



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.05.12

(21) Номер заявки
201791417

(22) Дата подачи заявки
2015.12.23

(51) Int. Cl. *C12N 15/113* (2010.01)
A61P 25/14 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01)

(54) СУПРЕССИЯ ГЕНА ГЕНТИНГИНА, ИНДУЦИРОВАННАЯ РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИЕЙ

(31) 14200308.6

(32) 2014.12.24

(33) EP

(43) 2017.12.29

(86) PCT/EP2015/081157

(87) WO 2016/102664 2016.06.30

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЮНИКЕР АйПи Б.В. (NL)

(72) Изобретатель:
**Константинова Павлина Стефанова,
Миниарикова Яна (NL)**

(74) Представитель:
**Осипов К.В., Ильмер Е.Г., Пантелеев
А.С., Хмара М.В., Дошечкина В.В.,
Новоселова С.В., Липатова И.И. (RU)**

(56) RODRIGUEZ-LEBRON ET AL.: "Intrastratial rAAV-mediated delivery of anti-huntingtin shRNAs induces partial reversal of disease progression in R6/1 Huntington's disease transgenic mice", MOLECULAR THERAPY, NATURE PUBLISHING GROUP, GB, vol. 12, no. 4, 12 July 2005 (2005-07-12), pages 618-633, XP005078441, ISSN: 1525-0016, DOI: 10.1016/J.YMTHE.2005.05.006 the whole document

NICHOLAS R. FRANICH ET AL.: "AAV Vector-mediated RNAi of Mutant Huntingtin Expression Is Neuroprotective in a Novel Genetic Rat Model of Huntington's Disease", MOLECULAR

THERAPY, vol. 16, no. 5, 25 March 2008 (2008-03-25), pages 947-956, XP055192031, ISSN: 1525-0016, DOI: 10.1038/mt.2008.50 the whole document

US-A1-2008015158

WO-A2-2008134646

WO-A2-2008150897

WO-A2-2005105995

MCBRIDE JODI L. ET AL.: "Artificial miRNAs mitigate shRNA-mediated toxicity in the brain: Implications for the therapeutic development of RNAi", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, US, vol. 105, no. 15, 15 April 2008 (2008-04-15), pages 5868-5873, XP002513712, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.0801775105 the whole document

RYAN L. BOUDREAU ET AL.: "Nonallele-specific Silencing of Mutant and Wild-type Huntingtin Demonstrates Therapeutic Efficacy in Huntington's Disease Mice", MOLECULAR THERAPY, vol. 17, no. 6, 24 February 2009 (2009-02-24), pages 1053-1063, XP055192169, ISSN: 1525-0016, DOI: 10.1038/mt.2009.17 the whole document

JODI L. MCBRIDE ET AL.: "Preclinical Safety of RNAi-Mediated HTT Suppression in the Rhesus Macaque as a Potential Therapy for Huntington's Disease", MOLECULAR THERAPY, vol. 19, no. 12, 25 December 2011 (2011-12-25), pages 2152-2162, XP055192172, ISSN: 1525-0016, DOI: 10.1038/mt.2011.219 cited in the application the whole document

WO-A2-2011133889

(57) Изобретение обеспечивает двухцепочечную РНК, содержащую первую последовательность РНК и вторую последовательность РНК, в которой первая и вторая последовательности РНК являются, по существу, комплементарными, причем первая последовательность РНК имеет длину последовательности, равную по меньшей мере 19 нуклеотидам, и является, по существу, комплементарной последовательности SEQ ID NO: 1. Двухцепочечная РНК предназначена для применения в индукции РНК-интерференции против последовательностей экзона 1 гена белка гентингина. Двухцепочечная РНК по настоящему изобретению была способна снижать гибель нейрональных клеток и образование агрегатов белка гентингина в экспериментальной модели на животных.

Предшествующий уровень техники

Ген гентингтина, который также обозначают как ген НТТ или HD ген (HD; от англ.: Huntington's disease - болезнь Гентингтона), кодирует белок гентингтин. Ген гентингтина - это большой ген, содержащий примерно 13,5 тысяч пар оснований (kb; от англ.: kilobase) (масса белка гентингтина равна примерно 350 кДа). Болезнь Гентингтона - это генетическое нейродегенеративное заболевание, вызываемое генетической мутацией в гене белка гентингтина. Генетическая мутация затрагивает сегмент ДНК гена гентингтина, известный как трехнуклеотидный CAG-повтор. В норме CAG-сегмент в гене гентингтина человека повторяется несколько раз, а именно примерно от 10 до 35 раз. Люди, у которых развивается болезнь Гентингтона, имеют экспансию числа CAG-повторов по меньшей мере в одной аллели. Пораженный человек обычно наследует мутированную аллель от пораженного родителя. В редких случаях человек с болезнью Гентингтона не имеет родителя, страдающего нарушением (спорадическая HD). У людей с числом CAG-повторов, лежащим в диапазоне от 36 до 39, могут развиваться признаки и симптомы болезни Гентингтона, тогда как у людей с 40 и более повторами почти всегда развивается заболевание. Увеличение размера CAG-повтора приводит к продукции удлиненного (мутированного) белка гентингтина. Этот белок подвергается в клетке процессингу с образованием более мелких фрагментов, которые являются цитотоксическими и которые накапливаются и агрегируют в нейронах. Это приводит к нарушению нормальной функции и к последующей гибели нейронов. Это процесс, который происходит в мозге и который лежит в основе признаков и симптомов болезни Гентингтона.

РНК-интерференция (RNAi; от англ.: RNA interference) - это естественный механизм, который включает последовательность-специфическую даун-регуляцию мРНК. Даун-регуляция мРНК приводит к снижению количества экспрессируемого белка. РНК-интерференция запускается двухцепочечной РНК. Одна из цепей двухцепочечной РНК по существу или полностью комплементарна своей мишени - мРНК. Эту цепь называют направляющей цепью. Механизм РНК-интерференции включает включение направляющей цепи в РНК-индуцируемый сайленсинг-комплекс (RISC; от англ.: RNA-induced silencing complex). Этот комплекс является многооборотным комплексом, который через комплементарные пары оснований связывается с мРНК-мишенью. Связавшись со своей мРНК-мишенью, он может либо расщепить мРНК, либо снизить эффективность ее трансляции. После того как была открыта РНК-интерференция, ее широко использовали для нокдауна специфических генов-мишеней. Триггеры, которые использовали для индукции РНК-интерференции, включали использование малых интерферирующих РНК (siRNA; от англ.: small interfering RNA) или коротких шпилечных РНК (shRNA; от англ.: short hairpin RNA). Кроме того, молекулы, которые могут естественным образом запускать РНК-интерференцию, так называемые микроРНК (miRNA; от англ.: microRNA), использовали для получения искусственных микроРНК, которые имитировали свои естественно существующие аналоги. Общим у этих стратегий было то, что они обеспечивали, по существу, двухцепочечные молекулы РНК, которые были сконструированы так, что мишенью для них был ген выбора. Разрабатываются терапевтические подходы, основанные на РНК-интерференции, в которых используют последовательность-специфическую модальность РНК-интерференции, и некоторые из них в настоящее время находятся в стадии клинических исследований (см., например, Davidson and McCray, Nature Reviews - Genetics, 2011; Vol. 12; 329-340).

Поскольку болезнь Гентингтона включает экспрессию мутантного белка гентингтина, накопление которого приводит к болезни, РНК-интерференция обеспечивает возможность лечения болезни, поскольку она может снизить экспрессию гена гентингтина. Парадигма, лежащая в основе этого подхода, включает уменьшение количества мутантного Htt-белка с целью снижения за счет этого токсических эффектов, вызываемых мутантным Htt-белком, для достижения облегчения и/или задержки симптомов болезни Гентингтона или даже для полного предотвращения возникновения симптомов болезни Гентингтона. Возможность целенаправленной супрессии гена гентингтина предполагали на предшествующем уровне техники, в том числе был составлен перечень примерно двух тысяч гипотетических целевых последовательностей siРНК (WO 2005105995). Стратегии для снижения экспрессии гена гентингтина известны в данной области техники и включают специфический таргетинг мутантных генов гентингтина (например, US 20090186410, US 20110172291). Альтернативно, РНК-интерференцию использовали также для таргетинга как мутантных, так и немутантных генов (например, Rodriguez-Lebron et al., 2005, Mol Ther, Vol. 12, № 4: 618-633; Franich et al., 2008, Mol Ther, Vol. 16, № 5: 947-956; Drouet et al., 2009, Annals of Neurology; Vol. 65, № 3: 276-285 и McBride et al. Mol Ther, 2011 Dec; 19(12):2152-62; US 20080015158, WO 2008134646). В последнем случае было показано, что нокдаун белка гентингтина дикого типа не оказывал явных отрицательных эффектов.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение обеспечивает двухцепочечную РНК, содержащую первую последовательность РНК и вторую последовательность РНК, в которой первая и вторая последовательности РНК являются, по существу, комплементарными, причем первая последовательность РНК имеет длину последовательности, равную по меньшей мере 19 нуклеотидам и является, по существу, комплементарной последовательности SEQ ID NO: 1. Большое число последовательностей-мишеней испытали на эффективный нокдаун гена гентингтина. Было обнаружено, что выбранная двухцепочечная РНК по настоящему

изобретению эффективно снижала экспрессию гена гентингина. Двухцепочечная РНК при введении в клетку, либо прямо посредством трансфекции, либо непрямо посредством доставки ДНК (например, посредством трансфекции) или посредством вектор-опосредованной экспрессии, при которой может экспрессироваться двухцепочечная РНК, способна снижать экспрессию как мутантного гена гентингина, так и нормального гена гентингина. Кроме того, было показано, что двухцепочечная РНК по настоящему изобретению была способна снижать экспрессию гена-мишени при ее представлении либо в форме siРНК, либо в микроРНК каркасе. При испытании на животной модели было показано, что двухцепочечная РНК по настоящему изобретению была способна снижать гибель нейрональных клеток и количество агрегатов гентингина. Двухцепочечная РНК по настоящему изобретению по сравнению с двухцепочечными РНК, известными в данной области техники, обеспечивает усовершенствование направленного воздействия (таргетинг - от англ. targeting) на ген гентингина или обеспечивает, по меньшей мере, альтернативу известным двухцепочечным РНК.

Двухцепочечная РНК по настоящему изобретению может быть получена в форме siРНК, shРНК, пре-микроРНК (англ. pre-miRNA) или прай-микроРНК (pri-miRNA). Такие двухцепочечные РНК можно доставить в клетки-мишени прямо, например, через захват клетками, с использованием, например, способов трансфекции. Предпочтительно доставку обеспечивают с использованием геннотерапевтического вектора, причем кассету экспрессии для siРНК, shРНК, пре-микроРНК или прай-микроРНК включают в вектор. Таким образом клетки можно обеспечить постоянным поступлением двухцепочечной РНК для достижения длительной супрессии гена гентингина без необходимости повторного введения. Предпочтительно вирусным вектором выбора является AAV5 (вектор на основе аденоассоциированного вируса серотипа 5, от англ. - adeno-associated virus). Соответственно настоящее изобретение также обеспечивает медицинское применение двухцепочечной РНК по настоящему изобретению, например для лечения болезни Гентингина, причем такое медицинское применение может также включать кассету экспрессии или вирусный вектор, например AAV5, способный экспрессировать двухцепочечную РНК по настоящему изобретению.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1. Ген гентингина (НГТ) человека и последовательности-мишени. (А) Схематическое изображение гена НГТ человека (L27350.1) с CAG-экспансиями (черные) и последовательностями-мишенями для miN1-N21 (светло-серые). (В) Последовательность экзона 1 РНК гена НГТ (SEQ ID NO: 2). Последовательность CAG-повторов образована нуклеотидами с 367 по 429. (С) Схематическое изображение исследованных последовательностей-мишеней экзона 1 (Н1, 185-205; Н2, 186-206; Н3, 189-209; Н4, 191-211; Н5, 194-214; Н6, 196-216; Н7, 250-270; Н8, 261-281; Н9, 310-330; Н10, 311-331; Н11, 339-359; Н12, 345-365; Н13, 454-474; Н14, 459-479; Н15, 477-497; Н16, 486-506; Н17, 492-512; Н18, 498-518; Н19, 549-569; Н20, 557-577; Н21, 558-578; последовательности Н1-Н21 соответствуют SEQ ID NO: 23-43) Изображенные последовательности являются ДНК-последовательностями. Номера относятся к соответствующим последовательностям нуклеотидов РНК в SEQ ID NO: 2. Соответствующие последовательности-мишени РНК из SEQ ID NO: 2 имеют последовательности, указанные в пункте (С), за исключением того, что если ДНК кодирует "Т", то РНК кодирует "У".

Фиг. 2. Примеры двухцепочечных РНК и кассет экспрессии. (А) Показаны примеры прай/пре-микроРНК каркасов для miN12 pre-miN12-155 (SEQ ID NO: 44) и pre-miP12-451 каркаса (SEQ ID NO: 45) с направляющей последовательностью miN12 (серый цвет). (В) Схематическое изображение двухцепочечных РНК по настоящему изобретению и того, как они могут обработаны посредством механизма РНК-интерференции. Двухцепочечная РНК может быть короткой шпилечной РНК (1) или удлиненной siРНК (2). Шпилечная РНК или удлиненная siРНК содержат первую РНК-последовательность на проксимальном конце, как показано на фигуре (обозначено цифрой 1 и скобками). Короткая шпилечная РНК или удлиненная siРНК могут быть обработаны в клетке по механизму РНК-интерференции с образованием siРНК (3), которая также может быть двухцепочечной РНК по настоящему изобретению, у которой одна цепь, содержащая первую РНК-последовательность, может быть включена в RISC-комплекс (4). Двухцепочечная РНК может быть включена в прай-микроРНК последовательность (5) или пре-микроРНК последовательность (6). Прай-микроРНК может быть обработана по механизму РНК-интерференции с получением пре-микроРНК и затем зрелого микро-РНК дуплекса (7), одна из цепей которого, содержащая первую последовательность РНК, может быть включена в комплекс RISC (4). Положение первой последовательности РНК в пре-микроРНК, прай-микроРНК и микроРНК дуплексе обозначено цифрой 1 и скобками. (С) Последовательность ДНК кассеты экспрессии pVD-CMV-miN12-155 (CMV промотор (промотор цитомегаловируса, CMV - от англ. - cytomegalo virus) (1-588), интрон, последовательность Зеленого Флуоресцентного Белка (GFP-последовательность; от англ.: Green Fluorescent Protein) (713-1432), 5'-фланкирующая последовательность прай-микроРНК (1433-1514), 5' пре-микроРНК, направляющая цепь (первая последовательность РНК) (1520-1540), последовательность петли, "сопровождающая" цепь (вторая последовательность РНК) (1560-1578), 3' пре-микроРНК, 3' прай-микроРНК фланкирующая последовательность (1584-1704), сигнальная последовательность HSV ТКполиА (1705-1976); (D) последовательность ДНК pVD-CAG-miN 12-451 (CAG промотор (43-1715)), 5' пре-микроРНК, направляющая цепь (первая последовательность РНК) (2034-2054), вторая последователь-

ность РНК и 3' пре-микроРНК, 3' прай-микроРНК фланкирующая последовательность (2090-2320), hGH полиА сигнальная последовательность (2321-2417) и (Е) последовательность ДНК кассеты экспрессии pVD-PGK-miH 12-451 (PGK промотор (промотор фосфоглицераткиназы, PGK - от англ. - phosphoglycerate kinase) (23-277), 5' прай-микроРНК фланкирующая последовательность (278-794), 5' пре-микроРНК, направляющая цепь (первая последовательность РНК) (811-831), вторая последовательность РНК и 3' пре-микроРНК, 3' прай-микроРНК фланкирующая последовательность (867-1097), hGH полиА сигнальная последовательность (1098-1194). (F) pri-miH12-155 последовательность, которая кодируется pVD-CMV-miH12-155. (G) pri-miH 12-451 последовательность, которая кодируется pVD-PGK-miH 12-451. На фигурах (Е), (F) и (G) тип шрифта является таким же, как использованный выше для соответствующей ДНК. Промоторные последовательности обозначены жирным шрифтом, последовательность Зеленого Флуоресцентного Белка - курсивом с подчеркиванием (только С), последовательности прай-микроРНК набраны шрифтом нормального типа, направляющая цепь (первая последовательность РНК) - жирным курсивом и "сопровождающая" цепь, или вторая последовательность РНК, - курсивом, последовательности пре-микроРНК подчеркнуты, и полиА сигнальная последовательность обозначена жирным шрифтом с подчеркиванием.

Фиг. 3. Эффективность нокдауна *in vitro* miH1-21. (А) Общий нокдаун НТТ посредством таргетинга экзона 1. LucНТТ был сотрансфицирован в клетки Hek293T совместно с miH1-miH21. Флуоресценцию люциферазы Renilla и светлячка измерили через 48 ч после трансфекции. miScr (контроль) использовали в качестве негативного контроля и приняли за 100%. miH12 показала наиболее сильную эффективность нокдауна. (В) Нокдаун LucНТТ осуществили с использованием синтетической siH12 длиной от 19 до 23 нуклеотидов.

Фиг. 4. Эффективность нокдауна *in vitro* miH12-451 с различными промоторами. (А) Репортерный ген LucНТТ сотрансфицировали с CaG-miH12 или PGK-miH12 вариантами и определили их эффективность, как описано выше для фиг. 3. (В) Активность "сопровождающей" (*) цепи miH12-451*, экспрессированной из CaG или PGK промоторов, измерили на специфических LucНТТ* репортерных генах. Не обнаружили активности "сопровождающей" цепи.

Фиг. 5. Эффективность *in vivo* miH12, доставленной AAV5. (А) Схема эксперимента. Мышей соинъектировали AAV5-Luc73QНТТ и AAV5-CMV-miScr-155 или AAV5-CMV-miH12-155 в соотношении 1:5. Моменты измерения обозначены стрелками; (В) Нокдаун AAV5-Luc73QНТТ у животных через 6 недель после инъекции измерили с использованием системы MS; (С) Тренд нокдауна AAV5-Luc73QНТТ посредством AAV5-miH12 в течение 6 недель после инъекции.

Фиг. 6. Проверка идеи нокдауна НТТ человека на механистической модели HD у крыс. (А) Схема эксперимента. (В) Гистология головного мозга, демонстрирующая меньшую нейродегенерацию (DARPP32) и меньшее количество агрегатов мутантного Htt (EM48) в группе, получавшей AAV5-CMV-miH12-155. (С) Гистология головного мозга с GFP. (D) Гистология головного мозга с маркером активации иммунной системы Iba 1.

Фиг. 7. Нокдаун НТТ человека в модели HD на мышши с гуманизированным Hu97/18. (А) Эффективность трансдукции в головном мозге мышши после медленной интрастриатальной инъекции, интрастриатальной инъекции с диффузией, усиленной конвекцией (CED; от англ.: convection enhanced diffusion) или интрацеребральной вентрикулярной (ICV; от англ.: intracerebral ventricular) инъекции AAV5-CMV-miH12-155. Флуоресценция GFP была выявлена через 5 недель после инъекции. (В) Измерение посредством вестерн-блоттинга нокдауна НТТ человека в мозге мышши после доставки AAV5-miНТТ. (С) Количественное определение НТТ посредством вестерн-блоттинга.

Фиг. 8. Сравнение выбранной мишени для H12 с последовательностями-мишенями согласно предшествующему уровню техники. LucНТТ сотрансфицировали в клетки Hek293T с указанными siРНК (А) и микроРНК конструкциями (В и С). Флуоресценцию люциферазы Renilla и светлячка измерили через 48 ч после трансфекции. miH12 и siH12 показали наиболее высокую эффективность нокдауна.

Сведения, подтверждающие возможность осуществления изобретения

Настоящее изобретение обеспечивает двухцепочечную РНК, содержащую первую последовательность РНК и вторую последовательность РНК, в которой первая и вторая последовательности РНК являются, по существу, комплементарными, причем первая последовательность РНК имеет длину последовательности, равную по меньшей мере 19 нуклеотидам, и является, по существу, комплементарной последовательности SEQ ID NO: 1.

SEQ ID NO: 1 (5'-CUUCGAGUCCCUCAAGUCCUU-3') соответствует последовательности-мишени экзона 1 гена гентингина (SEQ ID NO: 2). Экзон 1, как показано на фиг. 1В, содержит 21 повтор CAG-последовательностей от нуклеотида 367 до нуклеотида 429. Последовательность экзона 1, изображенная на фиг. 1В, соответствует нормальному гену гентингина, который не связан с болезнью.

Соответствующие мутантные гены гентингина, связанные с болезнью Гентингтона, содержат последовательности, содержащие значительно более 21 CAG-повтора. Как указано выше, при числе повторов от 36 до 39 могут развиваться признаки и симптомы болезни Гентингтона, тогда как при 40 или более повторах почти всегда развивается болезнь. Последовательность-мишень SEQ ID NO: 1 содержится, по существу, во всех последовательностях экзона 1 независимо от числа CAG-повторов.

SEQ ID NO: 1 соответствует нуклеотидам с номерами с 345 по 365 последовательности SEQ ID NO: 2. 18 различных последовательностей-мишеней в экзоне 1 исследовали на таргетинг с использованием двухцепочечных РНК, которые были сконструированы с целью индукции последовательность-специфического ингибирования SEQ ID NO: 2 (см. фиг. 1 и 3А), и было обнаружено, что, в частности, таргетинг этой последовательности из экзона 1 можно было использовать для снижения экспрессии гена гентингина. Кроме того, было обнаружено, что siРНК различной длины, то есть состоящие из 19, 20, 21, 22 и 23 последовательных пар оснований с двухнуклеотидными оверхенгами, были эффективными против этой последовательности, как и два отдельных микроРНК каркаса, несущих последовательность из 21 нуклеотида, комплементарную SEQ ID NO: 1, в положении направляющей последовательности (см. фиг. 3А, 3В и 4). Соответственно первая последовательность РНК, которая, по существу, комплементарна последовательности-мишени SEQ ID NO: 1 гентингина, имеет длину последовательности, равную по меньшей мере 19 нуклеотидам.

Первая последовательность РНК по настоящему изобретению включена в направляющую цепь двухцепочечной РНК, которую также называют антисмысловой цепью, поскольку она комплементарна ("анти") смысловой последовательности-мишени. Вторая последовательность РНК включена в "сопровождающую" цепь, также называемую "смысловой цепью", поскольку она может обладать значительной идентичностью последовательности-мишени или быть идентичной последовательности-мишени. Первая и вторая последовательности РНК включены в двухцепочечную РНК и являются, по существу, комплементарными. Двухцепочечная РНК по настоящему изобретению предназначена для индукции РНК-интерференции, за счет которой снижается экспрессия мутантного гена гентингина и гена гентингина дикого типа. Тем не менее, следует понимать, что термин "по существу, комплементарные" означает, что нет необходимости в том, чтобы все нуклеотиды первой и второй последовательностей РНК были парными, то есть полностью комплементарными, или чтобы все нуклеотиды первой последовательности РНК и SEQ ID NO: 1 были парными. Если двухцепочечная РНК способна индуцировать РНК-интерференцию за счет последовательности, которая специфически нацелена на последовательность, содержащую SEQ ID NO: 1, то такая, по существу, комплементарность является предметом настоящего изобретения.

Соответственно в одном из вариантов осуществления двухцепочечная РНК по настоящему изобретению, содержащая первую последовательность РНК и вторую последовательность РНК, в которой первая и вторая последовательности РНК являются, по существу, комплементарными, причем первая последовательность РНК имеет длину последовательности, равную по меньшей мере 19 нуклеотидам, и является, по существу, комплементарной последовательности SEQ ID NO: 1, способна индуцировать РНК-интерференцию с последовательностью, специфически снижающей экспрессию РНК-транскрипта, содержащего SEQ ID NO: 1. В другом варианте осуществления настоящего изобретения индукция РНК-интерференции для снижения экспрессии РНК-транскрипта, содержащего SEQ ID NO: 1, означает, что она снижает экспрессию гена гентингина человека.

Можно легко определить, происходит ли это, с использованием стандартных анализов с репортерным геном люциферазы и соответствующих контролей, которые описаны в примерах и известны в данной области техники (Zhuang et al., 2006, *Methods Mol Biol*, 2006; 342:181-7). Например, можно использовать репортерный ген люциферазы, содержащий SEQ ID NO: 1, чтобы показать, что двухцепочечная РНК по настоящему изобретению способна осуществлять последовательность-специфический нокдаун. Кроме того, как показано в разделе с примерами осуществления настоящего изобретения, экспрессию гентингина можно определить с использованием специфических антител для определения уровня экспрессии посредством вестерн-блоттинга или нозерн-блоттинга, определяющего количество РНК-транскрипта.

Соответственно двухцепочечная РНК по настоящему изобретению предназначена для индукции РНК-интерференции. Двухцепочечная РНК по настоящему изобретению предназначена для снижения экспрессии транскриптов, содержащих SEQ ID NO: 1, например SEQ ID NO: 2 или сходных с различным числом CAG-повторов.

Как указано выше, двухцепочечная РНК способна индуцировать РНК-интерференцию. В данной области техники хорошо известны двухцепочечные структуры РНК, способные индуцировать РНК-интерференцию. Например, малая интерферирующая РНК (siРНК) содержит две отдельные РНК-цепи, причем одна цепь содержит первую последовательность РНК, а другая цепь содержит вторую последовательность РНК. Часто используемая конструкция siРНК содержит 19 последовательных пар оснований с 3' двухнуклеотидными оверхенгами (см. фиг. 2). Эта конструкция основана на наблюдаемом Dicer-процессинге более крупных двухцепочечных РНК, который приводит к образованию siРНК, обладающих такими свойствами. 3'-оверхенг может быть включен в первую последовательность РНК. 3'-оверхенг может быть дополнением к первой последовательности РНК. Длина двух цепей, из которых состоит siРНК, может быть равна 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 или 27 нуклеотидам или более. Каждая из двух цепей содержит первую и вторую последовательности РНК. Цепь, содержащая первую последовательность РНК, также может состоять из нее. Цепь, содержащая первую последовательность РНК, также может состоять из первой последовательности РНК и последовательности оверхенга.

siРНК могут также служить субстратами для фермента Dicer. Например, субстрат для фермента Dicer может быть 27-мером, состоящим из двух цепей РНК, которые содержат 27 последовательных пар оснований. Первая последовательность РНК расположена на 3'-конце 27-мерного дуплекса. На 3'-конце, как и в случае siРНК, находится двухнуклеотидный оверхенг. 3'-оверхенг может быть включен в первую последовательность РНК. 3'-оверхенг может быть дополнением к первой последовательности РНК. С 5'-стороны относительно первой последовательности РНК могут быть включены дополнительные последовательности, которые либо комплементарны последовательности-мишени, соседней с SEQ ID NO: 1, либо нет. Другой конец siРНК, являющейся субстратом для фермента Dicer, является тупым концом. Эта конструкция субстрата для фермента Dicer приводит к предпочтительному процессингу ферментом Dicer, так что образуется siРНК, сходная с конструкцией siРНК, описанной выше, которая содержит 19 последовательных пар оснований и двухнуклеотидные оверхенги на обоих 3'-концах. В любом случае siРНК или сходные структуры состоят из двух отдельных цепей РНК (Fire et al., 1988, Nature 1998 Feb., 19; 391(6669):806-11), причем каждая РНК-цепь содержит или состоит из первой и второй последовательностей РНК по настоящему изобретению.

Двухцепочечная РНК по настоящему изобретению не требует, чтобы первая и вторая последовательности РНК были включены в две отдельные цепи. Первая и вторая последовательности РНК также могут быть включены в одну цепь РНК, например в shРНК. shРНК может содержать, начиная с 5'-конца, вторую последовательности РНК - последовательность петли - первую последовательности РНК - необязательную 2-нуклеотидную оверхенг-последовательность - 3'. Альтернативно, shРНК может содержать, начиная с 5'-конца, первую последовательности РНК - последовательность петли - вторую последовательности РНК - необязательную 2-нуклеотидную оверхенг-последовательность - 3'. Такая молекула РНК образует внутримолекулярные пары оснований за счет, по существу, комплементарных первой и второй последовательностей РНК. Подходящие петлевые последовательности хорошо известны в данной области техники (среди прочего, приведенные в публикациях Dallas et al. 2012, Nucleic Acid Res. 2012 Oct; 40(18):9255-71 и Schopman et al., Antiviral Res. 2010 May; 86(2):204-11).

Петлевая последовательность также может быть последовательностью типа "стебель-петля", в которой двухцепочечная область shРНК удлинена. Без привязки к конкретной теории полагают, что, как и siРНК, являющаяся субстратом для фермента Dicer, shРНК обычно подвергается процессингу ферментом Dicer с образованием, например, siРНК, имеющей строение siРНК, описанное выше, например содержащую 19 последовательных пар оснований и 2-нуклеотидные оверхенги на обоих 3'-концах. В случае, когда двухцепочечная РНК должна подвергаться процессингу ферментом Dicer, она предпочтительно содержит первую и вторую последовательности РНК на конце.

Двухцепочечная РНК по настоящему изобретению также может быть включена в пре-микроРНК или прай-микроРНК каркас. МикроРНК, то есть микроРНК, являются направляющими цепями, которые происходят от двухцепочечных молекул РНК, экспрессируемых, например, в клетках млекопитающих. микроРНК образуется из молекулы-предшественника пре-микроРНК в ходе процессинга, сходного с процессингом shРНК или удлиненной siРНК, описанным выше, по механизму РНК-интерференции и включаются в активированный РНК-индуцируемый сайленсинг-комплекс (RISC) (Tijsterman M., Plasterk R.H. Dicers at RISC; mechanism of RNAi. Cell. 2004 Apr 2; 117(1):1-3). Без привязки к конкретной теории полагают, что пре-микроРНК является молекулой-шпилькой, которая может быть частью более крупной молекулы РНК (прай-микроРНК), например, содержаться в интроне, который первым подвергается процессингу ферментом Drosha с образованием молекулы-шпильки пре-микроРНК. Молекула пре-микроРНК является shРНК-подобной молекулой, которая может впоследствии подвергаться процессингу ферментом Dicer с образованием siРНК-подобного двухцепочечного дуплекса. микроРНК, то есть направляющая цепь, которая является частью двухцепочечного РНК-дуплекса, впоследствии включается в RISC. Молекулу РНК, существующую в природе, то есть прай-микроРНК, пре-микроРНК или микроРНК дуплекс, можно использовать в качестве каркаса для получения искусственной микроРНК, которая специфически нацелена на ген выбора. На основании предсказанной структуры РНК, например предсказанной с использованием программного обеспечения Mfold, природную последовательность микроРНК, присутствующую в структуре РНК (то есть в дуплексе, пре-микроРНК или прай-микроРНК), и присутствующую в структуре последовательности РНК, ей комплементарную, удаляют и заменяют первой последовательности РНК и второй последовательности РНК по настоящему изобретению. Первая последовательности РНК и вторая последовательности РНК могут быть выбраны так, чтобы образующиеся РНК-структуры, то есть пре-микроРНК, прай-микроРНК и/или микроРНК дуплекс, напоминали соответствующие предсказанные оригинальные последовательности. пре-микроРНК, прай-микроРНК и микроРНК дуплексы (которые состоят из двух отдельных РНК-цепей, которые гибридизированы через комплементарные пары оснований), обнаруживаемые в природе, часто являются не полностью спаренными, то есть не все нуклеотиды, соответствующие первой и второй цепям, определенным выше, являются парными, и первая и вторая цепи часто имеют неодинаковую длину. Как использовать молекулы-предшественники микроРНК в качестве каркасов для выбранной целевой последовательности и, по существу, комплементарной первой последовательности РНК описано, например, в публикации Liu Y.P., Nucleic Acids Res. 2008 May; 36(9):2811-24.

В любом случае, как понятно из приведенного выше, двухцепочечная РНК, содержащая первую и вторую последовательности РНК, может содержать дополнительные нуклеотиды и/или последовательности нуклеотидов. Двухцепочечная РНК может быть включена в одинарную последовательность РНК или входить в состав двух отдельных цепей РНК. Без привязки к конкретной теории полагают, что какую бы структуру ни использовали для двухцепочечной РНК, она должна быть сконструирована так, чтобы антисмысловая последовательность, содержащая первую последовательность РНК по настоящему изобретению, могла быть подвергнута процессингу с использованием механизма РНК-интерференции, чтобы ее можно было включить в комплекс RISC для проявления ее действия. Последовательность, содержащая первую последовательность РНК по настоящему изобретению или состоящая из первой последовательности РНК по настоящему изобретению, способна к последовательность-специфическому нацеливанию на SEQ ID NO: 1. Соответственно, если двухцепочечная РНК способна индуцировать РНК-интерференцию, такая двухцепочечная РНК входит в объем настоящего изобретения. Соответственно в одном из вариантов осуществления настоящего изобретения двухцепочечная РНК по настоящему изобретению содержится в пре-микроРНК каркасе, прай-микроРНК каркасе, shРНК или siРНК.

В контексте настоящего изобретения термин "комплементарный" обозначает нуклеотиды последовательности нуклеиновой кислоты, которые могут связываться с другой последовательностью нуклеиновой кислоты водородными связями, то есть нуклеотиды, способные к спариванию. Рибонуклеотиды, строительные блоки РНК, состоят из мономеров (нуклеотидов), содержащих сахар, фосфат и основание, которое является либо пуриновым (гуанин, аденин), либо пиримидиновым (урацил, цитозин). Комплементарные РНК-цепи формируют двухцепочечную РНК. Двухцепочечная РНК может быть сформирована из двух отдельных комплементарных цепей РНК или две комплементарные цепи РНК могут содержаться в одной цепи РНК. В комплементарных цепях РНК нуклеотиды цитозин и гуанин (С и G), гуанин и урацил (G и U) и урацил и аденин (U и A) могут спариваться. Термин "по существу, комплементарность" означает, что не требуется, чтобы первая и вторая последовательности РНК были полностью комплементарными или чтобы первая последовательность РНК и SEQ ID NO: 1 были полностью комплементарными. Например, первый и второй нуклеотиды, изображенные на фиг. 2А, являются, по существу, комплементарными и не полностью комплементарными.

В варианте осуществления настоящего изобретения "по существу, комплементарность" между первой последовательностью РНК и SEQ ID NO: 1 означает отсутствие ошибок спаривания, одну ошибку спаривания или две ошибки спаривания нуклеотидов. Очевидно, что одна ошибка спаривания означает, что на всей длине первой последовательности РНК, которая содержит парные основания к последовательности SEQ ID NO: 1, только один нуклеотид не спаривается с SEQ ID NO: 1. Отсутствие ошибок спаривания означает, что все нуклеотиды являются парными к последовательности SEQ ID NO: 1, а наличие двух ошибок спаривания означает, что два нуклеотида не спариваются с последовательностью SEQ ID NO: 1. Первая последовательность РНК также может быть длиннее, чем 21 нуклеотид, при таком сценарии, по существу, комплементарность определяют по всей длине SEQ ID NO: 1. Это означает, что SEQ ID NO: 1 в данном варианте осуществления настоящего изобретения либо не содержит ошибок спаривания, либо содержит одну или две ошибки спаривания по всей длине при спаривании с первой последовательностью РНК. Например, как показано на фиг. 3D и в примерах, были испытаны siРНК, имеющие длину первой последовательности нуклеотидов, равную 22 и 23 нуклеотидам. Эти первые последовательности нуклеотидов не содержали ошибок спаривания и были полностью комплементарными SEQ ID NO: 1. Наличие небольшого числа ошибок спаривания между первой последовательностью нуклеотидов и SEQ ID NO: 1 может быть допустимым по настоящему изобретению, если двухцепочечная РНК по настоящему изобретению способна снижать экспрессию транскриптов, содержащих SEQ ID NO: 1, например репортерного гена люциферазы, или, например, транскрипта, содержащего SEQ ID NO: 1. В данном варианте осуществления настоящего изобретения, по существу, комплементарность между первой последовательностью РНК и SEQ ID NO: 1 состоит в отсутствии ошибок спаривания или в наличии одной или двух ошибок спаривания по всей длине либо первой последовательности РНК, либо SEQ ID NO: 1, в зависимости от того, какая из них короче.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения первая последовательность РНК и SEQ ID NO: 1 содержат по меньшей мере 15, 16, 17, 18 или 19 нуклеотидов, которые спариваются. Предпочтительно первая последовательность РНК и SEQ ID NO: 1 являются, по существу, комплементарными, эта комплементарность охватывает по меньшей мере 19 пар оснований. В другом варианте осуществления настоящего изобретения первая последовательность РНК содержит по меньшей мере 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14 последовательных нуклеотидов, которые спариваются с последовательными нуклеотидами SEQ ID NO: 1. В следующем варианте осуществления настоящего изобретения первая последовательность РНК содержит по меньшей мере 19 последовательных нуклеотидов, которые образуют пары с последовательными нуклеотидами SEQ ID NO: 1. В другом варианте осуществления настоящего изобретения первая последовательность РНК содержит по меньшей мере 19 последовательных нуклеотидов, которые спариваются с 19 последовательными нуклеотидами SEQ ID NO: 1. В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения первая последовательность РНК содержит по меньшей мере 17 нуклеотидов, которые спариваются с SEQ ID NO: 1, и содержит по меньшей мере 15 последовательных нук-

леотидов, которые спариваются с последовательными нуклеотидами SEQ ID NO: 1. Длина первой последовательности нуклеотидов равна не более чем 21, 22, 23, 24, 25, 26 или 27 нуклеотидам.

Как указано выше, ошибка спаривания по настоящему изобретению означает, что нуклеотид в первой последовательности РНК не спаривается с SEQ ID NO: 1. Нуклеотидами, которые не спариваются, являются А и С, С и U или А и G. Ошибка спаривания может также быть результатом делеции нуклеотида или вставки нуклеотида. Если ошибка спаривания является делецией в первой последовательности РНК, это означает, что нуклеотид SEQ ID NO: 1 не спаривается с первой последовательностью РНК при сопоставлении со всей длиной первой последовательности РНК. Нуклеотидами, которые могут спариваться, являются А-U, G-C и G-U. Пару оснований G-U также называют G-U неоднозначностью, или неоднозначной парой оснований. В варианте осуществления настоящего изобретения количество G-U спаренных оснований между первой последовательностью РНК и SEQ ID NO: 1 равно 0, 1 или 2. В варианте осуществления настоящего изобретения нет ошибок спаривания между первой последовательностью РНК и SEQ ID NO: 1, а спаренные основания G-U, или G-U пары, являются допустимыми. Предпочтительно спаренные основания G-U между первой последовательностью РНК и SEQ ID NO: 1 могут отсутствовать, или первая последовательность РНК и SEQ ID NO: 1 имеют лишь спаренные основания А-U или G-C. Предпочтительно отсутствуют спаренные основания G-U и ошибки спаривания между первой последовательностью РНК и SEQ ID NO: 1. Соответственно первая последовательность РНК двухцепочечной РНК по настоящему изобретению предпочтительно является полностью комплементарной SEQ ID NO: 1, эта комплементарность обеспечивается парами оснований G-C и А-U.

Может не требоваться полная комплементарность (то есть полное спаривание оснований (отсутствие ошибок спаривания) и отсутствие спаренных оснований G-U) между первой последовательностью нуклеотидов и SEQ ID NO: 1, если первая последовательность нуклеотидов все еще может обеспечивать достаточную супрессию экспрессии гена. Также отсутствие полной комплементарности может быть предусмотрено, например, для предотвращения или снижения нецелевой последовательность-специфической супрессии генов с сохранением последовательность-специфического ингибирования транскриптов, содержащих SEQ ID NO: 1. Тем не менее, может быть предпочтительным наличие полной комплементарности, поскольку это может привести к более сильному ингибированию. Без привязки к конкретной теории полагают, что наличие полной комплементарности между первой последовательностью РНК и SEQ ID NO: 1 может обеспечивать расщепление последовательности-мишени активированным комплексом RISC, содержащим эту первую последовательность РНК, тогда как наличие ошибок спаривания может обеспечивать только ингибирование трансляции, что приводит к менее сильному ингибированию.

В варианте осуществления настоящего изобретения первая последовательность РНК имеет длину, равную по меньшей мере 19 нуклеотидам, предпочтительно 20 нуклеотидам, более предпочтительно по меньшей мере 21 нуклеотиду. Длина последовательности также может быть равна по меньшей мере 22 нуклеотидам или по меньшей мере 23 нуклеотидам. Первая последовательность РНК по настоящему изобретению может быть выбрана из SEQ ID NO: 3-7.

Таблица 1
Первые последовательности РНК

SEQ ID NO:	Первая последовательность РНК	Длина
3	5'-AAGGACUUGAGGGACUCGA-3'	19
4	5'-AAGGACUUGAGGGACUCGAA-3'	20
5	5'-AAGGACUUGAGGGACUCGAAG-3'	21
6	5'-AAGGACUUGAGGGACUCGAAGG-3'	22
7	5'-AAGGACUUGAGGGACUCGAAGGC-3'	23

В табл. 1 показаны первые последовательности РНК, которые специфически ингибируют транскрипты, содержащие SEQ ID NO: 1, как описано в разделе с примерами осуществления настоящего изобретения.

В варианте осуществления настоящего изобретения первая последовательность нуклеотидов двухцепочечной РНК по настоящему изобретению является полностью комплементарной SEQ ID NO: 1. Это означает, что отсутствуют ошибки спаривания между первой последовательностью РНК и SEQ ID NO: 1 по всей длине либо первой последовательности РНК, либо SEQ ID NO: 1, в зависимости от того, какая из них короче. Предпочтительно первая последовательность нуклеотидов и SEQ ID NO: 1 являются полностью комплементарными и содержат только пары оснований G-C и А-U. Предпочтительно первая последовательность РНК выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3-7, которые полностью комплементарны SEQ ID NO: 1. Наиболее предпочтительно первая последовательность РНК является SEQ ID NO: 5. Если первая последовательность нуклеотидов содержит 21 нуклеотид или менее (SEQ ID NO: 3, 4 и 5), то все нуклеотиды первой последовательности нуклеотидов спариваются с SEQ ID NO: 1. Если первая последовательность нуклеотидов длиннее 21 нуклеотида (SEQ ID NO: 6 и 7), все нуклеотиды SEQ ID NO: 1 спариваются с первой последовательностью нуклеотидов. Дополнительные нуклеотиды, которые содержатся в первой последовательности РНК, не спариваются с SEQ ID NO: 1. Если первая последовательность нуклеотидов длиннее 21 нуклеотида и дополнительные нуклеотиды должны быть частью на-

правляющей цепи, то предпочтительно дополнительные нуклеотиды комплементарны фланкирующей последовательности SEQ ID NO: 1, если она содержится в SEQ ID NO: 2.

Что касается второй последовательности РНК, то вторая последовательность РНК, по существу, комплементарна первой последовательности РНК. Вторая последовательность РНК совместно с первой последовательностью РНК формирует двухцепочечную РНК. Как указано выше, это необходимо для формирования подходящего субстрата для механизма РНК-интерференции, так что направляющая последовательность, происходящая из первой последовательности РНК, включается в комплекс RISC для последовательность-специфического ингибирования экспрессии ее мишени, то есть экспрессии гена гентингина. Как указано выше, двухцепочечная РНК предпочтительно включена в пре-микроРНК каркас, прай-микроРНК каркас, shРНК или siРНК.

Последовательность нуклеотидов второй последовательности РНК имеет черты сходства с последовательностью-мишенью. Однако, по существу, комплементарность с первой последовательностью РНК может быть выбрана с меньшей, по существу, комплементарностью, по сравнению, по существу, с комплементарностью между первой последовательностью РНК и SEQ ID NO: 1. Соответственно вторая последовательность РНК может содержать 0, 1, 2, 3, 4 или более ошибок спаривания, 0, 1, 2, 3 или более G-U неоднозначных спариваний, и она может содержать вставки 0, 1, 2, 3, 4 нуклеотидов и/или делеции 0, 1, 2, 3, 4 нуклеотидов. Предпочтительно первая последовательность РНК и вторая последовательность РНК являются, по существу, комплементарными, эта комплементарность включает 0, 1, 2 или 3 пары G-U и/или эта комплементарность включает по меньшей мере 17 пар оснований.

Эти ошибки спаривания, неоднозначные пары G-U, вставки и делеции относятся к первой последовательности РНК, то есть к двухцепочечной области, образующейся между первой и второй последовательностями РНК. Если первая и вторая последовательности РНК могут, по существу, спариваться и способны индуцировать последовательность-специфическое ингибирование SEQ ID NO: 1, то такая, по существу, комплементарность допустима по настоящему изобретению. Также понятно, что, по существу, комплементарность между первой последовательностью РНК и второй последовательностью РНК может зависеть от конструкции выбора двухцепочечной РНК. Она может зависеть, например, от микроРНК каркаса, который выбран для включения в него двухцепочечной РНК.

Таблица 2

Вторые последовательности РНК

SEQ ID NO:	Вторая последовательность РНК	Длина
8	5'-UCGAGUCCCUCAAGUCCUU-3'	19
9	5'-UUCGAGUCCCUCAAGUCCUU-3'	20
10	5'-CUUCGAGUCCCUCAAGUCCUU-3'	21
11	5'-CCUUCGAGUCCCUCAAGUCCUU-3'	22
12	5'-GCCUUCGAGUCCCUCAAGUCCUU-3'	23
13	5'-CUUCGAGUCUCAAGUCCUU-3'	19
14	5'-ACGAGUCCCUCAAGUCCUC-3'	19

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения вторая последовательность РНК выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8-14. В табл. 2 приведены примеры вторых последовательностей РНК по настоящему изобретению. SEQ ID NO: 8, 9, 10, 11 и 12 полностью комплементарны SEQ ID NO: 1 по всей длине. SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 14 могут быть объединены с первой последовательностью нуклеотидов, соответствующей SEQ ID NO: 5, содержащей 21 нуклеотид, которая комплементарна SEQ ID NO: 1 по всей длине. SEQ ID NO: 13 комплементарна SEQ ID NO: 5, содержащей двухнуклеотидную делецию (что приводит к тому, что соответствующие 2 нуклеотида SEQ ID NO: 5 не спарены), и 19 нуклеотидов которой спарены. SEQ ID NO: 14 комплементарна SEQ ID NO: 5, содержащей двухнуклеотидную делецию, две ошибки спаривания и 17 спаренных нуклеотидов. Комплементарность также можно видеть на фиг. 2B, поскольку комбинация SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 13 содержится в miH12-155, а комбинация SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 14 содержится в miH12-451a. Соответственно из изложенного выше очевидно, что вторая последовательность РНК не требует комплементарности с первой последовательностью РНК и может содержать делеции, вставки и мутации, которые приводят к ошибкам спаривания, по сравнению с SEQ ID NO: 1.

Как очевидно из вышеизложенного, по существу, комплементарность между первой последовательностью РНК и второй последовательностью РНК может включать ошибки спаривания, делеции и/или вставки относительно полной комплементарности первой и второй последовательностями РНК (то есть полного спаривания оснований). В варианте осуществления настоящего изобретения первая и вторая последовательности РНК содержат по меньшей мере 11 последовательных спаренных оснований. Соответственно по меньшей мере 11 последовательных нуклеотидов первой последовательности РНК и по меньшей мере 11 последовательных нуклеотидов второй последовательности РНК являются полностью комплементарными. В другом варианте осуществления настоящего изобретения первая и вторая последовательности РНК содержат по меньшей мере 15 спаренных нуклеотидов. Такие пары по меньшей мере 15 нуклеотидов первой последовательности РНК и по меньшей мере 15 нуклеотидов второй последовательности РНК могут состоять из пар G-U, G-C и A-U или они могут состоять из пар G-C и A-U. В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения первая и вторая последовательности РНК со-

держат по меньшей мере 15 нуклеотидов, которые спариваются, и содержат по меньшей мере 15 последовательных спаренных оснований. В следующем варианте осуществления настоящего изобретения первая последовательность РНК и вторая последовательность РНК являются, по существу, комплементарными, причем эта комплементарность включает по меньшей мере 17 пар оснований. Эти 17 спаренных оснований предпочтительно могут быть 17 последовательными парами оснований, и эти спаренные основания состоят из G-U, G-C и A-U пар оснований или состоят из G-C и A-U пар оснований.

В варианте осуществления настоящего изобретения первая и вторая последовательности нуклеотидов выбраны из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 14; SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 11; и SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 12. Показано, что такие комбинации первой и второй последовательностей нуклеотидов эффективны при включении их в каркасы siРНК или микроРНК.

Первая и вторая последовательности нуклеотидов, которые являются, по существу, комплементарными, предпочтительно не образуют двухцепочечную РНК, состоящую из 30 последовательных спаренных оснований или более длинную, поскольку они могут запускать естественный иммунный ответ по активированному двухцепочечной РНК (dsRNA; от англ.: double-stranded RNA) протеинкиназному пути. Соответственно двухцепочечная РНК предпочтительно содержит менее 30 последовательных пар оснований. Предпочтительно пре-микроРНК каркас, прай-микроРНК каркас, shРНК или siРНК, содержащие двухцепочечную РНК по настоящему изобретению, не содержат 30 последовательных пар оснований.

Предпочтительно двухцепочечная РНК по настоящему изобретению включена в пре-микроРНК каркас или прай-микроРНК каркас. Прай-микроРНК каркас включает пре-микроРНК каркас. пре-микроРНК каркас содержит двухцепочечную РНК по настоящему изобретению, то есть первую последовательность РНК и вторую последовательность РНК. Предпочтительно двухцепочечная РНК по настоящему изобретению включена в прай-микроРНК каркас, производный от miR-451a (также обозначаемый как miR-451) или miR-155. Примеры двухцепочечных РНК по настоящему изобретению, включенных в пре-микроРНК каркас, изображены на фиг. 2А. Последовательности этих пре-микроРНК приведены в табл. 3 ниже

Таблица 3
пре-микроРНК каркасы, содержащие SEQ ID NO: 5

SEQ ID NO:	Название	Последовательность
15	pre-miR451a	5'-CUUGGGAUUGGCAAGGAAGGACUUGAGGGACUCG AAGACGAGUCCCUCAAGUCCUCUCUUAUACCCAGA-3'
16	pre-miR155	5'-UGCUGAAGGACUUGAGGGACUCGAAGGUUUUGGCCA CUGACUGACCUUCGAGUCUCAAGUCCUUCAGGA-3'

пре-мРНК последовательность SEQ ID NO: 15 состоит из 5'-плеча, соответствующего нуклеотидам с 1 по 16 SEQ ID NO: 15, первой последовательности РНК, соответствующей SEQ ID NO: 5, состоящей из нуклеотидов с 17 по 37 SEQ ID NO: 15, второй последовательности РНК, соответствующей SEQ ID NO: 14, состоящей из нуклеотидов с 38 по 56 SEQ ID NO: 15, и 3'-плеча, соответствующего нуклеотидам с 57 по 72 SEQ ID NO: 15. Каркас pre-miR451a по настоящему изобретению содержит 5'-плечо, соответствующее нуклеотидам с 1 по 16 SEQ ID NO: 15, за которым следует первая последовательность нуклеотидов по настоящему изобретению, вторая последовательность нуклеотидов по настоящему изобретению и 3'-плечо, соответствующее нуклеотидам с 57 по 72 SEQ ID NO: 15. Предпочтительно первая и вторая последовательности РНК выбраны таким образом, что при включении в каркас pri-miR451a получают предсказанную структуру, которая в высокой степени сходна с изображенной на фиг. 2В или является такой, как изображено на фиг. 2В. Предпочтительно пары оснований, которые образуются между первой и второй последовательностями РНК, являются парами G-C, G-U и A-U, и предпочтительно длина первой последовательности РНК равна 21 нуклеотиду, а длина второй последовательности РНК предпочтительно равна 19 нуклеотидам. Предпочтительно пары оснований, которые образуются между первой и второй последовательностями РНК, являются парами G-C и A-U, и предпочтительно длина первой последовательности РНК равна 21 нуклеотиду, а длина второй последовательности РНК предпочтительно равна 19 нуклеотидам. Без привязки к конкретной теории полагают, что этот pri-R451a каркас может быть предпочтительным, поскольку он не приводит к процессингу "сопровождающей" цепи по механизму РНК-интерференции с ее включением в RISC (Cheloufi et al., 2010 Jun 3; 465(7298):584-9). Из siРНК или микроРНК дуплекса, в принципе, обе цепи могут быть включены в RISC. Поскольку "сопровождающая" цепь (соответствующая второй последовательности) может приводит к таргетингу других транскриптов, отличающихся от транскрипта гентингина, использование pri-miR451a или pre-miR451a каркаса может позволить избежать такого нежелательного таргетинга. При испытании на потенциальную активность "сопровождающей" цепи не было обнаружено активности при использовании pri-451a каркаса (см. фиг. 4А и 4В). Процессинг шпильки пре-микро-РНК считается независимым от фермента Dicer, и расщепление осуществляется белком Ago2 (Yang et al., Proc Natl Acad Sci USA 2010 Aug 24; 107(34):15163-8).

пре-мРНК последовательность SEQ ID NO: 16 состоит из 5'-плеча, соответствующего нуклеотидам

с 1 по 5 SEQ ID NO: 16, первой последовательности РНК, соответствующей SEQ ID NO: 5, состоящей из нуклеотидов с 6 по 26 SEQ ID NO: 16, петлевой последовательности, состоящей из нуклеотидов с 27 по 45 SEQ ID NO: 16, второй последовательности РНК, соответствующей SEQ ID NO: 13, состоящей из нуклеотидов с 46 по 64 SEQ ID NO: 16, и 3'-плеча, соответствующего нуклеотидам с 65 по 69 SEQ ID NO: 16. pre-155 каркас, содержащий первую и вторую последовательности РНК по настоящему изобретению, содержит 5'-плечо, соответствующее нуклеотидам с 1 по 5 SEQ ID NO: 16, первую последовательность РНК, петлевую последовательность, соответствующую нуклеотидам с 27 по 45 SEQ ID NO: 16, вторую последовательность РНК, и 3'-плечо, соответствующее нуклеотидам с 65 по 69 SEQ ID NO: 16. Предпочтительно первая и вторая последовательности РНК выбраны так, что, если они включены в pre-miR155 каркас (или прай-микроРНК каркас), то получают предсказанную структуру, которая в высокой степени сходна с изображенной на фиг. 2В. Предпочтительно пары оснований, которые формируются между первой и второй последовательностями РНК, являются парами G-C или A-U, и предпочтительно длина первой последовательности РНК равна 21 нуклеотиду, а длина второй последовательности РНК предпочтительно равна 19 нуклеотидам. Эти 19 нуклеотидов предпочтительно полностью комплементарны нуклеотидам с 2 по 18 первой последовательности нуклеотидов, состоящей из 21 нуклеотида.

пре-микроРНК последовательность, если она содержится в более крупной последовательности РНК, требует 5'- и 3'-одноцепочечных фланкирующих последовательностей, которые позволяют распознавание и расщепление ферментом Drosha. Последовательностями, пригодными для обеспечения распознавания и расщепления ферментом Drosha, являются последовательность 5'-прай-микроРНК и последовательность 3'-прай-микроРНК. Например, экспрессируемая pre-miH12-155 последовательность, как показано на фиг. 5А, фланкирована 5'-прай-микроРНК и 3'-прай-микроРНК последовательностями miR155 в векторе экспрессии CMV-miH12-155 (фиг. 2С). Последовательность прай-микроРНК, содержащая miR12-155, приведена на фиг. 2F, 5'-прай-микроРНК соответствует нуклеотидам с 1 по 87, а 3'-прай-микроРНК соответствует нуклеотидам с 147 по 272. Сходным образом, CAG-miH12-451 и PGK-miH12-451 последовательности прай-микроРНК, экспрессируемые соответствующими векторами, изображенными на фиг. 2D и 2E, показаны на фиг. 2G и 2H. 5'-прай-микроРНК и 3'-прай-микроРНК экспрессируемых CAG-miH12-451РНК соответствуют нуклеотидам с 1 по 302 и с 375 по 605, а 5'-прай-микроРНК и 3'-прай-микроРНК экспрессируемых PGK-miH12-451РНК соответствуют нуклеотидам с 1 по 516 и с 589 по 819 соответственно. Длина одноцепочечных фланкирующих последовательностей может варьироваться, однако в характерном случае равна примерно 80 нуклеотидам (Zeng and Cullen, J Biol Chem, 2005 Jul 29; 280(30):27595-603; Cullen, Mol Cell, 2004 Dec 22; 16(6):861-5). Минимальную длину одноцепочечных фланкирующих последовательностей легко можно определить, поскольку, если они становятся слишком короткими, может нарушиться процессинг ферментом Drosha, и последовательность-специфическое ингибирование будет снижено или даже будет отсутствовать. В варианте осуществления настоящего изобретения прай-микроРНК каркас, несущий первую и вторую последовательности РНК по настоящему изобретению, имеет 5'-фланкирующую последовательность и 3'-фланкирующую последовательность относительно предсказанной структуры пре-микроРНК, равные по меньшей мере 50 нуклеотидам. Все последовательности, производные от пре-микроРНК и прай-микроРНК, предпочтительно являются производными одной и той же существующей в природе прай-микроРНК последовательности.

пре-микроРНК последовательности SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 16 кодируются последовательностями ДНК, изображенными на фиг. 2С (SEQ ID NO: 16), 2D (SEQ ID NO: 15) и 2E (SEQ ID NO: 15). Последовательности прай-микроРНК, содержащие последовательности пре-микроРНК, изображены на фиг. 2F (SEQ ID NO: 16), фиг. 2G (SEQ ID NO: 15) и фиг. 2F (SEQ ID NO: 15). Прай-микроРНК, кодируемые CMV-miH12-155, соответствуют нуклеотидам с 1433 по 1704 из фиг. 2С, кодируемые CAG-miH12-451 соответствуют нуклеотидам с 1716 по 2320 из фиг. 2D и кодируемые PGK-miH12-451 соответствуют нуклеотидам с 278 по 1097 из фиг. 2F. Сходным образом, можно включить первую и вторую последовательности РНК, как описано выше для пре-микроРНК.

Двухцепочечные РНК по настоящему изобретению, включенные в siРНК, shРНК, прай-мРНК каркас или пре-микроРНК каркас, могут быть доставлены в клетку с использованием способов, известных в данной области техники, таких как липофекция, трансфекция, или с использованием любых других подходящих способов. Двухцепочечные РНК по настоящему изобретению могут быть синтетическими двухцепочечными РНК или природными двухцепочечными РНК. Синтетические двухцепочечные РНК могут содержать нуклеиновые кислоты, содержащие известные аналоги природных нуклеотидов. Такие двухцепочечные РНК обладают свойствами, сходными с их природными аналогами, и РНК-интерференционной активностью, сходной или превышающей активность двухцепочечных РНК, которые состоят исключительно из несинтетической двухцепочечной РНК. Например, синтетические siРНК могут содержать в своей конструкции "запертую" нуклеиновую кислоту (рибозное кольцо, соединенное метиленовым мостиком (оранжевый) между 2'-О и 4'-С атомами), модифицированные нуклеотиды, такие как нуклеотиды, содержащие фосфоротиоаты, 2'-О-Ме, 2'-О-аллил и 2'-дезоксифторуридин. Хорошо известно, что двухцепочечные РНК, например siРНК, могут воспринять довольно большое число модификаций как в спаренных, так и в неспаренных положениях без существенной утраты активности. Предпочтительно двухцепочечная РНК по настоящему изобретению является двухцепочечной РНК, состоящей из

природных нуклеотидов, например, полученных в результате экспрессии двухцепочечной РНК.

Соответственно в варианте осуществления настоящего изобретения двухцепочечные РНК по настоящему изобретению закодированы в последовательности ДНК. Последовательность ДНК, кодирующая двухцепочечную РНК, например, заключенную в siРНК, shРНК, прай-микроРНК каркас или пре-микроРНК каркас, включена в кассету экспрессии. Очевидно, что, если двухцепочечная РНК должна быть, например, siРНК, состоящей из двух цепей РНК, необходимы две кассеты экспрессии. Одна кодирует цепь РНК, содержащую первую последовательность РНК, другая кассета кодирует цепь РНК, содержащую вторую последовательность РНК. Если двухцепочечная РНК содержится в одной молекуле РНК, например, кодирующей shРНК, пре-микроРНК или прай-микроРНК, может быть достаточно одной кассеты экспрессии. Кассета экспрессии pol II может содержать промоторную последовательность, последовательность, кодирующую РНК, подлежащую экспрессии, и затем последовательность полиаденилирования. В случае если экспрессируемая двухцепочечная РНК содержит прай-микроРНК каркас, кодируемая последовательность РНК может кодировать интронные последовательности и экзонные последовательности, а также 3'-UTR и 5'-UTR. Кассета экспрессии pol III, в целом, содержит промоторную последовательность, за которой следует последовательность ДНК, кодирующая РНК (например, shРНК последовательность, пре-микроРНК или цепь двухцепочечной РНК, которая должна быть включена, например, в siРНК или удлиненную siРНК). Кассета экспрессии pol I может содержать промотор pol I, затем последовательность, кодирующую РНК, и 3'-фрагмент. Кассеты экспрессии для двухцепочечных РНК хорошо известны в данной области техники, и может быть пригодна кассета экспрессии любого типа, например, в которой может быть использован промотор pol III, промотор pol II или промотор pol I (среди прочего, Ter Brake et al., *Mol Ther*, 2008 Mar; 16(3):557-64, Maczuga et al., *BMC Biotechnol.*, 2012 Jul 24; 12:42). Примеры кассет экспрессии, экспрессирующих двухцепочечную РНК по настоящему изобретению, изображены на фиг. 2С-Е.

Предпочтительно используют промотор pol II, например PGK промотор, СВА промотор (промотор бета-актина кур, СВА - от англ. - chicken β -actin) или CMV промотор (см. фиг. 2). Поскольку болезнь Гентингтона поражает нейроны, может быть особенно выгодным использование нейроспецифического промотора. Примерами подходящих нейроспецифических промоторов являются нейрон-специфическая эналаза (NSE; от англ.: Neuron-Specific Enolase), синапсин 1 человека, саМК-киназа (кальций²⁺/кальмодулинзависимая киназа) и тубулин. Другими подходящими промоторами, которые могут быть предусмотрены, являются индуцируемые промоторы, то есть промоторы, которые инициируют транскрипцию только в том случае, когда клетка-хозяин подвергается воздействию определенного стимула.

Кассеты экспрессии по настоящему изобретению можно переместить в клетку с использованием, например, способов трансфекции. Любые подходящие средства могут быть достаточными для переноса кассеты экспрессии по настоящему изобретению. Предпочтительно используют геннотерапевтические векторы, которые стабильно переносят кассету экспрессии в клетки, так что может быть достигнута стабильная экспрессия двухцепочечных РНК, которые индуцируют последовательность-специфическое ингибирование гена гентингтина, описанное выше. Подходящими векторами могут быть лентивирусные векторы, векторные системы на основе ретротранспозонов или векторы на основе аденоассоциированного вируса (AAV-векторы). Очевидно, что, например, лентивирусные векторы содержат РНК-геном, РНК-геном будет кодировать кассету экспрессии, так что после трансдукции в клетке образуются последовательность ДНК и кассета экспрессии. Предпочтительно используют вирусный вектор, такой как AAV. Предпочтительно используемый AAV-вектор является AAV-вектором серотипа 5. AAV серотипа 5 могут быть, в частности, пригодны для трансдукции нейронов, как показано в примерах. Продукция AAV-векторов, содержащих любую кассету экспрессии, представляющую интерес, подробно описана в публикациях WO 2007/046703, WO 2007/148971, WO 2009/014445, WO 2009/104964, WO 2011/122950, WO 2013/036118, содержание которых включено в данную публикацию посредством ссылки.

AAV-последовательности, которые можно использовать в настоящем изобретении для получения AAV-векторов, например их продукции в линиях клеток насекомых или млекопитающих, можно получить из генома любого серотипа AAV. В целом, серотипы AAV имеют геномные последовательности со значительной гомологией на уровнях аминокислот и нуклеиновых кислот, выполняют идентичный набор генетических функций, продуцируют вирионы, которые, по существу, физически и функционально эквивалентны, и реплицируются и собираются по практически идентичным механизмам. Геномную последовательность различных серотипов AAV и обзор геномных черт сходства см., например, учетную запись GenBank U89790; учетную запись GenBank J01901; учетную запись GenBank AF043303; учетную запись GenBank AF085716; Chlorini et al. (1997, *J. Vir.* 71: 6823-33); Srivastava et al. (1983, *J. Vir.* 45:555-64); Chlorini et al. (1999, *J. Vir.* 73:1309-1319); Rutledge et al. (1998, *J. Vir.* 72:309-319) и Wu et al. (2000, *J. Vir.* 74: 8635-47). AAV серотипов 1, 2, 3, 4 и 5 являются предпочтительными источниками последовательностей нуклеотидов AAV для использования в контексте настоящего изобретения. Предпочтительно ITR-последовательности (инвертированные концевые повторы; от англ.: inverted terminal repeats) AAV для использования в контексте настоящего изобретения получают из AAV1, AAV2 и/или AAV5. Сходным образом, кодирующие последовательности Rep52, Rep40, Rep78 и/или Rep68 предпочтительно получают

из AAV1, AAV2 и/или AAV5. Однако последовательности, кодирующие капсидные белки VP1, VP2 и VP3, для использования в контексте настоящего изобретения могут быть получены из любого из 42 известных серотипов, более предпочтительно из AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8 или AAV9, или из недавно разработанных AAV-подобных частиц, полученных, например, способами шаффлинга генов капсидных белков и из библиотек капсидных белков AAV.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрена клетка-хозяин, содержащая последовательность ДНК или кассету экспрессии по настоящему изобретению. Например, кассета экспрессии или последовательность ДНК может быть включена в плазмиду, содержащуюся в бактерии. Кассета экспрессии или последовательность ДНК может также содержаться в продуктивной клетке, которая продуцирует, например, вирусный вектор.

Как показано в разделе примеров осуществления настоящего изобретения и как разъяснено выше, последовательность ДНК по настоящему изобретению, кассета экспрессии по настоящему изобретению и геннотерапевтический вектор по настоящему изобретению предназначены для применения в медицинском лечении, в частности для применения в лечении болезни Гентингтона. Медицинское лечение с использованием AAV-вектора (или сходного геннотерапевтического вектора) включает прямую инфузию AAV-вектора по настоящему изобретению в головной мозг. Прямая инфузия в других вариантах осуществления настоящего изобретения включает интратекальную инфузию вектора в цереброспинальную жидкость. Такая интратекальная инфузия является эффективным способом доставки геннотерапевтического вектора в ЦНС и достижения им нейронов. Предпочтительно мишенями являются стриатальные и кортикальные структуры за счет доставки AAV-векторов посредством интрастриатальной диффузии, усиленной конвекцией (CED), после инъекций в стриатум. Более предпочтительно для большего покрытия ЦНС инъекции выполняют в стриатум и таламус. Соответственно AAV-векторы доставляют интрастриатально или доставляют интрастриатально и интраталамически посредством инъекций в стриатум или в стриатум и гипоталамус, обеспечивающих диффузию, усиленную конвекцией (CED). Такие инъекции предпочтительно выполняют как инъекции под контролем МРТ. Такие способы лечения, в частности, можно использовать для лечения людей, страдающих болезнью Гентингтона. Очевидно, что лечение болезни Гентингтона включает людей, страдающих болезнью Гентингтона, включая людей, обладающих генетической предрасположенностью к развитию болезни Гентингтона, у которых еще не проявились признаки болезни. Соответственно лечение людей с болезнью Гентингтона включает лечение любого человека, являющегося носителем аллели Гентингтона с более чем 35 повторами CAG.

Варианты осуществления настоящего изобретения.

1. Двухцепочечная РНК, содержащая первую последовательность РНК и вторую последовательность РНК, в которой первая и вторая последовательности РНК являются, по существу, комплементарными, причем первая последовательность РНК имеет длину последовательности, равную по меньшей мере 19 нуклеотидам, и является, по существу, комплементарной последовательности SEQ ID NO: 1.

2. Двухцепочечная РНК согласно варианту осуществления 1, отличающаяся тем, что двухцепочечная РНК способна снижать экспрессию гена гентингтина.

3. Двухцепочечная РНК согласно варианту осуществления 1 или варианту осуществления 2, отличающаяся тем, что двухцепочечная РНК включена в пре-микроРНК каркас, прай-микроРНК каркас, shРНК или siРНК, предпочтительно в пре-микроРНК каркас.

4. Двухцепочечная РНК согласно любому из вариантов осуществления с 1 по 3, отличающаяся тем, что первая последовательность РНК имеет длину последовательности, равную по меньшей мере 20 нуклеотидам, предпочтительно по меньшей мере 21 нуклеотиду.

5. Двухцепочечная РНК согласно любому из вариантов осуществления с 1 по 4, отличающаяся тем, что первая последовательность РНК полностью комплементарна SEQ ID NO: 1.

6. Двухцепочечная РНК согласно любому из вариантов осуществления с 1 по 5, отличающаяся тем, что первая последовательность РНК выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 7.

7. Двухцепочечная РНК согласно любому из вариантов осуществления с 1 по 6, отличающаяся тем, что первая цепь и вторая цепь выбраны из группы, состоящей из комбинаций SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 14; SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 12.

8. Двухцепочечная РНК согласно любому из вариантов осуществления с 1 по 7, отличающаяся тем, что двухцепочечная РНК включена в пре-микроРНК каркас, производный от miR-451a или miR-155.

9. Последовательность ДНК, кодирующая двухцепочечную РНК по любому из вариантов осуществления с 1 по 8.

10. Кассета экспрессии, кодирующая двухцепочечную РНК по любому из вариантов осуществления с 1 по 9.

11. Кассета экспрессии согласно варианту осуществления 10, отличающаяся тем, что кассета экспрессии содержит РНК промотор, CMV промотор, нейроспецифический промотор или СВА промотор.

12. Геннотерапевтический вектор, содержащий кассету экспрессии согласно вариантам осуществления 10 или 11.

13. Геннотерапевтический вектор согласно варианту осуществления 12, отличающийся тем, что геннотерапевтический вектор является AAV-вектором, предпочтительно AAV-вектором серотипа 5.

14. Клетка-хозяин, содержащая последовательность ДНК согласно варианту осуществления 9 или кассету экспрессии согласно варианту осуществления 10 или варианту осуществления 11.

15. Двухцепочечная РНК согласно любому из вариантов осуществления с 1 по 8, последовательность ДНК согласно варианту осуществления 9, кассета экспрессии согласно варианту осуществления 10 или варианту осуществления 11, геннотерапевтический вектор согласно варианту осуществления 12 или варианту осуществления 13 для применения в медицинском лечении.

16. Двухцепочечная РНК согласно любому из вариантов осуществления с 1 по 8, последовательность ДНК согласно варианту осуществления 9, кассета экспрессии согласно варианту осуществления 10 или варианту осуществления 11, геннотерапевтический вектор согласно варианту осуществления 12 или варианту осуществления 13 для применения в лечении болезни Гентингтона.

Описание примеров осуществления изобретения

Конструкции, экспрессирующие микроРНК, и siРНК.

Для создания содержащих микроРНК каркас векторов на основе miR155 содержащие 21 нуклеотид последовательности, полностью комплементарные избранным последовательностям-мишеням в НТТ, указанным на фиг. 1, включили в pri-mir-155 каркас pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния) с получением pVD-CMV-miНТТ-155 (пример последовательности кассеты экспрессии изображен на фиг. 2С, последовательности пре-микроРНК и прай-микроРНК, включенные в экспрессируемую РНК, изображены на фиг. 2В и 2F соответственно). pri-miR-155 конструкции сконструировали на основе инструкций, предоставленных компанией Invitrogen (BLOCK-iT™, наборы векторов экспрессии Pol II miR RNAi, версия E, 22 июня 2007 г., 25-0857), посредством отжига синтетических двухцепочечных олигонуклеотидов в сайте Bsal pcDNA6.2-GW/emGFP-miR155. Структуру всех искусственных пре-микроРНК, кодируемых miНтt конструкциями, подтвердили с использованием программного обеспечения Mfold (Nucleic Acids Res. 31(13), 3406-15 (2003)), версия 3.5, которое доступно онлайн по адресу <http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold>). Предсказанная структура пре-miРНК-155 каркаса, несущего последовательность, соответствующую SEQ ID NO: 5, изображена на фиг. 2В. Последовательность ДНК, кодирующая конструкцию, экспрессирующую pri-miРНК-155 каркас с SEQ ID NO: 5 в качестве выбранной первой последовательности, приведена на фиг. 2С (SEQ ID NO: 17), эту конструкцию также обозначают как miН12, а ее мишень - как Н12. Для 20 других выбранных последовательностей-мишеней сконструировали последовательности, полностью комплементарные последовательностям-мишеням, изображенным на фиг. 1, и микроРНК каркас, имеющий те же структурные признаки, что и изображенный на фиг. 2В, то есть вторая последовательность РНК, включенная в каркас, соответствует последовательности, которой выбранная первая последовательность РНК полностью комплементарна, но содержит 2 делеции нуклеотидов в центре. Сходным образом, в качестве контроля скремблированную последовательность РНК использовали в качестве первой последовательности РНК и, аналогично описанному выше, сконструировали вторую последовательность РНК с получением вектора pVD-CMV-miScr-155. Конструкции содержали ген GFP для обеспечения визуализации экспрессии микроРНК и трансдукции in vitro и in vivo.

Вектор, содержащий микроРНК, создали на основе miR451a. Последовательность ДНК, кодирующую pri-miR-451 каркас, синтезировали на основе замены предсказанной зрелой последовательности miR-451 на последовательность, имеющую в качестве мишени Н12, то есть на SEQ ID NO: 5, в качестве первой последовательности РНК. Вторую последовательность РНК сконструировали так, что она была полностью комплементарной нуклеотидам со 2 по 18 первой последовательности РНК. Вторую последовательность РНК выбрали так, что предсказанная структура РНК искусственной пре-микроРНК последовательности имела структуру, сходную с оригинальной структурой дикого типа. Структуру пре-микроРНК, кодируемой конструкциями, подтвердили с использованием программного обеспечения Mfold (Nucleic Acids Res. 31(13), 3406-15 (2003)), версия 3.5, которое доступно онлайн по адресу <http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold>). Предсказанная структура, в которой использована SEQ ID NO: 5, изображена на фиг. 2В. Получили два различных вектора, экспрессирующих каркасы miR451a. Последовательности ДНК экспрессирующих конструкций изображены на фиг. 2D и 2E, соответствующие последовательности прай-микроРНК каркасов, содержащихся в экспрессируемых РНК, приведены на фиг. 2G и 2H. Фиг. 2D изображает последовательность ДНК кассеты экспрессии pVD-CAG-miН12-451, которая экспрессирует микроРНК каркас с CAG-промотором, в на фиг. 2E показана последовательность ДНК кассеты экспрессии pVD-PGK-miН12-451, в которой использован PGK-промотор.

Синтетические siРНК, нацеленные на НТТ с мишенью miН12, то есть SEQ ID NO: 1, сконструировали с длиной от 19 до 23 нуклеотидов (табл. 1). siРНК содержали первую и вторую последовательности нуклеотидов, соответствовавшие SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 12. siРНК были сконструированы так, что они имели 3'-UU оверхенги в обеих цепях.

Репортерные конструкции.

psiCheck-2 конструкции LucНТТ, содержавшие полную последовательность экзона 1 НТТ, сконструировали и клонировали в соответствии с инструкциями, предоставленными компанией Promega (si-

СHECK™ векторы, C8011, Promega Benelux b.v., Лейден, Нидерланды). LucНТТ содержит SEQ ID NO: 1 и фланкирующие последовательности, которые присутствуют в SEQ ID NO: 2 (см. фиг. 1B). Репортер LucН12-451a содержит последовательность, комплементарную второй последовательности РНК, которая сконструирована для экспрессии рVD-CAG-miН12-451 и рVD-PGK-miН12-451. Все конструкции секвенировали и подтвердили правильность последовательности. Эффективность нокдауна всех микроРНК каркасов и siРНК определили на специфических репортерных генах люциферазы *in vitro*. Клетки Нек293Т сотрансфицировали miНtt и репортерным геном люциферазы в соотношении 1:1 (miR-155, PGK-miН12-451) или в соотношении 1:10 (CAG-miН12-451, то есть CAG-промотор является очень сильным). Нокдаун гена люциферазы Renilla измерили через 48 ч после трансфекции (p.t.; от англ.: post transfection), а нокдаун гена люциферазы светлячка измерили в качестве внутреннего контроля. miScr использовали в качестве негативного контроля и приняли за 100%.

Результаты экспериментов *in vitro*.

Из miН1-miН21 конструкций, нацеленных на экзон 1, miН12 вызвала наиболее сильный нокдаун репортерного гена люциферазы со снижением на 77-80% (фиг. 3A). Показано, что все siРНК, нацеленные на Н12, то есть SEQ ID NO: 1, имели сходную эффективность нокдауна, продемонстрировав более сильный нокдаун с возрастанием дозы. siРНК, содержавшие 19 и 21 пару оснований, продемонстрировали несколько большее ингибирование по сравнению с другими испытанными siРНК. Выполнили анализ способом секвенирования следующего поколения (NGS; от англ.: next generation sequencing) РНК, экспрессированных из рVD-CMV-miНТТ-155, и он продемонстрировал преимущество направляющих и "сопровождающих" цепей (см., например, фиг. 2B(7)), соответствовавших первой последовательности РНК и второй последовательности РНК, если они были включены в конструкцию как часть микроРНК каркаса. рVD-CAG-miН12-451 и рVD-PGK-miН12-451 испытали на таргетинг LucНТТ и LucН12-451a. И CAG-конструкции, и PGK-конструкции продемонстрировали последовательность-специфическое ингибирование (фиг. 4A), тогда как активность Luc-репортерного гена, содержавшего последовательность, полностью комплементарную второй последовательности РНК конструкций, не была снижена.

Нокдаун генов у мышей *in vivo* с использованием AAV-векторов.

Экспрессирующую конструкцию CMV-miН12-155 из PVD-CMV-miНТТ-155 клонировали в каркасе вектора AAV5 и получили AAV% с использованием бакуловирусной системы продукции. В качестве контроля CMV-miScr-155 также включили в AAVS-каркас, чтобы эта конструкция служила в качестве негативного контроля. Для мониторинга эффективности трансдукции в головном мозге кассеты экспрессии содержали GFP (фиг. 5A). Вектор AAV-5 содержал конструкцию с репортерным геном люциферазы, Luc73QНТТ, содержавший последовательность-мишень SEQ ID NO: 1 (то есть полную последовательность экзона 1 НТТ с 73 CAG-повторами), и фланкирующие последовательности, присутствующие в SEQ ID NO: 2 (см. фиг. 1B). Мышей Balb/6 (n равно 5) соинъецировали интрастриатально 2 мкл AAV5-Luc73QНт/SNP ($3,6 \times 10^{12}$ gc/мл (gc - от англ.: genome copies - копии генома)) и AAV5-miScr ($1,8 \times 10^{13}$ gc/мл) или AAV5-miН12 ($1,8 \times 10^{13}$ gc/мл) в соотношении 1:5. Отдельную группу инъецировали AAV5-Luc73QНт/SNP и фосфатным буфером. Экспрессию люциферазы контролировали через 2, 4 и 6 недель после инъекции посредством масс-спектрометрии. Уже через 1 неделю после инъекции наблюдали явный нокдаун Luc19QНт/wt в случае miН12 по сравнению с животными, получавшими только miScr и Luc19QНт/wt (фиг. 7B и 7C). Продемонстрировали тенденцию, свидетельствующую о значимом снижении экспрессии репортерного гена люциферазы с течением времени, которое было почти необнаружимым (miН12 № 1 и № 2) в головном мозге по сравнению с контрольными группами, показавшими сильный нокдаун НТТ-мишени CMV-miН12-155. В конце эксперимента флуоресценция Luc73QНт в группе, получавшей CMV-miН12-155, была примерно на 1 логарифмическую единицу ниже по сравнению с miScr.

Нокдаун *in vivo* с использованием AAV-векторов в животной модели HD.

AAV5-CMV-miН12-155 испытали в LV-171-82Q модели HD на крысах (Drouet et al., 2009, Ann Neurol. 2009 Mar; 65(3):276-85). Модель основана на избыточной стриатальной экспрессии первых 171 аминокислот мутантного фрагмента НТТ с 82 повторами, связанного с фрагментом экзона 67, содержащего SNP С/Т. Крысам с HD инъецировали AAV5-CMV-miН12-155 или контрольный AAV5-CMV-miScr-155 (фиг. 6A). Крысам интрастриатально вводили LV-171-82Q и через неделю - AAV5-CMV-miН12-155 или AAV5-CMV-miScr-155. Нейропротекторный эффект AAV5-CMV-miН12-155 определили на основании гистологического окрашивания (на DARPP32, EM48, GFP и Iba1) срезов головного мозга крыс с HD в ранние и поздние моменты времени (фиг. 6B, 6C и 6D, через 2 недели после инъекции). Поражения, выявленные с помощью DARPP32 (фиг. 6B, верхняя панель), свидетельствуют о нейродегенерации, и их можно наблюдать как белые пятна на срезах головного мозга. Панель четко показывает меньшую гибель нейронов и соответственно отсутствие белых пятен на срезах головного мозга крыс, получавших AAV5-CMV-miН12-155. Срезы мозга окрашивали для выявления агрегатов мутантного НТТ (EM48, фиг. 6B), которые видны как мелкие коричневые точки на срезах. Нейродегенерация была заметно меньшей, и меньше было агрегатов мутантного НТТ у крыс с HD, которым инъецировали AAV5-CMV-miН12-155, по сравнению с контрольной группой (фиг. 6B, средняя и нижняя панели). Сходные результаты были

получены на позднем сроке через 8 недель после инъекции (данные не показаны). Результаты GFP-гистологии (коричневое окрашивание) показывают эффективную стриатальную трансдукцию при всех векторах, использованных в данном исследовании (фиг. 6С). Кроме того, через 8 недель после инъекции, по существу, не был обнаружен иммунный ответ на основании Iba1 окрашивания (фиг. 6D).

Затем AAV5-CMV-miH12-155 дополнительно испытали на гуманизированной Nu97/18 модели HD у мышей (Southwell et al. 2013, Hum Mol Genet. 2013 Jan 1; 22(1):18-34). В этой модели ген Hdh мыши заменен двумя копиями НТТ человека, одна из которых содержит 97 СAG-повторов, а вторая - 18 СAG-повторов. Выполнили подробное исследование двигательных, психиатрических, когнитивных, электрофизиологических, нейрпатологических и биохимических изменений в Nu97/18 модели на мышах в результате прогрессирования болезни. AAV5-CMV-miH12-155 инъецировали мышам 2-месячного возраста, являвшимся гуманизированной Nu97/18 моделью HD, посредством интрацеребральной доставки с диффузией, усиленной конвекцией (IC-CED), в стриатум или медленной доставки в стриатум или интрацеребровентрикулярной доставки (ICV) в желудочки головного мозга.

Флуоресценция GFP показала полную трансдукцию в стриатуме мышей после медленной и CED доставки (фиг. 7А). Вестерн-блот анализ НТТ человека выявил нокдаун, вызванный AAV5-CMV-miH12-155, в стриатуме при использовании CED-доставки (фиг. 7В).

Сравнение H12 с последовательностями-мишенями предшествующего уровня техники.

Последовательности-мишени из предшествующего уровня техники в непосредственной близости от последовательности H12 сравнили с последовательностями H12. Сконструировали siРНК и микроРНК каркасы и провели прямое сравнение с использованием люциферазной репортерной системы, как описано выше. Низкие концентрации siРНК трансфицировали (0,25 нМ) в трех параллельных опытах, чтобы избежать эффектов вне мишени, искажающих результаты. siРНК сконструировали с полностью комплементарными направляющей и "сопровождающей" цепями (пары оснований G-C и A-U) и с UU-3' оверхенгами в обеих цепях. Скремблированную siРНК использовали в качестве контроля, и значения измеряли относительно контроля. siРНК с H12 показала наиболее сильное ингибирование (см. фиг. 8А). Сходным образом, получили микроРНК каркасы на основании miR-155, как описано выше, в соответствии с инструкциями компании Invitrogen и также провели прямое сравнение. Посредством замены 19 и 18 нуклеотидов получили каркасы R6.1 и R6.2, которые были превосходно комплементарными последовательностям-мишеням R6.1 и R6.2, в направляющей последовательности каркаса miR-155 от компании Invitrogen. Поэтому в зависимости от процессинга пре-микроРНК ферментом Dicer обработанная направляющая цепь R6 может содержать нуклеотиды из каркаса miR-155 на конце (или концах) последовательности. Каркасы микроРНК трансфицировали, как описано выше, с использованием различных соотношений между микроРНК-конструкцией и репортерным геном (конструкция микроРНК каркаса: репортерный ген люциферазы). Скремблированную микроРНК конструкцию использовали в качестве контроля, и значения измеряли относительно контроля. Фиг. 8В демонстрирует соотношение 1:1, тогда как фиг. 8С демонстрирует соотношение 1:10. Каркас H12 микроРНК продемонстрировал наиболее сильное ингибирование. H12 показал выраженное сильное ингибирование как в случае siРНК, так и в случае микроРНК, в частности, при низких концентрациях, которые можно считать наиболее значимыми для применения *in vivo*.

Таблица 4
Сравнение мишеней из предшествующего уровня техники и H12

Мишень	Последовательность-мишень	Sl.	L.	Id.
H12	5'-CUUCGAGUCCCUCAAGUCCUU-3'	34	21	21
H11	5'-GAAGCCUUCGAGUCCCUCAA-3'	33	21	15
R1 (siHUNT-2)	5'-GGCCUUCGAGUCCCUCAAGUCC-3'	46	21	18
R2 (shD2)	5'-GGCCUUCGAGUCCCUCAAGUC----3'	47	21	18
R3 (siPHK-DExon1)	5'-AGGCCUUCGAGUCCCUCAAGU-3'	48	21	17
R4 (HDAS 07)	5'-AUGAAGGCCUUCGAGUCCCU-3'	49	21	13
R6.1 (54)	5'-GCCUUCGAGUCCCUCAAGU-3'	50	19	17
R6.2 (55)	5'-CCUUCGAGUCCCUCAAGU-3'	51	18	17

Показаны последовательности-мишени. Целевые нуклеотиды, обладающие идентичностью с последовательностью-мишенью H12, подчеркнуты (Sl. обозначает SEQ ID NO; L обозначает длину нуклеотидов, Id. обозначает количество нуклеотидов, обладающих идентичностью с H12). R1 является производным от siРНК siHUNT-2 из публикации Rodriguez-Lebron et al., 2005, Mol Ther. Vol 12, No.4: 618-633, R2 является производным от экспрессируемой shРНК shD2 из публикации Franich et al., 2008, Mol Ther, Vol. 16, No. 5; 947-956, R3 является производным от siРНК-DExon1 из публикации US 20080015158, R4 является производным от HDAS 07 из публикации WO 2008134646, R6.1 и R6.2 взяты из перечня примерно 1750 гипотетических siРНК, предназначенных для таргетинга гена гентингина (WO 2005105995).

<400> 16
 ugcugaagga cuugagggac ucgaagguuu uggccacuga cugaccuucg agucucaagu
 60
 ccuucagga
 69

<210> 17
 <211> 1989
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> pVD-CMV-микроH12-155

<400> 17
 gttgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat tacggggtea ttagttcata
 60
 gccatatat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa tggcccgcct ggctgaccgc
 120
 ccaacgaccc cgcgccattg acgtcaataa tgacgtatgt tcccatagta acgccaatag
 180
 ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta aactgcccac ttggcagtac
 240
 atcaagtgtg tcaatgcca agtaagcccc ctattgacgt caatgacggg aaatggcccg
 300
 cctggcatta tgcccagtac atgaccttat gggactttcc tacttggcag tacatctacg
 360
 tattagtcac cgctattacc atgggtgatgc ggttttgcca gtacatcaat gggcgtggat
 420
 agcggtttga ctaecgggga tttccaagtc tcaaccccat tgaagtoaat gggagtttgt
 480
 tttggcacca aaatcaacgg gactttccaa aatgtcgtaa caactccgcc ccattgacgc
 540
 aaatggggcg taggcgtgta cgggtggagg tctatataag cagagctctc tggctaacta
 600
 gagaacccac tgcttactgg cttatcgaat ttaatacagc tcaatagtag gactcccaag
 660
 ctggctagtt aagctatcaa caagtttcta caaaaaagca ggctttaaaa ccatggtgag
 720
 caaggcgag gagctgttca cgggggtgt gccatcctg gtcgagctgg acggcgacgt
 780
 aaacggccac aagttcagcg tgtccggcga gggcgagggc gatgccacct acggcaagct
 840
 gaccctgaag ttcactctga ccaccggcaa gctgcccgtg ccttggccca cctctgtgac
 900
 caccttcacc tacggcgtgc agtgccttgc ccgctacccc gaccacatga agcagcacga
 960
 cttcttcaag tccgccatgc ccgaaggcta cgtccaggag cgcaccatct tcttcaagga
 1020
 cgaaggcaac tacaagacce gcgcccaggt gaagttcgag ggcgacaccc tggatgaacc
 1080
 catcgagctg aaggccatcg acttcaagga ggacggcaac atcctggggc acaagctgga
 1140
 gtacaactac aacagccaca aggtctatat caccgcccag aagcagaaga acggcatcaa
 1200
 ggtgaacttc aagaccgcc acaacatcga ggacggcagc gtgcagctcg ccgaccacta
 1260
 ccagcagaac acccccacgc gcgacggccc cgtgctgctg cccgacaacc actacetgag
 1320
 caccagctc gccctgagca aagaccocaa cgaagaagcgc gatcacatgg tctgctgga
 1380
 gttcgtgacc gccgcccggg tcaactctcg catggacgag ctgtacaagt aagetgaaga
 1440
 cttcgtggcc gtcgatcgtt taaaggagg tagtgagtcg accagtgat cctggaggct
 1500
 tgctgaagcg tgtatgctga aggacttgag ggactcgaag gttttggcca ctgactgacc
 1560
 ttcgagctc aagtccttca ggacacaagg cctgttacta gcaactacat ggaacaatg
 1620
 gccagatct ggcgcactc gagatatcta gaccagctt tcttgtacaa agtggttgat
 1680
 ctagagggcc cgcggttccg tgatggggga ggctaactga aacacggaag gagacaatac
 1740
 cggaaaggaac ccgctctatg acggcaataa aaagacagaa taaaacgcac ggggtgtggg
 1800
 tctttgttc ataaacgcgg ggttcggtcc cagggtggc actctgtcga taccaccgg
 1860
 tgaccocatt ggggccaata cgcgccggtt tcttctttt ccccacocca ccccacaagt
 1920
 tcgggtgaag gccacgggct cgcagccaac gtcggggcgg caggccctgc catagcatcc
 1980
 cctatagtg
 1989

037696

<210> 18
 <211> 2444
 <212> ДНК
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> pVD-CAI-микроH12-451

<400> 18
 cagtcacgac gttgtaaaac gacggccagt gaattcgccc ttaattcggg accctagtta
 60
 ttaatagtaa tcaattacgg ggtcattagt tcatagccca tatatggagt tccgcgttac
 120
 ataacttacg gtaaatggcc cgcctggctg accgcccac gacccccgcc cattgacgtc
 180
 aataatgacg tatgttccca tagtaacgcc aatagggaat ttccattgac gtoaatgggt
 240
 ggactattta cggtaaaact cccacttggc agtacatcaa gtgtatcata tgccaagtac
 300
 gccccctatt gacgtcaatg acggtaaaat gcccgctgg cattatgcc agtacatgac
 360
 cttatgggac ttctactt ggcagtacat ctacgtatta gtcacgcta ttaccatggt
 420
 cgaggtgagc cccaacttct gcttcaetct ccccatctcc cccccctccc caecccacat
 480
 tttgtattta tttatTTTT aattatttTg tgcagcagat ggggcggggg gggggggggg
 540
 gcgcgcgcca ggcggggcgg ggcggggcga ggggcggggc ggggcgaggg ggagaggtgc
 600
 ggccggcagcc aatcagagcg gcgcgctccg aaagtctct tttatggcga ggccggcggc
 660
 gcggcgcccc tataaaaagc gaagcgcgcg gcggcgggga gtcgctgcga cgcctgcctc
 720
 gccccgtgcc ccgctccgcc gccgctcgc gcccccgcc ccggctctga ctgaccgct
 780
 tactcccaca agtgagcggg cgggacggcc cttctctcc gggctgtaat tagcgttgg
 840
 tttaatgacg gcttgtttct tttctgtggc tgcgtgaaag ccttgagggg ctccgggagg
 900
 gccctttgtg cgggggggag cggctcgggg ggtgcgtgcg tgtgtgtgtg cgtggggagc
 960
 gcccgctgcg gcccgcgctg cccggcggct gtgagcgtg cgggcgcggc gccgggcttt
 1020
 gtgcgctccg cagtgtgcgc gaggggagcg cggccggggg ccgtgccccg cgtgcccggg
 1080
 ggggctgcga ggggaacaaa ggctgcgtgc ggggtgtgtg cgtggggggg tgagcagggg
 1140
 gtgtgggccc ggcggtcggg ctgtaacccc cccctgcacc cccctccccg agttgctgag
 1200
 cacggcccgg cttcgggtgc ggggctcgt acggggcgtg gcgcggggct cgcctgcgc
 1260
 ggccgggggt ggcggcaggt ggggggtccc ggcggggcgg gcccgctcgc ggcgggggag
 1320
 ggctcggggg aggggcgccc cggccccgg agcccgggcg gctgtcaggg cgcggcggcg
 1380
 cgcagccatt gccctttatg gtaatcgtgc gagagggcgc agggacttcc tttgtccaa
 1440
 atctgtcggg agccgaaatc tgggaggcgc cgcgcacccc cctctagcgg gcgcggggcg
 1500
 aagcgggtgc gcgcggcag gaaggaaatg ggcggggagg gccctcgtgc gtcgcccgcg
 1560
 cgcctcccc ttctccctct ccagcctcgg ggcgtgcgc ggggggacgg ctgcctcggg
 1620
 gggggacggg gcagggcggg gttcggcttc tggcgtgtga ccggcggctc tagagcctct
 1680
 gctaaccatg ttcattcctt cttcttttct ctacagctcc tgggcaactg gctggttatt
 1740
 gtgctgtctc atcattttg caaagaatta agggcgaatt cgagctcggg acctcgcgaa
 1800
 tgcactaga tateggcgt atgcttctg tgcctccagt gggccctcgg ctgggatttc
 1860
 atcataact gtaagtttgc gatgagacac tacagtatag atgatgtact agtccgggca
 1920
 cccccagctc tggagcctga caaggaggac agggagatg ctgcaagccc aagaagctct
 1980
 ctgctcagcc tgtcacaacc tactgactgc cagggcactt ggggaatggca aggaaggact
 2040
 tgagggactc gaagacgagt ccctcaagtc ctctctgtct ataccagaa aacgtgccag
 2100
 gaagagaact caggaccctg aagcagacta ctggaaggga gactccagct caaacaaggc
 2160
 aggggtgggg cgtgggatt ggggtaggg gagggaaatg atacatttct tcttctctgt
 2220

037696

tgtaaagaaa taaagataag ccaggcacag tggctcagc ctgtaatccc accactttoa
2280

gaggccaagg cgctggatcc agatctcgag cggccgcccg tggcatccct gtgaccctc
2340

cccagtgcct ctccctggccc tggaaattgc cactccagtg cccaccagcc ttgtccta
2400

aaaattaagt tgcatacaaga tcgacgggcc cgtcgactgc agag
2444

<210> 19
<211> 1224
<212> ДНК
<213> искусственная последовательность

<220>
<223> pVD-PGK-микроН12-451

<400> 19
gttgtaaac gacggccagt gaattctacc gggtagggga ggcgctttc ccaaggcagt
60

ctggagcatg cgttttagca gccccgctgg gcaactggcg ctacacaagt ggcctctggc
120

ctcgcacaca ttcacatcc accggtaggc gccaaccggc tcgcttcttt ggtggccct
180

tcggccacc ttctactct cccctagtca ggaagtccc ccccgccccg cagctcgcgt
240

cgtgcaggac gtgacaaatg gaagtagcac gtctcactag tctcgtgcag atggacagca
300

ccgctgagca atggaagcgg gtaggccttt ggggcagcgg ccaatagcag ctttgcctc
360

tcgctttctg ggtcagagg ctgggaaggg gtgggtccgg gggcgggctc agggcggggc
420

tcaggggcgg ggcgggcgcc cgaaggtcct cggaggcccc ggcattctgc acgcttcaaa
480

agcgcaagtc tgccgcgctg ttctctctct cctcatctcc gggcctttcg acccgatcc
540

cccgggctgc aggaattcga gctcgtacc tcgcaatgc atotagatat cggcgctatg
600

cttctctgtc cccagtgagg gccctggctg ggatttcatc atatactgta agtttgcgat
660

gagcactac agtatagatg atgtactagt ccgggcaccc ccagctctgg agcctgacaa
720

ggaggacagg agagatgctg caagcccaag aagetctctg ctgagcctgt cacacactac
780

tgactccag ggcacttggg aatggcaagg aaggacttga gggactcga gacgagtc
840

tcaagtctc tcttgctata cccagaaaac gtgccaggaa gagaactcag gacctgaag
900

cagactactg gaagggagac tccagctcaa acaaggcagg ggtggggcgg tgggattggg
960

ggtaggggag ggaatagata cattttctct ttctgttgtt aaagaaataa agataagcca
1020

ggcacagtgg ctacgcctg taatcccacc actttcagag gccaaaggcgc tggatccaga
1080

tctcgagcgg ccgcccgtgg catcctctg acccctcccc agtgcctctc ctggccctgg
1140

aaagttgccac tccagtgccc accagccttg tcotaataaa attaagttgc atcaagatcg
1200

acgggcccgt cgaactgcaga gggc
1224

<210> 20
<211> 272
<212> РНК
<213> искусственная последовательность

<220>
<223> каркас прай-микроН12-155

<400> 20
gcaaaagcacu ucguggccgu cgaucguuua aagggaggua gugagucgac caguggaac
60

uggaggcuug cugaagcug uaugcugaag gacuuagggg acucgaaggu uuuggccacu
120

gacugaccuu cgaugucuaa guccuucagg acacaaggcc uguuacuaag acucacaugg
180

aaacaauggc ccaaaucugg ccgcaucuga gaaucuaaga cccagcuuuc uguuacaaag
240

ugguugaucu agagggcccg cgguucgcu au
272

<210> 21
<211> 605
<212> РНК
<213> искусственная последовательность

<220>
<223> каркас прай-микроН12-451

<400> 21
 gcuccugggc aacgugcugc uuauugugcu gucucaucau uuuggcaaaag aauuaagggc
 60
 gaaucgagc ucgguaccuc gcgaaugcau cuagauaucg gcgcuaugcu uccugugccc
 120
 ccaguggggc ccuggcuggg auuucaucau auacuguaag uuugcgaua gacacuacag
 180
 uauagaugau guacuagucc gggcaccccc agcucuggag ccugacaagg aggacaggag
 240
 agaugcugca agcccaagaa gcucucugcu cagccuguca caaccuacug acugccaggg
 300
 cacuugggaa uggcaaggaa ggacuugagg gacucgaaga cgagucccuc aaguccucuc
 360
 uugcuauacc sagaaaacgu gccaggaaga gaacucagga ccugaagca gacuacugga
 420
 agggagacuc cagcucaaaс aaggcagggg uggggcgug ggauuggggg uaggggaggg
 480
 aauagauaca uuuucuuuu ccuguuuuua agaaauaag auaaagccagg cacaguggcu
 540
 caccgcuua auccaccac uucagagggc caaggcgugc gaucagauc ucgagcggcc
 600
 gcccg
 605

<210> 22
 <211> 819
 <212> РНК
 <213> искусственная последовательность

<220>
 <223> каркас прай-микроН12-451

<400> 22
 agucugcugc agauggacag caaccgugag caauuggaagc ggguaagccu uuugggcagc
 60
 ggccaauagc agcuuugcuc cuucgcuuuc ugggucacaga ggcuggggaag gggugggucc
 120
 gggggcgggc ucaggggcgg gcucaggggc ggggcggggc cccgaagguc cuccggaggc
 180
 ccggcauucu gcacgcuuca aaagcgcacg ucugccgcgc uguucuccuc uuuccuucu
 240
 ccgggscuuu cgaaccggau cccccgggcu gcaggaauc gagcucgguu ccucgcaau
 300
 gcaucagau auccgcgcuu ucguucugcu gcccccagug gggcccuaggc ugggaauuca
 360
 ucauauacug uaaguuuugc augagacacu acaguauaga ugauguaaua guccgggcaс
 420
 ccccagcucu ggagccugac aaggaggaca ggagagauc ucgaagccca agaagcucuc
 480
 ucucagccu gucacaaccu acugacugcc agggcacuug ggaauggca ggaaggacu
 540
 gagggacucg aagacgaguc ccucaagucc ucucuuugua uaccagaаа acugccagg
 600
 aagagaacuc aggaccuga agcagacuac uggaaggag acuccagcuc aaacaaggca
 660
 gggguugggg cguuggauug ggguaaggg agggauuaga uacauuuuu cuuucuguu
 720
 guaaagaaau aaagauaagc caggcacagu ggcucacgcc uguauucca ccacuucag
 780
 aggccaaaggc gcuggaucca gaucugagc ggcgcgccg
 819

<210> 23
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> гомо сапиенс

<400> 23
 tccaagatgg acggccgctc a
 21

<210> 24
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> гомо сапиенс

<400> 24
 ccaagatgga cggccgctca g
 21

<210> 25
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> гомо сапиенс

<400> 25
 agatggacgg ccgctcaggt t
 21

<210> 26
 <211> 21

<212> ДНК
 <213> homo sapiens

 <400> 26
 atggacggcc gctcaggttc t
 21

 <210> 27
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> homo sapiens

 <400> 27
 gacggccgct caggttctgc t
 21

 <210> 28
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> homo sapiens

 <400> 28
 cggccgctca ggttctgctt t
 21

 <210> 29
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> homo sapiens

 <400> 29
 gtgctgagcg gcgcccagag t
 21

 <210> 30
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> homo sapiens

 <400> 30
 cggccgagct cggcccagag c
 21

 <210> 31
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> homo sapiens

 <400> 31
 accgcatgg cgaacctgga a
 21

 <210> 32
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> homo sapiens

 <400> 32
 ccgcatggc gacctgga a
 21

 <210> 33
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> homo sapiens

 <400> 33
 gaaggccttc gagtccctca a
 21

 <210> 34
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> homo sapiens

 <400> 34
 cttcagctcc ctcaagctct t
 21

 <210> 35
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> homo sapiens

 <400> 35
 ccgcccgcgc ctctcagct t
 21

 <210> 36
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> homo sapiens

 <400> 36
 gccgctcct cagcttcctc a
 21

 <210> 37
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> homo sapiens

 <400> 37
 tcagccgccc ccgaggcac a
 21

 <210> 38
 <211> 21

<212> ДНК
 <213> гомо сапиенс

 <400> 38
 gccgcaggca cagccgctgc t
 21

 <210> 39
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> гомо сапиенс

 <400> 39
 gccacagccg ctgctgcctc a
 21

 <210> 40
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> гомо сапиенс

 <400> 40
 gccgctgctg cctcagccgc a
 21

 <210> 41
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> гомо сапиенс

 <400> 41
 cggcccggt gtggtgagg a
 21

 <210> 42
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> гомо сапиенс

 <400> 42
 ctgtggctga ggaaccgctg c
 21

 <210> 43
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> гомо сапиенс

 <400> 43
 tgtggctgag gagccgctgc a
 21

 <210> 44
 <211> 69
 <212> РНК
 <213> искусственная последовательность

 <220>
 <223> микроH12_155 каркасная последовательность фигура 2A

 <400> 44
 ucsugaagga сугаgggac исгааgгиш иggссасуга сугассицг агисусаагу
 60
 ссиссаgga
 69

 <210> 45
 <211> 72
 <212> РНК
 <213> искусственная последовательность

 <220>
 <223> микроH12_451a каркасная последовательность фигура 2A

 <400> 45
 сиugggaaug gсааggaagg асиугаggga сисгааgасг агисссисаа гиссисисии
 60
 гсиаиассса ga
 72

 <210> 46
 <211> 21
 <212> РНК
 <213> гомо сапиенс

 <400> 46
 gсссисаgи сссисааgис с
 21

 <210> 47
 <211> 21
 <212> РНК
 <213> гомо сапиенс

 <400> 47
 gсссисаg исссисааgи с
 21

 <210> 48
 <211> 21
 <212> РНК
 <213> гомо сапиенс

 <400> 48
 агсссисаgа гиссссисааg и
 21

```

<210> 49
<211> 21
<212> РНК
<213> гомо сапиенс

<400> 49
ацгааggccсcи ucсаgиccсcи с
21

```

```

<210> 50
<211> 19
<212> РНК
<213> гомо сапиенс

```

```

<400> 50
gсссuссаgи ccсссааgи
19

```

```

<210> 51
<211> 18
<212> РНК
<213> гомо сапиенс

```

```

<400> 51
ccссссаgиcc ccсссааgи
18

```

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Двухцепочечная РНК, способная снижать экспрессию гена гентингина, содержащая первую последовательность РНК и вторую последовательность РНК, где первая и вторая последовательности РНК являются комплементарными, причем первая последовательность РНК имеет длину последовательности, равную по меньшей мере 19 нуклеотидам, и является комплементарной последовательности SEQ ID NO: 1, где первая последовательность РНК выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 7.

2. Двухцепочечная РНК по п.1, отличающаяся тем, что двухцепочечная РНК включена в пре-микроРНК каркас, прай-микроРНК каркас, shРНК или siРНК, предпочтительно в пре-микроРНК каркас.

3. Двухцепочечная РНК по любому из пп.1 и 2, отличающаяся тем, что первая последовательность РНК имеет длину последовательности, равную по меньшей мере 20 нуклеотидам, предпочтительно по меньшей мере 21 нуклеотиду.

4. Двухцепочечная РНК по любому из пп.1-3, отличающаяся тем, что первая последовательность РНК полностью комплементарна SEQ ID NO: 1.

5. Двухцепочечная РНК по любому из пп.1-4, отличающаяся тем, что первая цепь и вторая цепь выбраны из группы, состоящей из комбинаций SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 13; SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 14; SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 12.

6. Двухцепочечная РНК по любому из пп.1-5, отличающаяся тем, что двухцепочечная РНК включена в пре-микроРНК каркас, полученный из miR-451a или miR-155.

7. Последовательность ДНК, кодирующая двухцепочечную РНК по любому из пп.1-6.

8. Кассета экспрессии, способная снижать экспрессию гена гентингина, кодирующая двухцепочечную РНК по любому из пп.1-6.

9. Кассета экспрессии по п.8, отличающаяся тем, что кассета экспрессии содержит промотор фосфолицераткиназы, промотор цитомегаловируса, нейроспецифический промотор или промотор бета-актина кур.

10. Геннотерапевтический вектор, способный снижать экспрессию гена гентингина, содержащий кассету экспрессии по п.8 или 9.

11. Геннотерапевтический вектор по п.10, отличающийся тем, что геннотерапевтический вектор является вектором на основе аденоассоциированного вируса, предпочтительно вектором на основе аденоассоциированного вируса серотипа 5.

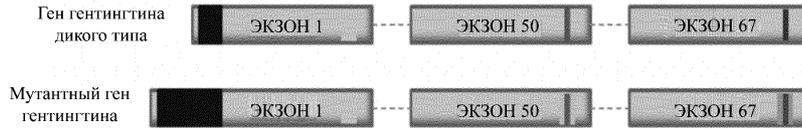
12. Клетка-хозяин, содержащая последовательность ДНК по п.7 или кассету экспрессии по п.8 или 9.

13. Применение двухцепочечной РНК по любому из пп.1-6 в качестве лекарственного средства для лечения болезни Гентингтона.

14. Применение последовательности ДНК по п.7 в качестве лекарственного средства для лечения болезни Гентингтона.

15. Применение кассеты экспрессии по п.8 или 9 в качестве лекарственного средства для лечения болезни Гентингтона.

16. Применение геннотерапевтического вектора по п.10 или 11 в качестве лекарственного средства для лечения болезни Гентингтона.

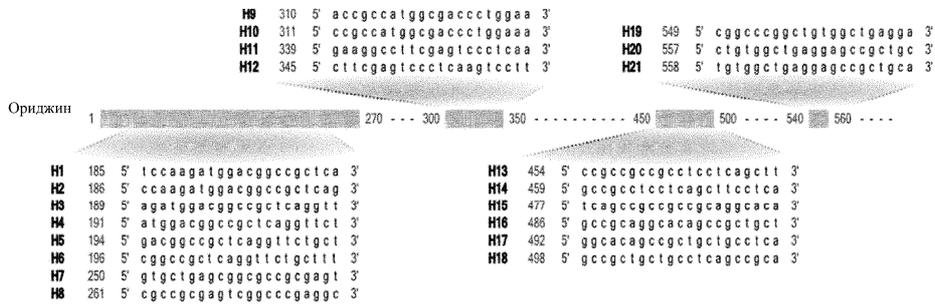


Фиг. 1А

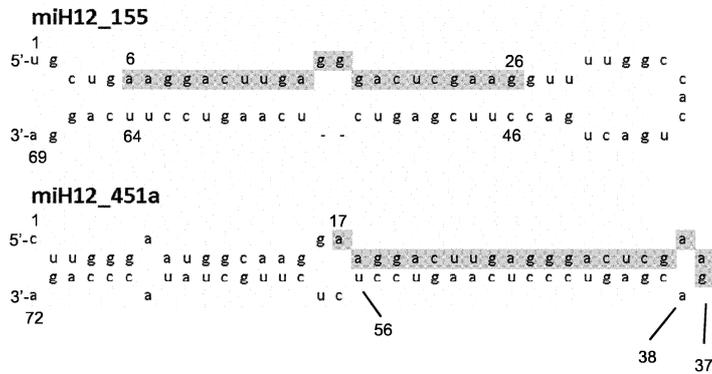
```

1 UUGCUGUGUG AGGCAGAACC UGCGGGGGCA GGGCGGGGCU GGUUCCUUGG CCAGCCAUUG
61 GCAGAGUCCG CAGGCUAGGG CUGUCAAUCA UGCUGGCCGG CGUGGCCCCG CCUCCGCCGG
121 CGCGGCCCCG CUUCCGCCGG CGCACGUCUG GGACGCAAGG CGCGUGGGG GCUCGCCGGA
181 CGGGUCCAAG AUGGACGGCC GCUCAGGUUC UGCUUUUACC UGCGGCCAG AGCCCAUUC
241 AUUGCCCGG UGCUGAGCGG CGCCGCGAGU CGGCCGAGG CCUCCGGGA CUGCCGUGCC
301 GGGCGGAGA CCGCAUUGC GACCCUGGAA AAGCUGAUGA AGGCCUUGCA GUCCUCAAG
361 UCCUCCAGC AGCAGCAGCA GCAGCAGCAG CAGCAGCAGC AGCAGCAGCA GCAGCAGCAG
421 CAGCAGCAGC AACAGCCGCC ACCGCCCGCG CGCCGCCCGC CGCUUCCUCA GCUUCCUCAG
481 CCGCCGCCCG AGGCACAGCC GCUGCUGCCU CAGCCGCAGC CGCCGCCCGC GCGCCGCCCG
541 CCGCCACCCG GCCCGGUCUG GGCUGAGGAG CGCUCGACC GACCGUGAGU UUGGGCCCGC
601 UGCAGCUCCU UGUC
    
```

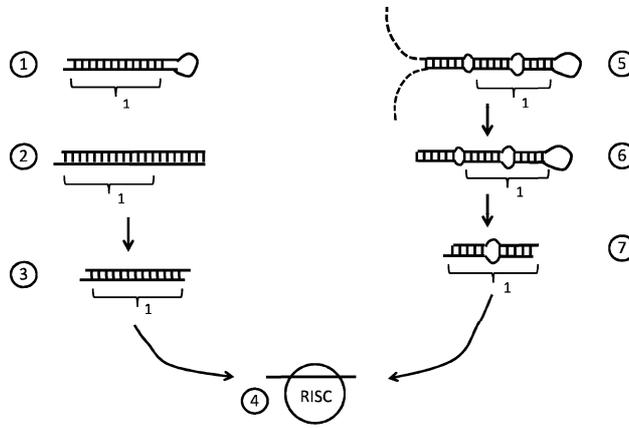
Фиг. 1В



Фиг. 1С



Фиг. 2А



Фиг. 2В

GTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGT
 CATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGG
 TAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGT
 CAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTCCATT
 GACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCACTTGGCAGTAC
 ATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACG
 GTAATGGCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACT
 TTCTTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGG
 TGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGATAGCGGTTTTGACT
 CACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGT
 TTTGGCACAAATCAACGGGACTTTCCAATAATGTCGTAACAATCCG
 CCCCATTGACGCAAAATGGGCGTAGCGGTGACGGTGGGAGGCTATA
 TAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCTGCTTACTGGCTTA
 TCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGTCCAAGTGGCTAGTTAA
 GCTATCAACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTAAACCATGGTGGAG
 CAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGGCCATCTGGTGGAGCT
 GGACGGCGACGTAACCGGCCACAAGTTACGCGTTCGGCGGAGGGCGA
 GGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCGAAAGTTTCACTGACCCAC
 CGCAAGCTGCGCGTGCCTGGCCACCCCTCGTGACCACCTTCACTA
 CGCGCTGCAGTCTTCCGCCGTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGA
 CTTCCTCAAGTCCGCATGCCGAAGGCTACGTCAGGAGCGCACCAT
 CTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCCGCGGAGGTGAAGTT
 CGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTT
 CAAGGAGGACGGCAACATCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACATAAA
 CAGCCACAAGGCTATATCACCCCGCACAAGCAGAAGAACGGCATCAA
 GGTGAACCTCAAGACCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCT
 CGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGCGCAGGCCCGCTGCT
 GCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAGA
 CCCCACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCTGTGACCGC
 CGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAGCTAAGCA
 CTTCGTGGCCGTCGATCGTTTAAAGGGAGGTAGTGAAGTCCAGCAGTGG
 ATCCTGGAGGCTTGTGAAGGCTGTATGCTGAAGGACTTGGGGACTC
 GAAGTTTTGGCCACTGACTGACTTTCGAGTCTCAAGTCTTCAGGAC
 ACAAGGCTGTACTAGCACTCACATGGAACAATGGCCAGATCTGG
 CCGCACTCGAGATATCTAGACCCAGCTTCTGTGACAAAGTGGTTGAT
 CTAGAGGGCCCGCGTTTCGCTGATGGGGGAGGCTAACTGAAACACGGA
 AGGAGACAATACCGGAAGGAACCCGCGCTATGACGGCAATAAAAAGAC
 AGAATAAAACGCACGGGTGTTGGGTGCTTGTTCATAAACCGCGGGT
 CGGTCCCAGGGCTGGCCTCTGTGATACCCACCGTACCCCATTTGG
 GGCCAAATACGCCCGCTTCTTCTTTTCCCAACCCACCCCAAGT
 TCGGTTGAAGGCCAGGGCTCGCAGCCAACGTCGGGGCGGACGGCCT
 GCCATAGCATCCCTATAGTG

(SEQ ID NO: 17)
Фиг. 2С

CAGTCACGACGTTGTAACGACGGCCAGTGAATTCGCCCTTAATTCG
 GTACCCCTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCAATTAGTTCATAG
 CCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCC
 TGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTA
 TGTTCCTCATAGTAACGCCAATAGGGACTTCCATTGACGTCAATGGGT
 GCAATATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCA
 TATGCCAAGTACGCCCTTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGC
 CTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTCTTACTTGGCA
 GTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTCGAGGTGAGCCC
 CAGCTTCTGCTTCACTCTCCCATCTCCCGCCCTCCCAACCCCAAT
 TTTGTATTTATTTATTTTAAATTTTGTGACGCGATGGGGCGGG
 GGGGGGGGGGGCGCGCCAGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
 GGGCGGGGGGAGGCGGAGAGGTGCGGGCGGCAATCAGAGCGGGCG
 GCTCCGAAAGTTTCTTTTATGGCGAGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
 TAAAAAGCGAAGCGCGCGGGGGGGAGTTCGCTGCGACGCTGCCTTC
 GCCCGTGCCTCGCTCCGCGCGGCTCGCGCGCGCGCGCGCGGGCTCT
 GACTGACCGGTTACTCCCAAGTGAAGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
 CTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTAATGACGGCTTGTTCCTTTTC
 TGTGGCTGCGTGAAGCCTTGAAGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCG
 GGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCCTGTGTGTGCGTGGGGAGC
 GCCGCTGCGGGCCCGCGTGCCTGGGGGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCG
 GCGGGGGCTTTGTGCGCTCCGCAAGTGTGCGGAGGGGAGCGGGGGCG
 GGGGGGGTCCCGCGGTGCGGGGGGGGGTGCAGGGGAACAAGGCT
 GCGTGGGGGTGTGTGCGTGGGGGGTGAAGGGGGGTGTGGCGCGGG
 CGGTGCGGGCTGAACCCCGCTGCACCCCTCCCGAGTTGCTGAG
 CACGGCCCGGCTTCGGGTGCGGGCTCCGTAAGGGGGCTGGCGGGGG
 CTCGCGGTGCGGGGGGGGGGGTGGCGCAGGTGGGGGTGCGGGGGGG
 GCGGGGGCGCTCGGGCGGGGGGGCTCGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
 CCCCAGCGCGGGGGGGTGTGAGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG

CTTTTATGGTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCAA
ATCTGTGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCCACCCCTCTAGC
GGGCGCGGGCGAAGCGGTGCGGCGCCGGCAGGAAGGAAATGGCGGG
GAGGGCCTTCGTGCGTCCGCGCGCCGCGTCCCTTCTCCCTCTCCAG
CCTCGGGGTGTCCGCGGGGGACGGTGCCTTCGGGGGGGACGGGGC
AGGGCGGGTTCGGCTTCGGCGGTGACCGCGGGCTCTAGAGCCTCT
GCTAACCATGTTTCATGCTTCTTCTTTTCTTACAGCTCCTGGGCAAC
GTGCTGGTTATTGTGCTGTCATCATTTTGGCAAAGAAATTAAGGGCG
AATTCGAGCTCGGTACCTCGGAATGCATCTAGATATCGGCGTATGC
TTCTGTGCCCCAGTGGGGCCCTGGCTGGGATTTTCATCATATACTGT
AAGTTTGCATGAGACACTACAGTATAGATGATGTACTAGTCCGGGCA
CCCCAGCTCTGGAGCCTGACAAGGAGACAGGAGAGATGCTGCAAGC
CCAAGAAGCTCTCTGCTCAGCCTGTACAACTACTGACTGCCAGGGC
ACTTGGGAATGGCAAGG**AAGGACTTGAGGGACTCGAAG**ACGAGTCCCT
CAAGTCTCTTTCTATACCCAGAAACGTGCCAGGAAGAACTCA
GGACCTGAAGCAGACTACTGGAAGGGAGACTCCAGCTCAAAACAAGC
AGGGTGGGGCGTGGGATTGGGGTAGGGAGGGAATACATACATTT
TCTCTTCTGTGTAAGAAATAAAGATAAGCCAGGCACAGTGGCTC
ACGCTGTAATCCACCCTTTAGAGGCAAGGGCTGGATCCAGAT
CTCGAGCGGCCCGCT**TGGCATCCCTGTGACCCCTCCCACTGCTCT**
CCTGGCCCTGGAAGTGGCACTCCAGTCCCACCAGCCTTGTCTAAT
AAAATTAAGTGCATCAAGATCGACGGGCCGTCGACTGCAGAG

(SEQ ID NO: 18)
Фиг. 2D

GTTGTA AACACGACGGCCAGTGAATTTCTACCGGGTAGGGAGGGCCTTT
TCCCAAGGCAGTCTGGAGCATGCGCTTTAGCAGCCCGCTGGGCACTT
GGCGCTACACAAGTGGCCTCTGGCCTCGCACACATTCACATCCACCG
GTAGGGCCCAACCGGCTCCGTTCTTTGGTGGCCCTTCGCGCCACCTT
CTACTCTCCCTAGTCAGGAAGTTCCTCCCGCCCGCAGCTCGGCT
CGTGAGGACGCTGACAAATGGAAGTAGCACGCTC**CACT**AGTCTCGTGC
AGATGGACAGCACCGCTGAGCAATGGAAGCGGTAGCCCTTTGGGGCA
GCGGCAATAGCAGCTTTGCTCCTTCGCTTTCTGGGCTCAGAGGCTGG
GAAGGGTGGGTCCGGGGCGGGCTCAGGGGCGGGCTCAGGGGCGGG
CGGGCGCCGAAGTCTCCGAGGCGCCGCTTTCGACGCTTCAAA
AGCGCACGCTGCGCGCTGTCTCTCTCTCTCATCTCCGGCCCTT
CGACCCGGATCCCGGGCTGCAGGAATTCGAGCTCGGTACCTCGCGA
ATGCATCTAGATATCGGGCTATGCTTCTGTGCCCCAGTGGGGCC
TGGCTGGGATTTTCATCATATACTGTAAGTTTGCATGAGACACTACAG
TATAGATGATGTAAGTCTCCGGCACCCAGCTCTGGAGCTGACAA
GGAGGACAGGAGAGATGCTGCAAGCCAAAGAGCTCTGCTCAGCCT
GTCACAACTACTACTGCCAGGGCACTTGGGAATGGCAAGC**AAGGAC**
TTGAGGACTCGAAGACGAGTCCCTCAAGTCTCTTTGCTATACCCA
GAAAACGTGCCAGGAAGAGAATCAGGACCTGAAGCAGACTACTGGA
AGGGAGACTCCAGCTCAAACAAGGCAGGGGTGGGGCGTGGGATGGG
GGTAGGGGAGGAATAGATACATTTCTCTTTCTGTTGTAAGAAAT
AAAGATAAGCCAGGCACAGTGGCTCACGCTGTAATCCACCACCTTTC
AGAGGCCAAGGCGCTGGATCCAGATCTCGAGCGGCCGCCCT**TGGCATC**
CCTGTGACCCCTCCCACTGCTCTCTTGGCCCTGGAAGTGGCACTC
CAGTGCCACCAGCCTTGTCTAATAAAAATTAAGTGCATCAAGATCG
ACGGGCCGTCGACTGCAGAGCC

(SEQ ID NO: 19)
Фиг. 2E

GCUAAGCACUUCGUGGCCGUGCAUCGUUUAAGGGAGGUAGUGAGUCG
ACCAGUGGAUCCUGGAGGUUUGUGAAGGUGUAUGCUG**AAGGACUUG**
AGGGACUCGAAGGUUUUGGCCACUGACUGACCUUCGAGUCUCAAGUCC
UUCAGGACACAAGGCCUGUUACUAGCACUCAUGGAACAAAUGGCC
AGAUCUGGCCGCACUCGAGAUUCUAGACCCAGCUUUCUUGUACAAG
UGGUUGAUCUAGAGGGCCCGGUUCGUGAU

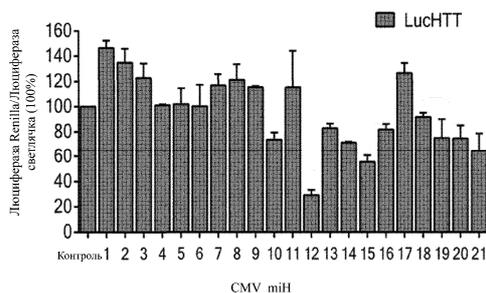
Fpri-miH12-155 (SEQ ID NO: 20)
Фиг. 2

GCUCCUGGGCAACGUGCUGGUUUAUGUGCUGUCUCAUUAUUUGGCAA
AGAAUUAAGGGCGAAUUCGAGCUCGUAACCUCGGAUUGCAUCUAGAU
AUCGGCGCUAUGCUUCUGGCCAGUGGGGCCUGGUGGGAUUU
CAUCAUAUCUGUAAGUUUGCAUGAGACACUACAGUAUAGAUAGU
ACUAGUCCGGGACCCCGACUCUGAGCCUGACAGGAGGACAGGAG
AGAUGCUGCAAGCCAAAGACUCUCUGCUCAGCCUGUCACAACCUAC
UGACUGCCAGGGCACUUGGAAUGGCAAG**AAGGACUUGAGGGACUCG**
AAGACGAGUCCCUAAGUCCUCUUGCUAUACCCAGAAAACGUGCCA
GGAAGAGAUCUCAGGCCUGAAGCAGACUACUGGAAGGGAGACUCCA
GCUCAAAACAAGCAGGGGUGGGGGCGUGGGAUUUGGGGUAGGGGAGGG
AAUAGAUACAUUUCUUCUUCUGUUGUAAAGAAAUAACAUAAGCCA
GGCACAGUGGCUACGCCUGUAUCCACACUUCAGAGGCCAAGGC
GCUUGAUCAGAUUCGAGCGGCCGCCCG

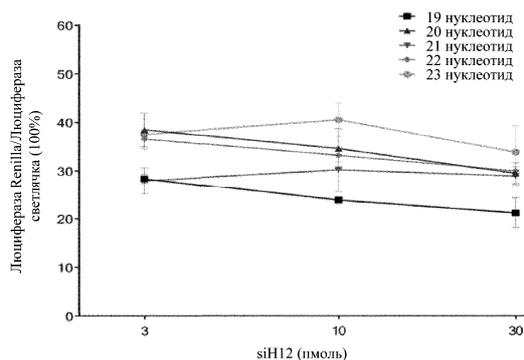
pri-miH12-451 (CAG-конструкция, SEQ ID NO: 21)
Фиг. 2G

AGUCUCGUGCAGAUGGACAGCACCGCUGAGCAAUGGAAGCGGGUAGGC
 CUUUGGGGACGCGCCAAUAGCAGCUUUGCUCUUCGCUUUCUGGGCUC
 CAGAGGUCUGGAAGGGUGGGUCCGGGGCGGGCUCAGGGCGGGCUC
 AGGGGCGGGCGGGCCCGGAAGGUCCUCCGGAGGCCCGGCAUUCUGC
 ACGCUUCAAAAGCGCACGUCUGCCGCGCUGUUCUCCUCUUCUCAUCU
 CCGGGCUUUCGACCCGGAUCCCGGGGUGCAGGAAUUCGAGCUCGG
 UACCUCGCGAAUGCAUCUAGAUAUCGGCGCUAUGCUUCUGUGCCCC
 AGUGGGCCUUGGCGGGAUUUCAUCAUAUACUGUAAGUUGCGAUGA
 GACACUACAGUAUAGAUAGUACUAGUCCGGGCACCCCGAGCUCUGG
 AGCCUGACAAGGAGGACAGGAGAUGCUGCAAGCCCAAGAAGCUCUC
 UGCUCAGCCUGUCACAACCUACUGACUGCCAGGGCACUUGGGAAUGGC
ААGGААGGАCUGAGGGACUCGААGACGAGUCCCUCAAGUCUCUCUU
 GCUAUACCCAGAAAACGUGCCAGGAAGAGAUCUCAGGACCCUGAAGCA
 GACUACUGGAAGGGAGACUCCAGCUCAAACAAGGCAGGGUGGGGGCG
 UGGAAUUGGGGUAGGGAGGGAAUAGAACAUUUUCUUCUUCUGUU
 GAAAAGAAUAAAGAUAAAGCCAGGCACAGUGGCUACGCCUGUAAUCC
 CACCACUUUCAGAGGCCAAGGCGUGGAUCCAGAUUCGAGCGGGCCG
 CCG

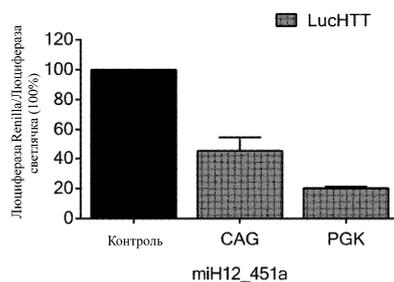
gri-miH12-451 (PGK-конструкция, SEQ ID NO: 22)
 Фиг. 2H



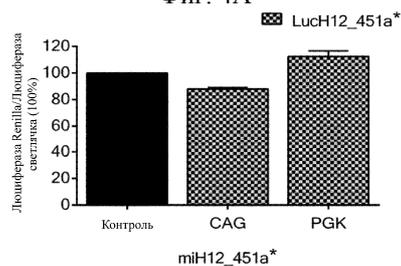
Фиг. 3A



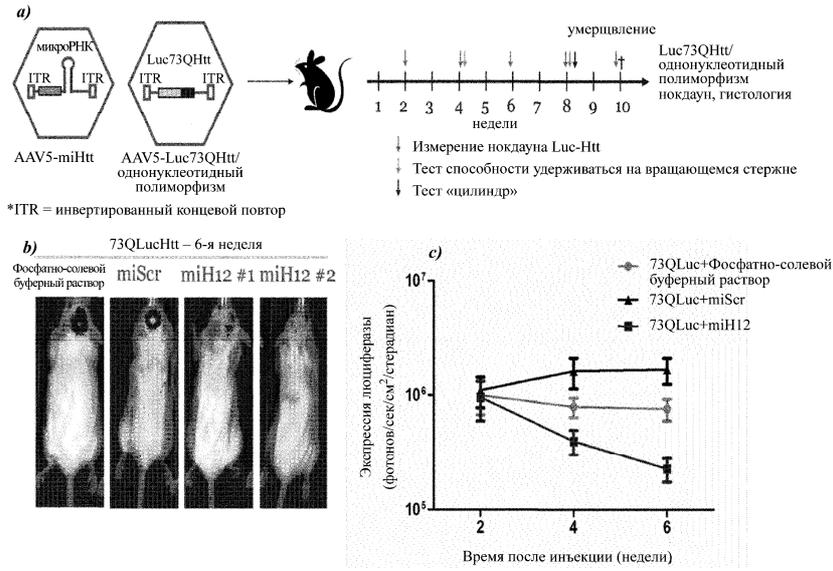
Фиг. 3B



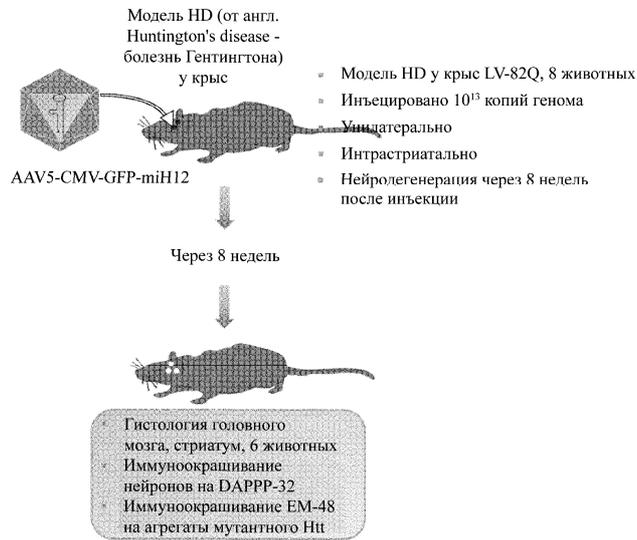
Фиг. 4A



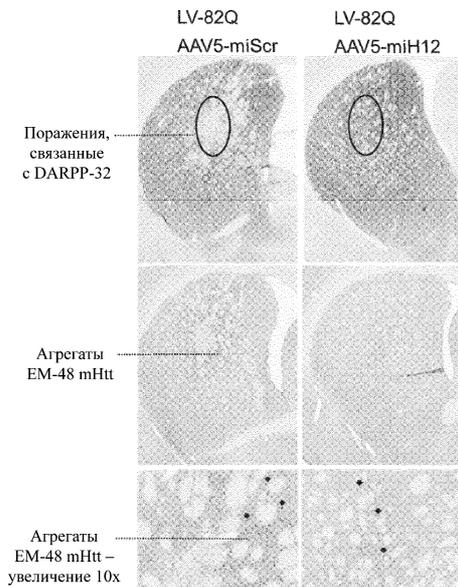
Фиг. 4B



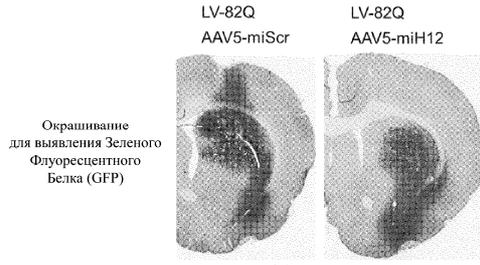
Фиг. 5



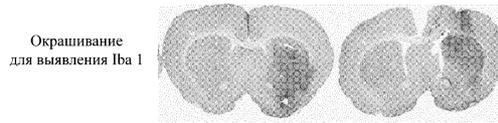
Фиг. 6А



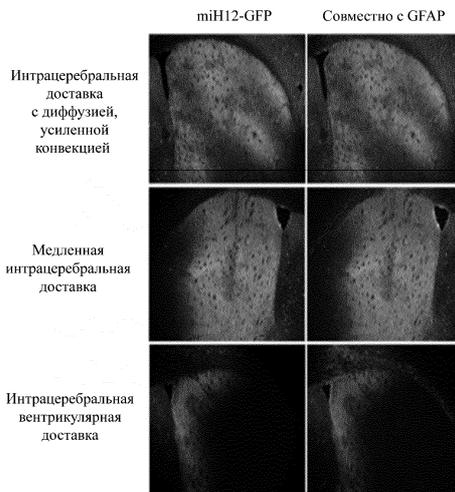
Фиг. 6В



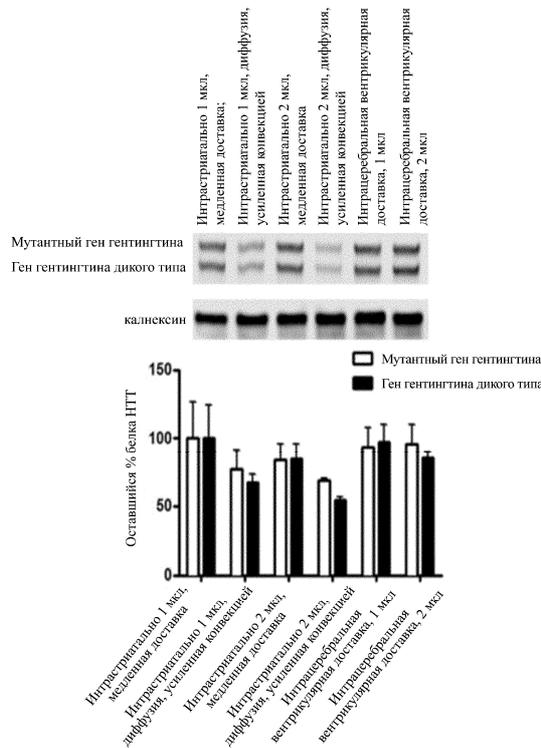
Фиг. 6С



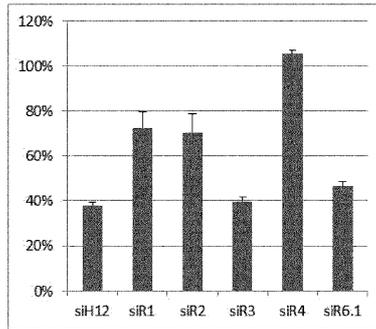
Фиг. 6D



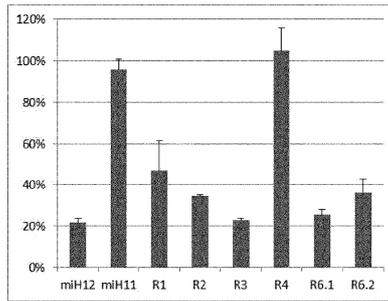
Фиг. 7А



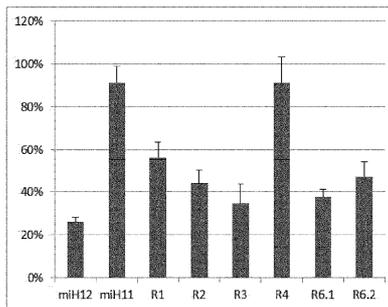
Фиг. 7В



Фиг. 8А



Фиг. 8В



Фиг. 8С

