 25°C с быстрым линейным изменением при -1,0°C/сек, и затем выдерживали при 4°C. 1 мкл энхансера Surveyor и 1 мкл Нуклеазы Surveyor (Transgenomic, Omaha, NE) добавляли к каждой реакционной смеси, инкубировали при 42°C в течение 60 мин, после чего, 1 мкл раствора для остановки добавляли в реакционную смесь. 1 мкл реакционной смеси количественно измеряли на Биоанализаторе 2100, используя чип ДНК 1000 (Agilent, Santa Clara, CA). Для анализа геля, 2 мкл 6X загрузочного буфера (New England Biolabs) добавляли к оставшейся реакционной смеси и загружали на гель с 3% агарозой, содержащий бромид этидия. Гели визуализировали на Системе для визуализации Gel Logic 200 (Kodak, Rochester, NY), и количественно измеряли, используя ImageJ v. 1,46. Частоты NHEJ рассчитывали, используя выведенное

биномиальное уравнение:

$$\% \text{ геной модификации} = 1 - \sqrt{1 - \frac{(a+b)}{(a+b+c)}} \times 100$$

где значения "a" и "b" равны интегрированной площади расщепленных фрагментов после вычитания фона, и "c" равно интегрированной площади нерасщепленного продукта ПЦР после вычитания фона (Guschinet al. (2010) *Methods in Molecular Biology* 649: 247-256).

### ПРИМЕР 3

ФИГ. 11А, ФИГ. 11В, и ФИГ. 11С показывают рибозим типа головки молотка для генерации 5'-конца РНК-проводника. 5'-цис-рибозим типа головки молотка (SEQ ID NO: 49) и пРНК (SEQ ID NO: 50) изображены на ФИГ. 11А. Указаны последовательности рибозима типа головки молотка, и указаны нуклеотиды, важные для катализа (решающие-красным цветом, важные-оранжевым цветом). Положение расщепления указано стрелкой. При расщеплении рибозимом (внизу), результирующая пРНК высвобождается, без ограничения доступа к любому нуклеотиду в заново образованном 5'-положении. Конструкции, демонстрирующие экспрессию головки молотка-пРНК, показаны на ФИГ. 11В. Промотор, как правило, промотор *rol III*, как U6, H1 или T7, может применяться для экспрессии 5'-цис-рибозима типа головки молотка, который после саморасщепления будет высвобождать пРНК. Нацеливание на два локуса показано на ФИГ. 11С с использованием аналитического теста Surveyor (H1+последовательность CGG PAM=SEQ ID NO: 51; H2+последовательность AGG PAM=SEQ ID NO: 52), с успешным расщеплением (стрелки) посредством 5'-цис-рибозима типа головки молотка.

ФИГ. 12 показывает регулируемую конструкцию CRISPR, с использованием аптазимов для процессинга пРНК в присутствии специфичных аптамеров. Конкретно, ФИГ. 12 отображает теофиллиновый аптамер (оранжевый), гибридизированный со спиралью II рибозима типа головки молотка с образованием теофиллинового аптазима, который находится в 5' пРНК (синий). Связывание теофиллина стабилизирует спираль II, которая затем обеспечивает

саморасщепление головки молотка и высвобождение пРНК. пРНК, наряду с Cas9, теперь обладает способностью нацеленно действовать на расщепление посредством системы CRISPR.

### Методы

*Построение плазмиды:* Для генерации конструкции 5'-цис-головка молотка, управляемой промотором U6, H1 или T7, последовательность головки молотка (GTACGTTTCCSTCTGATGAGTCCCAAATAGGACGAAACGCGCTTCGGTGCGTC; SEQ ID NO:53) помещают по нисходящей от промотора, и по восходящей от мишени и каркаса пРНК. Для образования спирали I, 10 нуклеотидов комплементарных пРНК последовательности-мишени помещали 5' последовательности головки молотка, которая затем могла бы связываться с комплементарной последовательностью, обнаруженной в пРНК (ФИГ. 12). Для генерации различных пРНК, используемых в данном исследовании, перекрывающиеся олигонуклеотиды, отжигали и амплифицировали посредством ПЦР, используя двустадийную амплификацию Phusion Flash ДНКполимеразы Phusion Flash (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL), и последовательно очищали, используя модифицированные карбоксилатом магнитные шарики Sera-Mag (Thermo Fisher Scientific), смешанные с 2X объемом 25% PEG и 1,5M NaCl. Очищенные продукты ПЦР затем ресуспендировали в H<sub>2</sub>O и количественно измеряли, используя NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific). пРНК-экспрессирующие конструкции генерировали, используя Gibson Assembly (New England Biolabs, Ipswich, MA) (Gibson et al. (2009) *Nature Methods* 6:343-345) с небольшими модификациями. Общий объем реакции снижали от 20 мкл до 2мкл.

*Культура клеток:* Линию H7 клеток hESC и клетки IMR-90 iPS (WiCell, Madison WI) поддерживали посредством клонального распространения на Matrigel с пониженным содержанием фактора роста (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) в среде mTeSR1 (Stem Cell Technologies, Vancouver, BC), в инкубаторе с 10% CO<sub>2</sub>/5% O<sub>2</sub> в соответствии с ранее описанными протоколами (Walker et al. (2010) *Nat. Commun.* 1:71; Maruotti et al. (2013) *Stem Cells Translational Medicine* 2:341-354). Для пассирования, колонии hESC сначала инкубировали с 5мкМ блебистатином (Sigma-Aldrich,

St. Louis, MO) в mTeSR1, и затем собирали после 5-10 мин обработки аккутазой (Sigma-Aldrich). Сгустки клеток осторожно диссоциировали в суспензию одиночных клеток и гранулировали центрифугированием. Затем, hPSCs ресуспендировали в mTeSR1 с блеббистатином и высевали на чашки при приблизительно 1000-1500 клеток/см<sup>2</sup>. Через два дня после пассирования, среду заменяли на mTeSR1 (без блеббистатина) и замену проводили ежедневно.

Линию hESC человеческих эмбриональных клеток почек (HEK), 293T, (Life Technologies, Grand Island, NY) поддерживали при 37°C с 5% CO<sub>2</sub>/20% O<sub>2</sub> в модифицированной Дульбекко среде Игла (DMEM) (Invitrogen), дополненной 10% фетальной бычьей сывороткой (Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY) и 2мМ GlutaMAX (Invitrogen).

*Направленное воздействие на гены клеток H7:* клетки hESC культивировали в 10мкМ ингибитора Rho Kinase (DDD00033325, EMDMillipore, Billerica, MA) за 24 ч до электропорации. Электропорацию выполняли, используя набор Neon (Invitrogen), в соответствии с инструкцией производителя. Вкратце, в день проведения электропорации, hESC обрабатывали аккутазой (Sigma-Aldrich) в течение 1-2 мин до лифтинга колоний. Важно отметить, что колонии не диссоциировали в суспензию одиночных клеток. После сбора колоний, влажные гранулы выдерживали на льду в течение 15 мин, и затем ресуспендировали в буфере для электропорации, содержащем плазмиды с направленным воздействием на гены. Параметры электропорации были следующими: напряжение: 1400 мс; интервал: 30 мс; 1 импульс. После электропорации, колонии клеток медленно переносили в среду mTeSR1, содержащую 10мкМ ингибитора Rho Kinase, и затем выдерживали при комнатной температуре в течение 20 мин перед засеиванием в чашки, покрытые Matrigel, и дополнительно культивировали.

Для анализа клонально полученных колоний, электропорированные hESC выращивали до субконфлюентности, пассировали, как описано в предыдущем параграфе, и высевали на чашки при плотности, равной 500 клеток на чашку с диаметром 35 мм. В последующем, одиночные колонии изолировали посредством

ручного пикирования и дополнительно культивировали.

*Генерация конститутивно экспрессируемых линий GFP ESC:*  
 Линию H7 человеческих ESC (WiCell) поддерживали в среде mTeSR1 (Stem Cell Technologies) на субстрате Matrigel. Перед пассированием клеток, клетки подвергали короткой предобработке с блеббистатином (>5 мин) для увеличения жизнеспособности клеток, обрабатывали аккутазой в течение 7 мин, растирали до суспензии одиночных клеток, гасили с использованием равного объема mTeSR, гранулировали при 80хg в течение 5 мин и ресуспендировали в mTeSR, содержащей блеббистатин.  $1 \times 10^6$  клеток гранулировали, среду осторожно удаляли и клетки помещали на лед в течение 10-15 мин. 10 мкг донорного вектора AAV-CAGGSEGFP (#22212, Addgene), имеющего гомологию с безопасным локусом AAVS1, плюс 5мкг каждого из hAAVS1 1R+L TALEN (#35431 и 35432, Addgene) (Hockemeyer et al. (2009) *Nat. Biotechnol.* 27: 851-857; Sanjana et al. (2012) *Nature Protocols* 7: 171-192) в R-буфере, электропорировали с использованием наконечника типа 100 мкл, используя систему для трансфекции Neon (Life Technologies) со следующими параметрами: 1500 В, 20 мс импульс и 1 импульс. Клетки затем осторожно добавляли к 1 мл среды и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин и затем помещали на чашки с диаметром 35 мм, покрытые Matrigel, содержащие mTeSR и 5мкМ блеббистатина. Через 2 дня, клетки высевали при плотности, равной  $1 \times 10^4$ , после чего стабильные клональные сублинии отбирали вручную с помощью оборудованного флуоресцентной приставкой Nikon TS100 эпифлуоресцентного микроскопа.

*Аналитический тест Surveyor и анализ методом секвенирования модификации генома:* Для анализа Surveyor, геномную ДНК экстрагировали посредством ресуспендирования клеток в растворе QuickExtract (Epicentre, Madison, WI), инкубируя при 65°C в течение 15 мин, и затем при 98°C в течение 10 мин. Раствор экстракта очищали, используя DNA Clean и Concentrator (Zymo Research, Irvine, CA) и количественно оценивали посредством NanoDrop (Thermo Fisher Scientific). Геномную область, окружающую сайты-мишени для CRISPR, амплифицировали из 100 нг

геномной ДНК, используя ДНК-полимеразу Phusion (New England Biolabs). Множество независимых реакционных смесей ПЦР объединяли и очищали, используя спин-колонку Qiagen MinElute, следуя по протоколу изготовителя (Qiagen, Valencia, CA). Объем 8мкл, содержащий 400 нг продукта ПЦР в 12,5мМ Tris-HCl (pH 8,8), 62,5мМ KCl и 1,875мМ MgCl<sub>2</sub>, денатурировали и медленно повторно отжигали для обеспечения образования гетеродуплексов: 95°C в течение 10 мин, от 95°C до 85°C с быстрым линейным изменением при -1,0°C/сек, 85°C в течение 1 сек, от 85°C до 75°C с быстрым линейным изменением при -1,0°C/сек, 75°C в течение 1 сек, от 75°C до 65°C с быстрым линейным изменением при -1,0°C/сек, 65°C в течение 1 сек, от 65°C до 55°C с быстрым линейным изменением при -1,0°C/сек, 55°C в течение 1 сек, от 55°C до 45°C с быстрым линейным изменением при -1,0°C/сек, 45°C в течение 1 сек, от 45°C до 35°C с быстрым линейным изменением при -1,0°C/сек, 35°C в течение 1 сек, от 35°C до 25°C с быстрым линейным изменением при -1,0°C/сек, и затем выдерживали при 4°C. 1мкл энхансера Surveyor и 1 мкл нуклеазы Surveyor (Transgenomic, Omaha, NE) добавляли к каждой реакционной смеси, инкубировали при 42°C в течение 60 мин, после чего, 1 мкл раствора для остановки добавляли в реакционную смесь. 1 мкл реакционной смеси количественно измеряли на Биоанализаторе 2100, используя чип ДНК 1000 (Agilent, Santa Clara, CA). Для анализа геля, 2мкл 6X загрузочного буфера (New England Biolabs) добавляли к оставшейся реакционной смеси и загружали на гель с 3% агарозой, содержащий бромид этидия. Гели визуализировали на системе для визуализации Gel Logic 200 (Kodak, Rochester, NY), и количественно измеряли, используя ImageJ v. 1,46. Частоты NHEJ рассчитывали, используя выведенное биномиальное уравнение:

$$\% \text{ геномной модификации} = 1 - \sqrt{1 - \frac{(a+b)}{(a+b+c)}} \times 100$$

где значения "a" и "b" равны интегрированной площади расщепленных фрагментов после вычитания фона, и "c" равно интегрированной площади нерасщепленного продукта ПЦР после

вычитания фона (Guschinet al. (2010) *Methods in Molecular Biology* 649: 247-256).

#### ПРИМЕР 4

##### Изложение сущности

Пигментная дистрофия сетчатки (RP) представляет собой наследственное дегенеративное заболевание сетчатки, при котором дисфункция и смерть фоторецепторных клеток сетчатки (палочек и колбочек) приводит к потере зрения и потенциально к слепоте. Существуют как аутосомно-рецессивные, так и аутосомно-доминантные генетические формы RP (ARRP и ADRP, соответственно). При ARRP имеются мутации в обеих копиях гена, ответственного за болезнь) (для большинства генов, одна копия гена наследуется от матери и другая от отца). Заболевание, вызываемое мутациями, ассоциированными с ARRP, обычно приводит к потере функции вовлеченного гена, т.е. дегенерации сетчатки обусловлена потерей способности вовлеченного гена выполнять его нормальную функцию. В таких случаях совершенно ясно, по меньшей мере, в теории, что необходимо сделать для разработки соответствующего лечения - необходимо заменить функцию потерянного гена. Наглядными примерами данного подхода являются продолжающиеся испытания на людях лечения амавроза Лебера (LCA), при котором генную терапию вместе с адено-ассоциированным вирусом (AAV) применяют для замены функции дефектного гена RPE65, который вызывает заболевание.

При ADRP, в отличие от ARRP, только одна из двух копий гена, вызывающего заболевание, является мутированной. В большинстве случаев, этот одиночный мутированный ген не вызывает дегенерацию сетчатки, так как он утратил функцию; скорее, он вызывает заболевание, поскольку мутация приводит к выработке генного продукта, который приобрел новую функцию, функцию, которая является токсичной или вредной для палочек и/или колбочек фоторецепторов клетки. Такая ситуация делает стратегии генной замены более сложными, так как введение функционального гена не является достаточным; эффективная терапия требует как разработки подхода с избавлением от экспрессии "плохого" генного

продукта, продуцируемого из гена с токсической мутацией, и поддержания функции немутированной копии гена, которую генетики называют геном "дикого типа" (WT).

В настоящее время, не существует терапий ADRP, разрешенных FDA. В большинстве лабораторных исследований и испытаний на животных используется двустадийный подход: 1) устранить функцию как мутированной, так и WT копий гена, и затем 2) ввести, обычно посредством AAV-опосредованной генной терапии, новую "отвержденную" форму гена WT, которая является резистентной к терапии, применяемой на первой стадии, которая разрушила эндогенный ген WT.

Раскрытый в настоящее время объект изобретения предоставляет новую стратегию лечения ADRP, стратегию, в которой используют редактирование гена по действию CRISPR/Cas9, чтобы точно направленно редактировать информацию генома живого организм, т.е. которая обеспечивает терапевтическую модуляцию генов. В раскрытых в настоящее время способах применяют редактирование генов под действием CRISPR/Cas9 чтобы специфически изменить мутированную копию гена, вызывающего заболевание, таким образом, чтобы он не экспрессировал свой токсичный генный продукт, в то же время, не воздействуя на экспрессию гена WT. Например, мутантная версия гена родопсина, ассоциированная с ADRP (P23H) может специфически подвергаться направленному действию, изменяющему его последовательность таким образом, что он более не экспрессирует токсичный генный продукт. В нескольких вариантах осуществления, компоненты CRISPR/Cas9 доставляют в глаз в одиночной вирусной частице AAV. Эту систему тестируют на мышинной мутантной модели ADRP P23H родопсина. Эти исследования подтверждают новый подход для генной терапии, основанный на специальной генетической инженерии клеток сетчатки, для лечения ADRP. Раскрытый в настоящее время объект изобретения является применимым к различным формам ADRP, также другим аутосомно-доминантным наследственным дистрофиям сетчатки.

#### Конкретные цели

Аутосомно-доминантная форма пигментной дистрофии сетчатки

(ADRP) составляет приблизительно 30-40% всех случаев RP, и среди пациентов с ADRP наиболее часто мутированный RP-ассоциированный ген является геном, который кодирует зрительный пигмент родопсин (Dryja et al. (1990) *New England Journal of Medicine* 323, 1302-1307; Dryja et al. (1990) *Nature* 343, 364-366). Раскрытый в настоящее время объект изобретения предоставляет подход к лечению ADRP посредством использования Технологии редактирования гена с использованием CRISPR/Cas9 (Doudna & Charpentier (2014) *Science* 346, 1258096; Hsu et al. (2014) *Cell* 157, 1262-1278), при которой проводимая РНК эндонуклеаза Cas9 применяется в сочетании с персонализированными малыми РНК-проводниками (пРНК), чтобы направленно действовать и расщеплять мутантный аллель родопсина. Допускающее ошибки негомологичное объединение концов (NHEJ) специфически выключает экспрессию мутантного аллеля, не оказывая воздействия на нормальный аллель. Необходимые компоненты могут быть доставлены к фоторецепторам посредством единственной AAV5, серотипа AAV с отраженными в документах характеристиках в палочках млекопитающих. Даже если имеет место экспрессия на уровне только 50% от уровня для дикого типа, данные для животных позволяют предположить, что это является достаточным для обеспечения клинически применимой функции палочек (Lianget al. *Journal of Biological Chemistry* 279, 48189-48196).

В то время как было показано, что направленное действие CRISPR на мутации заболевания является эффективной *in vitro* и *in vivo*, на мышах и в других исследованиях на животных, все применяемые в настоящее время подходы все еще далеки от коинического применения вследствие по большей части затруднений с доставкой. Векторы AAV являются наиболее часто используемыми вирусными векторами в генной терапии глаза (Dalkara & Sahel (2014) *Comptes Rendus Biologies* 337, 185-192; Day et al. (2014) *Advances in Experimental Medicine and Biology* 801, 687-693; Willett & Bennett (2013) *Frontiers in Immunology* 4, 261; Dinculescu et al. (2005) *Human Gene Therapy* 16, 649-663). Некоторые признаки делают AAV привлекательным для выбора: вирус является непатогенным, он инфицирует как делящиеся, так и

неделяющиеся клетки, экспрессия может быть устойчивой в течение долгих периодов времени, и он заслуживает особенного внимания за его историю безопасности, эффективности действия и общего отсутствия токсичности при клинических испытаниях. Дополнительно, разрабатываются комбинации вариантных серотипов AAV и промоторов, которые являются эффективными при нацеленном действии на фоторецепторные клетки после интравитреальной инъекции. Однако, поскольку в их имеющемся в настоящее время состоянии эти векторы запускают иммунный ответ, и у них отсутствует эффективный панретинальный тропизм по отношению к фоторецепторам в глазах человеческого размера (Kotterman *et al.* (2015) *Gene Therapy* 22, 116-126; Mowat *et al.* (2014) *Gene Therapy* 21, 96-105; Dalkara *et al.* (2013) *Science Translational Medicine* 5, 189ra176), внимание будет сосредоточено на уже хорошо охарактеризованном применении вектора AAV5, вводимого посредством субретинальной инъекции.

Геном AAV представляет собой одноцепочечную молекулу ДНК, имеющую 4,7 то, которая может быть модифицирована, чтобы вынести до 5,2 то рекомбинантной ДНК, хотя подталкивание этого предела приводит к сниженной эффективности упаковки и удаленным вставкам (Berns *et al.* (1986) *Fundamental Virology*, ed B.N. Fields и Knipe, D.M., 545-562 Raven Press). Вследствие крупного размера гена, самого кодирующего обычно используемый белок Cas9 (4,1 то), доставка с использованием пРНК, включающей промоторные, терминаторные последовательности и вирусные последовательности обращенного терминального повтора (ITR), необходимые для экспрессии посредством одиночного вирусного вектора, в настоящее время является ограниченной этой емкостью упаковки AAV. Несомненно, воссоздание активного комплекса CRISPR требует со-трансдукции, которая является менее эффективной, чем единичная трансдукция. Дополнительно, это требует более высокой вирусной дозы, которая могла бы потенциально индуцировать более сильный иммунный ответ и ассоциированную токсичность. Также, вполне вероятно, что эта доставка второго вирусного вектора при испытаниях на людях приведет к дополнительным проблемам при получении разрешения FDA.

Развитие технологии CRISPR/Cas9 революционизировало область редактирования генов. Более ранние способы технологий геномного редактирования, такие как цинк-пальцевые нуклеазы (ZFN) и подобные активатору транскрипции эффекторные нуклеазы (TALEN), сделали возможным генерацию целенаправленных геномных модификаций и предложили потенциал для точной коррекции связанных с болезнью мутаций. Будучи эффективными, эти технологии обременены практическими ограничениями, поскольку пары, как ZFN, так и TALEN требуют синтеза крупных и уникальных распознающих белков для данного сайта-мишени ДНК. Недавно несколько групп сообщили о редактировании генома с высокой эффективностью посредством применения сконструированной системы CRISPR/Cas9 типа II, которая обходит эти ключевые ограничения (Jinek et al. (2012) *Science* 337, 816-821; Cong et al. (2013) *Science* 339, 819-823; Mali et al. (2013) *Science* 339, 823-826). Система CRISPR/Cas9 состоит из РНК-проводника (пРНК), которая нацеливает нуклеазу Cas9 на последовательность-специфичную ДНК. Так как редактирование генома посредством CRISPR/Cas9 основано на короткой синтетической пРНК для нацеливания на геном, в большей степени, чем на уникальные комбинации ДНК-связывающих доменов в нуклеазе, как это требуется для ZFN и TALEN, исключается требующее много времени и трудное задание по созданию конструкций, необходимых для экспрессии ZFN и TALEN. Генерация конструкций для системы CRISPR/Cas9 является простой и быстрой, и мишени могут быть мультиплексированы. Расщепление под действием системы CRISPR требует комплементарного спаривания оснований пРНК с 20-нуклеотидной последовательностью ДНК и необходимого мотива, прилегающего к протоспейсеру (PAM), короткого нуклеотидного мотива, обнаруженного на 3'-конце сайта-мишени. Теоретически, можно сделать мишенью любую уникальную N<sub>20</sub>-PAM последовательность в геноме, используя технологию CRISPR. В настоящее время, наименее ограничивающий и наиболее часто используемый белок Cas9 происходит из *S. pyogenes*, который распознает последовательность NGG, и, таким образом, последовательность-мишенью для CRISPR является N<sub>20</sub>NGG.

Вырожденный **N** в последовательности **NGG**, означает, что с учетом уникальной последовательности из 20 нуклеотидов ( $N_{20}$ ), Cas9 будет расщеплять  $N_{20}$ **AGG**,  $N_{20}$ **TGG**,  $N_{20}$ **CGG** и  $N_{20}$ **GGG** в равной степени, что может быть проблемой для точного нацеливания на аллели.

Для направленного воздействия *in vivo* на гены родопсина, требуемые эффекторные молекулы CRISPR/Cas9 доставляют палочковидным клеткам посредством субретинального введения соответствующим образом сконструированных векторов AAV5. Было показано, что вектор серотипа 5 является очень эффективным при трансдукции в фоторецепторы как примата, не являющегося человеком (Mancuso *et al.* (2009) *Nature* 461,784-787), так и собаки (Beltran *et al.* (2012) *Proceedings of National Academy of Sciences of United States of America* 109, 2132-2137) и способен опосредовать терапию сетчатки. Несмотря на то, что векторы AAV с модифицированной капсидой могут проникать в фоторецепторы из стекловидного тела у мышей (Petrus-Silva *et al.* (2011) *Molecular Therapy: Journal of American Society of Gene Therapy* 19, 293-301), до сих пор они были неспособны являться аналогичными пенетрантами у собак или нечеловеческих приматов (неопубликованные наблюдения).

Важной проблемой при доставке Cas9 и РНК-проводников через AAV является то, что ДНК, требуемая для экспрессии обоих компонентов, превышает предел упаковки для AAV, приблизительно 4,7-4,9 то, в то время как ДНК, требуемая для экспрессии Cas9 и пРНК, традиционными методами, превышает 5 то (промотор, ~500по; spCas9, 4140 по; Pol II терминатор, ~250по; промотор U6, ~315по; и пРНК, ~100 по). Swiech *et al.* (2015, *Nature Biotechnology* 33, 102-106) решил эту проблему посредством использования двухвекторного подхода: один AAV вектор для доставки Cas9 и еще один AAV вектор для доставки пРНК. Однако, подход с двойным AAV в этом исследовании имел преимущество в виде особенно малого промотора, мышиногo промотора Mesp2, который зотя и экспрессируется в клетках сетчатки, не экспрессируется в палочках (Song *et al.* (2014) *Epigenetics & chromatin* 7, 17; Jain *et al.* (2010) *Pediatric Neurology* 43, 35-40). Таким образом,

эта система в том виде как она сконструирована, не сможет быть подходящей для большинства случаев ADRP. Раскрытый в настоящее время объект изобретения предоставляет одновекторный подход для редактирования гена сетчатки, который должен увеличить эффективность, специфически целенаправленно действовать на фоторецепторы, и снизить потенциальную токсичность от доставки вирусной нагрузки.

### Результаты

Промотор H1, в большей степени, чем более традиционно используемый промотор U6, применяли для наведения транскрипции пРНК, и он обеспечивает приблизительное удвоение доступного пространства для направленного воздействия CRISPR на гены (Ranganathan et al. (2014) *Nature Communications* 5, 4516). Важно отметить, что была обнаружена более низкая склонность к нецелевому разрезанию, предполагая, что промотор H1 является более благоприятным для терапевтических подходов. Во время этих исследований, было отмечено присутствие гена, кодирующего белок, (PARP-2) в тесной геномной близости к эндогенному гену H1ПНК (Baer et al. (1990) *Nucleic Acid Research* 18, 97-103; Myslinski et al. (2001) *Nucleic Acid Research* 29, 2502-2509). Последовательность между началом H1ПНК (pol III РНК транскрипт) и геном PARP-2 (pol II транскрипт) имеет 230 по (ФИГ. 13), указывая на то, что эта относительно малая последовательность может функционировать как компактный двунаправленный промотор. Полагают, что она является единственной двунаправленного промотора последовательностью в генах млекопитающих, которая может наводить как транскрипт pol II, так и транскрипт pol III, и может применяться для преодоления препятствий, связанных с размерами упаковки обоих компонентов CRISPR в единственный AAV.

Чтобы разработать применение H1 в качестве двунаправленного pol II/III промотора для двойной экспрессии Cas9/пРНК, и поскольку его активность pol III уже хорошо охарактеризована, была создана конструкция eGFP репортера, чтобы лучше оптимизировать его активность pol II (ФИГ. 14). Первоначальные результаты на человеческих (HEK293) и мышинных клетках (NIH3T3) демонстрировали слабую, но четко обнаруживаемую флуоресценцию

GFP, указывая на то, что этот промотор H1 сможет направлять экспрессию *rol II*, хотя слабо. Используя эту систему GFP-репортера, экспрессия *rol II* увеличивалась при поддержании компактности промотора посредством оценки трех переменных компонентов в системе: последовательности промотора, 5'UTR, и терминаторной последовательности. Тестирование последовательностей промотора H1 из различных организмов показало, что последовательности как мыши (176 по), так и крысы (207 по) были способны управлять более сильно экспрессией GFP, чем человеческий промотор H1 (~7 и ~6-раз выше, соответственно). Однако, поскольку цель состояла в получении системы для применения вместе с человеческими клетками *in vivo*, человеческие промоторные последовательности применяли, где было возможно. Чтобы оценить различные терминаторные последовательности, тестировали семь различных последовательностей, и было обнаружено, что терминатор SV40 (240 по) и синтетическая поли(A) последовательность из 49 по (SPA) (Levitt et al. (1989) *Genes & Development* 3, 1019-1025) обе были функциональными для экспрессии GFP. Во время оптимизации эффективности трансляции через модификацию 5'UTR для улучшения экспрессии репортера, было обнаружено, что вставка последовательности из 50 по, взятая из 5'-UTR последовательности бета-глобина, была способна значительно улучшить экспрессию репортера. В соответствии с этим понятием, простая вставка из 9 оснований, кодирующая сильную последовательность Козака (Kozak (1987) *Nucleic Acid Research* 15, 8125-8148) (5'-GCCGCCACC-3') была достаточной для аппроксимации этих уровней (ФИГ. 15.)

На основе информации, полученной в результате этих экспериментов по оптимизации на основе GFP, генерировали конструкции направленного действия, используя последовательность человеческого промотора H1, чтобы одновременно экспрессировать белок Cas9 и нацеливающую пРНК. Для тестирования способности этих двунаправленных конструкций направлять расщепление в клетках, NIH3T3 клетки электропорировали с использованием либо стандартного подхода с двумя плазмидами (pCAAGS:Cas9 и H1:пРНК),

или с использованием системы с единственной плазмидой, экспрессирующей оба компонента. Два различных локуса в геноме мыши были подвергнуты направленному воздействию. Через сорок восемь часов после электропорации, геномную ДНК собирали и проводили анализ T7 Endo I (T7EI) (Ranet *al.* (2013) *Nature Protocols* 8, 2281-2308) для количественной оценки уровней геномной модификации. Анализ T7EI применяли в большей степени, чем более традиционный аналитический тест Surveyor, так как сообщалось, что он является более чувствительным при обнаружении делеций (Vouillot *et al.* (2015) *G3*). Было обнаружено, что расщепление CRISPR может быть эффективно направлено к этим двум локусам, с использованием компактной двунаправленной системы, которая имеет приблизительно 4,7 то, хорошо попадая в интервал емкости упаковки AAV (ФИГ. 16А и ФИГ. 16В). Дополнительно демонстрируя применимость и пригодность этой стратегии направленного действия в человеческих клетках, существуют данные для нацеливания Cas9 в линии H7 человеческих эмбриональных стволовых клеток. Используя мышинный промотор H1 вместо человеческой последовательности, и терминатор SPA вместо последовательности терминатора SV40, размер конструкций направленного действия может теоретически быть снижен на еще одни 200 по. Эти снижения последовательности могли бы обеспечить более эффективную упаковку, или потенциально дать добавленное пространство для модификаций последовательности, которые могли бы стимулировать, снижать и даже регулировать экспрессию системы Cas9; модификаций, которые могли бы быть важными для уменьшения потенциальных нецелевых эффектов. Были сгенерированы двунаправленные плазмиды с уникальным сайтом рестрикции, который обеспечивает простую целевую вставку, с использованием метода клонирования по Гибсону (NEB), наряду с фланкирующими сайтами NotI, которые могут легко клонироваться в ITR, содержащие векторы из системы AAV без хелпера (Agilent).

*Конструкция и оптимизация Cas9 и промотора pРНК, процессинг РНК и структурные элементы, чтобы они могли эффективно экспрессироваться из единственной системы вектора AAV и генерировать соответствующий GMP-подобный доклинический вектор.*

Посредством комбинации двунаправленного промотора H1 для одновременного управления экспрессией Cas9 и пРНК и усилий по оптимизации, уже был достигнут существенный прогресс в снижении размера доставки CRISPR ниже емкости упаковки AAV. Различные комбинации из последовательностей альтернативных промоторов, модификаций 5'/3' UTR и различных пРНК предоставляет набор инструментов для тестирования потенциального спектра эффективностей направленного действия.

Как только конструкции дополнительно оптимизируют с позиций размера, экспрессии и эффективности разрезания, их можно применять для генерации векторов AAV для тестирования *in vitro* и *in vivo*. Конструкции, используемые для исследований оптимизации, содержат уникальный сайт рестрикции, который обеспечивает простую вставку мишени, наряду с фланкирующими сайтами NotI, которые обеспечивают клонирование в ITR, содержащий плазмиды векторов для получения AAV. Высокий титр GMP-подобного доклинического вектора AAV5 для культивирования клеток и исследований на мышах может генерироваться в независимом производственном подразделении получения вектора, с использованием безхелперного метода трансфекции плазмиды, и очищаться посредством ранее разработанных технологий (разработка авторов (Dryja et al. (1990) *New England Journal of Medicine* 323, 1302-1307; Dryja et al. (1990) *Nature* 343, 364-366)). Каждый вирусный препарат может быть получен, с использования хелперной системы плазмидной ДНК рDG мини-Ad, которая устраняет аденовирус WT и загрязнение компетентного по репликации AAV в окончательном векторе. Векторы очищают градиентным центрифугированием с йодиксанолом с последующей Q-колоночной хроматографии ВДЖХ. Для установления GMP-подобной чистоты исходных растворов векторов AAV, каждый вектор может быть подвергнут стандартизованному набору физических и биологических анализов, включающих оценку чистоты, бионагрузки, стерильности, титра ДНК-содержащих частиц, титра инфекций, отношения частицы-к-инфекционности и потенциального загрязнения компетентным по репликации AAV.

Несмотря на использование промотора H1 до настоящего

времени указывало на низкий уровень нецелевых эффектов, (Ranganathan et al. (2014) *Nature Communications* 5, 4516), поскольку конструкции разрабатываются с целью возможного клинического применения, они должны быть подвергнуты тщательному мониторингу на предмет потенциальной нецелевой активности (Wu et al. (2014) *Quantitative Biology* 2, 59-70). С этой целью, можно следовать нескольким комплементарным подходам. Применяя биоинформационный подход, определяли все потенциальные сайты CRISPR в геноме человека и мыши, используя персонализированный скрипт Perl, написанный для поиска обеих цепей и случаев перекрытия последовательности 23-мерного сайта CRISPR (Ranganathan et al., рукопись в подготовке к публикации, 2015). Например, в человеческом геноме, первоначальный набор из 137409562 сайтов CRISPR был идентифицирован после отфильтровывания повторяющихся последовательностей. Каждому сайту затем присваивали оценку в баллах в соответствии с индивидуальным алгоритмом, который присваивает значения на основе уникальности последовательности из 23-оснований, отклоненной в сторону 3'- или PAM-конца (область посева) (Jinek et al. (2012) *Science* 337: 816-821). Окончательно, склонность для каждого сайта проявлять нецелевые эффекты рассчитывали по Bowtie (Langmead et al. (2009) *Genome Biology* 10, R25), для перегруппировки каждого сайта CRISPR обратно на геном, обеспечивая до трех несовпадений оснований во всей нацеливающей последовательности. Используя предсказанные по вычислениям нецелевые сайты, каждая пРНК может быть протестирована на предмет какого-либо ложного нацеливания. Праймеры ПЦР, фланкирующие предсказанные потенциальные нецелевые сайты, могут применяться для амплификации геномной последовательности, которая затем может тестироваться на предмет эффективности расщепления с использованием анализа T7EI. Это обеспечит мониторинг точности нацеливания для экспериментов по оптимизации как *in vitro*, так и *in vivo*. Целью будет менее чем 0,5% нецелевого разрезания, хотя меньше чем 5% будет приемлемо.

В то время как особое внимание уделялось стандартному

нацеливанию Cas9, рассматривались также альтернативные подходы, включающие альтернативные последовательности PAM для нацеливания. Сообщалось, что Cas9 направленно действует на моты PAM с NAG в дополнение к стандартным последовательностям NGG (Hsuet *al.* (2013) *Nature Biotechnology*, doi:10.1038/nbt.2647). Две последовательности CRISPR в человеческой последовательности и три целевые последовательности в мышином геноме перекрываются, и были идентифицированы мутации P23H, которые могли бы предоставить дополнительные сайты для направленного действия. В то время как ожидается, что NAG PAM сайты будут подвергаться направленному действию менее эффективно, чем сайты NGG (Zhanget *al.* (2014) *Scientific Reports* 4, 5405), это может предоставить механизм для титрования дозировки, который может быть ценным, если определяют, что конструкции имеют значительные нецелевые эффекты. Пять последовательностей с использованием сайта NAG PAM могут быть клонированы первоначально в pHlv126 с использованием сборки Гибсона (NEB). Две человеческие последовательности могут быть со-трансфицированы (Липофектамин 3000) с использованием плазмиды Cas9 в клетки 293, в то время как мышиные плазмиды могут быть электропорированы (Invitrogen, Neon) плазмидой Cas9 в клетки NIH3T3. Для обнаружения активности, можно количественно оценить скорости инсерционно-делеционных мутаций, вводимых посредством NHEJ в сайты расщепления Cas9 между каноническими сайтами NGG, а также неканоническими сайтами NAG.

Также может применяться альтернативный терапевтический подход, известный как CRISPRi, в котором используют версию Cas9 с мертвой нуклеазой (dCas9), чтобы специфически подавить экспрессию аллеля P23H (Qiet *al.* (2013) *Cell* 152, 1173-1183; Gilbertet *al.* (2013) *Cell* 154, 442-451; Larsonet *al.* (2013) *Nature Protocols* 8, 2180-2196; Fulleret *al.* (2014) *Advances in Experimental Medicine and Biology* 801, 773-781). Вместо индуцирования расщепления, dCas9 остается прочно связанным с последовательностью ДНК, и при направленном воздействии внутри активно транскрибируемого гена, ингибирование прогрессирования pol II через механизм стерического затруднения может приводить к эффективной транскрипционной репрессии. Посредством достижения

терапевтической репрессии P23H без индуцирования разрывов ДНК, и с учетом конститутивной экспрессии AAV, доставка AAV5 транскрипционного ингибитора могла бы быть благоприятной как с позиций генной терапии, так и регуляторного препятствия. Транскрипционная репрессия посредством CRISPRi может быть оптимизирована, с использованием кРВ-ПЦР для измерения аллель-специфичной экспрессии родопсина.

*Обоснование способности разработанного вектора AAV5 разрезать и выключать экспрессию мутантного аллеля родопсина in vitro, с использованием первичных культур фоторецепторов из мышей P23H.*

Первичная культура фоторецепторных клеток мыши может применяться для подтверждения конструкций направленного действия *in vitro* перед переходом к исследованиям на животных. В постнатальные дни 2-10, животные могут применяться для сбора и диссоциации мышиной сетчатки для выделения клеток для анализов направленного действия. Тестируемые конструкции у человека (h) Rho:GFP мышь (Chan et al. (2004) *Proceedings of National Academy of Sciences of United States of America* 101, 9109-9114) могут обеспечить дополнительную оптимизацию направленного действия на родопсин. Мыши с включенным геном hRho-GFP содержат гибрид человеческого родопсина-GFP включенный в открытую рамку считывания мышиного родопсина (ФИГ. 17). Эта частично гуманизированная мышь позволяет проводить нацеливание на человеческие специфичные последовательности в фоторецепторных клетках. Человеческая rho последовательность может подвергаться направленному действию, и затем потеря GFP из фоторецепторов может быть количественно измерена. Хотя родопсин является мишенью, репортер GFP гибридизирован в рамке считывания, и, таким образом, потеря флуоресценции служит в качестве удобного посредника для подверженной ошибке NHEJ по восходящей от сайта-мишень. При электропорации клеток сетчатки, обычно достигают 10-20% эффективности трансфекции, и, чтобы обогатить популяцию CRISPR-модифицированных клеток, трансфицированная популяция может быть отсортирована на основании интенсивности флуоресцентного репортера Cas9. Генерировали несколько

конструкций Cas9, гибридизированных с различными P2A: репортерными белками, которые обеспечивают мониторинг флуоресцентной активности, не подвергая риску активность Cas9. Используя ретинальные культуры из Rho:GFP мышей, Cas9:P2A:mCherry репортер и нацеливающая пРНК могут быть электропорированы. Затем, через 24 часа культивирования, дважды положительные клетки могут быть отсортированы, посредством чего происходит обогащение фоторецепторами, которые были трансфицированы. Через сорок восемь часов, клетки могут быть ресуспендированы в буфере QuickExtract (Epicentre) для сбора геномной ДНК, и проанализированы на предмет геномной модификации посредством анализа T7EI. Аналогично, нацеливание мутации родопсина может быть подтверждено с использованием первичных фоторецепторных культур из мышей P23H. Даже при низком уровне трансфекции (10%), редактирование генома может быть обнаружено с использованием анализа T7EI, если эффективность нацеливания конструкций составляет более 10%, в соответствии с первоначальными результатами. Дополнительно, применение векторов AAV5 должно давать значительно более высокие эффективности трансдукции.

Также будет проводиться сайт-специфичный анализ глубокого секвенирования целевых и нецелевых сайтов с высоким разрешением и высокой чувствительностью. Геномные последовательности, фланкирующие сайт-мишень CRISPR, и предсказанные нецелевые сайты могут быть амплифицированы с использованием высокоточной полимеразы (NEB, Phusion) в течение 15 циклов, и затем очищены, используя DNA Clean & Concentrator-5 (Zymo). Очищенные продукты ПЦР могут быть амплифицированы в течение 5 циклов для присоединения адапторов Illumina P5 и специфичных для образцов штрих-кодов, вновь очищены, и затем количественно измерены посредством флуоресценции SYBR зеленого, проанализированы на Биоанализаторе, и окончательно объединены в эквимольном отношении перед секвенированием с использованием персонального секвенатора MiSeq. Для анализа данных секвенирования, считывания 300 по со спаренным-концом MiSeq будут демультимплексированы, используя программное обеспечение Illumina MiSeq Репортер, с

последующим триммированием адаптера и качества необработанных считываний. Выравнивания с последовательностью дикого типа будут проводиться для всех считываний, и частота будет рассчитана по уравнению:  $100 \times (\text{число индел-считываний} / \text{число индел-считываний} + \text{число считываний WT})$ .

*Обоснование способности улучшенного вектора из SA2 разрезать и выключать экспрессию мутантного аллеля родопсина in vivo после субретинальной инъекции мышам P23H.*

Следующей стадией будет демонстрация *in vivo* направленного действия на мутацию P23H родопсина у мышей. По результатам биоинформационного анализа, был идентифицирован сайт для нацеливания CRISPR с высокой балльной оценкой, перекрывающийся с мышинным P23 кодоном. Сайт CRISPR в форме N<sub>20</sub>NGG попадает на обратную цепь: 5'-AGTACTGTGGGTACTCGAAGGGG-3' (PAM подчеркнут). Мутация P23H является C→A трансверсией, которая изменяет кодон aCCC Пролина на кодон CAC Гистидина. К сожалению, расположение мутации мышинового P23H в сайте CRISPR попадает в N NGG PAM мотива, только расположение в сайте для нацеливания, который является агностическим по идентичности. Так как это означает, что CRISPR, направленный против последовательности P23H, будет неспособен дискриминировать между последовательностью дикого типа и последовательностью P23H, и, следовательно, можно было бы ожидать, что направленное действие будет разрезать оба аллеля, был разработан альтернативный подход на основе распространности одиночных нуклеотидных полиморфизмов (SNP).

В геноме человека существует ~17 миллионов SNP (включающих вариации единственного основания, инсерционно-делеционные мутации, STR, MNP и т.д.), о которых сообщалось (~1 на каждые 180 по), и данная вариация является чрезвычайно важной в контекстах персонализированной геномной медицины. Было обосновано, что использование только природных генетических вариаций не может обеспечить способ специфического направленного воздействия на аллель родопсина P23H в мышинной модели, но также продемонстрирован подход к исследованию для подтверждения концепции, который вероятно станет даже более подходящим для

будущей геномной инженерии и терапевтических подходов. Было обнаружено, что мышь *castaneus* (*Cast*) содержит SNP в пролине 23 кодона гена родопсина, который отличается от последовательности C57BL/6J, и P23H мутантная мышь на генетической основе C57BL/6J была получена для анализа. SNP сразу же примыкает к причинной трансверсии C→A у мыши P23H, которая предоставляет подход для направленного действия на доминантный P23H аллель без направленного действия на аллель родопсина дикого типа. Поскольку основой для мутации P23H является C57BL/6J, через одно поколение от скрещивания *Cast*/P23H, получали гетерозиготных мышей, которые содержали как подверженный целевому действию CRISPR P23H аллель родопсина и, вследствие прочно связанного различия по SNP, дикого типа, устойчивый к CRISPR аллель родопсина, который отличается единственным несовпадением, расположенным в положении 20 в "посевной" области мишени ПРНК (ФИГ. 18А, ФИГ. 18В, и ФИГ. 18С).

Чтобы подтвердить обоснованность стратегии, генерировали двунаправленные конструкции Н1, которые целенаправленно действуют на последовательность кодона пролина 23 в C57BL/6J, которая присутствует в аллеле мутантного P23H, или последовательность кодона пролина 23 в мышах *Cast*, последовательность, которая будет присутствовать в аллеле родопсина WT гетерозиготных P23H/*Cast* животных. Клетки NIH3T3 (которые содержат C57BL/6J SNP) независимо электропорировали с использованием обеих конструкций, геномную ДНК изолировали, и затем проводили анализ T7EI для количественного определения уровня геномной модификации. Наблюдали специфичное направленное действие на родопсин: только конструкции, направленные на C57BL/6J (т.е. P23H) давали на выходе значительное разрезание, при уровнях геномной модификации, достигающих 50%, который вероятно является ниже оценки потенциала нацеливания с учетом того, что суммарная эффективность электропорации была ниже 80% (ФИГ. 19). В дополнение к подтверждению нацеливающего сайта родопсина и способности направлять расщепление посредством компактных двунаправленных конструкций, эти результаты

демонстрировали разрезание *in vitro*, происходящее специфически по SNP/мутантной последовательности, так как пРНК на основе последовательности родопсина *Cast*, содержащей единственное несовпадение оснований, не смогла произвести обнаруживаемое расщепление Cas9.

В целом полагают, что лимитирующим фактором направленного действия CRISPR является эффективная доставка, и было показано, что AAV5-опосредованная доставка способна к трансдукции большинства фоторецепторов, даже в крупных глазах. С учетом этой высокой степени трансдукции, коррекция гена, происходящая в 50% или более из трансдуцированных клеток клетки, и того, что 2/3 из событий NHEJ приводит к мутациям со сдвигом рамки, выключение экспрессии аллеля P23H должно достигаться в крупном множестве палочек и с дополнительной оптимизацией, в большинстве палочек. Исследования позволяют предположить, что этот уровень направленного действия должен быть достаточным, чтобы обеспечить выживание фоторецепторов и поддерживать обоснованно хороший уровень зрения, как посредством прямого сохранения палочек, так и посредством вторичных воздействий на выживание клубочек (Leveillard *et al.* (2004) *Nature Genetics* 36, 755-759; Leveillard & Sahel (2010) *Science Translational Medicine* 2, 26ps16; Sahelet *et al.* (2013) *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology=Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie* 251, 1669-1677). Оптимизированный вирус может вводиться инъекционно субретинально в один глаз 10 мышам при P15, как описано ранее (Mao *et al.* (2012) *Advances in Experimental Medicine and Biology* 723, 199-205; Mao *et al.* (2012) *Human Gene Therapy* 23, 356-366; Mao *et al.* (2011) *Human Gene Therapy* 22, 567-575). Анализы ERG и SDOCT (Bioptigen) подвергнутых лечению глаз в сравнении с контрольными парными глазами могут выполняться через 2, 6 и 12 недель после лечения. Более длительные прижизненные исследования могут продолжаться, при условии, что функциональное и структурное улучшение наблюдается в подвергнутых лечению глазах через 12 недель. После умерщвления могут быть выполнены гистологические анализы которые будут включать толщину ONL, спайдерграммы и

иммуногистологические анализы родопсина для установления точной локализации во внешних сегментах, и вестерн-блоттинг для определения уровней родопсина.

Можно оценить нецелевые эффекты обработки AAV5/CRISPR. Полногеномное секвенирование является, наименее отклоняющимся методом для оценки нецелевых мутаций, и было бы идеальным для подтверждения сайтов-мишеней. Сетчатка мышей из обработанных AAV и необработанных глаз может быть собрана и диссоциирована, и геномная ДНК может быть экстрагирована с использованием набора DNeasy Blood & Tissue (Qiagen) и ДНК, разрезанной с использованием Covaris AFA. Фрагменты ДНК могут быть восстановлены по концам A-наращиванием и лигированы с адапторами секвенирования Illumina с нанесенным штрих-кодом. Лигированные продукты могут быть амплифицированы посредством ПЦР для генерации полногеномных библиотек секвенирования с нанесенным штрих-кодом и секвенированы на платформе HiSeq (Illumina) до среднего покрытия, равного 15x. Данные считывания секвенирования затем могут быть выравнены с эталонным геномом человека (hg19/GRCh37) с использованием программы выравнивания с преобразованием Буровса-Вилера в режиме "mem" ("bwa mem") с параметрами по умолчанию. Поскольку каждое событие расщепления CRISPR приводит к уникальной мутации, допускают, что сайты двухцепочечных разрывов ДНК не будут приводить к такой же мутации *de novo*. Таким образом, исключение всех вариантов, являющихся общими для множества образцов, обеспечит фильтрацию при последующем биоинформационном анализе.

#### ССЫЛКИ

Все публикации, патентные заявки, патенты и другие ссылки, указанные в описании, показывают уровень квалифицированных специалистов в области, к которой относится раскрытый в настоящее время объект изобретения. Все публикации, патентные заявки, патенты и другие ссылки включены в данное описание посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая индивидуальная публикация, патентная заявка, патент и другая ссылка была конкретно и индивидуально показана, как включенная

посредством ссылки. Следует понимать, что, несмотря на то, что ряд патентных заявок, патентов и других ссылок приведены в данном описании в качестве ссылки, такая ссылка не является допущением, что любой из этих документов образует часть общедоступного знания в данной области.

Хотя приведенный выше объект изобретения был описан с некоторыми подробностями путем иллюстрации и примера с целью ясности понимания, специалисты в данной области смогут понять, что некоторые изменения и модификации могут быть практически реализованы в пределах объема притязаний прилагаемой формулы изобретения.

## СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Zack, Donald  
 Ranganathan, Vinod

<120> КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ ЭКСПРЕССИИ РНК-ПРОВОДНИКОВ CRISPR С  
 ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРОМОТОРА H1

<130> 111232-00401.P12924-02

<160> 59

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1  
 <211> 43  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> праймер ПЦР

<400> 1  
 cttcgatgtc gactcgagtc aaaaagcacc gactcgggtc cac 43

<210> 2  
 <211> 26  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> праймер ПЦР

<400> 2  
 aaaatatgga acgcttcacg aatttg 26

<210> 3  
 <211> 27  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> праймер ПЦР

<400> 3  
 gtttttagagc tagaaatagc aagttaa 27

<210> 4  
 <211> 20  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> праймер ПЦР

<400> 4  
 aagcaccgac tcggtgccac 20

<210> 5  
 <211> 23

<212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> праймер ПЦР  
  
 <400> 5  
 ctcgcttcgg cagcacatat act 23

<210> 6  
 <211> 22  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> праймер ПЦР  
  
 <400> 6  
 acgcttcacg aatttgcgtg tc 22

<210> 7  
 <211> 20  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> нацеливающая последовательность пРНК  
  
 <400> 7  
 gcactgcacg ccgtaggtca 20

<210> 8  
 <211> 20  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> нацеливающая последовательность пРНК  
  
 <400> 8  
 agcactgcac gccgtaggtc 20

<210> 9  
 <211> 20  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> нацеливающая последовательность пРНК  
  
 <400> 9  
 gctgaagcac tgcacgccgt 20

<210> 10  
 <211> 19  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>

<223> нацеливающая последовательность пРНК  
 <400> 10  
 gggcgcacca tcttcttca 19

<210> 11  
 <211> 20  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> нацеливающая последовательность пРНК  
 <400> 11  
 accatcttct tcaaggacga 20

<210> 12  
 <211> 20  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> нацеливающая последовательность пРНК  
 <400> 12  
 gccgtcgtcc ttgaagaaga 20

<210> 13  
 <211> 20  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> нацеливающая последовательность пРНК  
 <400> 13  
 ggtgaaccgc atcgagctga 20

<210> 14  
 <211> 20  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> нацеливающая последовательность пРНК  
 <400> 14  
 gtgaaccgca tscgagctgaa 20

<210> 15  
 <211> 20  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> нацеливающая последовательность пРНК  
 <400> 15  
 gcacggggcc gtcgccgatg 20

<210> 16  
 <211> 20  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> нацеливающая последовательность пРНК  
  
 <400> 16  
 agcacggggc cgtcgccgat 20

<210> 17  
 <211> 20  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> нацеливающая последовательность пРНК  
  
 <400> 17  
 ggtgctcagg tagtggttgt 20

<210> 18  
 <211> 20  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> нацеливающая последовательность пРНК  
  
 <400> 18  
 accgcccscg ggatcactct 20

<210> 19  
 <211> 20  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> нацеливающая последовательность пРНК  
  
 <400> 19  
 gtccatgscg agagtgatcc 20

<210> 20  
 <211> 23  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> нацеливающая последовательность пРНК  
  
 <400> 20  
 gggtaggggg agtttgctcc tgg 23

<210> 21  
 <211> 23

<212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> нацеливающая последовательность пРНК  
  
 <400> 21  
 ggatggaggg agtttgctcc tgg 23

<210> 22  
 <211> 23  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> нацеливающая последовательность пРНК  
  
 <400> 22  
 gggaggggtg agtttgctcc tgg 23

<210> 23  
 <211> 23  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> нацеливающая последовательность пРНК  
  
 <400> 23  
 cgggggaggg agtttgctcc tgg 23

<210> 24  
 <211> 23  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> нацеливающая последовательность пРНК  
  
 <400> 24  
 ggggagggga agtttgctcc tgg 23

<210> 25  
 <211> 23  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> нацеливающая последовательность пРНК  
  
 <400> 25  
 ggtgagtgag tgtgtgcgtg tgg 23

<210> 26  
 <211> 23  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>

<223> нацеливающая последовательность пРНК  
 <400> 26  
 ggtgagtgag tgtgtgtgtg agg 23

<210> 27  
 <211> 23  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> нацеливающая последовательность пРНК  
 <400> 27  
 agtgagtgag tgtgtgtgtg agg 23

<210> 28  
 <211> 23  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> нацеливающая последовательность пРНК  
 <400> 28  
 gctgagtgag tgtatgcgtg tgg 23

<210> 29  
 <211> 23  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> нацеливающая последовательность пРНК  
 <400> 29  
 tgtgggtgag tgtgtgcgtg agg 23

<210> 30  
 <211> 96  
 <212> РНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> нацеливающая последовательность пРНК

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (2)..(20)  
 <223> n является а, с, г или u

<400> 30  
 annnnnnnnn nnnnnnnnnn guuuuagagc uagaaaagc aaguuuuuuu aaggcuaguc 60

сгуиуаусаас uuгaaaaагу ggcaccgаgu ccgugc 96

<210> 31  
 <211> 74

<212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> область соединения локуса AAVS1

<400> 31  
 gcctctggcc cactgtttcc ccttcccagg caggtcctgc tttctctgac ctgcattctc 60  
 tcccctgggc ctgt 74

<210> 32  
 <211> 63  
 <212> ДНК  
 <213> Homo sapiens

<400> 32  
 cagcctggaa gaccacatac aggaaacgta gccattcccc aggtgacctc tgtcgaatca 60  
 aag 63

<210> 33  
 <211> 74  
 <212> ДНК  
 <213> Homo sapiens

<400> 33  
 acccagcctg gaagaccaca tacaggaaac gtagccattc cccaggtgac ctctgtcgaa 60  
 tcaaagcccc tacc 74

<210> 34  
 <211> 62  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> дельта 12 мутация области AN19NGG гена MERTK

<400> 34  
 acccagcctg gaagaccaca tacaggaaac gtagtgacct ctgtcgaatc aaagccccta 60  
 cc 62

<210> 35  
 <211> 73  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> дельта 1 мутация области AN19NGG гена MERTK

<400> 35  
 acccagcctg gaagaccaca tacaggaaac gtagccattc ccaggtgacc tctgtcgaat 60  
 caaagcccct acc 73

<210> 36  
 <211> 74

<212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> дельта 2, +2 мутация области AN19NGG гена MERTK

<400> 36  
 асccagcctg гааgассаса тасagгaaас gtagccattc гасaggtgас ctctgtcгaa 60  
 тсааagcccc тacc 74

<210> 37  
 <211> 68  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> дельта 6 мутация области AN19NGG гена MERTK

<400> 37  
 асccagcctg гааgассаса тасagгaaас gtagcccagg тгacctctgt сгаатсааag 60  
 ссстacc 68

<210> 38  
 <211> 67  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> дельта 7 мутация области AN19NGG гена MERTK

<400> 38  
 асccagcctg гааgассаса тасagгaaас gtagccaggt гacctctgtc гаатсааagc 60  
 ссстacc 67

<210> 39  
 <211> 60  
 <212> ДНК  
 <213> Homo sapiens

<400> 39  
 агtatttcга tttcttgгct ttatatatct tgtggaaagg асgaaacacc гtgctcgctt 60

<210> 40  
 <211> 20  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> последовательность промотора U6 и ПРНК

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (12)..(20)  
 <223> n является a, c, g или t

<400> 40

асгааасасс gnnnnnnnnnn

20

<210> 41  
<211> 20  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> последовательность промотора U6 и пРНК

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (12)..(15)  
<223> n является а, с, г или t

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (17)..(20)  
<223> n является а, с, г или t

<400> 41  
асгааасасс annnngnnnn

20

<210> 42  
<211> 20  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> последовательность промотора U6 и пРНК

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (12)..(13)  
<223> n является а, с, г или t

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (15)..(20)  
<223> n является а, с, г или t

<400> 42  
асгааасасс cnnngnnnnnn

20

<210> 43  
<211> 20  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> последовательность промотора U6 и пРНК

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (12)..(14)  
<223> n является а, с, г или t

<220>



<222> (12)..(20)  
 <223> n является а, с, г или t

<400> 47  
 actctttccc cnnnnnnnnnn 20

<210> 48  
 <211> 20  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> последовательность промотора H1 и пРНК

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (12)..(20)  
 <223> n является а, с, г или t

<400> 48  
 actctttccc tnnnnnnnnnn 20

<210> 49  
 <211> 143  
 <212> РНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> рибозим

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(143)  
 <223> n является а, u, с или g

<400> 49  
 nnnnnnnnnn сугагагагс сгуагагагс ааасгагагаа асисгиссnnn nnnnnnnnnn 60  
 nnnnnnnnguи uагагагсуаг аааиагсааг uааааиааг гсуагиссгуи uаисаасиуг 120  
 ааааагиггс ассгагисгг угс 143

<210> 50  
 <211> 96  
 <212> РНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> рибозим

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(96)  
 <223> n является а, u, с или g

<400> 50  
 nnnnnnnnnnn nnnnnnnnnn гуиуагагагс uагаааиагс аагуиааааи ааггсуагис 60



<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(82)  
 <223> n является а, и, с или г

<400> 55  
 nnnnnnnnnn сугаугагаи ассагссгаа аггсссиугг сагигааасг аггааасисг 60  
 ucnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nn 82

<210> 56  
 <211> 27  
 <212> ДНК  
 <213> Mus musculus

<400> 56  
 agccccttcg agcagccgca gtactac 27

<210> 57  
 <211> 27  
 <212> ДНК  
 <213> Mus musculus

<400> 57  
 agccacttcg agcagccgca gtactac 27

<210> 58  
 <211> 27  
 <212> ДНК  
 <213> Mus musculus

<400> 58  
 agcccttttcg agcagccgca gtactac 27

<210> 59  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 59  
 Ser Pro Phe Glu Gln Pro Gln Tyr Tyr  
 1 5

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Не встречающаяся в природе система CRISPR-Cas, содержащая один или несколько векторов, содержащих:

а) промотор H1, функционально связанный с, по меньшей мере, одной последовательностью, кодирующей РНК-проводник (пРНК) системы CRISPR-Cas, где пРНК гибридизируется с последовательностью-мишенью молекулы ДНК в клетке, и, где молекула ДНК кодирует один или несколько генных продуктов, экспрессируемых в клетке; и

б) регуляторный элемент, способный функционировать в клетке, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей белок Cas9,

где компоненты (а) и (б) располагаются на одинаковых или различных векторах системы, где пРНК направленно действует на последовательность-мишень и гибридизируется с ней, и белок Cas9 расщепляет молекулу ДНК для изменения экспрессии одного или нескольких генных продуктов.

2. Система по п. 1, где последовательность-мишень содержит нуклеотидную последовательность  $AN_{19}NGG$ ,  $GN_{19}NGG$ ,  $CN_{19}NGG$  или  $TN_{19}NGG$ .

3. Система по п. 1, где белок Cas9 представляет собой кодон, оптимизированный для экспрессии в клетке.

4. Система по п. 1, где белок Cas9 представляет собой белок Cas9 Типа-II.

5. Система по п. 1, где клетка представляет собой эукариотическую клетку.

6. Система по п. 5, где эукариотическая клетка представляет собой клетку млекопитающего или человеческую клетку.

7. Система по п. 5, где эукариотическая клетка представляет собой фоторецепторную клетку сетчатки.

8. Система по п. 1, где один или несколько генных продуктов представляют собой родопсин.

9. Система по п. 1, где экспрессия одного или нескольких генных продуктов снижается.

10. Система по п. 1, где система упакована в единичную частицу адено-ассоциированного вируса (AAV).

11. Способ изменения экспрессии одного или нескольких генных продуктов в клетке, где клетка содержит молекулу ДНК, кодирующую один или несколько генных продуктов, способ, включающий в себя введение в клетку не встречающейся в природе системы CRISPR-Cas, содержащей один или несколько векторов, содержащих:

а) промотор H1, функционально связанный с, по меньшей мере, одной последовательностью, кодирующей РНК-проводник (пРНК) системы CRISPR-Cas, где пРНК гибридизируется с последовательностью-мишенью молекулы ДНК; и

б) регуляторный элемент, способный функционировать в клетке, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей белок Cas9,

где компоненты (а) и (б) располагаются на одинаковых или различных векторах системы, где пРНК направленно действует на последовательность-мишень и гибридизируется с ней, и белок Cas9 расщепляет молекулу ДНК для изменения экспрессии одного или нескольких генных продуктов.

12. Способ по п. 11, где последовательность-мишень содержит нуклеотидную последовательность  $AN_{19}NGG$ ,  $GN_{19}NGG$ ,  $CN_{19}NGG$  или  $TN_{19}NGG$ .

13. Способ по п. 11, где белок Cas9 представляет собой кодон, оптимизированный для экспрессии в клетке.

14. Способ по п. 11, где белок Cas9 представляет собой белок Cas9 Типа-II.

15. Способ по п. 11, где клетка представляет собой эукариотическую клетку.

16. Способ по п. 15, где эукариотическая клетка представляет собой клетку млекопитающего или человеческую клетку.

17. Способ по п. 15, где клетка представляет собой фоторецепторную клетку сетчатки.

18. Способ по п. 11, где один или несколько генных продуктов представляют собой родопсин.

19. Способ по п. 11, где экспрессия одного или нескольких генных продуктов снижается.

20. Способ по п. 11, где систему вводят в клетку с использованием единичной частицы адено-ассоциированного вируса (AAV).

21. Не встречающаяся в природе система CRISPR-Cas, содержащая вектор, содержащий двунаправленный Промотор H1, где двунаправленный Промотор H1 содержит:

а) контрольные элементы, которые обеспечивают транскрипцию в одном направлении, по меньшей мере, одной нуклеотидной последовательности, кодирующей РНК-проводник (пРНК) системы CRISPR-Cas, где пРНК гибридизируется с последовательностью-мишенью молекулы ДНК в клетке, и, где молекула ДНК кодирует один или несколько генных продуктов, экспрессируемых в клетке; и

б) контрольные элементы, которые обеспечивают транскрипцию в противоположном направлении нуклеотидной последовательности, кодирующей белок Cas9,

где пРНК направленно действует на последовательность-мишень и гибридизируется с ней, и белок Cas9 расщепляет молекулу ДНК для изменения экспрессии одного или нескольких генных продуктов.

22. Система по п. 21, где последовательность-мишень содержит нуклеотидную последовательность  $AN_{19}NGG$ ,  $GN_{19}NGG$ ,  $CN_{19}NGG$  или  $TN_{19}NGG$ .

23. Система по п. 21, где белок Cas9 представляет собой кодон, оптимизированный для экспрессии в клетке.

24. Система по п. 21, где белок Cas9 представляет собой белок Cas9 Типа-II.

25. Система по п. 21, где клетка представляет собой эукариотическую клетку.

26. Система по п. 25, где эукариотическая клетка представляет собой клетку млекопитающего или человеческую клетку.

27. Система по п. 25, где эукариотическая клетка представляет собой фоторецепторную клетку сетчатки.

28. Система по п. 21, где один или несколько генных продуктов представляют собой родопсин.

29. Система по п. 21, где экспрессия одного или нескольких генных продуктов снижается.

30. Система по п. 21, где система упакована в единичную частицу адено-ассоциированного вируса (AAV).

31. Способ изменения экспрессии одного или нескольких генных продуктов в клетке, где клетка содержит молекулу ДНК, кодирующую один или несколько генных продуктов, способ, включающий в себя введение в клетку не встречающейся в природе системы CRISPR-Cas, содержащей вектор, содержащий двунаправленный Промотор H1, где двунаправленный Промотор H1 содержит:

а) контрольные элементы, которые обеспечивают транскрипцию в одном направлении по меньшей мере, одной нуклеотидной последовательности, кодирующей РНК-проводник (пРНК) системы CRISPR-Cas, где пРНК гибридизируется с последовательностью-мишенью молекулы ДНК; и

б) контрольные элементы, которые обеспечивают транскрипцию в противоположном направлении нуклеотидной последовательности, кодирующей белок Cas9,

где пРНК направленно действует на последовательность-мишень и гибридизируется с ней, и белок Cas9 расщепляет молекулу ДНК для изменения экспрессии одного или нескольких генных продуктов в клетке.

32. Способ по п. 31, где последовательность-мишень содержит нуклеотидную последовательность  $AN_{19}NGG$ ,  $GN_{19}NGG$ ,  $CN_{19}NGG$  или  $TN_{19}NGG$ .

33. Способ по п. 31, где белок Cas9 представляет собой кодон, оптимизированный для экспрессии в клетке.

34. Способ по п. 31, где белок Cas9 представляет собой белок Cas9 Типа-II.

35. Способ по п. 31, где клетка представляет собой эукариотическую клетку.

36. Способ по п. 35, где эукариотическая клетка представляет собой клетку млекопитающего или человеческую клетку.

37. Способ по п. 35, где эукариотическая клетка представляет собой фоторецепторную клетку сетчатки.

38. Способ по п. 31, где один или несколько генных

продуктов представляют собой родопсин.

39. Способ по п. 31, где экспрессия одного или нескольких генов снижается.

40. Способ по п. 31, где систему вводят в клетку с использованием единичной частицы адено-ассоциированного вируса (AAV).

41. Аптамер-регулируемый рибозим, содержащий:

а) цис-действующий рибозим типа головки молотка, содержащий каталитический центр и дуплексные области спирали I, спирали II, и спирали III, выступающие из него, где каждая из дуплексной области спирали II и дуплексной области спирали III содержит петлевую область напротив каталитического центра, и, где дуплексная область спирали II содержит аптамер, который связывается с лигандом;

б) нуклеотидная последовательность, кодирующая РНК-проводник (пРНК) системы CRISPR-Cas, где пРНК гибридизируется с последовательностью-мишенью молекулы ДНК в эукариотической клетке, и, где молекула ДНК кодирует один или несколько генов, экспрессируемых в эукариотической клетке, где нуклеотидная последовательность содержит 5'-конец и 3'-конец, и, где 5'-конец нуклеотидной последовательности непосредственно сочетается с дуплексной областью спирали III;

где связывание лиганда с аптамером производит конформационное изменение в рибозиме, таким образом, что рибозим претерпевает саморасщепление между 5'-концом нуклеотидной последовательности и дуплексной областью спирали III, где высвобождается пРНК.

42. Аптамер-регулируемый рибозим по п. 41, где лиганд представляет собой теофиллин.

43. Экспрессирующая конструкция, содержащая:

(а) кодирующую последовательность, которая, при транскрипции в РНК, продуцирует аптамер-регулируемый рибозим по п. 41; и

(б) один или несколько транскрипционных регуляторных последовательностей, которые регулируют транскрипцию РНК в клетке.

44. Эукариотическая клетка, содержащая экспрессирующую конструкцию по п. 43.

45. Способ изменения экспрессии одного или нескольких генных продуктов в клетке, где клетка содержит молекулу ДНК, кодирующую один или несколько генных продуктов, способ, включающий в себя введение экспрессирующей конструкции по п. 43 в клетку и контактирование клетки с лигандом в количестве, которое изменяет активность рибозима.

46. Способ по п. 45, где клетка представляет собой эукариотическую клетку.

47. Способ по п. 45, где клетка находится в субъекте.

48. Способ по п. 45, где субъект представляет собой человека.

49. Способ по п. 45, где лиганд представляет собой теофиллин.

50. Способ лечения глазного нейродегенеративного заболевания у субъекта, нуждающегося в таком лечении, способ, включающий в себя:

(a) предоставление не встречающейся в природе системы CRISPR-Cas, содержащей один или несколько векторов, содержащих:

i) промотор H1, функционально связанный с, по меньшей мере, одной последовательностью, кодирующей РНК-проводник (пРНК) системы CRISPR-Cas, где пРНК гибридизируется с последовательностью-мишенью молекулы ДНК в клетке субъекта, и, где молекула ДНК кодирует один или несколько генных продуктов, экспрессируемых в клетке; и

ii) регуляторный элемент, способный функционировать в клетке, функционально связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей белок Cas9,

где компоненты (i) и (ii) располагаются на одинаковых или различных векторах системы, где пРНК направленно действует на последовательность-мишень и гибридизируется с ней, и белок Cas9 расщепляет молекулу ДНК для изменения экспрессии одного или нескольких генных продуктов; и

(b) введение субъекту эффективного количества системы.

51. Способ по п. 50, где у субъекта наблюдают дисфункцию

и/или смерть фоторецепторных клеток сетчатки у субъекта.

52. Способ по п. 50, где глазное нейродегенеративное заболевание выбирают из группы, состоящей из глаукомы, дегенерации сетчатки и возрастной дегенерации желтого пятна.

53. Способ по п. 50, где глазное нейродегенеративное заболевание представляет собой пигментную дистрофию сетчатки (RP).

54. Способ по п. 50, где клетка представляет собой фоторецепторную клетку сетчатки.

55. Способ по п. 50, где один или несколько генных продуктов представляют собой родопсин.

56. Способ по п. 50, где промотор H1 является двунаправленным.

57. Способ по п. 50, где система упакована в единичную частицу адено-ассоциированного вируса (AAV) перед введением субъекту.

58. Способ по п. 50, где введение субъекту происходит посредством посредством субретинальной инъекции.

59. Способ по п. 50, где субъект представляет собой человека.

60. Способ по п. 50, где белок Cas9 представляет собой белок Cas9 Типа-II.

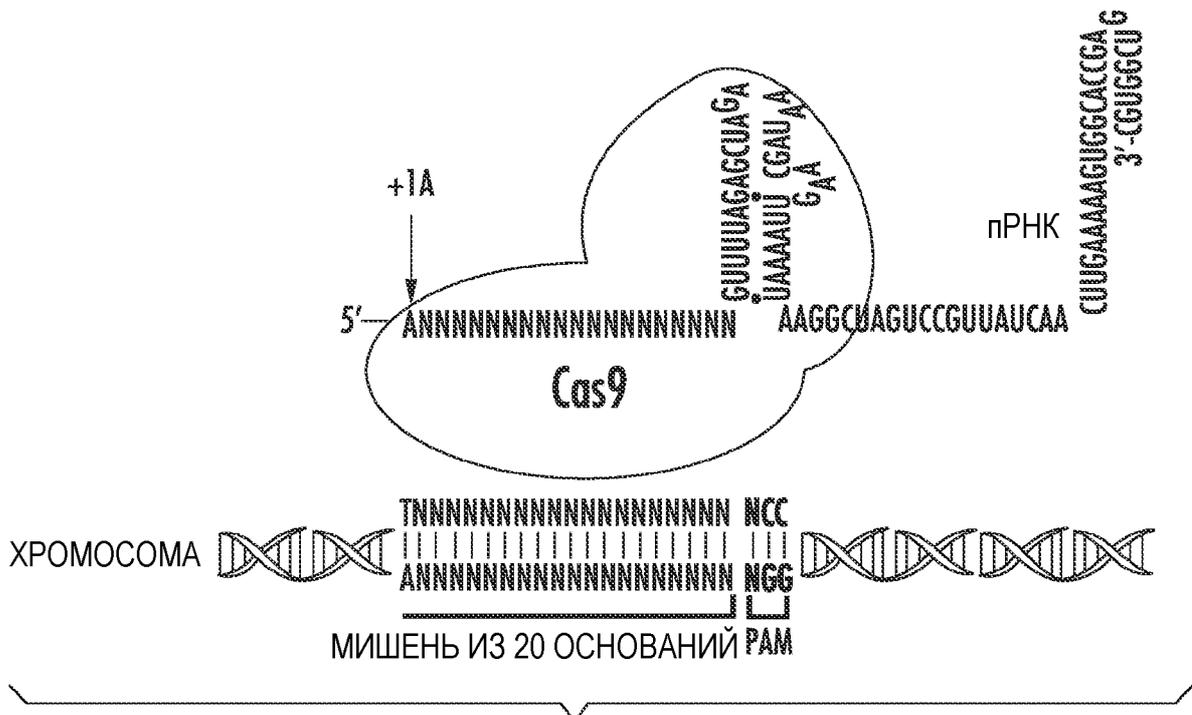
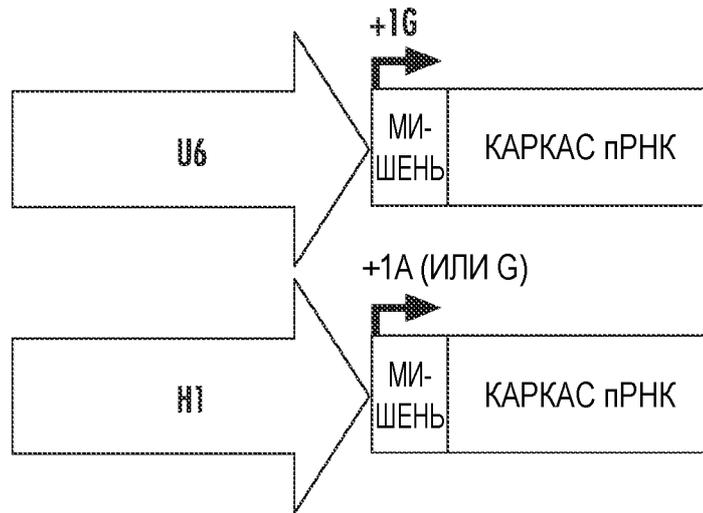
61. Способ по п. 50, где последовательность-мишень содержит нуклеотидную последовательность AN<sub>19</sub>NGG, GN<sub>19</sub>NGG, CN<sub>19</sub>NGG или TN<sub>19</sub>NGG.

62. Способ по п. 50, где белок Cas9 представляет собой кодон, оптимизированный для экспрессии в клетке.

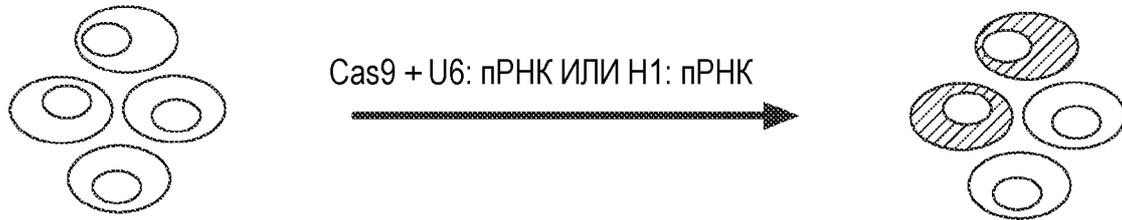
63. Способ по п. 50, дополнительно включающий в себя введение экспрессирующей конструкции по п. 43 и лиганда в количестве, которое изменяет активность рибозима.

64. Способ по п. 63, где лиганд представляет собой теofilлин.

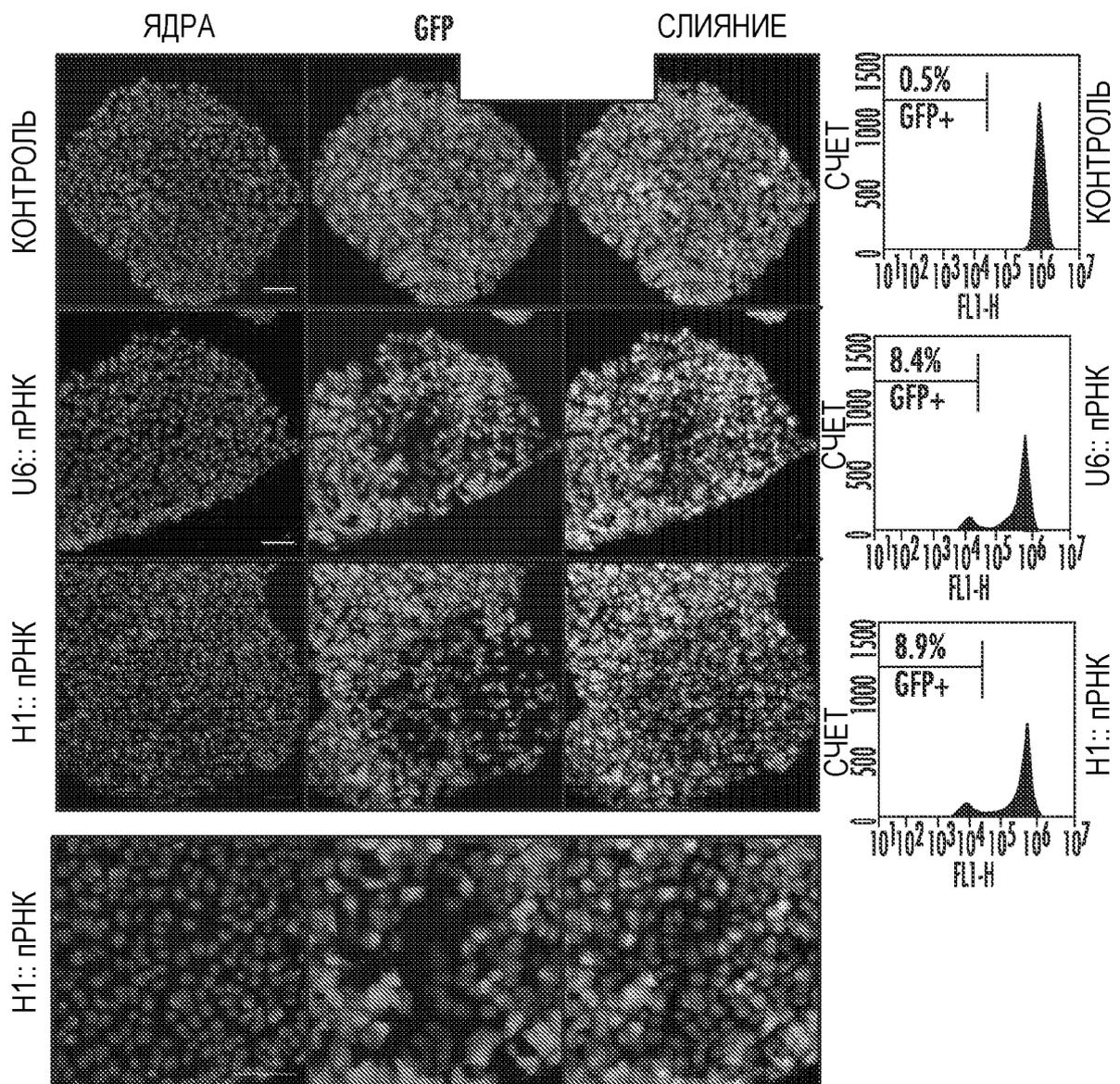
По доверенности



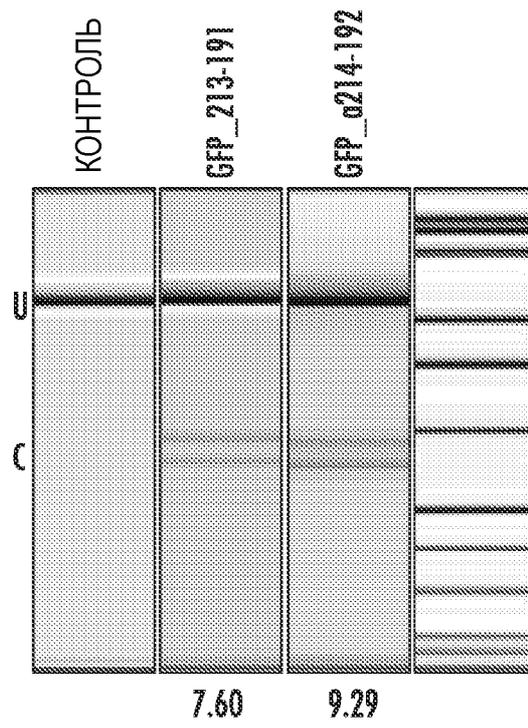
ФИГ. 1А



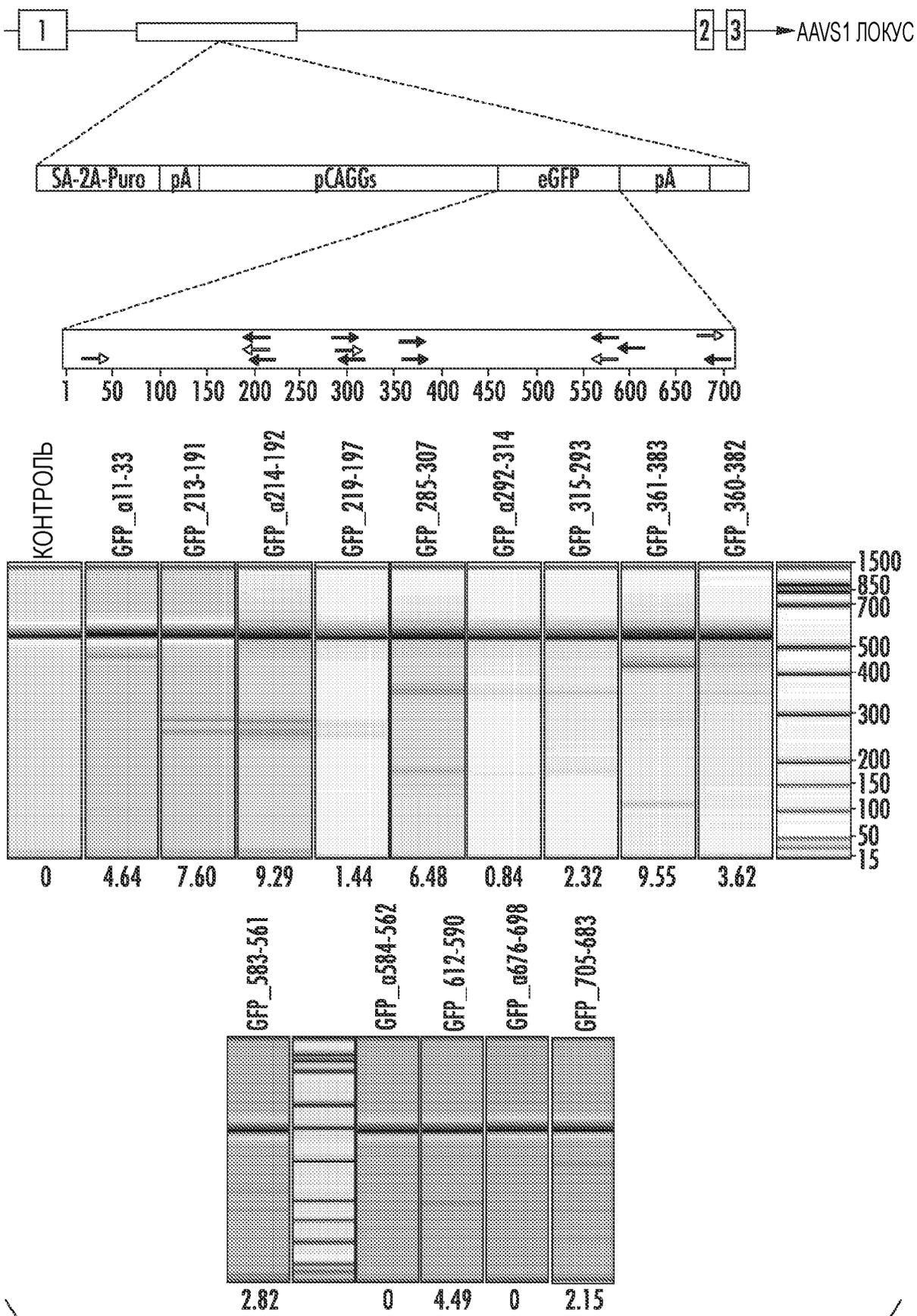
ФИГ. 1В



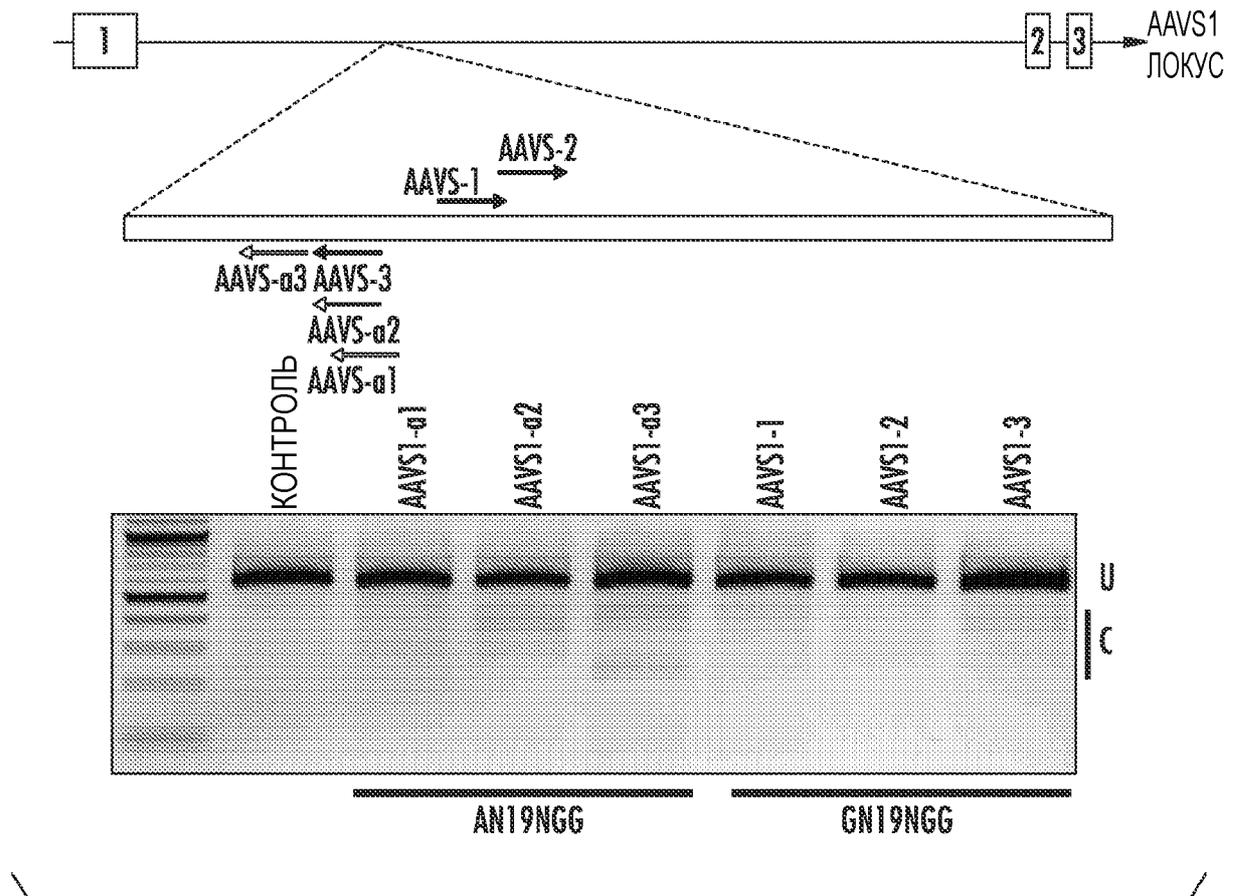
ФИГ. 1С



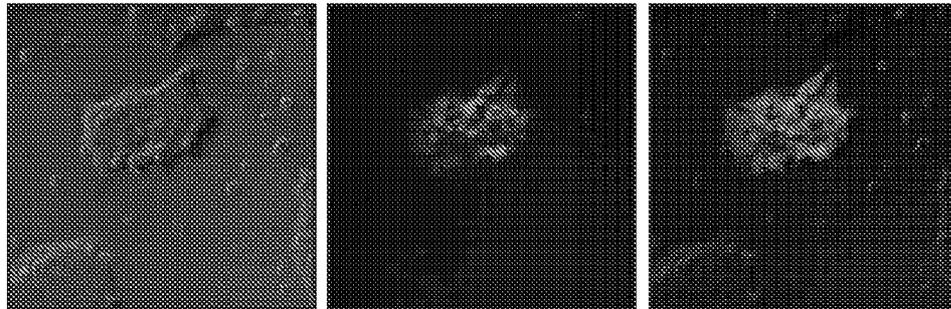
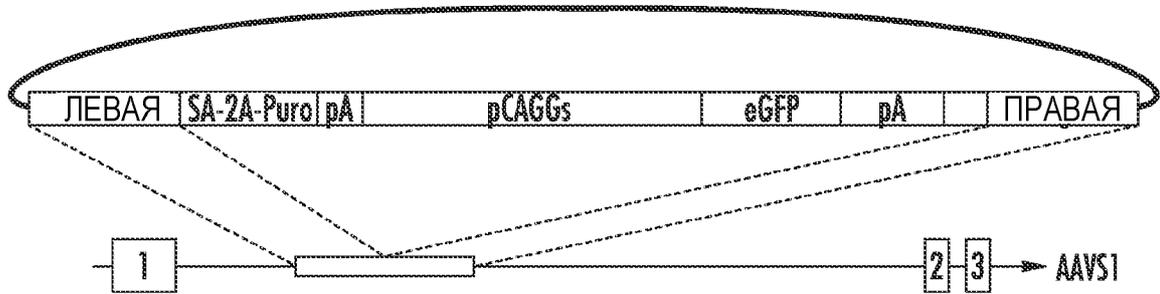
ФИГ. 1D



ФИГ. 2



ФИГ. 3А

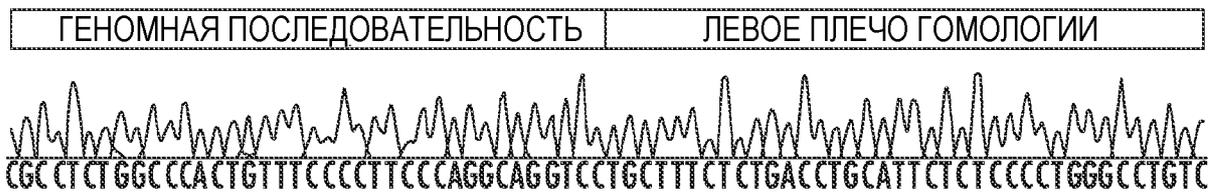


СВЕТЛОЕ ПОЛЕ

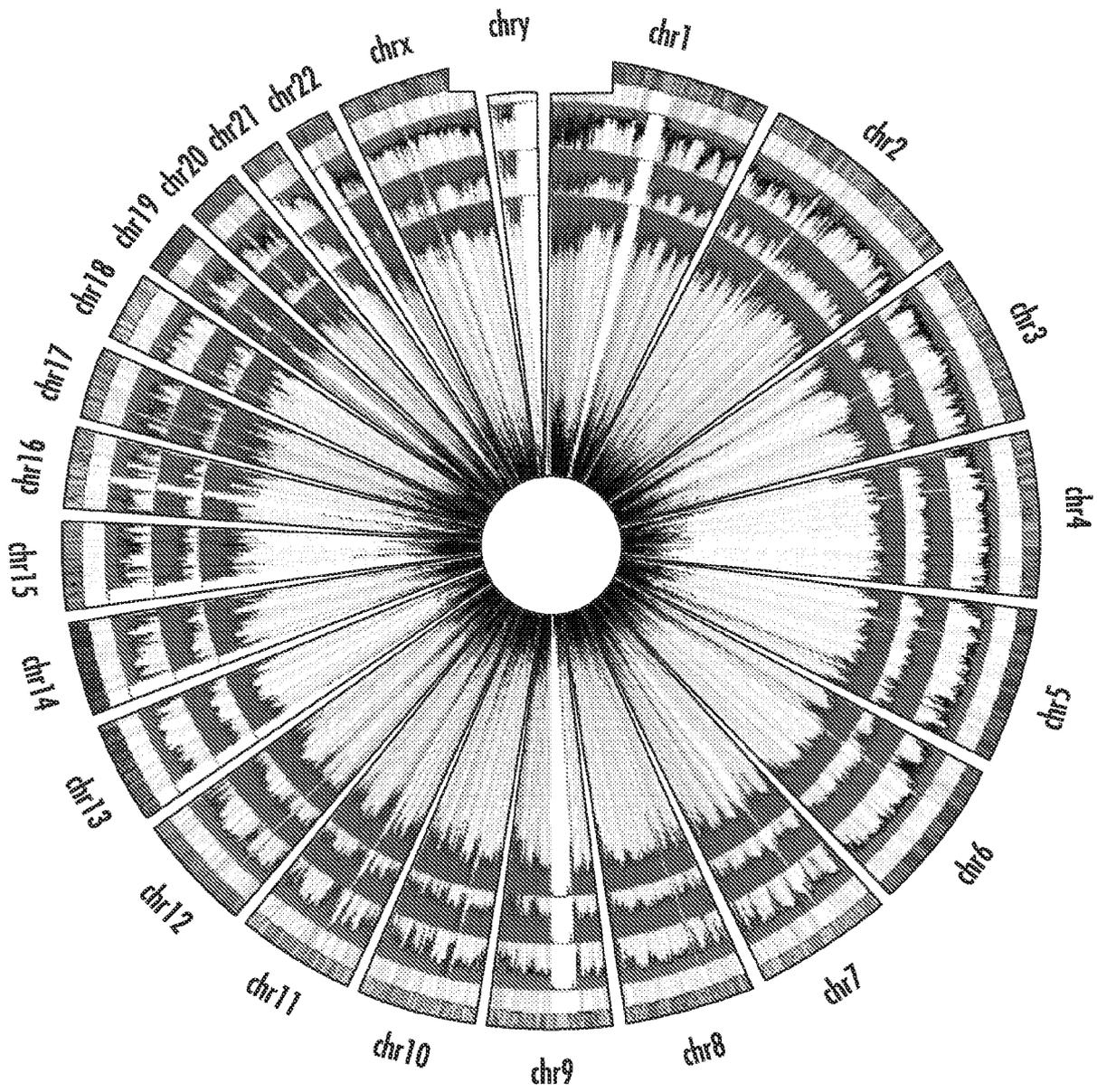
GFP

СЛИЯНИЕ

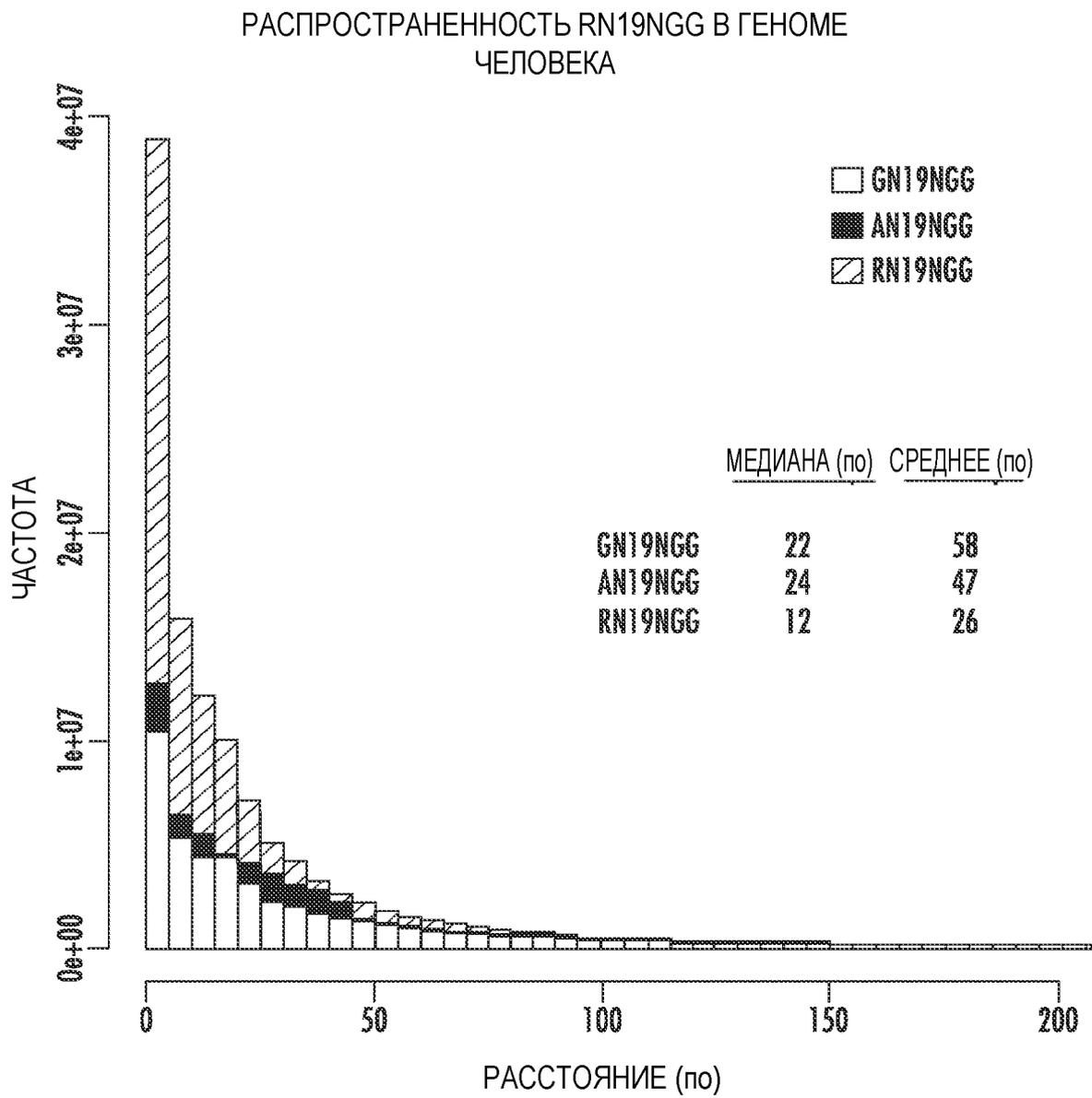
ФИГ. 3В



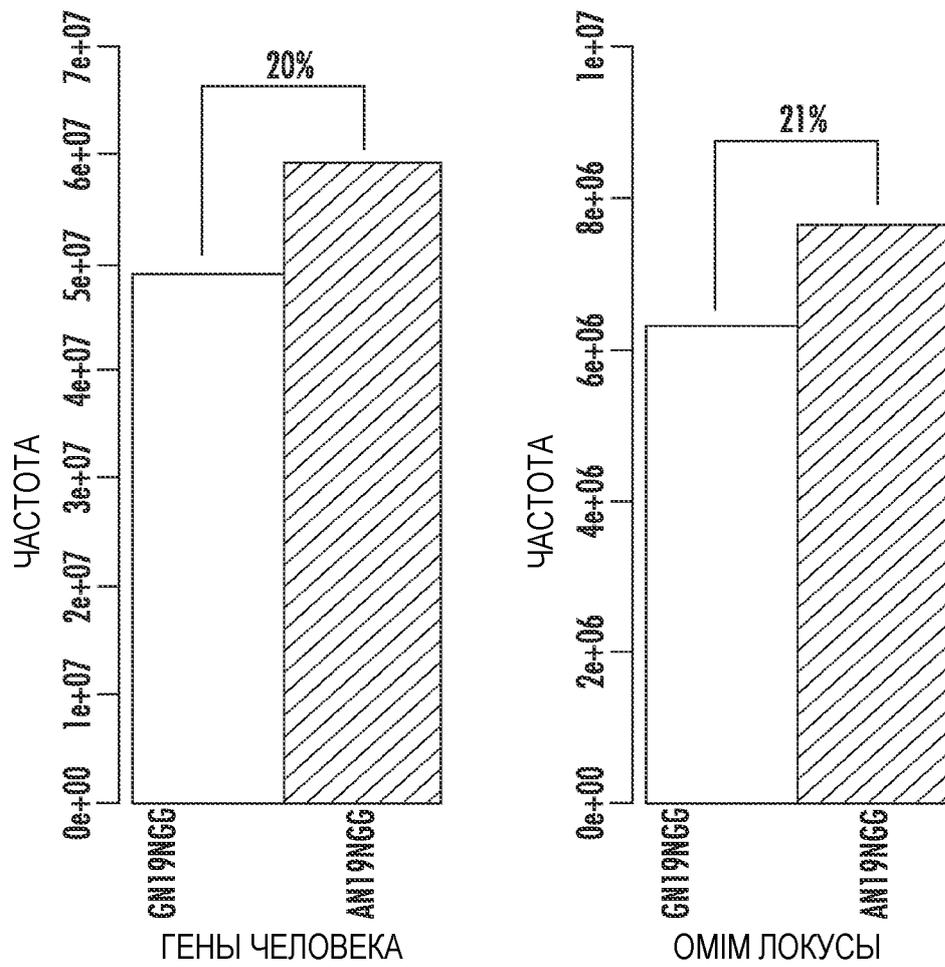
ФИГ. 3С



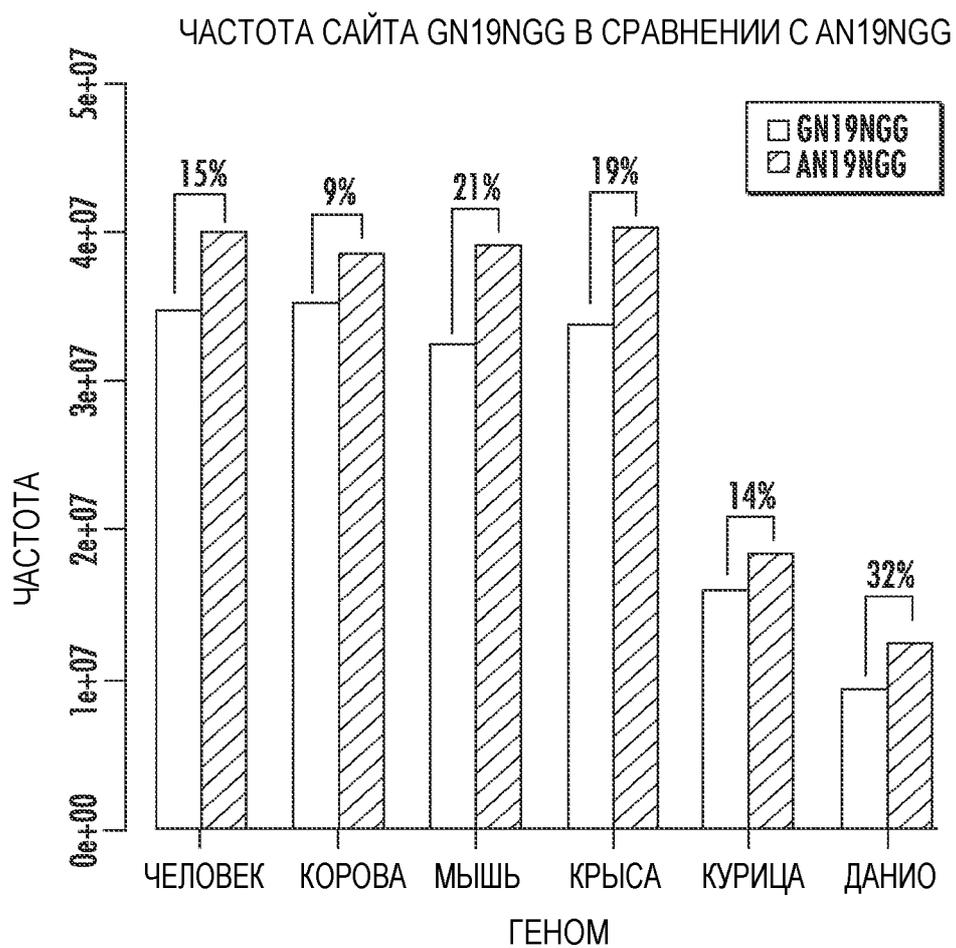
ΦΙΓ. 4Α



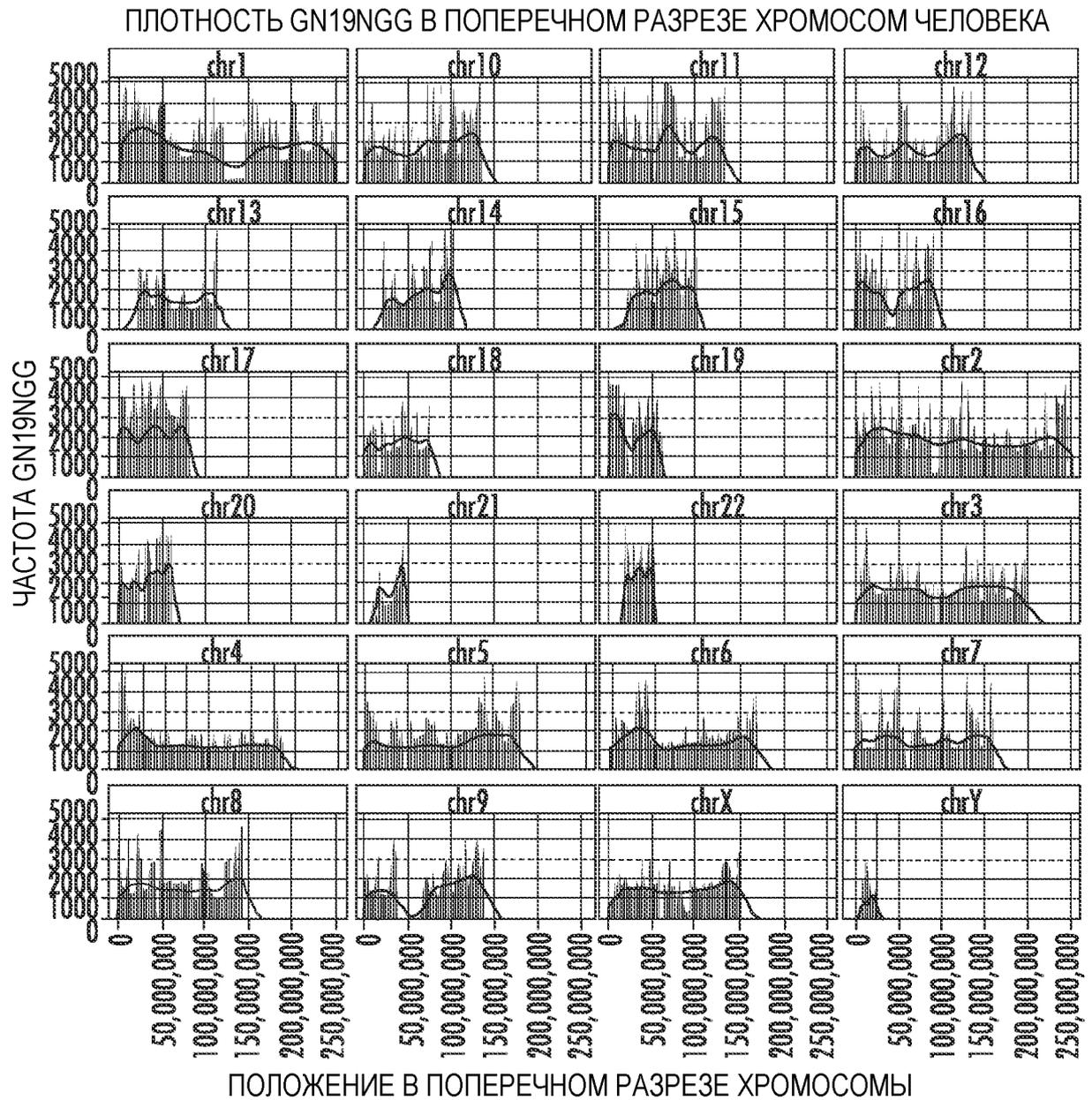
ФИГ. 4В

ЧАСТОТА GN19NGG В СРАВНЕНИИ С AN19NGG В ГЕНАХ  
ЧЕЛОВЕКА ИЛИ ЛОКУСАХ ЗАБОЛЕВАНИЯ

ФИГ. 4С

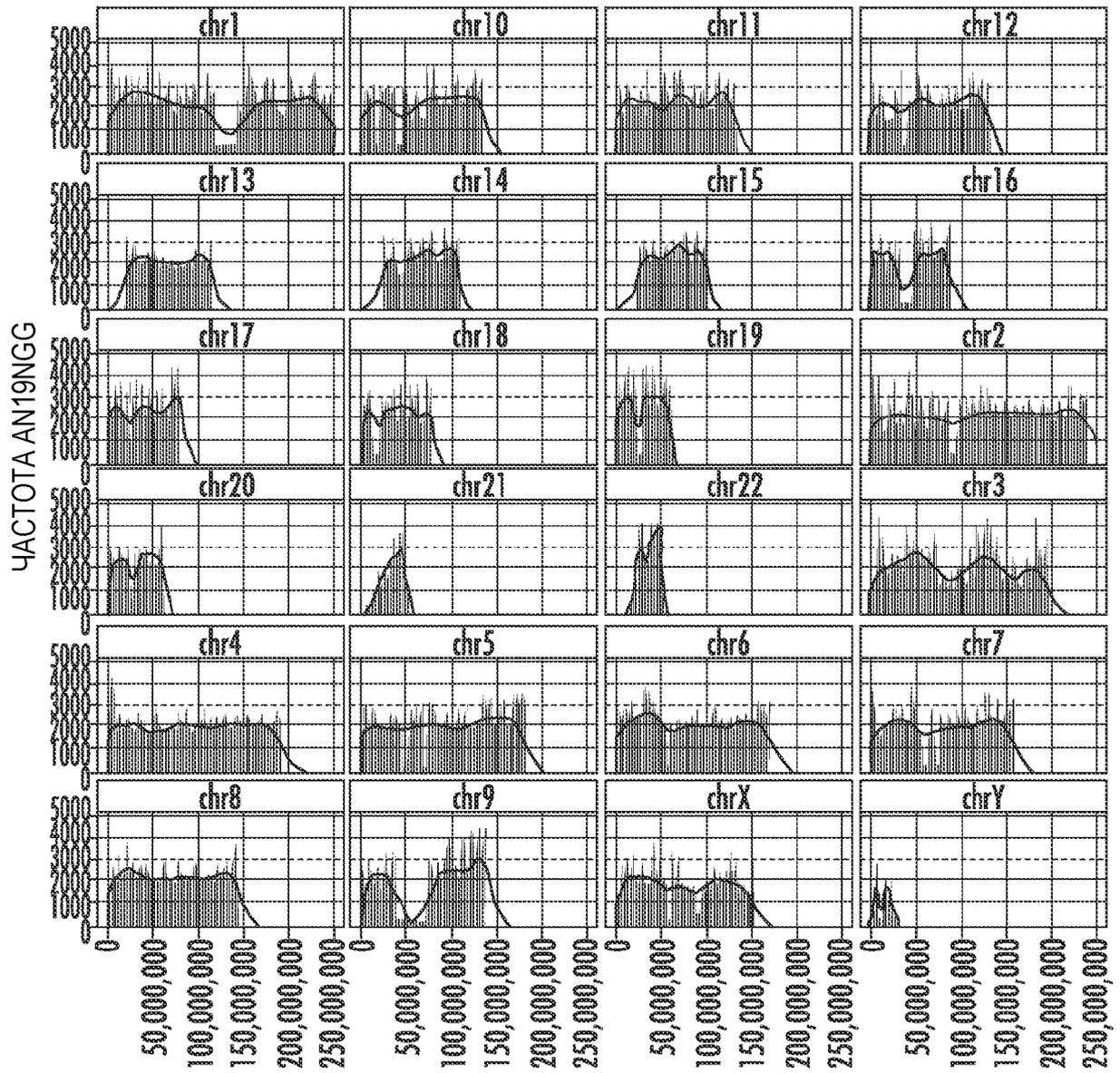


ФИГ. 4D



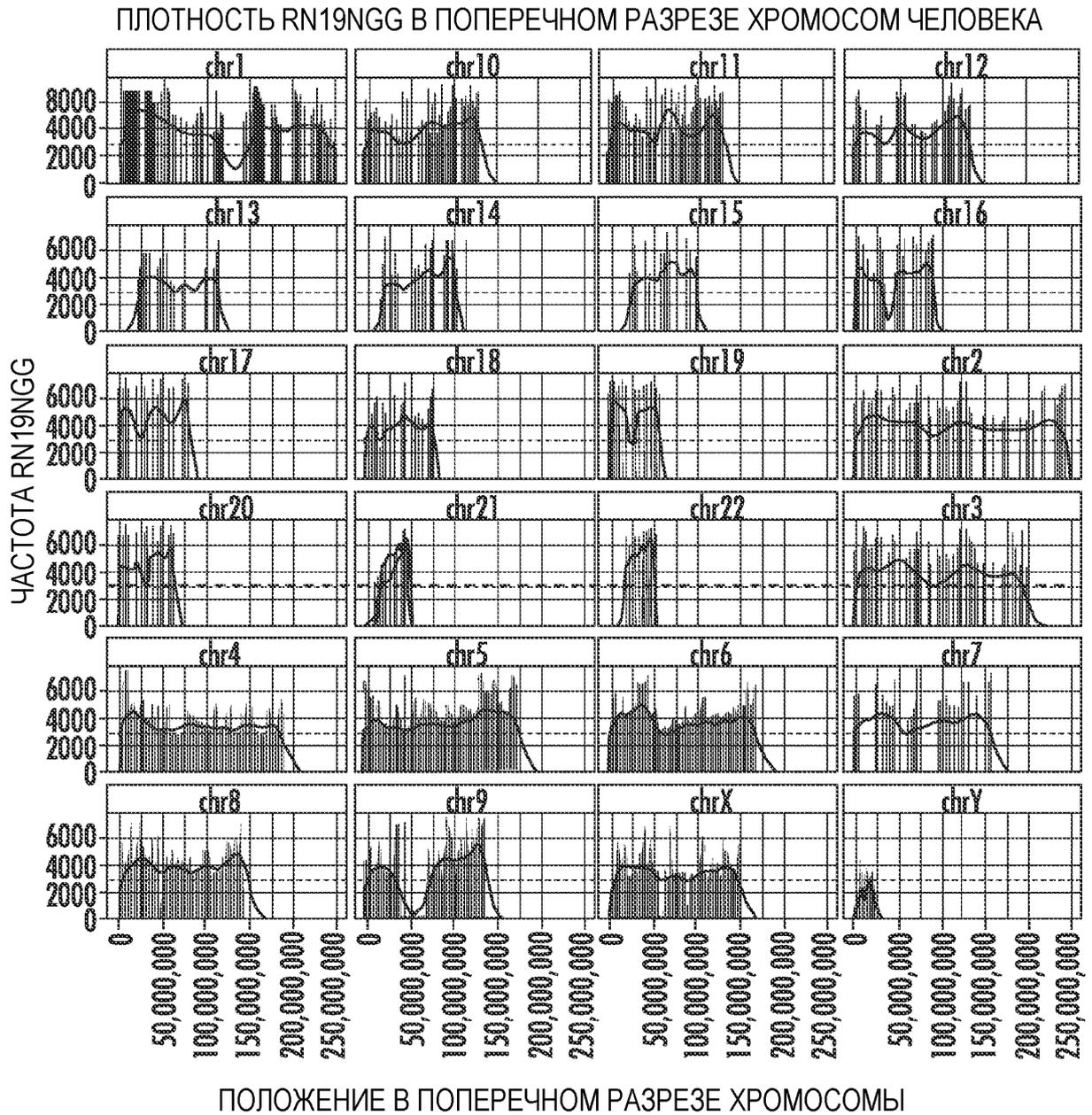
ФИГ. 5А

## ПЛОТНОСТЬ AN19NGG В ПОПЕРЕЧНОМ РАЗРЕЗЕ ХРОСОМ ЧЕЛОВЕКА



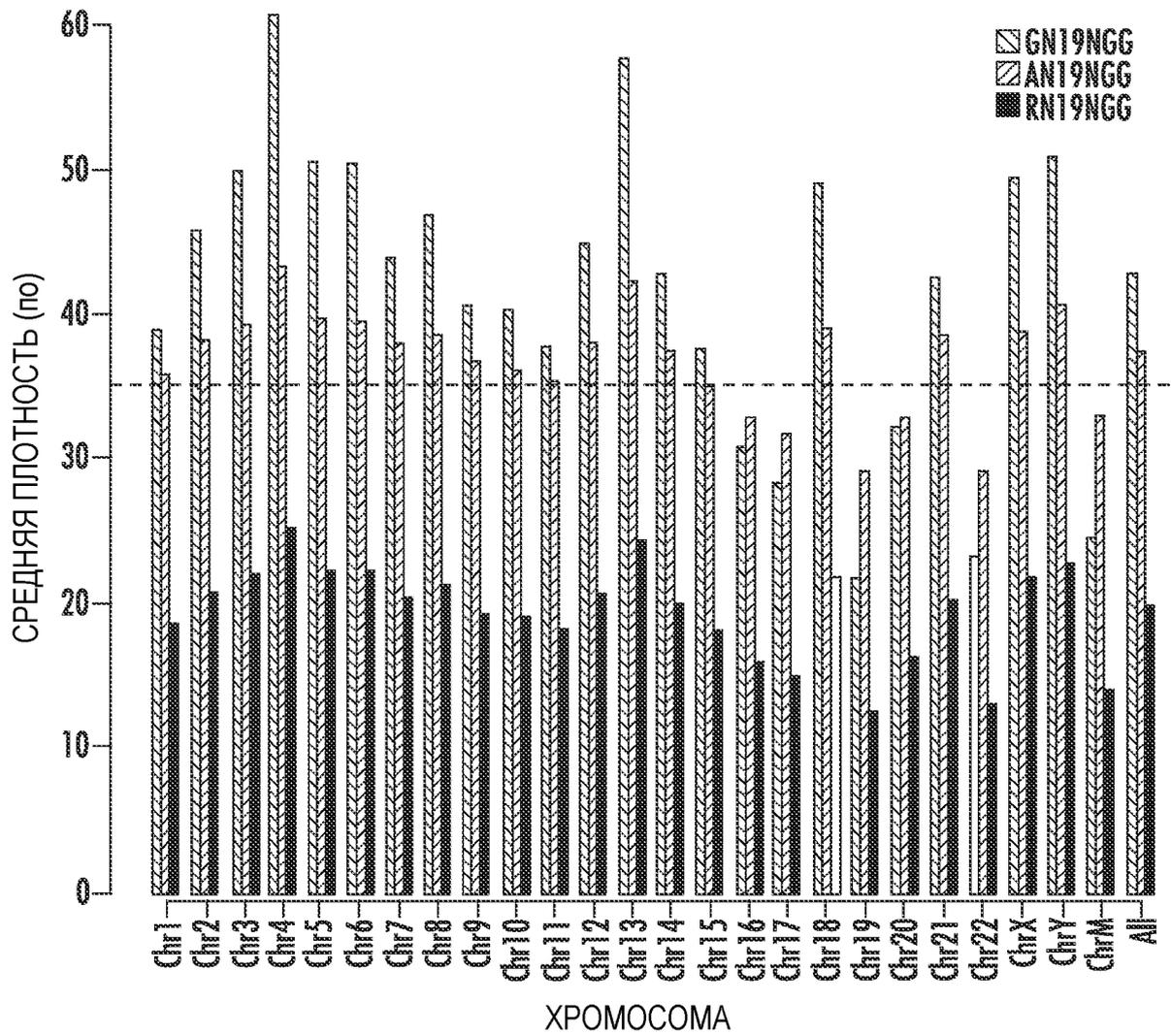
ПОЛОЖЕНИЕ В ПОПЕРЕЧНОМ РАЗРЕЗЕ ХРОСОМЫ

ФИГ. 5В

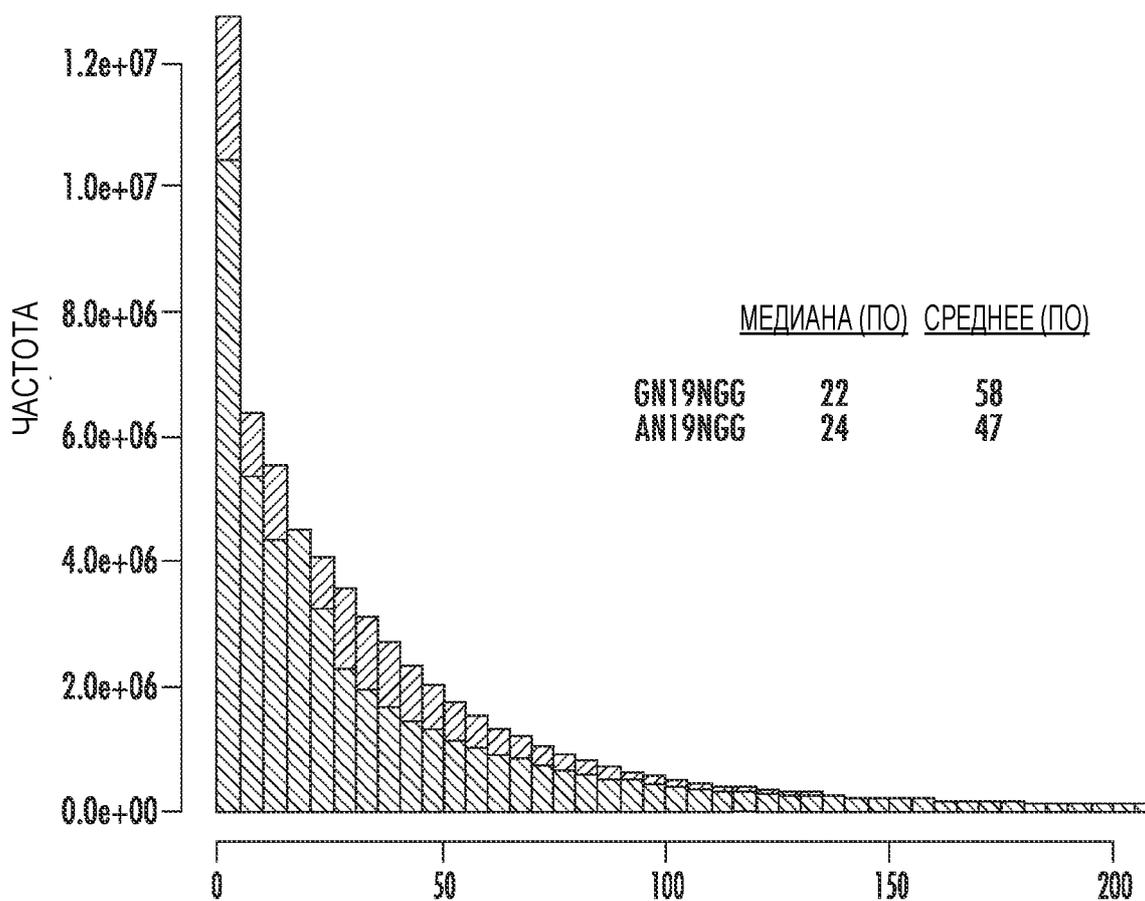


ФИГ. 5С

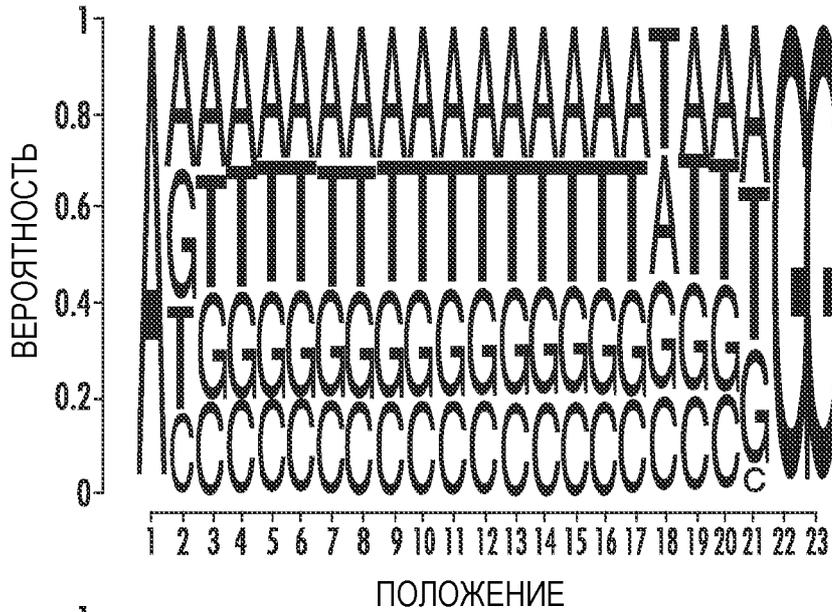
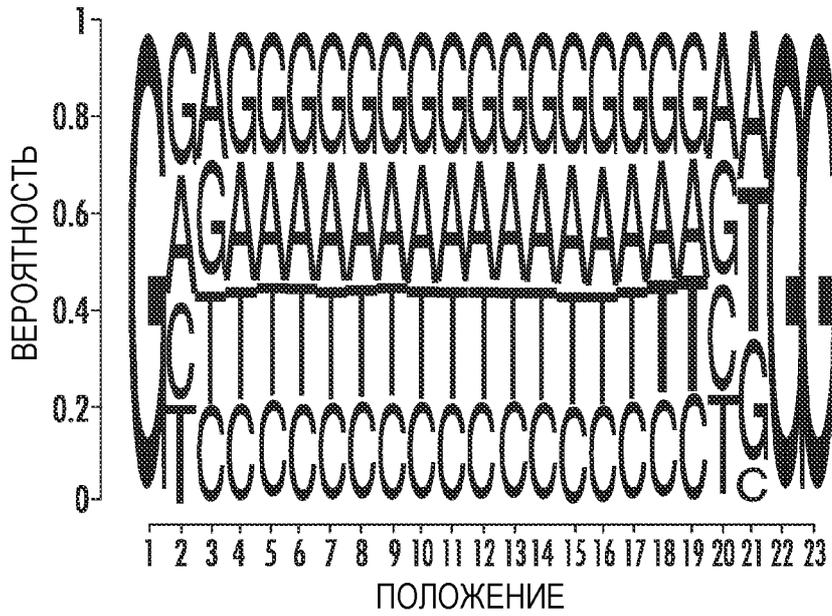
## СРЕДНЯЯ ПЛОТНОСТЬ НАЦЕЛИВАНИЯ ВДОЛЬ ХРОМОСОМ ЧЕЛОВЕКА



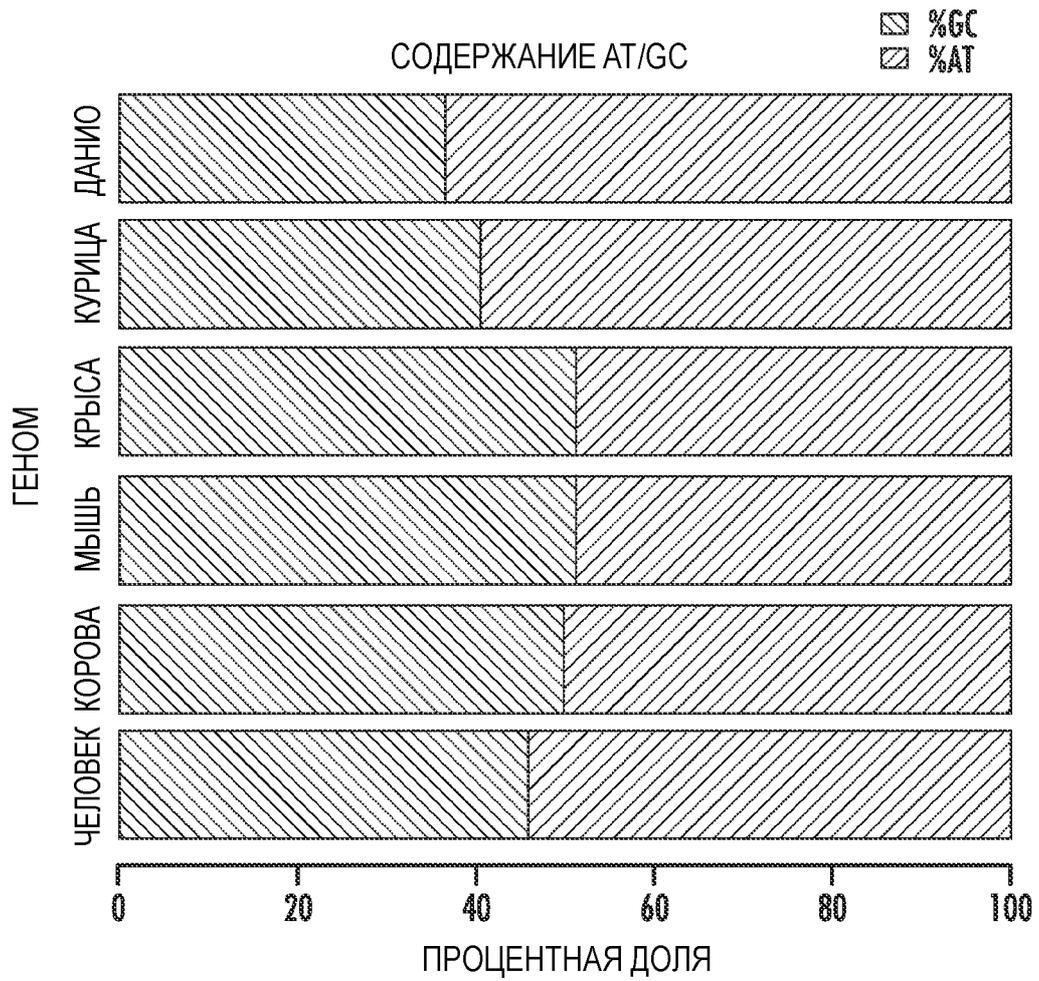
ФИГ. 5D

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ AN19NGG В СРАВНЕНИИ С GN19NGG В ГЕНОМЕ  
ЧЕЛОВЕКА

ФИГ. 5E

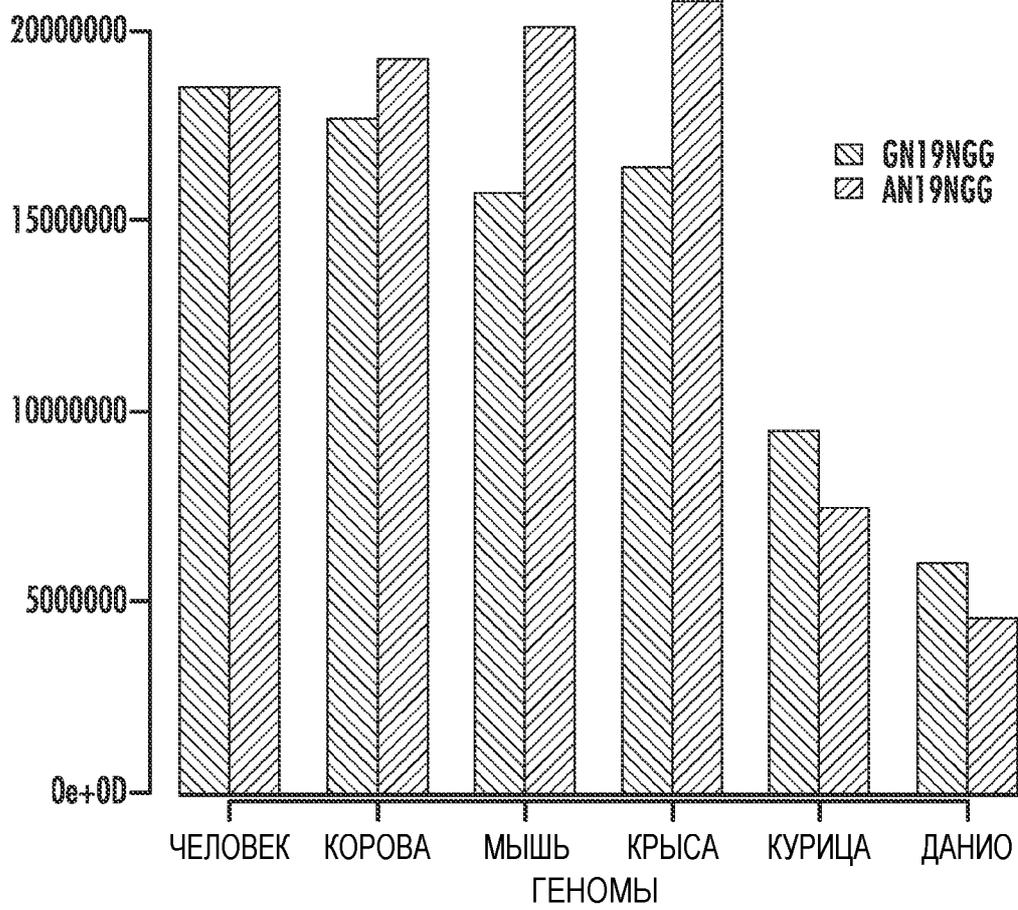


ФИГ. 5F

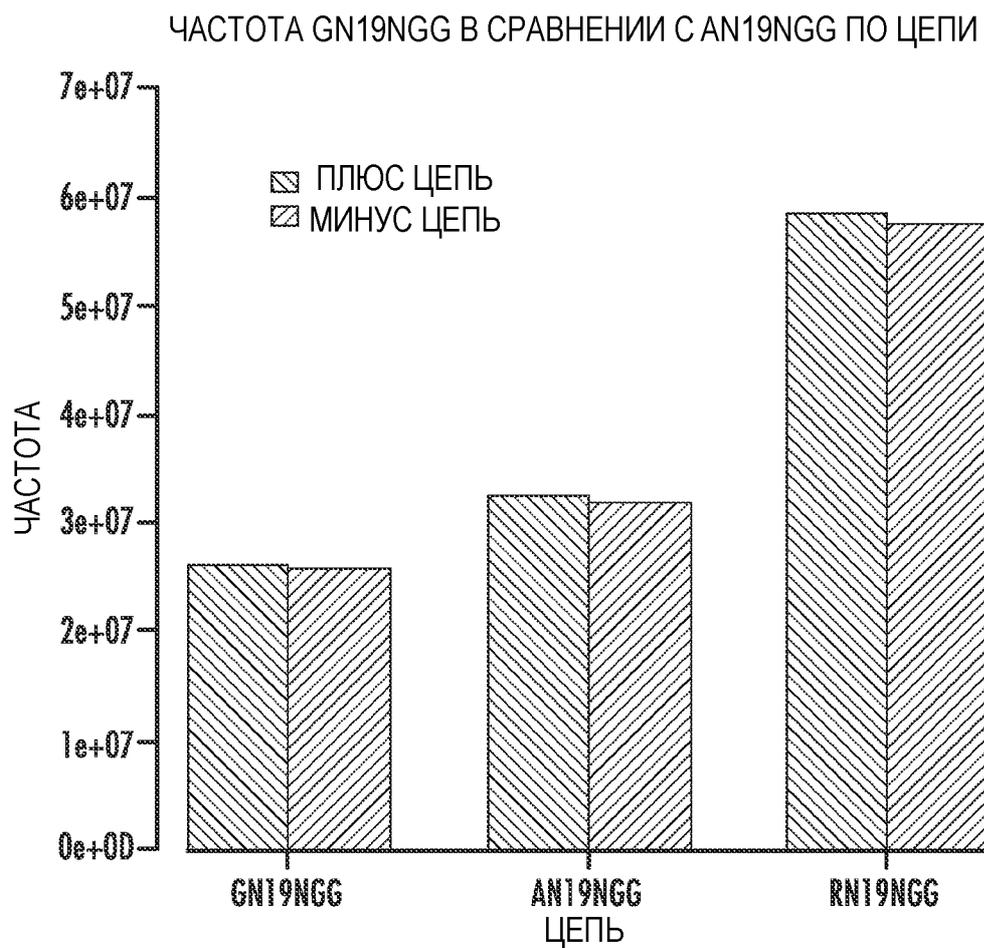


ФИГ. 6А

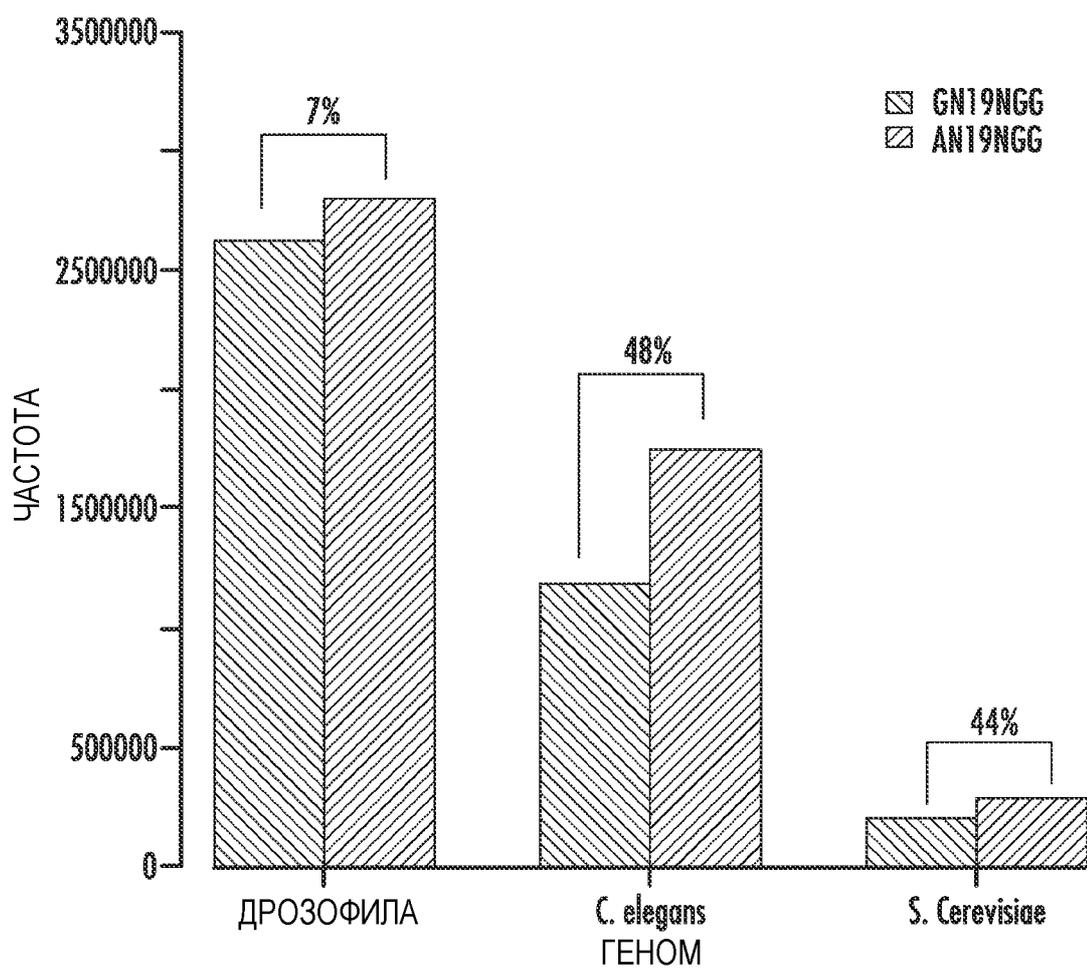
ЧАСТОТА GN19NGG В СРАВНЕНИИ С AN19NGG,  
НОРМАЛИЗОВАННАЯ ПО СОДЕРЖАНИЮ АТ/GC



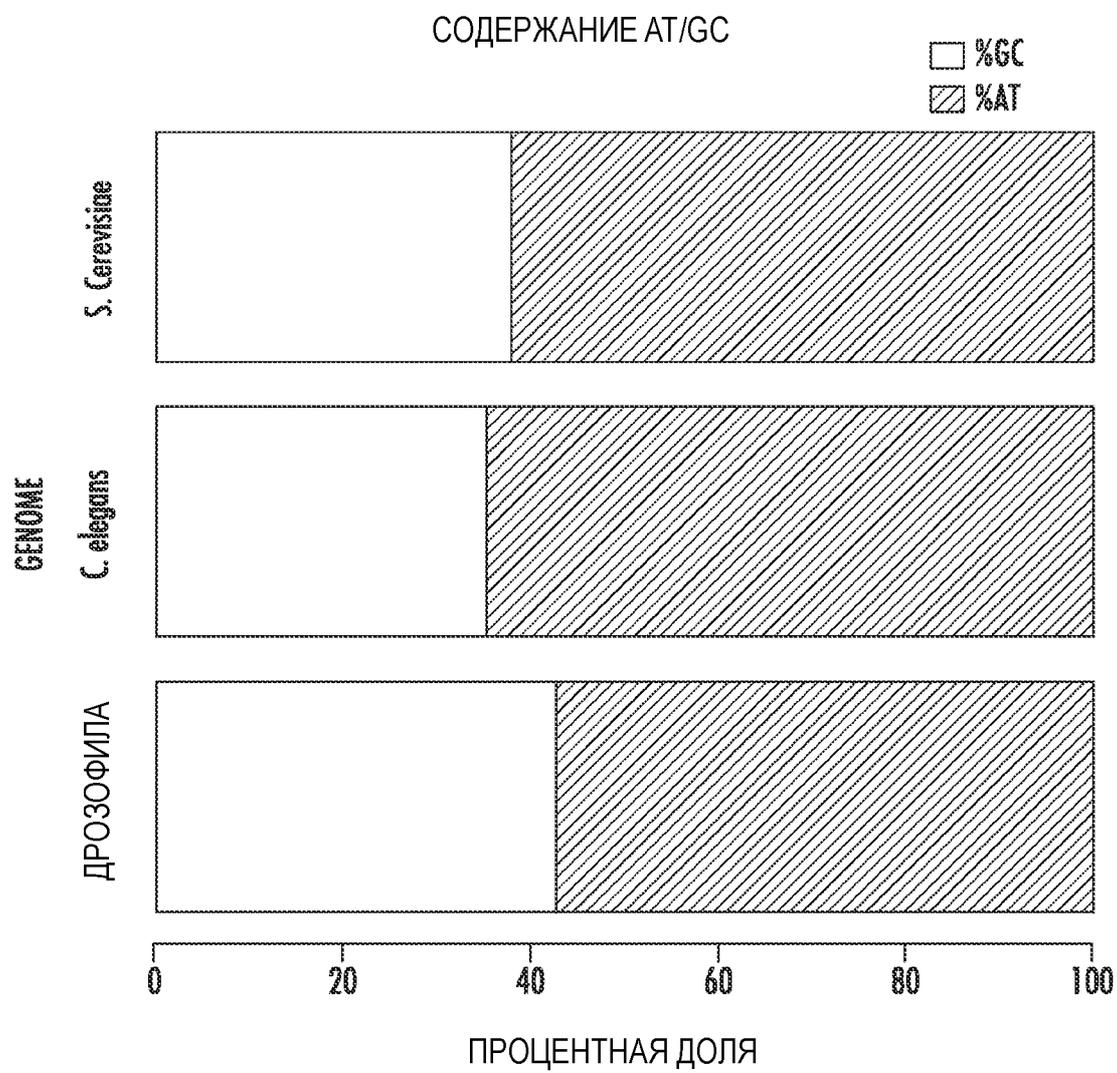
ФИГ. 6В



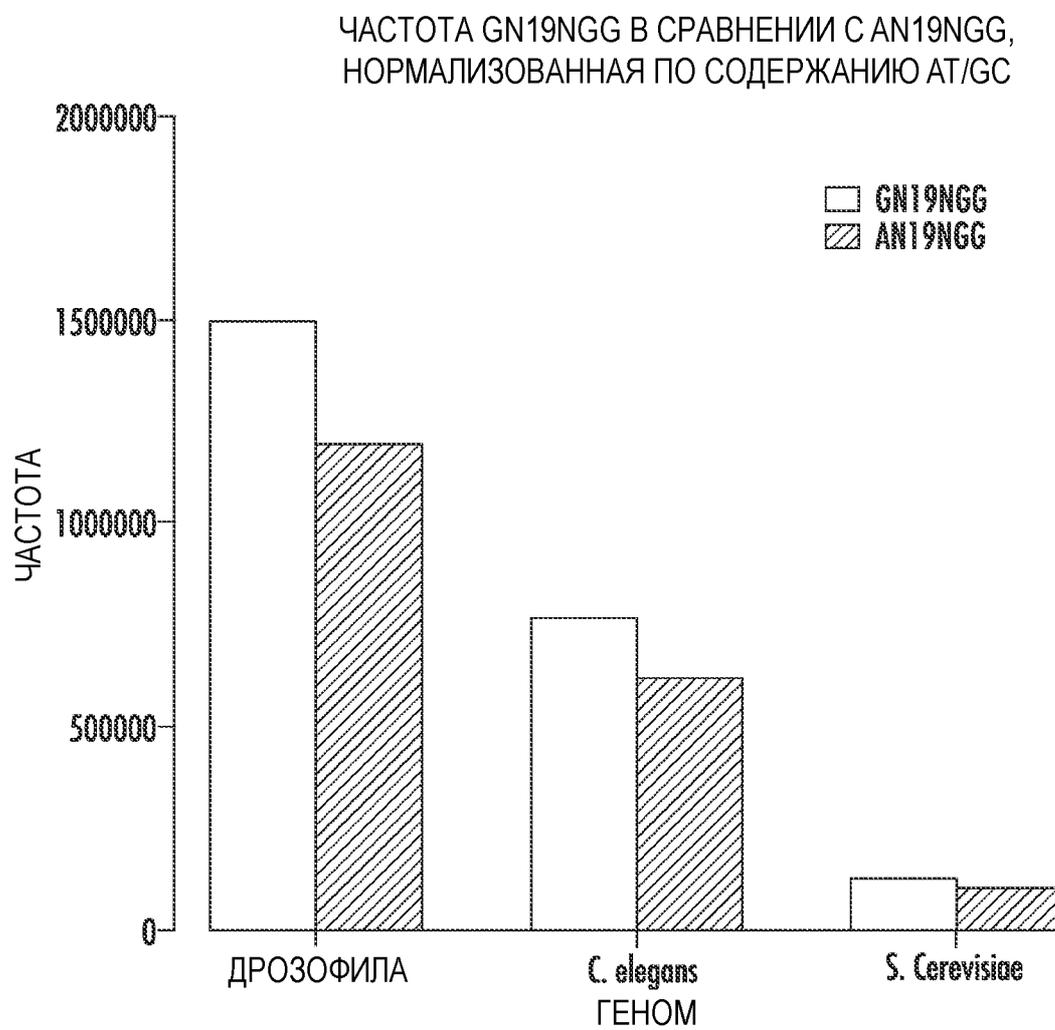
ФИГ. 6С

ЧАСТОТА GN19NGG В СРАВНЕНИИ С AN19NGG В  
ДРУГИХ ГЕНОМАХ

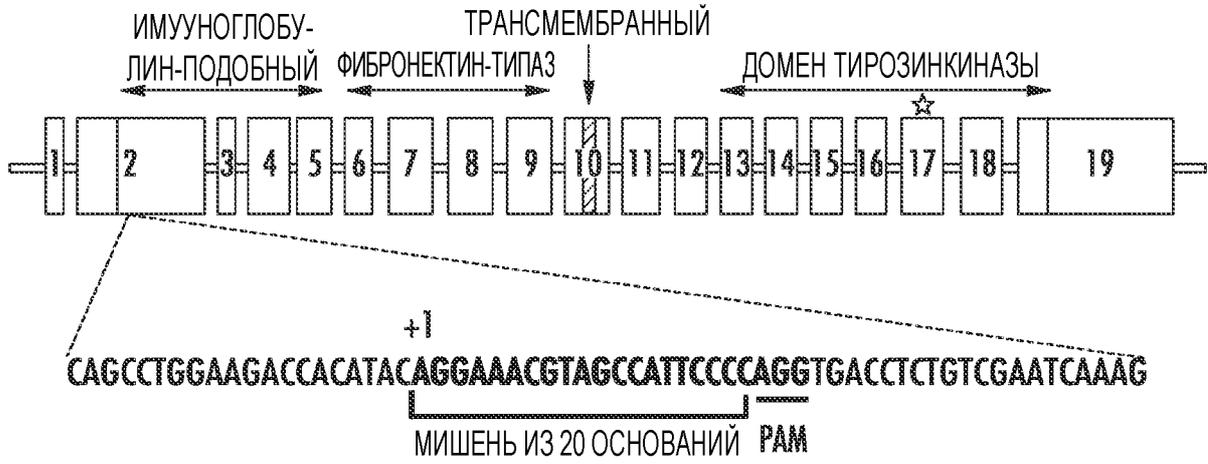
ФИГ. 6D



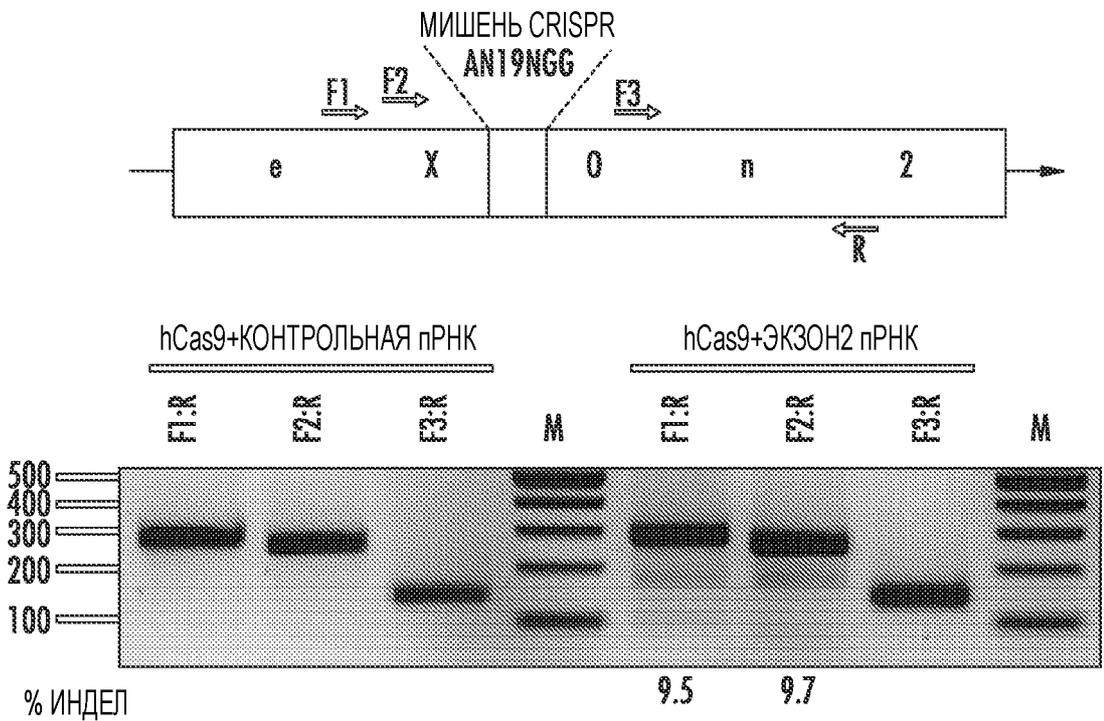
ФИГ. 6Е



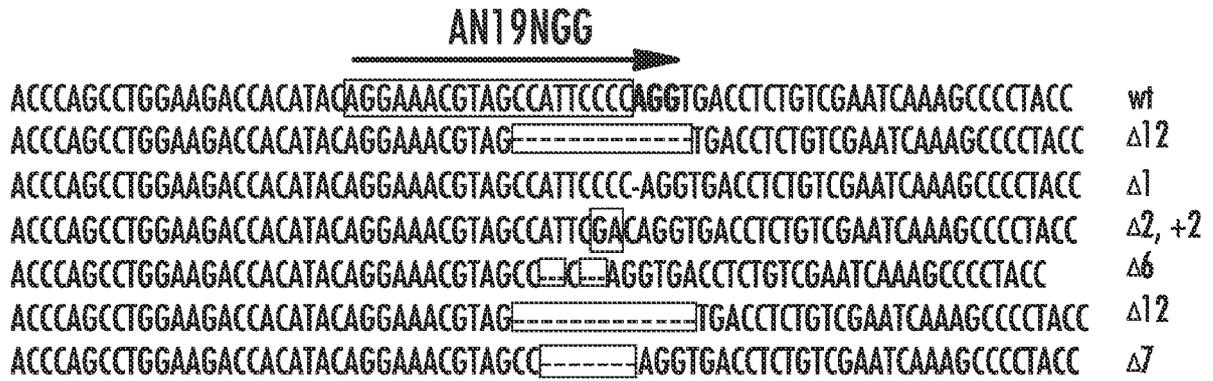
ФИГ. 6F



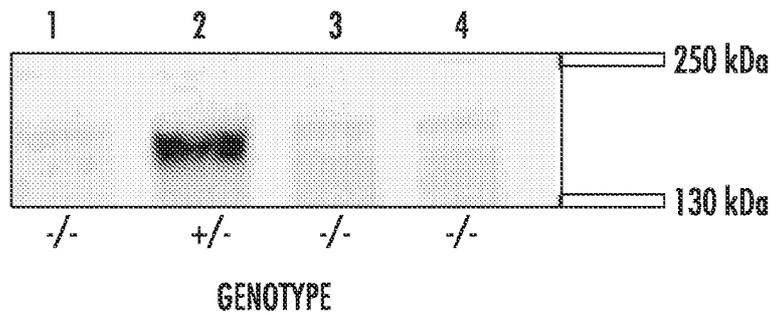
ФИГ. 7А



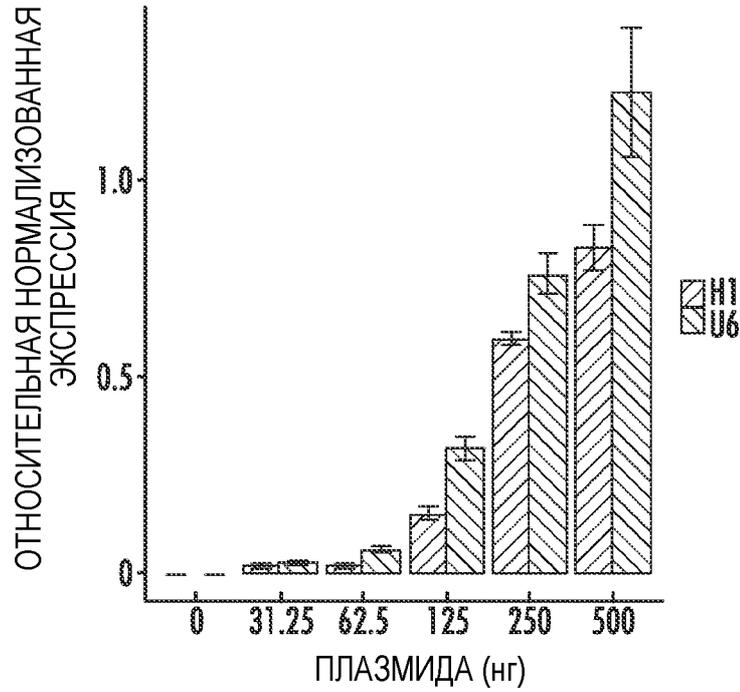
ФИГ. 7В



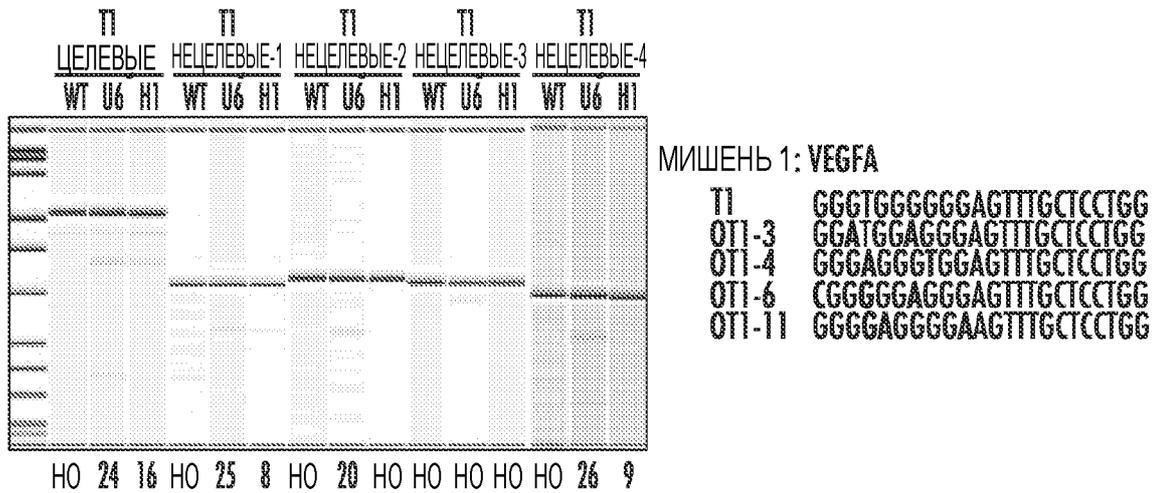
ФИГ. 7С



ФИГ. 7D

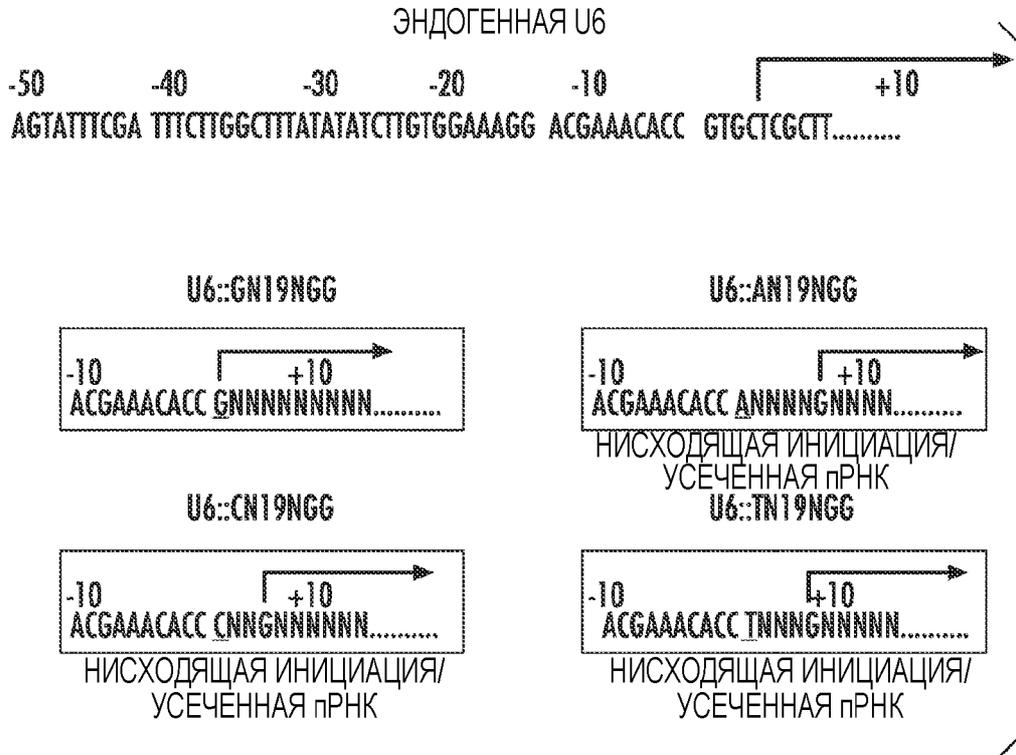


ФИГ. 8А

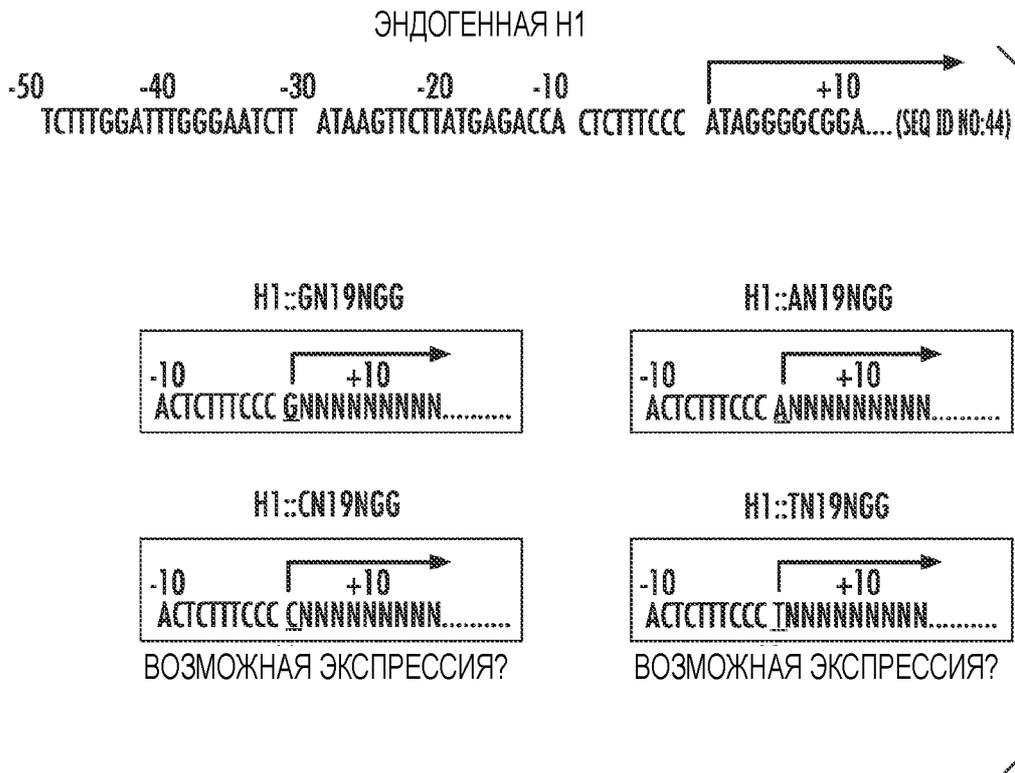


ФИГ. 8В

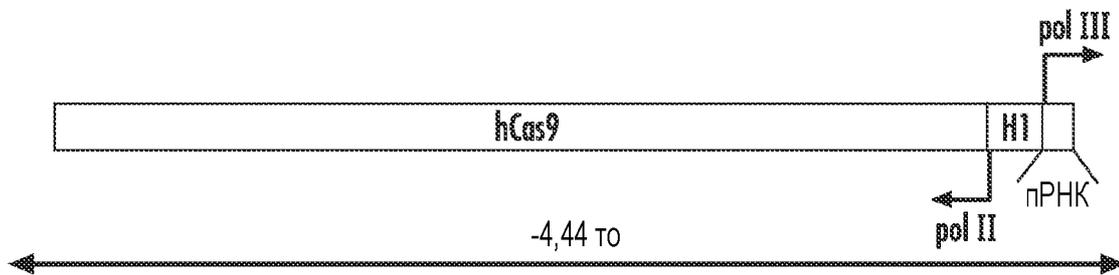




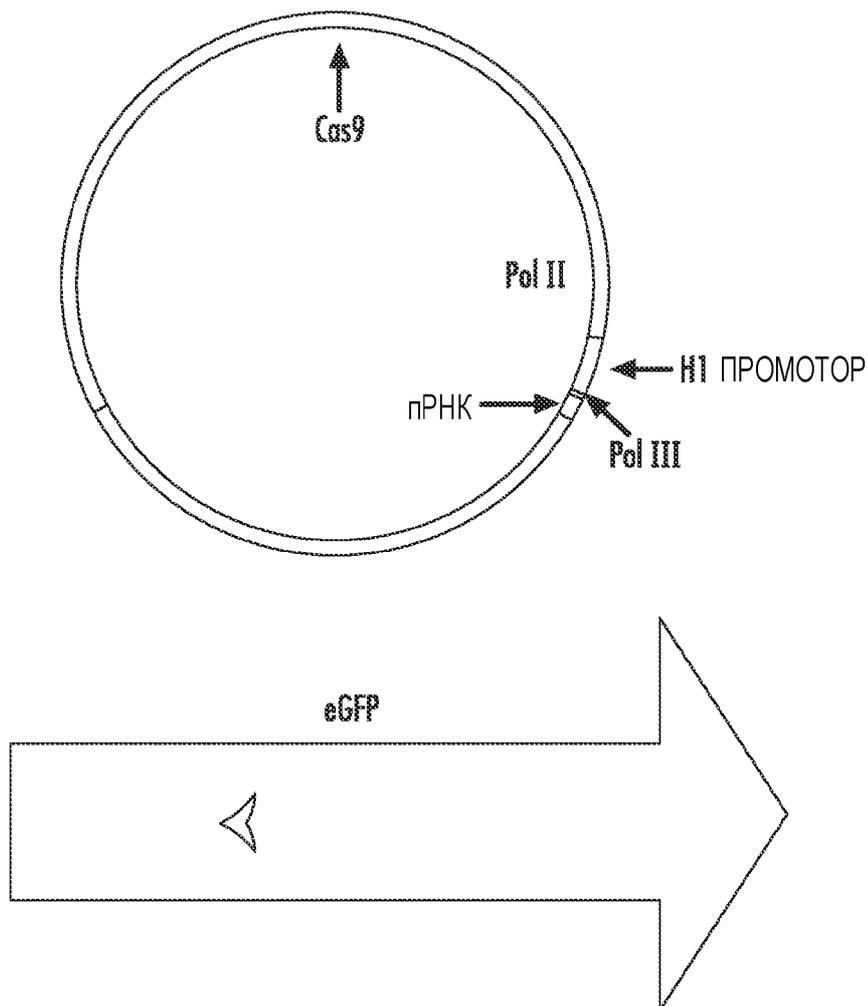
ФИГ. 9А



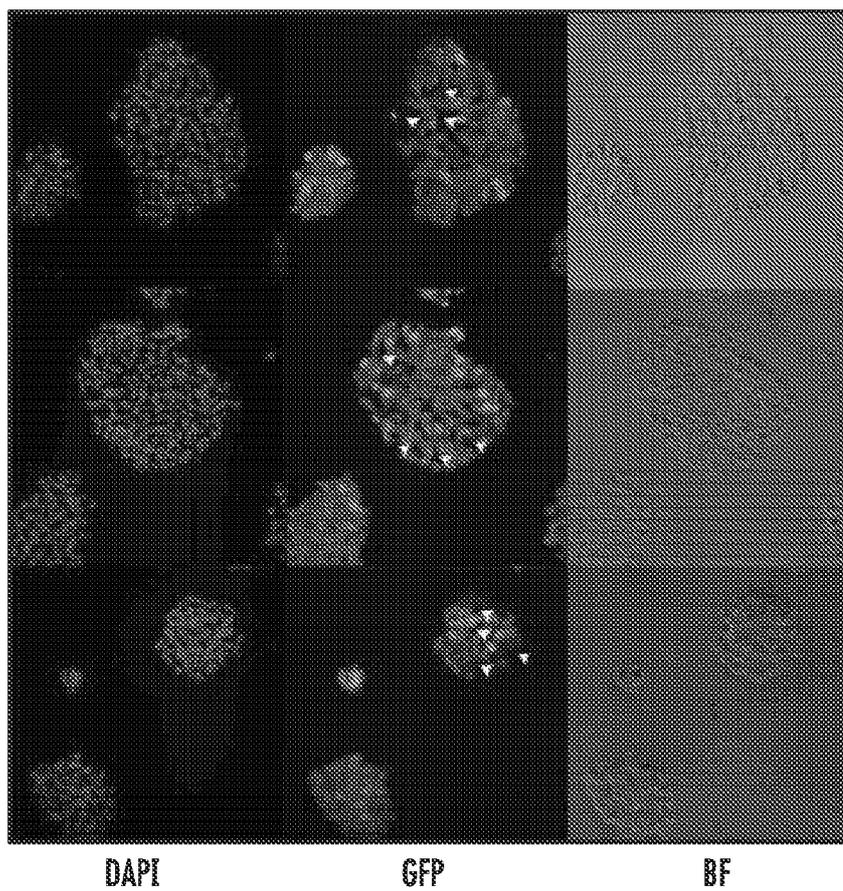
ФИГ. 9В



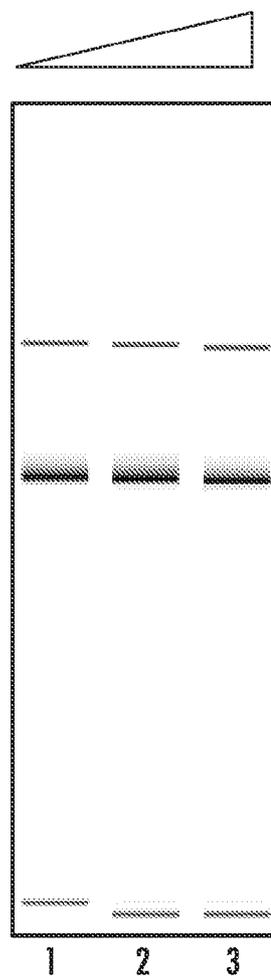
ФИГ. 10А



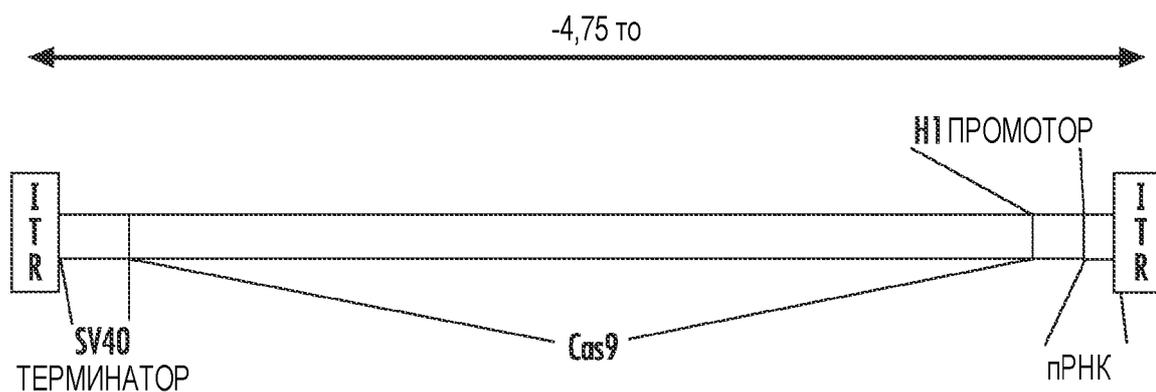
ФИГ. 10В



ФИГ. 10С

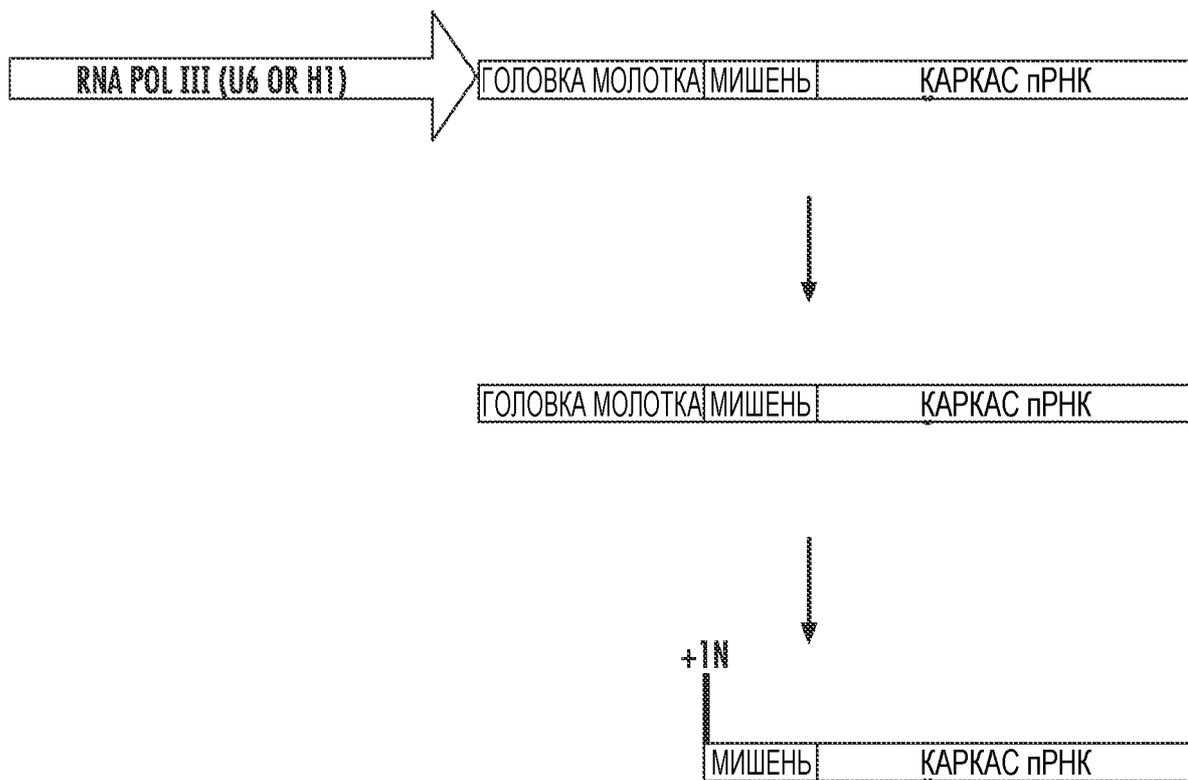


ФИГ. 10D



ФИГ. 10Е





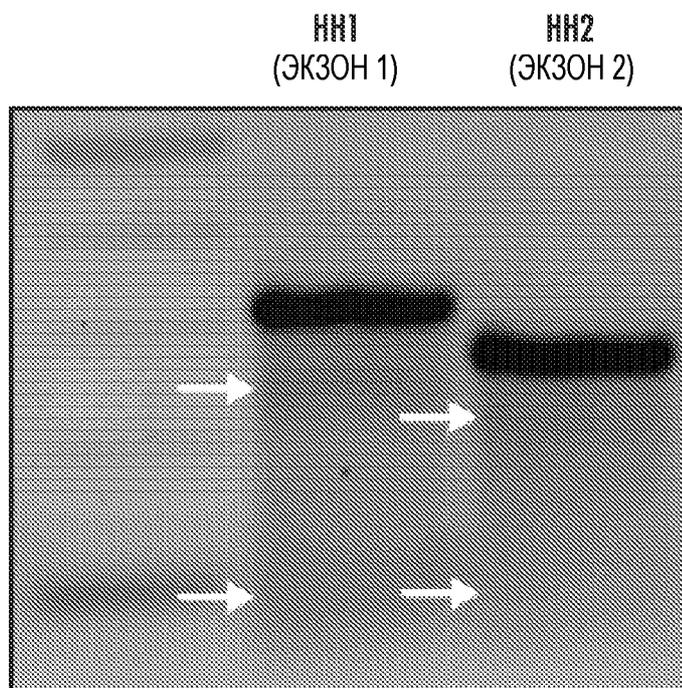
ФИГ. 11В

САЙТ-МИШЕНЬ                      РАМ

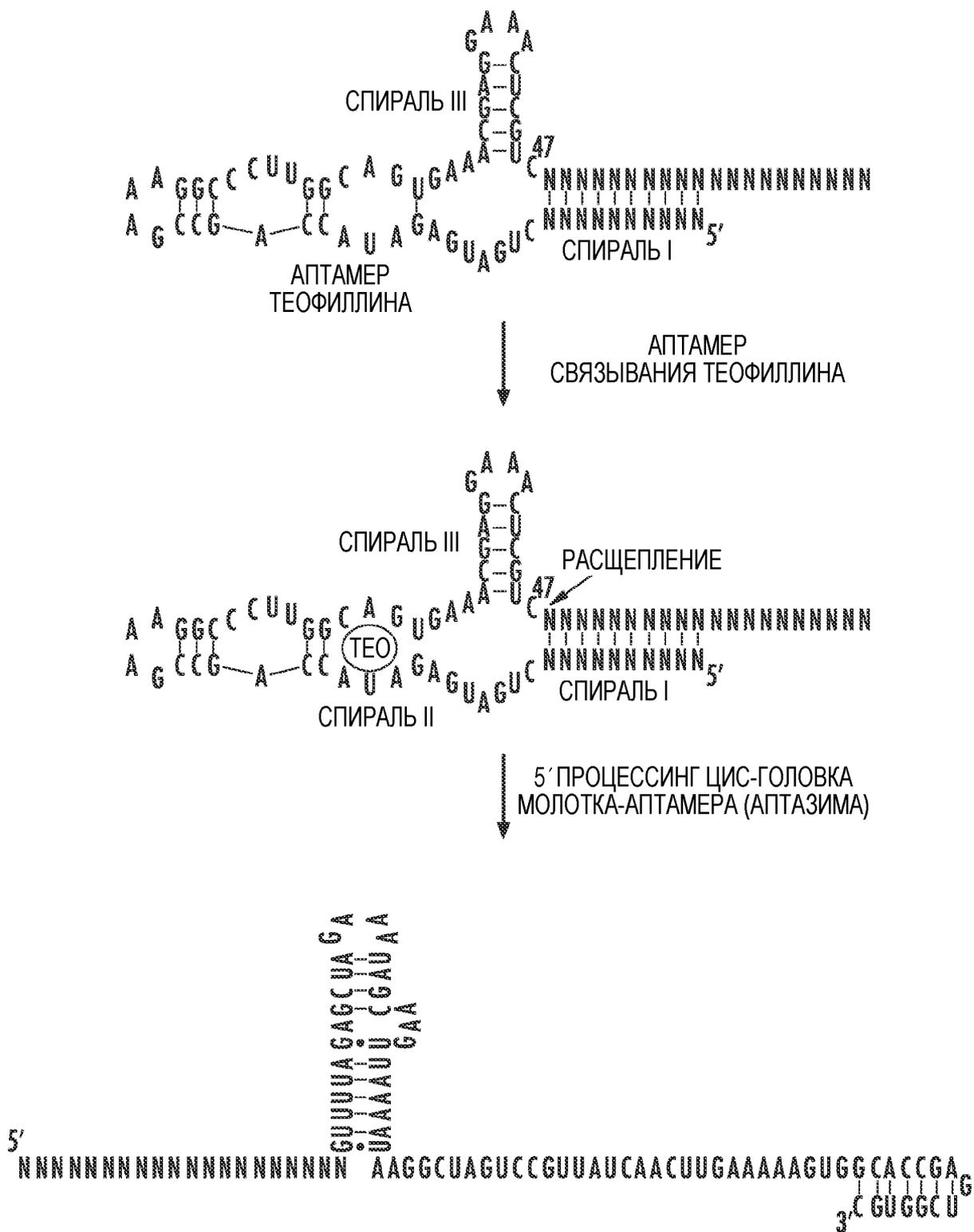
---

НН1: CTCACCTCTACGCCAGAGCGCGG

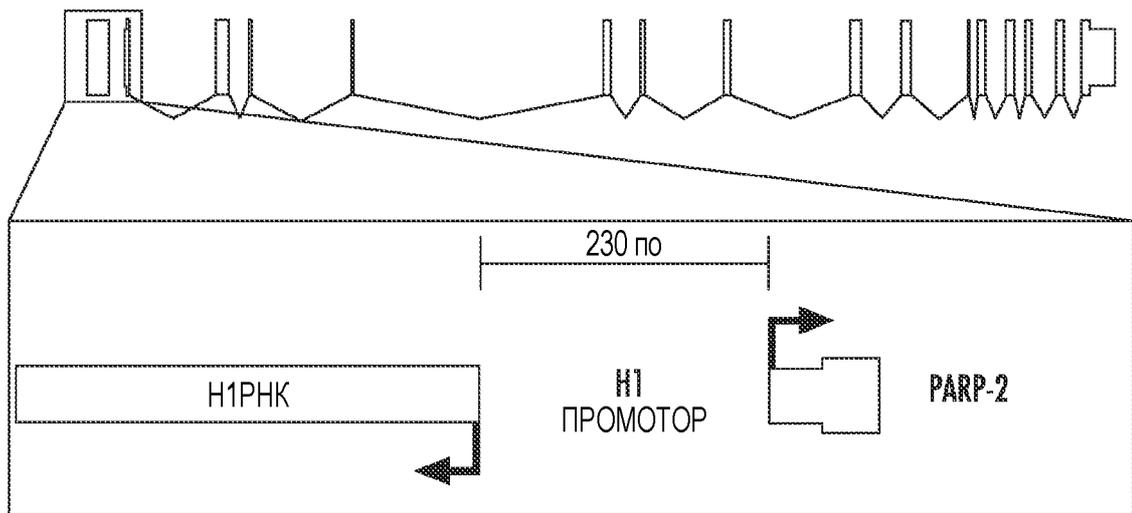
НН2: AGGAAACGTAGCCATTCCCCAGG



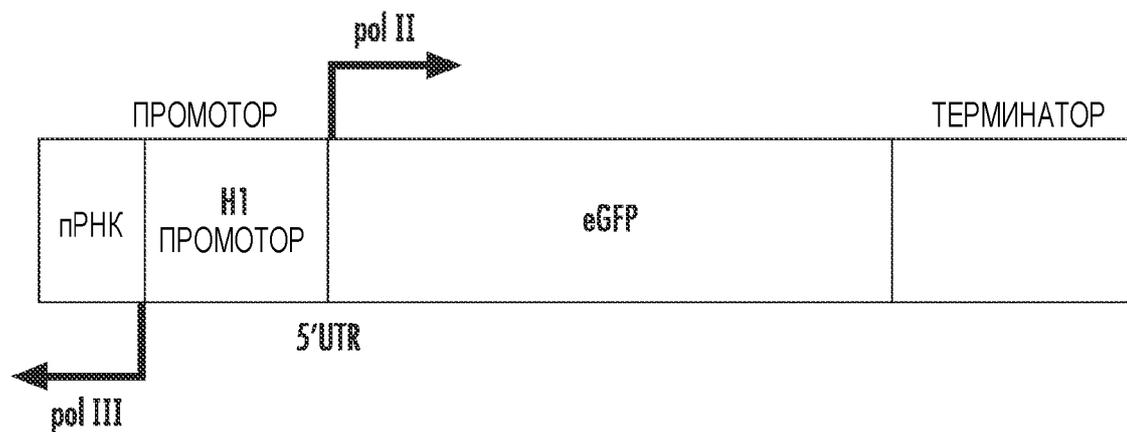
ФИГ. 11С



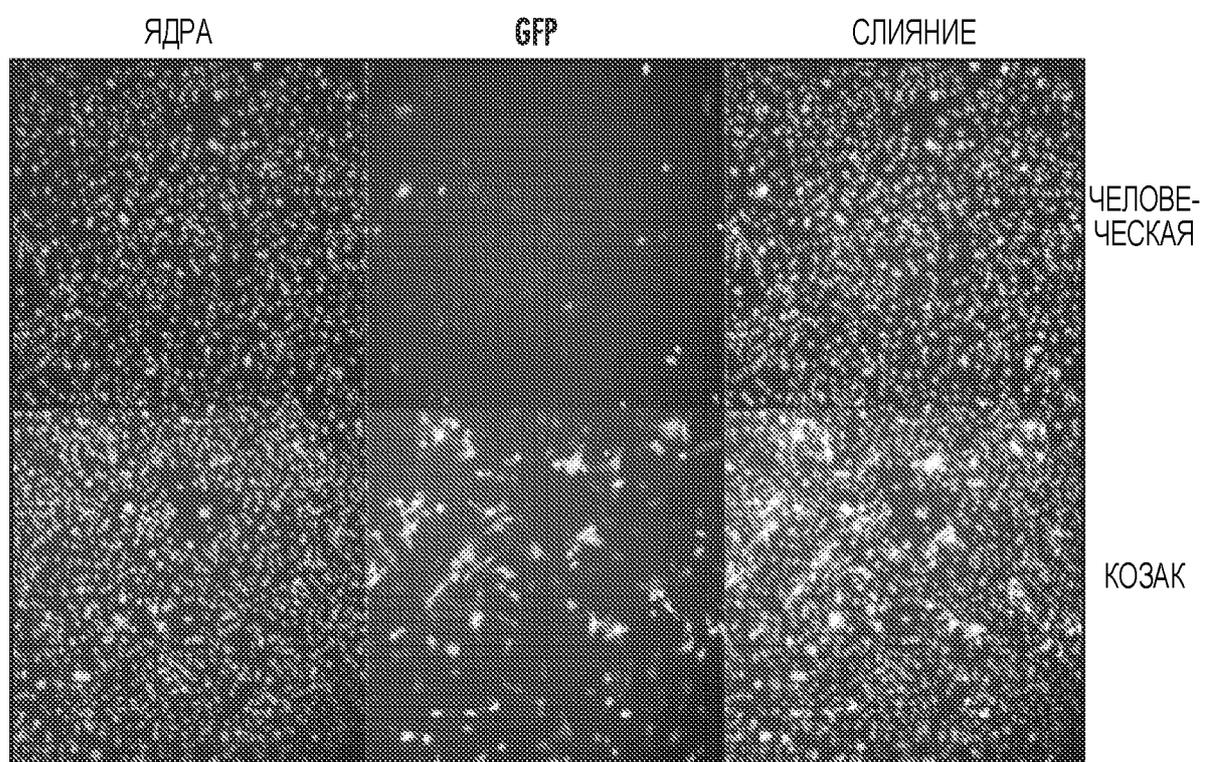
ФИГ. 12



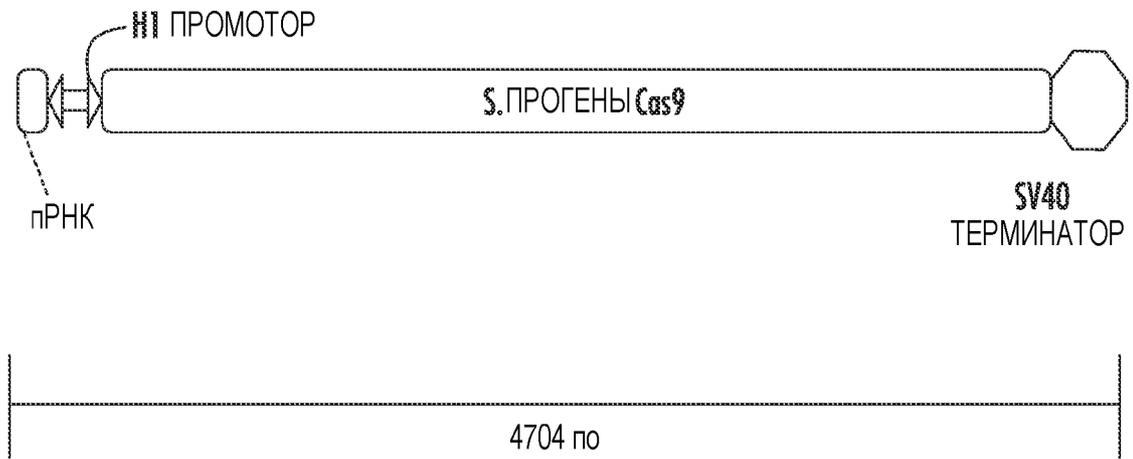
ФИГ. 13



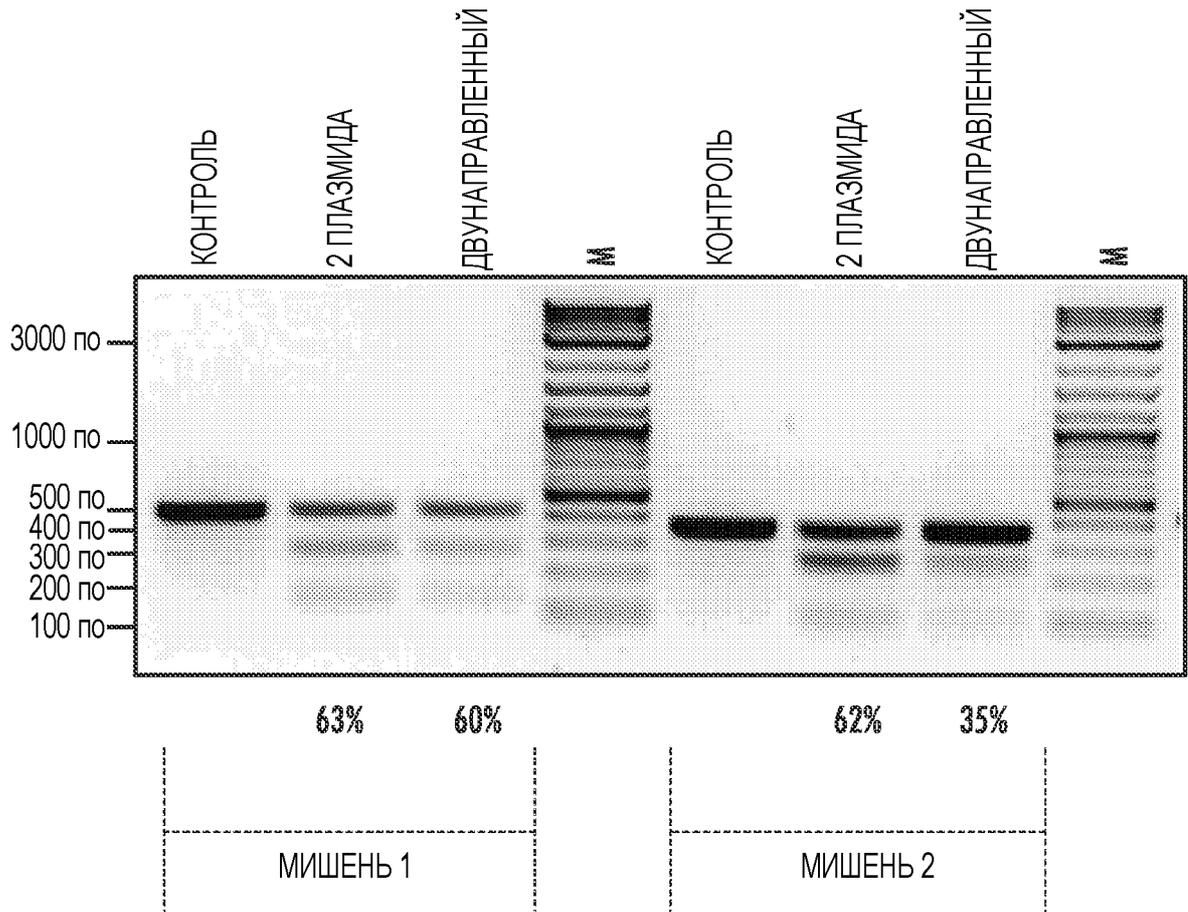
ФИГ. 14



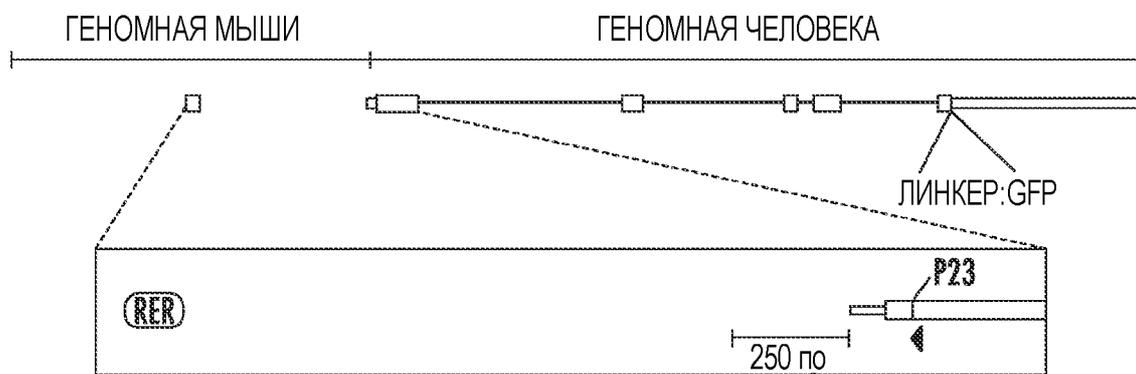
ФИГ. 15



ФИГ. 16А



ФИГ. 16В



ФИГ. 17

**WT (C57BL/6J)**

S P F E Q P Q Y Y

AGCCCTTTCGAGCAGCCGCAGTACTAC

T C G G G G C C T C T C G T C G G C G T C C T G A T G

пРНК

**P23H (CCC->CAC)**

S H F E Q P Q Y Y

AGCCACTTCGAGCAGCCGCAGTACTAC

T C G G T G C C T C T C G T C G G C G T C C T G A T G

пРНК

**WT (CAST/EIJ)**

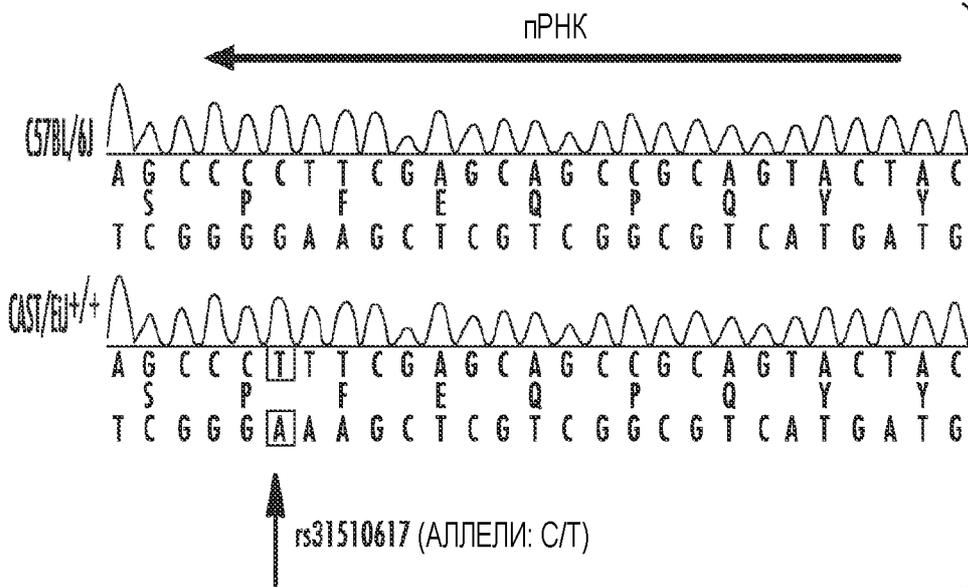
S P F E Q P Q Y Y

AGCCCTTTCGAGCAGCCGCAGTACTAC

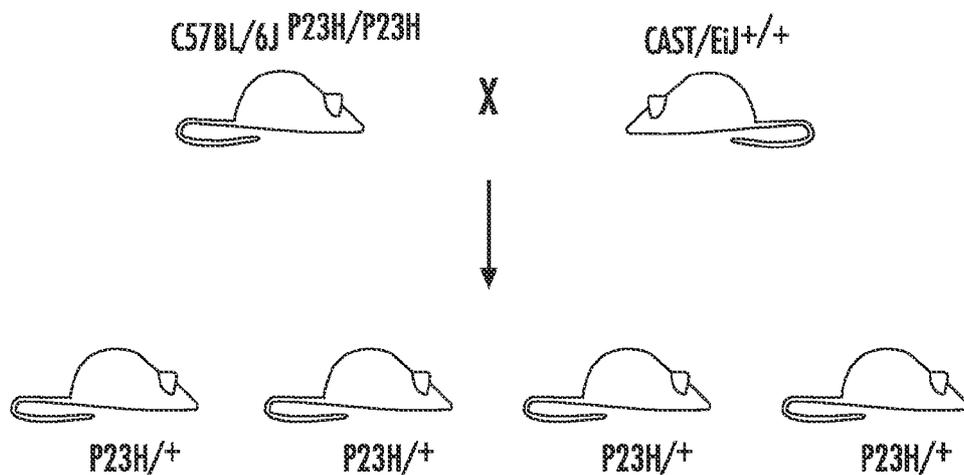
T C G G G A C C T C T C G T C G G C G T C C T G A T G

пРНК

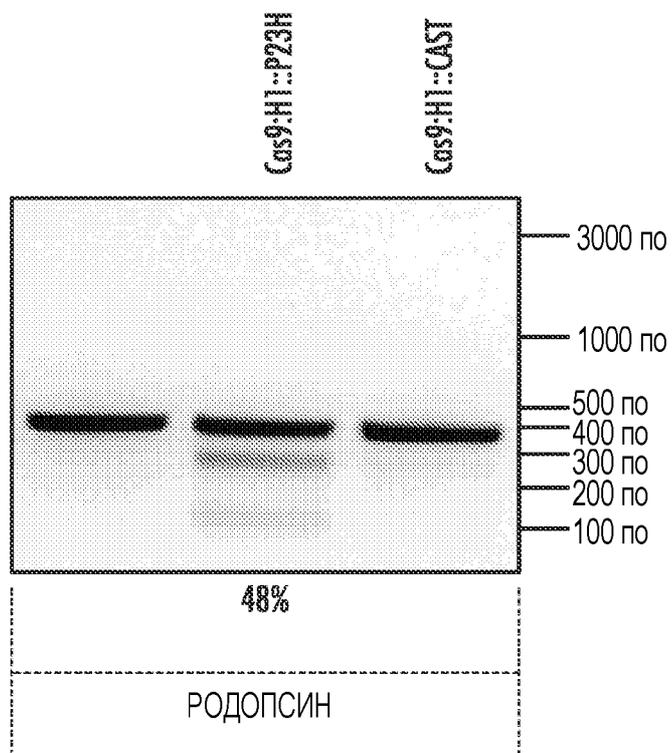
ФИГ. 18А



ФИГ. 18В



ФИГ. 18С



ФИГ. 19