

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **037993**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.06.21

(21) Номер заявки
201890493

(22) Дата подачи заявки
2016.09.23

(51) Int. Cl. *A61K 38/16* (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

(54) **РЕПРЕССОРЫ НТТ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) **62/222,588**

(32) **2015.09.23**

(33) **US**

(43) **2018.09.28**

(86) **PCT/US2016/053374**

(87) **WO 2017/053753 2017.03.30**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
САНГАМО ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.
(US)

(72) Изобретатель:
**Фрёлх Стивен, Миллер Джеффри К.,
Пацен Дэвид, Ребар Эдвард Дж.,
Цайтлер Брайан, Чжан Х. Стив (US)**

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) **US-A1-20140336133
US-A9-20070283460
US-A1-20130336947**

(57) В данном документе описаны репрессоры Нтт, а также способы и композиции для применения этих репрессоров Нтт.

B1

037993

037993

B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Данная заявка заявляет приоритет по предварительной заявке США № 62/222588, поданной 23 сентября 2015 года, которая включена в данное описание в качестве ссылки в полном объеме.

Область техники

Данное изобретение относится к области диагностики и лечения болезни Хантингтона.

Уровень техники

Болезнь Хантингтона (БХ), также известная как хорез Хантингтона, представляет собой прогрессирующее нарушение двигательных, когнитивных и психических функций. Средний возраст пациентов, при котором регистрируется начало этого заболевания, составляет 35-44 года, хотя в около 10% случаев болезнь начинается в возрасте до 21 года, а средняя продолжительность жизни после установления диагноза составляет 15-18 лет. Распространенность заболевания колеблется в диапазоне от около 3 до 7 случаев на 100000 населения западноевропейского происхождения. Болезнь Хантингтона является примером нарушений вызванных увеличением количества тринуклеотидных повторов, впервые выявленных в начале 1990-х годов (см. Di Prospero and Fischbeck (2005) *Nature Reviews Genetics* 6:756-765). Эти нарушения связаны с локализованной увеличением количества нестабильных повторов наборов трех нуклеотидов и могут привести к потере функции гена, в котором находится указанное увеличенное количество повтора, приобретению токсической функции или и к тому, и другому. Тринуклеотидные повторы могут локализоваться в любой части гена, включая некодирующие и кодирующие области гена. Повторы, локализованные в пределах кодирующих областей, обычно включают либо повторяющийся глутамин-кодирующий триплет (CAG), либо аланин-кодирующий триплет (CGA). Области с увеличенным количеством повторов в некодирующих последовательностях могут приводить к aberrантной экспрессии гена, в то время как увеличенные количества повторов в кодирующих областях (также известные как нарушения реитерации кодона) могут вызывать неправильное сворачивание и агрегацию белка. Точные патофизиологические причины, ассоциированные с aberrантными белками, часто являются неизвестными. Как правило, в генах дикого типа, которые подвержены увеличению количества тринуклеотидов, эти области содержат переменное количество повторяющихся последовательностей в нормальной популяции, но в пораженных популяциях количество повторов может увеличиваться, начиная от удвоения и до увеличения количества повторов на логарифмический порядок. При БХ повторы вставляются в область N-концевого кодирования большого цитозольного белка хантингтина (Htt). Нормальные аллели Htt содержат 15-20 повторов CAG, в то время как аллели, содержащие 35 или более повторов, можно рассматривать как аллели, потенциально обуславливающие БХ и придающие риск развития заболевания. Аллели, содержащие 36-39 повторов, считаются неполностью пенетрантными, и у тех индивидуумов, которые имеют эти аллели, может развиваться или может не развиваться указанное заболевание (или могут развиваться симптомы в более старшем возрасте), тогда как аллели, содержащие 40 повторов или более, считаются полностью пенетрантными. Фактически, не сообщалось о каких-либо бессимптомных субъектах, имеющих аллели БХ с этими множественными повторами. У тех индивидуумов, у которых начало БХ проявилось в молодом возрасте (<21 года), часто обнаруживается 60 или более повторов CAG. В дополнение к увеличению повторов CAG, также было показано, что БХ может включать +1 и +2 сдвигов рамки в повторяющихся последовательностях, в результате чего указанная область будет кодировать полисериновый полипептид (кодируемый повторами AGC в случае +1 сдвига рамки), а не полиглутаминовый (Davies and Rubinsztein (2006) *Journal of Medical Genetics* 43: 893-896).

При БХ мутантный аллель Htt обычно является унаследованным от одного родителя как доминирующий признак. Любой ребенок, рожденный от пациента с БХ, имеет 50% риск развития заболевания, если другой родитель не страдал от этой патологии. В некоторых случаях один из родителей может иметь промежуточный аллель БХ, не имея при этом клинических симптомов, в то время как у ребенка из-за увеличения количества повторов заболевание проявляется. Кроме того, аллель БХ может также проявлять феномен, известный как антиципация, при котором повышение тяжести или уменьшение возраста, при котором регистрируется начало заболевания, наблюдается в течение нескольких поколений из-за нестабильности природы области повторов во время сперматогенеза.

Кроме того, увеличение количества тринуклеотидов в Htt приводит к гибели средних проекционных шипиковых ГАМКергических (гамма-аминомасляная кислота) нейронов в стриатуме, при этом гибель нейронов также наблюдается в неокортексе. Средние шипиковые нейроны, которые содержат энкефалин и направляют выросты к внешнему бледному шару, являются более активными, чем нейроны, которые содержат вещество P и направляют выросты к внутреннему бледному шару. Другие области головного мозга, которые сильно поражаются у людей с болезнью Хантингтона, включают черную субстанцию, корковые слои 3, 5 и 6, область CA1 гиппокампа, угловую извилину в теменной доле, клетки Пуркинье мозжечка, боковые серобугорные ядра гипоталамуса и центромедиальный парафаскулярный комплекс таламуса (Walker (2007) *Lancet* 369:218-228).

Функции нормального белка Htt изучены недостаточно, но известно, что они могут вовлекаться в процессы нейрогенеза, апоптотической гибели клеток и перемещения везикул. Кроме того, имеются данные о том, что Htt дикого типа стимулирует продукцию нейротрофического фактора головного мозга (BDNF), фактора, способствующему выживанию стриарных нейронов. Продемонстрировано, что про-

гессия БХ коррелирует со снижением экспрессии BDNF в мышечных моделях БХ (Zuccato et al. (2005) *Pharmacological Research* 52(2): 133-139), и что доставка либо BDNF, либо нейротрофического фактора глиальной клеточной линии (GDNF) посредством системы доставки генов, опосредованной вектором адено-ассоциированного вируса (AAV), может обладать нейропротекторными свойствами в мышечных моделях БХ (Kells et al. (2004) *Molecular Therapy* 9(5): 682-688).

В настоящее время возможности диагностики и лечения БХ очень ограничены. Что касается диагностики, то уровни измененного (мутантного) Htt (mHTT) в значительной мере ассоциированы с балльной оценкой "бремени болезни", причем концентрация растворимых видов mHTT повышается с прогрессированием заболевания. Тем не менее, в ЦНС пациента трудно количественно оценить низкое содержание mHTT, что ограничивает как изучение нейробиологических характеристик БХ *in vivo*, так и включает возможность целевого назначения лекарственных средств, снижающих уровень Htt. См., например, Wild et al. (2014) *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 85:e4. Что касается лечения, то некоторые потенциальные методы с применением соединения гелданамицина, предназначенные для предотвращения токсичности, связанной с агрегацией белка, которая возникает в результате расширенной полиглутаминовой области, например, при сверхэкспрессии шаперонинов или индукции реакции теплового шока, продемонстрировали снижение указанной токсичности в моделях *in vitro*. Другие методы лечения нацелены на процессы апоптоза и ассоциированные с ним клинических проявлений заболевания. Например, замедление прогрессирования симптомов болезни было продемонстрировано посредством блокирования активности каспазы на моделях животных у потомков тех пар мышей, у которых у одного из родителей был аллель БХ, а другой родитель имел доминантный отрицательный аллель для каспазы 1. Кроме того, расщепление мутантного Htt БХ каспазой может играть роль в патогенезе заболевания. Обнаружено, что у трансгенных мышей, несущих резистентный к каспазе-6 мутантный Htt, поддерживается нормальная нейронная функция и не развивается нейродегенерация стриатума по сравнению с мышами, несущими мутантный аллель Htt, нерезистентный к каспазе (см. Graham et al. (2006) *Cell* 125: 1179-1191). Было также продемонстрировано, что молекулы, которые нацелены на апоптотический путь, способствуют замедлению прогрессирования симптомов. Например, было показано, что соединения zVAD-fmk и миноциклин, оба из которых ингибируют активность каспазы, замедляют развитие клинических проявлений болезни у мышей. Препарат ремачемид также применяли в небольших исследованиях с участием пациентов с БХ, по результатам которых следано предположение, что указанное соединение предотвращает связывание мутантного Htt с рецептором NDMA и таким образом предотвращает действие токсических эффектов на нервную клетку. Однако в этих исследованиях не наблюдали статистически значимых улучшений в показателях нейронной функции. Кроме того, группа исследователей, изучающих болезнь Хантингтона (Huntington Study Group), провела рандомизированное двойное слепое исследование с применением кофермента Q. Несмотря на то, что отмечалась тенденция к более медленному прогрессированию заболевания среди пациентов, которые получали кофермент Q10, достоверного изменения темпов снижения показателей общей функциональной способности не регистрировали. (Di Prospero and Fischbeck, там же).

Рекомбинантные факторы транскрипции и нуклеазы, содержащие ДНК-связывающие домены из белков с "цинковыми пальцами" ("ZFP"), TAL-эффекторные домены ("TALE") и системы транскрипционных факторов CRISPR/Cas (включая системы Cas и/или Cpf1) способны регулировать экспрессию эндогенных генов. См., например, патенты США №№ 9045763; 9005973; 8956828; 8945868; 8586526; 6534261; 6599692; 6503717; 6689558; 7067317; 7262054; 7888121; 7972854; 7914796; 7951925; 8110379; 8409861; патентные публикации США 20030232410; 20050208489; 20050026157; 20050064474; 20060063231; 20080159996; 201000218264; 20120017290; 20110265198; 20130137104; 20130122591; 20130177983 и 20130177960 и 20150056705, а также заявку на патент США № 14/706747; Perez-Pinera et al. (2013) *Nature Methods* 10:973-976; Platek et al. (2014) *Plant Biotechnology J.* doi: 10.1111/pbi. 12284), которые включены в данное описание посредством ссылки в полном объеме для всех целей. Кроме того, на основе системы Argonaute разрабатывают целенаправленные нуклеазы (например, из бактерии *T. thermophilus*, известной как "TtAgo", см. Swarts et al. (2014) *Nature* 507(7491): 258-261), которые также могут иметь потенциал для применения с целью редактирования генома и генной терапии. Клинические исследования с применением этих сконструированных факторов транскрипции, содержащих белки с "цинковыми пальцами", продемонстрировали, что эти новые факторы транскрипции могут быть эффективными в лечении различных патологических состояний (см., например, Yu et al. (2006) *FASEB J.* 20:479-481). Расщепление, опосредованное нуклеазой, включает применение сконструированных нуклеаз с целью индуцирования двухцепочечного разрыва (DSB) или одноцепочечного разрыва в целевой последовательности ДНК, в результате чего репарация разрыва с помощью процесса с ошибкой, такого как негомологичное соединение концов (NHEJ), или репарация с применением матрицы для репарации (репарация, направляемая гомологией, или HDR), может привести к нокауту гена или введению последовательности, представляющей интерес (целенаправленная интеграция). Введение двухцепочечного разрыва в отсутствие матрицы для репарации, поставляемой извне (см., например, "донор" или "трансген"), обычно применяют для инактивации целевого гена посредством мутаций (вставок и/или делеций, известных как "инсерционно-делеционные мутации"), вводимых посредством клеточного пути NHEJ. Например, па-

тентная публикация США 20110082093 описывает специфические белки с "цинковыми пальцами", нацеленные на Htt, а патентная публикация США № 20130253040 относится к ДНК-связывающим белкам, которые модулируют экспрессию аллеля БХ, такого как Htt. Публикация США № 20150335708 относится к способам модификации средние шипиковых нейронов. Тем не менее, по-прежнему существует потребность в разработке способов диагностики, изучения, лечения и/или предотвращения болезни Хантингтона, в том числе с применением моделей, способных обеспечить доставку с широким распространением в головном мозге.

Сущность изобретения

В данном документе описаны способы и композиции для диагностики, предотвращения и/или лечения болезни Хантингтона. В частности, в данном описании представлены способы и композиции для модификации (например, модулирующей экспрессии) аллеля БХ Htt с целью лечения болезни Хантингтона, включая репрессоры Htt (которые подавляют экспрессию Htt). Указанные композиции (репрессоры Htt), описанные в данном документе, обеспечивают терапевтический эффект у субъектов, например, путем уменьшения гибели клеток, снижения уровня апоптоза, усиления клеточной функции (метаболизма) и/или ослабления двигательных нарушений у субъектов. Также представлены способы и композиции, которые обеспечивают двунаправленный аксональный транспорт в мозге приматов. Неожиданно и на удивление для себя авторы данного изобретения обнаружили, что, в отличие от других серотипов AAV, которые ими применялись, AAV9 обеспечивал доставку с широким распространением в головном мозге, включая антероградный и ретроградный аксональный транспорт в области мозга, удаленные от места введения AAV9. Таким образом, в данном документе описан не встречающийся в природе белок с "цинковыми пальцами", который связывается с геном Htt, белок с "цинковыми пальцами", содержащий 5 доменов "цинковый палец", пронумерованных от F1 до F5, при этом домены "цинковый палец" содержат последовательности областей спиралей распознавания, показанные в одном ряду табл. 1.

Таким образом, в одном аспекте предлагаются сконструированные (не встречающиеся в природе) репрессоры Htt. Репрессоры могут содержать системы (например, белки с "цинковыми пальцами", TALE-эффекторные белки (TALE) или CRISPR/dCas-TF), которые модулируют экспрессию аллеля БХ (например, Htt). Сконструированные белки с "цинковыми пальцами" или TALE представляют собой не встречающиеся в природе белки с "цинковыми пальцами" или белки TALE, чьи ДНК-связывающие домены (например, спирали распознавания или RVD) были изменены (например, путем селекции и/или рационального проектирования) с целью связывания с предварительно выбранным целевым участком. Любой из белков с "цинковыми пальцами", описанных в данном документе, может включать 1, 2, 3, 4, 5, 6 или большее количество "цинковых пальцев", причем каждый "цинковый палец" имеет спираль распознавания, которая связывается с целевым участком в выбранной(ых) последовательности(ях), (например, в гене(ах)). Аналогично, любой из белков TALE, описанных в данном документе, может включать любое количество RVD TALE. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения по меньшей мере одна RVD характеризуется неспецифическим ДНК-связыванием. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения по меньшей мере одна спираль распознавания (или RVD) является такой, которая не встречается в природе. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения белки с "цинковыми пальцами" имеют спирали распознавания в белках, обозначенных 45643 или 46025 (табл. 1). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения репрессор содержит ДНК-связывающий домен (ZFP, TALE, единичную направляющую РНК), функционально связанный с доменом репрессии транскрипции. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения эти ZFP-TF, CRISPR/dCas-TF или TALE-TF включают домены взаимодействия белка (или "домены димеризации"), которые обеспечивают мультимеризацию при связывании с ДНК.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения белки с "цинковыми пальцами" (ZFP), белок Cas системы CRISPR/Cas или белки TALE, как описано в данном документе, могут быть помещены в функциональную связь с регуляторным доменом (или функциональным доменом) как часть слитого белка. Функциональным доменом может быть, например, домен активации, домен репрессии транскрипции и/или домен нуклеазы (расщепления). Выбирая либо домен активации, либо домен репрессии для применения с ДНК-связывающим доменом, такие молекулы могут применяться либо для активации, либо для подавления экспрессии генов. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается молекула, содержащая ZFP, dCas или TALE, нацеленная на мутантный Htt, как описано в данном документе, слитая с доменом репрессии транскрипции, которую можно применять для понижающей регуляции экспрессии мутантного Htt. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагается слитый белок, содержащий ZFP, CRISPR/Cas или TALE, нацеленные для аллель Htt дикого типа, слитый с доменом активации транскрипции, что может повышающе регулировать аллель Htt дикого типа. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения активность регуляторного домена регулируется экзогенной малой молекулой или лигандом, в результате чего в отсутствие экзогенного лиганда не будет происходить взаимодействие с механизмом транскрипции клетки, тогда как в других вариантах осуществления данного изобретения экзогенная малая молекула или лиганд предотвращают такое взаимодействие. Такие внешние лиганды контролируют степень взаимодействия ZFP-TF, CRISPR/Cas-TF или TALE-TF с механизмом транскрипции. Регуляторный(ые) домен(ы) может быть

функционально связан с любой частью(ями) одного или большего количества белков, выбранных из ZFP, dCas или TALE, в том числе между одним или большим количеством белков, выбранных из ZFP, dCas или TALE, вне одного или большего количества белков, выбранных из ZFP, dCas или TALE и любой их комбинацией. Любой из описанных в данном документе слитых белков может быть составлен в виде фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения сконструированные ДНК-связывающие домены, как описано в данном документе, могут быть помещены в функциональную связь с доменами нуклеазы (расщепления) как частью слитого белка. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения нуклеаза содержит нуклеазу Ttago. В других вариантах осуществления данного изобретения нуклеазные системы, такую как система CRISPR/Cas, можно применять со специфической единичной направляющей РНК для нацеливания нуклеазы в целенаправленное местоположение в ДНК. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения такие нуклеазы и слитые белки нуклеаз можно применять для нацеливания мутантных аллелей Htt в стволовых клетках, таких как индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC), эмбриональные стволовые клетки человека (hESC), мезенхимальные стволовые клетки (MSC) или нейронные стволовые клетки, при этом активность слитых белков нуклеаз приведет к получению аллеля Htt, содержащего количество повторов CAG дикого типа. Таким образом, любой из репрессоров Htt, описанных в данном документе, может дополнительно содержать домен димеризации и/или функциональный домен (например, домен активации транскрипции, домен репрессии транскрипции или домен нуклеазы). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения предлагаются фармацевтические композиции, содержащие модифицированные клетки (например, стволовые клетки).

В еще одном аспекте предлагается полинуклеотид, кодирующий один или большее количество описанных в данном документе ДНК-связывающих белков. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения полинуклеотид переносится вирусным (например, AAV или Ad) и/или невирусным (например, плазмиду или вектор мРНК) вектором. В данном изобретении также предлагаются клетки-хозяева, содержащие эти полинуклеотиды (например, AAV-векторы) и/или фармацевтические композиции, содержащие полинуклеотиды, белки и/или клетки-хозяева, как описано в данном документе.

В других аспектах данное изобретение включает доставку донора нуклеиновой кислоты в целевую клетку. Донор может быть доставлен до, после или вместе с нуклеиновой кислотой, кодирующей нуклеазу(ы). Донор нуклеиновой кислоты может содержать экзогенную последовательность (трансген), которая должна быть интегрирована в геном клетки, например, эндогенный locus. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения донор может содержать полноразмерный ген или его фрагмент, фланкированный областями гомологии с намеченным участком расщепления. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения донор не имеет гомологичных областей и интегрирован в целевой locus посредством независимого от гомологии механизма (т.е. NHEJ). Донор может содержать любую последовательность нуклеиновой кислоты, например нуклеиновую кислоту, которая при применении в качестве субстрата при направляемой гомологией репарации индуцированной нуклеазой двухцепочечного разрыва приводит к обусловленной донором делеции, которая должна быть сгенерирована в локусе эндогенной хромосомы или, в альтернативном (или в дополнительном) варианте, созданы новые аллельные формы эндогенного локуса (например, точечные мутации, которые удаляют участок связывания транскрипционного фактора). В некоторых аспектах донор нуклеиновой кислоты представляет собой олигонуклеотид, интеграция которого обуславливает явление коррекции гена или целенаправленную делецию. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения полинуклеотид, кодирующий ДНК-связывающий белок, представляет собой мРНК. В некоторых аспектах мРНК может быть химически модифицирована (см., например, Korgmann et al. (2011) *Nature Biotechnology* 29(2):154-157). В других аспектах мРНК может содержать кэп ARCA (см. патенты США 7074596 и 8153773). В других вариантах осуществления данного изобретения мРНК может содержать смесь немодифицированных и модифицированных нуклеотидов (см. публикацию заявки на патент США 2012-0195936). В еще одном аспекте предлагается вектор доставки гена, содержащий любой из описанных в данном документе полинуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения вектор представляет собой вектор аденовируса (например, вектор Ad5/F35), лентивирусный вектор (LV), включая способные или неспособные к интеграции лентивирусные векторы, или вектор адено-ассоциированного вируса (AAV). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения вектор AAV представляет собой вектор AAV6 или AAV9. Таким образом, в данном документе также представлены аденовирусные (Ad) векторы, LV или векторы адено-ассоциированного вируса (AAV), содержащие последовательность, кодирующую по меньшей мере одну нуклеазу (ZFN или TALEN) и/или донорную последовательность для целенаправленной интеграции в целевой ген. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения вектор Ad является химерным вектором Ad, например, вектором Ad5/F35. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения лентивирусный вектор представляет собой лентивирусный вектор, не содержащий интегразы (IDLV), или способный к интеграции лентивирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения вектор является псевдотипированной оболочкой VSV-G или другими оболочками.

Кроме того, в данном изобретении также предлагаются фармацевтические композиции, содержа-

шие нуклеиновые кислоты и/или белки (например, ZFP, Cas или TALE или слитые белки, содержащие ZFP, Cas или TALE). Например, некоторые композиции включают в себя нуклеиновую кислоту, содержащую последовательность, которая кодирует один из белков ZFP, Cas или TALE, описанных в данном документе, функционально связанных с регуляторной последовательностью, в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем или разбавителем, при этом регуляторная последовательность обеспечивает экспрессию нуклеиновой кислоты в клетке. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения кодируемые ZFP, CRISPR/Cas или TALE являются специфичными для аллеля БХ Htt. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения фармацевтические композиции включают в себя ZFP, CRISPR/Cas или TALE, которые модулируют аллель БХ Htt, а также ZFP, CRISPR/Cas или TALE, которые модулируют нейротрофический фактор. Композиции на основе белка включают в себя один из элементов: ZFP, CRISPR/Cas или TALE, как описано в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель. В еще одном аспекте также предлагается выделенная клетка, содержащая любой из белков, полинуклеотидов и/или композиций, как описано в данном документе.

В другом аспекте, описанном в данном документе, описаны способы модификации экспрессии гена Htt в клетке (например, в нейронной клетке *in vitro* или *in vivo* в головном мозге субъекта, например, в стриатуме), при этом указанный способ включает введение в клетку одного или большего количества белков, полинуклеотидов и/или клеток, как описано в данном документе. Ген Htt может содержать по меньшей мере один аллель Htt дикого типа и/или мутантный аллель Htt. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения экспрессию Htt подавляют.

В другом аспекте данного изобретения предлагаются способы лечения и/или предотвращения болезни Хантингтона с помощью способов и композиций (белков, полинуклеотидов и/или клеток), описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанные способы включают а себя композиции, в которых полинуклеотиды и/или белки могут доставляться с помощью вирусного вектора, невирусного вектора (например, плазмиды) и/или их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанные способы включают а себя композиции, содержащие популяции стволовых клеток, содержащие ZFP или TALE, или измененные с помощью нуклеазной системы ZFN, TALEN, Ttago или CRISPR/Cas по данному изобретению. Субъект может содержать по меньшей мере один мутантный аллель Htt и/или аллель Htt дикого типа. Еще одним аспектом, описанном в данном документе, является способ доставки репрессора Htt в головной мозг субъекта с помощью вектора AAV (например, AAV9). Доставка может осуществляться в любую область головного мозга, например, стриатум (например, в скорлупу (путамен)) с помощью любых пригодных способов, включая применение катетера. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения доставка осуществляется посредством непосредственной инъекции в интратекальное пространство. В других вариантах осуществления данного изобретения доставка осуществляется посредством внутривенной инъекции. Вектор AAV9 обеспечивает доставку репрессора с широким распространением в головном мозге субъекта, включая антероградный и ретроградный аксональный транспорт в области мозга, в которые вектор непосредственно не вводят (например, доставка к скорлупе обеспечивает доставку к другим структурам, таким как кора, черная субстанция, таламус и т.д. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения субъект является человеком, а в других вариантах осуществления данного изобретения субъект является приматом, не относящимся к человеку.

Таким образом, в других аспектах, описанных в данном документе, предлагается способ предотвращения и/или лечения БХ у субъекта, при этом способ включает введение субъекту репрессора мутантного аллеля Htt. Репрессор можно вводить в форме полинуклеотида (например, с помощью вирусного (например, AAV) и/или невирусного вектора (например, плазмиды и/или мРНК), в форме белка и/или с помощью фармацевтической композиции, как описано в данном документе (например, фармацевтической композиции, содержащей полинуклеотид, вектор AAV, белок и/или клетку, как описано в данном документе). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения репрессор вводят в ЦНС (например, в скорлупу) субъекта. Репрессор может проявлять терапевтические эффекты, включая, но не ограничиваясь этим, снижение образования агрегатов Htt в нейронах БХ у субъекта с БХ; уменьшение гибели клеток в нейроне или популяции нейронов (например, в нейроне или популяции нейронов БХ); и/или ослабление интенсивности двигательных нарушений (например, хватательных движений) у субъектов с БХ.

В любом из способов, описанных в данном документе, репрессором мутантного аллеля Htt может быть ZFP-TF, например, слитый белок, содержащий ZFP, который специфически связывается с мутантным аллелем Htt и доменом репрессии транскрипции (например, KOX, KRAB и т.д.). В других вариантах осуществления данного изобретения репрессором мутантного аллеля Htt может быть TALE-TF, например слитый белок, содержащий полипептид TALE, который специфически связывается с мутантным аллелем Htt и доменом репрессии транскрипции (например, KOX, KRAB и т.д.). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения репрессор мутантного аллеля Htt представляет собой систему CRISPR/Cas-TF, в которой домены нуклеазы в белке Cas инактивированы таким образом, что белок больше не расщепляет ДНК. Получаемый в результате Cas РНК-направленный ДНК-связывающий домен сливается с репрессором транскрипции (например, KOX, KRAB и т.д.) с целью репрессии мутантного ал-

леля Htt. В еще одном варианте осуществления данного изобретения репрессор может содержать нуклеазу (например, ZFN, TALEN и/или систему CRISPR/Cas), которая подавляет мутантный аллель Htt путем расщепления и тем самым инактивирует мутантный аллель Htt. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения нуклеаза вводит вставку и/или делецию ("инсерционно-делеционную мутацию") посредством негомологического концевое соединения (NHEJ) после расщепления нуклеазой. В других вариантах осуществления данного изобретения нуклеаза вводит донорную последовательность (посредством гомологичных или негомологичных способов), в которой интеграция донора инактивирует мутантный аллель Htt.

В любом из способов, описанных в данном документе, репрессор может быть доставлен в организм субъекта (например, в головной мозг) в виде белка, полинуклеотида или любой комбинации белка и полинуклеотида. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения репрессор(ы) доставляют с помощью вектора AAV (например, AAV9). В других вариантах осуществления данного изобретения по меньшей мере один компонент репрессора (например, sgRNA из системы CRISPR/Cas) доставляют в форме РНК. В других вариантах осуществления данного изобретения репрессор(ы) доставляют с помощью комбинации любой из экспрессионных конструкций, описанных в данном документе, например, один репрессор (или его часть) на одну экспрессионную конструкцию (например, AAV, такую как AAV9) и один репрессор (или его часть) на отдельную экспрессионную конструкцию (AAV или другую вирусную или невирусную конструкцию).

Кроме того, в любом из способов, описанных в данном документе, репрессоры можно доставлять в любой концентрации (дозе), которая обеспечивает желаемый эффект. В предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения репрессор доставляют с помощью вектора адено-ассоциированного вируса с концентрацией 10000-500000 векторных геномов/клетку (или любым значением в этом диапазоне). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения репрессор доставляют с помощью лентивирусного вектора при MOI (множественность заражения) от 250 до 1000 (или любым значением в этом диапазоне). В других вариантах осуществления данного изобретения репрессор доставляют с помощью плазмидного вектора при 150-1500 нг/100000 клеток (или любым значением в этом диапазоне). В других вариантах осуществления данного изобретения репрессор доставляют в виде мРНК при 150-1500 нг/100000 клеток (или любым значением в этом диапазоне).

В результате осуществления любого из способов, описанных в данном документе, можно получить около 70% или более, около 75% или более, около 85% или более, около 90% или более, около 92% или более или около 95% или более репрессии мутантного аллеля Htt в одном или большем количестве нейронов БХ у субъекта.

В дополнительных аспектах описанное в данном документе изобретение включает в себя один или большее количество Htt-модулирующих факторов транскрипции, таких как Htt-модулирующие факторы транскрипции, содержащие один или большее количество белков с "цинковыми пальцами" (ZFP TF), TALE (TALE-TF) и CRISPR/Cas-TF, например, ZFP-TF, TALE-TF или CRISPR/Cas-TF. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения Htt-модулирующий фактор транскрипции может подавлять экспрессию мутантного аллеля Htt в одном или большем количестве нейронов БХ у субъекта. Репрессия может составлять около 70% или более, около 75% или более, около 85% или более, около 90% или более, около 92% или более, или около 95% или более репрессии мутантных аллелей Htt в одном или большем количестве нейронов БХ у субъекта по сравнению с нейронами без воздействия (дикого типа) у субъекта. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения Htt-модулирующий фактор транскрипции можно применять для реализации одного или большего количества описанных в данном документе способов.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения терапевтическую эффективность оценивают с помощью Унифицированной оценочной шкалы болезни Хантингтона (UHDRS) (Группа исследователей, изучающих болезнь Хантингтона, (1996) *Mov Disord* 11 (2): 136-142), на основании анализа наблюдаемых клинических симптомов. В других вариантах осуществления данного изобретения эффективность у пациентов оценивают с помощью ПЭТ и МРТ. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения лечение с применением фактора модулирования транскрипции мутантного Htt предотвращает дальнейшее развитие выраженных клинических симптомов и предотвращает дальнейшую потерю функциональности нейронов. В других вариантах осуществления данного изобретения лечение с применением фактора модулирования транскрипции мутантного Htt ослабляет клинические симптомы и улучшает функцию нейронов. Также в данном изобретении предлагается набор, содержащий один или большее количество Htt-модуляторов AAV9 (например, репрессоров) и/или полинуклеотидов, содержащих компоненты кодирующих Htt-модуляторов и/или кодирующие Htt-модуляторы (или их компоненты), как описано в данном документе. Наборы могут дополнительно содержать клетки (например, нейроны), реагенты (например, для обнаружения и/или количественного определения белка mHtt, например, в СМЖ (спинномозговая жидкость)) и/или инструкции для применения, включая способы, описанные в данном документе.

Таким образом, настоящее изобретение охватывает, но не ограничивается этим, следующие перечисленные варианты осуществления.

1. Не встречающийся в природе белок с "цинковыми пальцами", который связывается с геном Htt, причем белок с "цинковыми пальцами" содержит 5 доменов "цинковый палец", пронумерованных от F1 до F5, при этом домены "цинковый палец" содержат последовательности областей спиралей распознавания, показанные в одном ряду табл. 1.

2. Репрессор Htt по п.1, дополнительно содержащий домен димеризации, который обеспечивает мультимеризацию белков с "цинковыми пальцами" при связывании с ДНК.

3. Слитый белок, содержащий белок с "цинковыми пальцами" по п.1 или 2 и функциональный домен.

4. Слитый белок по п.3, отличающийся тем, что его функциональный домен выбран из группы, состоящей из домена активации транскрипции, домена репрессии транскрипции и домена нуклеазы.

5. Полинуклеотид, кодирующий один или большее количество белков с "цинковыми пальцами" по пп.1-2 или один или большее количество слитых белков по п.3 или 4.

6. Вектор AAV, содержащий полинуклеотид по п.5.

7. Вектор AAV по п.6, отличающийся тем, что вектор представляет собой вектор AAV9.

8. Клетка-хозяин, содержащая один или большее количество белков с "цинковыми пальцами" по пп.1-2 или один или большее количество слитых белков по п.3 или 4, один или большее количество полинуклеотидов согласно п.5 или один или большее количество векторов AAV согласно п.6 или 7.

9. Фармацевтическая композиция, содержащая один или большее количество белков с "цинковыми пальцами" по пп.1-2 или один или большее количество слитых белков по п.3 или 4, один или большее количество полинуклеотидов согласно п.5 или один или большее количество векторов AAV согласно п.6 или 7.

10. Способ модификации экспрессии гена Htt в клетке, включающий введение в клетку одного или большего количества полинуклеотидов согласно п.5 или одного или большего количества векторов AAV согласно п.6 или 7.

11. Способ по п.10, отличающийся тем, что ген Htt содержит по меньшей мере один мутантный аллель.

12. Способ по п.10, отличающийся тем, что ген Htt является геном дикого типа.

13. Способ по любому из пп.10-12, отличающийся тем, что слитый белок содержит домен репрессии, и экспрессия гена Htt репрессируется.

14. Способ по любому из пп.10-13, отличающийся тем, что клетка представляет собой нейронную клетку.

15. Способ по п.14, отличающийся тем, что нейронная клетка находится в головном мозге.

16. Способ по п.15, отличающийся тем, что нейронная клетка находится в стриатуме головного мозга.

17. Способ лечения и/или предотвращения болезни Хантингтона у субъекта, нуждающегося в этом, при этом способ включает введение одного или большего количества полинуклеотидов согласно п.5 или одного или большего количества векторов AAV согласно п.6 или 7 субъекту, нуждающемуся в этом.

18. Способ модификации экспрессии гена Htt в клетке, включающий введение в клетку одного или большего количества векторов AAV9, векторов AAV9, кодирующих один или большее количество репрессоров Htt.

19. Способ по п.18, отличающийся тем, что ген Htt содержит по меньшей мере один мутантный аллель.

20. Способ по п.18, отличающийся тем, что ген Htt является геном дикого типа.

21. Способ по любому из пп.18-21, отличающийся тем, что слитый белок содержит домен репрессии, и экспрессия гена Htt репрессируется.

22. Способ по любому из пп.18-21, отличающийся тем, что клетка представляет собой нейронную клетку.

23. Способ по п.22, отличающийся тем, что нейронная клетка находится в головном мозге.

24. Способ по п.23, отличающийся тем, что нейронная клетка находится в стриатуме головного мозга.

25. Способ лечения и/или предотвращения болезни Хантингтона у субъекта, нуждающегося в этом, при этом способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, одного или большего количества векторов AAV9, векторов AAV9, кодирующих один или большее количество репрессоров Htt. Эти и другие аспекты будут очевидны для квалифицированного специалиста в контексте изложенной в данном документе информации в целом.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1A-1J представлены изображения, демонстрирующие результаты после инфузионного введения векторов AAV9 в скорлупу (путамен) приматов, не относящихся к человеку (ПНЧ). Сравнительные панели результатов инфузионного билатерального введения AAV9-GFP (100 мкл) под контролем МРТ-визуализации в скорлупу 2 нормальных приматов, не относящихся к человеку (обозначенных как ПНЧ-1 и ПНЧ-2), приведены на фиг. 1A и 1B, а 3-мерные реконструкции каждого субъекта приведены на фиг. 1C и 1D. Реконструированные объемы каждой скорлупы (n = 4), помеченные синим, имели размер

около 850 мкл у ПНЧ-1 и 625 мкл у ПНЧ-2. Инфузат, содержащий частицы AAV9-GFP и хелатный гадолиниевый реагент для визуализации, помеченный оранжевым, распределялся примерно по 350 мкл для каждой инфузии. На фиг. 1E, 1F и 1G изображены фронтальные, сагитальные левые и сагитальные правые виды (соответственно) путей траектории катетера у ПНЧ-1, а на фиг. 1H, 1I и 1J изображены фронтальные, сагитальные левые и сагитальные правые виды (соответственно) путей траектории катетера у ПНЧ-2.

На фиг. 2A-2H изображена AAV9-опосредованная экспрессия GFP в скорлупе ПНЧ и врожденный иммунный статус. На фиг. 2A и 2B изображено окрашивание GFP внутри скорлупы. Изображения с высоким увеличением, которые помещены в рамку и показаны ниже, демонстрируют NeuN-позитивные клетки в скорлупе, в которую вводили либо высокую дозу ("ВД", левое полушарие, $1,5 \times 10^{13}$ вг/мл (вирусных геномов на мл)), либо низкую дозу ("НД", правое полушарие, $1,5 \times 10^{12}$ вг/мл) вектора. На фиг. 2C и 2D представлены графики, изображающие основную область трансдукции (РАТ), показанную белым цветом, а область внутри скорлупы "снаружи" GFP-позитивного сигнала называется "oРАТ" и показана серым цветом. В результате подсчета количества NeuN-позитивных клеток в трех фронтальных позициях при РАТ и oРАТ, выполненный наряду с наивными контрольными ПНЧ внутри скорлупы, не выявили заметной разницы в сигнале NeuN при сравнении полушарий с низкой и высокой дозой. Подсчет локализованных GFP-позитивных/NeuN-позитивных клеток показал, что трансдукция составляет около 74% в РАТ от низкой до нулевой эффективности в oРАТ. Данные представлены как среднее количество клеток \pm СО. Р-значения (*) <0,01 для трансдуцированных клеток в пределах РАТ и oРАТ, ранговый ранговый S-критерий Уилкоксона. Масштабная линейка для фиг. 2A-2D: 50 мкм. На фиг. 2E, 2F, 2G и 2H изображены дистальные (фиг. 2E и 2F) и проксимальные (фиг. 2G и 2H) сравнения врожденного иммунного статуса. Повышение количества позитивно окрашенных МНСII (фиг. 2E и 2G, масштабная линейка 50 мкм) и активация Iba1 (фиг. 2F и 2H, масштабная линейка 200 мкм) показана проксимально от места инфузии по сравнению с дистальным участком.

На фиг. 3A-3F изображен клеточный тропизм векторов AAV9 в месте инфузии в скорлупу указанных мишеней (NeuN, GFAP, Iba1, красный цвет), GFP (зеленый) и иммунофлуоресценции с двойным мечением (желтый). На фиг. 3A, 3B и 3C приведены результаты для ПНЧ-1, а на фиг. 3D, 3E и 3F приведены результаты для ПНЧ-2. Иммунофлуоресценция с двойным мечением выявила экспрессию GFP как в NeuN-позитивных, так и в GFAP-позитивных клетках. Напротив, капсиды не трансдуцировали Iba1-позитивные тела клеток, что указывает на то, что AAV9, по-видимому, не трансдуцирует микроглию. Масштабная линейка: 50 мкм.

На фиг. 4A и 4B изображен ретроградный аксональный транспорт AAV9 от скорлупы к коре. Во фронтальных срезах головного мозга, полученных от ПНЧ-1 (фиг. 4A) и ПНЧ-2 (фиг. 4B), спереди (i и ii) и сзади (iii и iv) от тракта катетера отмечали устойчивый аксональный транспорт AAV9-GFP вдоль кортико-стриальных выростов. Изображения областей с высоким увеличением в черном квадрате, обозначенных как "i" "ii" "iii" и "iv.", демонстрируют повышенную экспрессию GFP в телах клеток и волокнах коры в пределах полушария, получающего высокую дозу вектора, что указывает на эффект дозы по отношению к контралатеральной стороне. Масштабная линейка: 200 мкм.

На фиг. 5A и 5B изображен аксональный транспорт в дистальные области. На фиг. 5A приведены результаты для ПНЧ-1, а на фиг. 5B приведены результаты для ПНЧ-2. В результате инфузионного введения AAV9 в скорлупу GFP-позитивные клетки определялись во многих дистальных областях, которые известны своей функциональной зависимостью от скорлупы. Также изображена иммуногистохимия анти-GFP с приблизительным положением каждого фронтального среза 12 мм сзади от тракта катетера. Изображения с высоким увеличением ниже соответствуют левому и правому полушариям бледного шара ("GP"), таламусу, субталамическому ядру ("STN"), медиальному пучку переднего мозга ("MFB") и черной субстанции ("SN"). Масштабная линейка: 500 мкм.

На фиг. 6A и 6B изображен аксональный транспорт AAV в сетчатый слой и компактный слой черной субстанции. На фиг. 6A приведены результаты для ПНЧ-1, а на фиг. 6B приведены результаты для ПНЧ-2. Иммунофлуоресценция с двойным мечением (желтый цвет) определяется для GFP-позитивных (зеленый цвет) и тирозингидроксилаза-позитивных (красный цвет) тел клеток в волокнах компактного слоя черной субстанции ("SNc") и в волокнах сетчатого слоя ("SNr"). Окрашивание тирозингидроксилазы ("TH") идентифицирует дофаминергические нейроны. Трансдукция тел клеток в SNr и SNc демонстрирует как антероградный, так и ретроградный аксональный транспорт, соответственно. Повышенная экспрессия GFP наблюдалась между ипсилатеральными (высокая доза) и контралатеральными (низкая доза) полушариями. Масштабная линейка: 500 мкм.

На фиг. 7 приведено схематическое изображение путей нейронной связи в головном мозге приматов. На схеме проиллюстрирована антероградная и ретроградная транспортная система и эффект дозы между полушариями мозга ПНЧ, получившими высокую дозу (левое) и низкую дозу (правое). Вирусные частицы AAV9-GFP на участке введения в стриатум ("Str"), окрашенные в серый цвет, переносились ретроградно во вторичные области мозга, включая кору ("Ctx"), таламус ("Th") и компактный слой черной субстанции ("SNc"). Антероградный транспорт вирусных частиц был нацелен на сетчатый слой ("SNr").

Транспорт либо путем периваскулярного распространения, либо антероградного аксонального переноса в бледный шар ("GP") в свою очередь обуславливал аксональный транспорт в субталамическое ядро ("STN"). Наличие нейронных GFP-позитивных волокон обозначено серыми штрихами, а наличие GFP-позитивных тел клеток - черными точками. Отсутствие трансдуцированных тел клеток обозначено пустым кружком.

На фиг. 8 представлен график, демонстрирующий профили экспрессии либо гена Htt дикого типа (серые столбцы, CAG18), либо мутантного гена Htt (черные столбцы, CAG45) в фибробластах пациентов с БХ, которые получали либо ZFP 46025, ZFP 45643, либо контроль GFP. Данные показывают, что, хотя уровень экспрессии аллеля Htt дикого типа является довольно постоянным во всех образцах, клетки, на которые воздействовали мутантными Htt-специфическими ZFP, снижали экспрессию мутантного Htt при более высоких дозах мРНК ZFP.

На фиг. 9 представлен график, демонстрирующий профили экспрессии либо гена Htt дикого типа (серые столбцы, CAG21), либо мутантного гена Htt (черные столбцы, CAG38) в фибробластах пациентов с БХ, которые получали либо ZFP 46025, ZFP 45643, либо контроль GFP. Данные показывают, что, хотя уровень экспрессии аллеля Htt дикого типа является довольно постоянным во всех образцах, клетки, на которые воздействовали мутантными Htt-специфическими ZFP, снижали экспрессию мутантного Htt при более высоких дозах мРНК ZFP.

На фиг. 10 представлен график, демонстрирующий профили экспрессии либо гена Htt дикого типа (серые столбцы, CAG17), либо мутантного гена Htt (черные столбцы, CAG48) в нейронах, которые были отдифференцированы из эмбриональных стволовых клеток БХ. Данные показывают, что при более высоких дозах мРНК, кодирующей ZFP, мутантный ген Htt репрессировался, тогда как аллель Htt дикого типа - не репрессировался.

На фиг. 11A и 11B представлены графики, демонстрирующие репрессию Htt в отдифференцированных нейронах CAG17/48, при этом применяемые ZFP доставляли с помощью вирусных векторов AAV6 или AAV9. Векторы AAV6 (фиг. 11A) или векторы AAV9 (фиг. 11B), кодирующие ZFP 46025, 45643 или контроль GFP, применяли для инфицирования нейронов, отдифференцированных из эмбриональных стволовых клеток БХ (ЭСК) GENEА020 (GENEA/CHDI) в двух повторностях. Приведенные данные демонстрируют, что мутантный аллель Htt репрессировался посредством ZFP при доставке либо с помощью AAV6, либо с помощью AAV9 по сравнению с клетками, на которые воздействовали контролем GFP, или клетками, на которые воздействовали согласно протоколу трансфекции пустым вектором.

На фиг. 12A и 12B представлены графики, демонстрирующие эффект воздействия ZFP на фенотипические характеристики нейронов БХ. На фиг. 12A продемонстрировано, что уровни АТФ отмечались выше в тех нейронах БХ, на которые воздействовали ZFP, по сравнению с клетками, на которые воздействовали контролем VENUS или имитировали воздействие. Для сравнения, в нейронах дикого типа не наблюдали какого-либо эффекта от воздействия ZFP. На фиг. 12B приведен процент клеток, которые являются TUNEL-позитивными (маркер апоптоза), и продемонстрировано, что нейроны БХ, на которые воздействовали ZFP, имеют меньшее количество TUNEL-позитивных клеток, чем контрольные образцы. Для сравнения на графике также показаны данные для нейронов дикого типа.

На фиг. 13A-13C представлены графики, изображающие активность ZFP *in vivo*, проанализированную на гетерозиготных мышах HdhQ50/Hdh + (Q50) после интрастриального инъекционного введения векторов AAV9, кодирующих ZFP 46025, ZFP 45643 или контроль GFP. Мыши Q50 содержат аллель, в котором экзон 1 эндогенного гена Hdh мыши заменен экзоном 1 гена Htt человека с 48 CAG. Через 5 недель после инъекции, аллель-специфичный анализ обработанного стриатума методом колПЦР в реальном времени показал, что ZFP 45643 и ZFP 46025 репрессируют мутантный аллель Htt (Q50) на 79% и 74% соответственно по сравнению с носителем, вводимым в качестве контроля; при этом аллель дикого типа (Q7) не регулировался никаким ZFP (фиг. 13A и 13B). Активность ZFP 45643 также анализировали через 12 недель после инъекции (фиг. 13C), и наблюдали значительную репрессию (70%) мутантного Htt (Q50) без репрессии аллеля дикого типа (Q7).

Подробное описание

В данном изобретении предлагаются композиции и способы доставки композиций с широким распространением в ЦНС для обнаружения, мониторинга прогрессирования заболевания, лечения и/или предотвращения болезни Хантингтона (БХ). В частности, в композициях и способах, описанных в данном документе, применяются векторы AAV9 для доставки репрессоров Htt, что обеспечивает распространение функциональных репрессоров Htt за пределы места доставки. Репрессоры Htt (например, Htt-модулирующие факторы транскрипции, такие как Htt-модулирующие факторы транскрипции, содержащие белки с "цинковыми пальцами" (ZFP TF), TALE (TALE-TF) или CRISPR/Cas-TF, например ZFP-TF, TALE-TF или CRISPR/Cas-TF, которые подавляют экспрессию мутантного аллеля Htt) модифицируют ЦНС, вследствие чего проявления и/или симптомы БХ снижаются или устраняются, например, в результате уменьшения агрегации Htt в нейронах БХ, увеличения энергетической емкости нейронов БХ (например, повышение уровня АТФ), уменьшения апоптоза в нейронах БХ и/или ослабления интенсивности двигательных нарушений у субъектов с БХ.

Общие сведения

Для реализации способов на практике, а также при приготовлении и применении описанных в данном документе композиций используют, если не указано иное, обычные методы молекулярной биологии, биохимии, структуры и анализа хроматина, вычислительной химии, культуры клеток, рекомбинантной ДНК и методы смежных областей, которые находятся в пределах компетентности специалиста данной области техники. Эти методы в полной мере описаны в литературе. См., например, Sambrook et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 и Third edition, 2001; Ausubel et al., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New York, 1987 и периодические обновления; серии METHODS IN ENZYMOLOGY, Academic Press, San Diego; Wolffe, CHROMATIN STRUCTURE AND FUNCTION, Third edition, Academic Press, San Diego, 1998; METHODS IN ENZYMOLOGY, Vol. 304, "Chromatin" (P.M. Wassarman and A. P. Wolffe, eds.), Academic Press, San Diego, 1999; и METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Vol. 119, "Chromatin Protocols" (P.B. Becker, ed.) Humana Press, Totowa, 1999.

Определения

Термины "нуклеиновая кислота", "полинуклеотид" и "олигонуклеотид" применяются взаимозаменяемо для обозначения дезоксирибонуклеотидного или рибонуклеотидного полимера, линейной или кольцевой конформации, а также находящегося либо в одно-, либо в двух-цепочечной форме. Для целей данного изобретения эти термины не следует рассматривать как ограничивающие длину полимера. Термины могут включать известные аналоги природных нуклеотидов, а также нуклеотиды, которые модифицированы в основной, сахарной и/или фосфатных частях (например, фосфортиоатные остовы). В общем, аналог конкретного нуклеотида имеет одинаковую специфичность спаривания оснований; т.е., аналог А будет парой оснований сТ.

Термины "полипептид", "пептид" и "белок" применяются взаимозаменяемо для обозначения полимера аминокислотных остатков. Этот термин также относится к аминокислотным полимерам, в которых одна или большее количество аминокислот являются химическими аналогами или модифицированными производными соответствующей встречающейся в природе аминокислоты.

Термин "связывание" относится к последовательностному, нековалентному взаимодействию между макромолекулами (например, между белком и нуклеиновой кислотой). Не все компоненты связывающего взаимодействия нуждаются в специфичности относительно последовательности (например, контакты с фосфатными остатками в остове ДНК), при условии, что взаимодействие в целом является специфичным относительно последовательности. Как правило, такие взаимодействия характеризуются константой диссоциации (K_d) 10^{-6} М⁻¹ или ниже. Термин "аффинность" относится к прочности связывания: повышенная аффинность связывания коррелирует с более низким значением K_d .

"Связывающий белок" представляет собой белок, который способен нековалентно связываться с другой молекулой. Связывающий белок может связываться, например, с молекулой ДНК (ДНК-связывающий белок), молекулой РНК (РНК-связывающий белок) и/или белковой молекулой (белок-связывающий белок). В случае белок-связывающего белка он может связываться с самим собой (с образованием гомодимеров, гомотримеров и т.д.) и/или он может связываться с одной или большим количеством молекул другого белка или белков. Связывающий белок может иметь более одного типа активности связывания. Например, белки с "цинковыми пальцами" имеют ДНК-связывающую, РНК-связывающую и белок-связывающую активность.

"ДНК-связывающий белок с "цинковыми пальцами" "(или связывающий домен) представляет собой белок или домен в более крупном белке, который связывает ДНК с помощью специфичного для последовательности способа с применением одного или большего количества "цинковых пальцев", которые являются областями аминокислотной последовательности в пределах связывающего домена, структура которого стабилизирована путем координации иона цинка. Термин "ДНК-связывающий белок с "цинковыми пальцами" часто сокращается как белок с "цинковыми пальцами" или ZFP.

"ДНК-связывающий домен TALE" или "TALE" представляет собой полипептид, содержащий один или большее количество повторных доменов/единиц TALE. Повторные домены участвуют в связывании TALE с узнаваемой им последовательностью целевой ДНК. Как правило, одна "единица повтора" (также называемая "повтором") составляет 33-35 аминокислот в длину и демонстрирует по меньшей мере некоторую гомологию последовательности с другими последовательностями повтора TALE в белке TALE, встречающемся в природе. См., например, патент США № 8586526.

"TtAgo" представляет собой прокариотический белок Argonaute, который, как считается, участвует в сайленсинге генов. TtAgo происходит от бактерий *Thermus thermophilus*. См., например, Swarts et al. (2014) *Nature* 507(7491):258-261, G. Sheng et al. (2013) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 652). "Система TtAgo" представляет собой набор всех необходимых компонентов, включая, например, направляющие ДНК для расщепления ферментом TtAgo. "Рекомбинация" относится к процессу обмена генетической информацией между двумя полинуклеотидами, включая, но не ограничиваясь этим, захват донора с помощью негомологичного концевого соединения (NHEJ) и гомологичной рекомбинации. Для целей данного изобретения термин "гомологичная рекомбинация (ГР)" относится к специализированной форме такого обмена, которая имеет место, например, при репарации двухцепочечных разрывов в клетках с

помощью гомологичных механизмов репарации. Этот процесс требует гомологий нуклеотидной последовательности, использует "донорную" молекулу для матричной репарации "целевой" молекулы (т.е. ту, в которой отмечался двухцепочечный разрыв), и называется по-разному: конверсия некриссоверных генов или конверсия генов короткого участка, поскольку указанный процесс обуславливает передачу генетической информации от донора к целевой молекуле. Не желая быть связанными какой-либо конкретной теорией, такая передача может включать коррекцию несоответствия гетеродуплексной ДНК, которое образуется между целевой молекулой с разрывом и донором, и/или "синтеззависимый отжиг цепи", при котором донор используется для ресинтеза генетической информации, которая впоследствии станет частью целевой молекулы, и/или может включать другие связанные процессы. Такая специализированная ГР часто приводит к изменению последовательности целевой молекулы, в результате чего часть или вся последовательность донорного полинуклеотида встраивается в целевой полинуклеотид.

Связывающие домены "цинковый палец" или ДНК-связывающие домены TALE могут быть "сконструированы" для связывания с заданной нуклеотидной последовательностью, например, с помощью конструирования (изменяющей одну или большее количество аминокислот) областей спиралей распознавания встречающегося в природе белка с "цинковыми пальцами" или с помощью конструирования RVD белка TALE. Таким образом, сконструированные белки с "цинковыми пальцами" или TALE являются такими белками, которые не встречаются в природе. Не ограничивающие примеры способов конструирования белков с "цинковыми пальцами" или TALE представляют собой разработку и выбор. "Разработанный" белок с "цинковыми пальцами" или TALE представляет собой белок, не встречающийся в природе, модель/композиция которого обусловлены главным образом рациональными критериями. Рациональные критерии разработки включают применение правил подстановки и компьютеризированных алгоритмов для обработки информации в базе данных, хранящей информацию о существующих разработках ZFP и данных о связывании. "Выбранный" белок с "цинковыми пальцами" или TALE представляет собой не встречающийся в природе белок, изготовления которого осуществляют в основном с помощью эмпирического процесса, такого как фаговый дисплей, ловушка взаимодействия или гибридная селекция. См., например, патенты США 8586526; 6140081; 6453242; 6746838; 7241573; 6866997; 7241574 и 6534261; см. также WO 03/016496.

Термин "последовательность" относится к нуклеотидной последовательности любой длины, которая может быть ДНК или РНК; может быть линейной, кольцевой или разветвленной, а также может быть одноцепочечной или двухцепочечной. Термин "донорная последовательность" относится к нуклеотидной последовательности, которую вводят в геном. Донорная последовательность может быть любой длины, например длиной от 2 до 10000 нуклеотидов (или любое целое число в этом диапазоне или больше), предпочтительно от около 100 и до 1000 нуклеотидов в длину (или любое целое число в этом диапазоне), более предпочтительно от около 200 и до 500 нуклеотидов в длину.

"Целевой участок" или "целевая последовательность" представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая определяет часть нуклеиновой кислоты, с которой связывается связывающая молекула, при условии наличия достаточных условий для связывания. "Экзогенная" молекула представляет собой молекулу, которая обычно не присутствует в клетке, но может быть введена в клетку с помощью одного или большего количества генетических, биохимических или других способов. "Нормальное присутствие в клетке" определяется в отношении конкретного этапа развития и условий окружающей среды клетки. Так, например, молекула, которая присутствует только во время эмбрионального развития мышц, является экзогенной молекулой по отношению к зрелой мышечной клетке. Аналогично, молекула, индуцированная тепловым шоком, представляет собой экзогенную молекулу по отношению к клетке, на которую не воздействовали тепловым шоком. Экзогенная молекула может содержать, например, функционирующий вариант неправильно функционирующей эндогенной молекулы или неправильно функционирующий вариант нормально функционирующей эндогенной молекулы.

Экзогенная молекула может быть, среди прочего, небольшой молекулой, например, сгенерированной с помощью процесса комбинаторной химии, или макромолекулой, такая как белок, нуклеиновая кислота, углевод, липид, гликопротеин, липопротеин, полисахарид, любое модифицированное производное вышеупомянутых молекул, или любым комплексом, содержащим одну или большее количество вышеупомянутых молекул. Нуклеиновые кислоты включают ДНК и РНК, могут быть одно- или двухцепочечными; могут быть линейными, разветвленными или кольцевыми; и могут быть любой длины. К нуклеиновым кислотам относятся те, которые способны образовывать дуплексы, а также триплекс-образующие нуклеиновые кислоты. См., например, патенты США №№ 5176996 и 5422251. Белки включают, но не ограничиваются ими, ДНК-связывающие белки, факторы транскрипции, факторы ремоделирования хроматина, метилированные ДНК-связывающие белки, полимеразы, метилазы, деметилазы, ацетилазы, деацетилазы, киназы, фосфатазы, интегразы, рекомбиназы, лигазы, топоизомеразы, гиразы и геликазы.

Экзогенная молекула может быть тем же типом молекулы, что и эндогенная молекула, например, экзогенным белком или нуклеиновой кислотой. Например, экзогенная нуклеиновая кислота может содержать инфицирующий вирусный геном, плазмиду или эписому, вводимые в клетку, или хромосому, которая обычно не присутствует в клетке. Способы введения экзогенных молекул в клетки известны специалистам в данной области техники и включают, но не ограничиваются ими, липид-опосредованный

перенос (т.е., с помощью липосом, включая нейтральные и катионные липиды), электропорацию, непосредственное инъекционное введение, слияние клеток, бомбардировку частицами, совместное осаждение фосфатом кальция, перенос, опосредуемый DEAE-декстраном, и перенос, опосредуемый вирусным вектором. Экзогенная молекула также может быть молекулой того же типа, что и эндогенная молекула, но получена из другого вида, чем клетка. Например, последовательность нуклеиновой кислоты человека может быть введена в линию клеток, первоначально полученную от мыши или хомяка. Напротив, "эндогенная" молекула представляет собой ту, которая обычно присутствует в конкретной клетке на определенном этапе развития в конкретных условиях окружающей среды. Например, эндогенная нуклеиновая кислота может содержать хромосому, геном митохондрии, хлоропласт или другую органеллу или встречающуюся в природе эписомальную нуклеиновую кислоту. Дополнительные эндогенные молекулы могут включать белки, например, транскрипционные факторы и ферменты.

"Слитая" молекула представляет собой молекулу, в которой две или большее количество субъединичных молекул являются связанными, предпочтительно ковалентно. Субъединичные молекулы могут быть молекулами одного и того же химического типа или могут быть молекулами разных химических типов. Примеры первого типа слитой молекулы включают, но не ограничиваются ими, слитые белки (например, слияние между ZFP или ДНК-связывающим доменом TALE и одним или большим количеством доменов активации) и слияние нуклеиновых кислот (например, нуклеиновой кислоты, кодирующей слитый белок, описанный выше). Примеры второго типа слитой молекулы включают, но не ограничиваются ими, слияние между триплекс-образующей нуклеиновой кислотой и полипептидом и слияние между белком, связывающимся с малой бороздой, и нуклеиновой кислотой. Термин также включает в себя системы, в которых полинуклеотидный компонент связывается с полипептидным компонентом с образованием функциональной молекулы (например, система CRISPR/Cas, в которой единичная направляющая РНК связывается с функциональным доменом с целью модуляции экспрессии генов). Экспрессия слитого белка в клетке может быть результатом доставки слитого белка в клетку или доставки полинуклеотида, кодирующего слитый белок, в клетку, при этом полинуклеотид транскрибируют, а транскрипт транслируют с целью генерирования слитого белка. Транс-сплайсинг, расщепление полипептида и лигирование полипептидов также могут быть вовлечены в экспрессию белка в клетке. Способы доставки полинуклеотидов и полипептидов в клетки представлены в другом месте этого описания. "Домен мультимеризации" (также называемый "доменом димеризации" или "доменом белкового взаимодействия") представляет собой домен, включенный в amino-, карбокси- или amino- и карбоксиконцевые области ZFP TF или TALE TF. Эти домены позволяют мультимеризовать множество единиц ZFP TF или TALE TF, так что более крупные участки повторяющихся доменов тринуклеотида становятся предпочтительно связанными мультимеризованными TF ZFP или TALE TF относительно более коротких участков доменов дикого типа. Примеры доменов мультимеризации включают в себя лейциновые молнии. Домены мультимеризации также могут регулироваться малыми молекулами, в которых домен мультимеризации принимает правильную конформацию, позволяющую взаимодействовать с другим доменом мультимеризации только в присутствии малой молекулы или внешнего лиганда. Таким образом, экзогенные лиганды можно применять для регулирования активности этих доменов.

"Ген" для целей данного описания включает область ДНК, кодирующую генный продукт (см. ниже), а также все области ДНК, которые регулируют продукцию гена, независимо от того, являются ли такие регуляторные последовательности смежными с кодирующими и/или транскрибированными последовательностями. Соответственно, ген включает, но не обязательно ограничивается этим, промоторные последовательности, терминаторы, трансляционные регуляторные последовательности, такие как участки связывания рибосом и участки внутренней посадки рибосомы, энхансеры, сайленсеры, инсуляторы, граничные элементы, участки инициации репликации, участки прикрепления матриц и области контроля локусов. Термин "экспрессия гена" относится к преобразованию информации, содержащейся в гене, в продукт гена. Продукт гена может быть прямым транскрипционным продуктом гена (например, мРНК, тРНК, рРНК, антисмысловая РНК, рибозим, структурная РНК или любой другой тип РНК) или белком, продуцируемым в результате трансляции мРНК. Продукты генов также включают РНК, которые модифицируются такими способами, как "кэппинг", полиаденилирование, метилирование и редактирование, а также белки, модифицированные, например, метилированием, ацетилизацией, фосфорилированием, убиквитинированием, АДФ-рибозилированием, миристилированием и гликозилированием.

Термин "модуляция" экспрессии генов относится к изменению активности гена. Модуляция экспрессии может включать, но не ограничивается этим, активацию гена и репрессию гена. Редактирование генома (например, расщепление, изменение, инактивация, случайная мутация) можно применять для модуляции экспрессии. Термин "инактивация гена" относится к любому уменьшению экспрессии гена по сравнению с клеткой, которая не включает в себя белок ZFP или TALE, как описано в данном документе. Таким образом, инактивация гена может быть частичной или полной.

"Область, представляющая интерес" представляет собой любую область клеточного хроматина, такую как, например, ген или некодирующая последовательность в пределах или рядом с геном, в которой является желательным связывание экзогенной молекулы. Связывание может быть предназначено для целенаправленного расщепления ДНК и/или целенаправленной рекомбинации. Область, представляю-

шая интерес, может присутствовать в хромосоме, эписоме, геноме органелл (например, митохондрия, хлоропласт) или, например, инфицирующем вирусном геноме. Область, представляющая интерес, может находиться в кодирующей области гена в пределах транскрибируемых некодирующих областях, таких как, например, лидерные последовательности, трейлерные последовательности или интроны, или в пределах нетранскрибируемых областей либо выше, либо ниже по ходу транскрипции кодирующей области. Область, представляющая интерес, может быть такой же небольшой по размеру, что и одиночная нуклеотидная пара или до 2000 пар нуклеотидов в длину, или любое целое число пар нуклеотидов.

Термин "эукариотические" клетки включает в себя, но не ограничиваются ими, грибковые клетки (такие как дрожжи), растительные клетки, клетки животных, клетки млекопитающих и клетки человека (например, Т-клетки).

Термины "функциональная связь" и "функционально связанный" (или "функционально ассоциированный") применяются взаимозаменяемо со ссылкой на сопоставление двух или более компонентов (таких как элементы последовательности), в которых компоненты расположены так, что оба компонента функционируют нормально, что дает возможность по меньшей мере одному из компонентов опосредовать функцию, которая воздействует по меньшей мере на один из других компонентов. В качестве иллюстрации регуляторная последовательность транскрипции, такая как промотор, является функционально связанной с кодирующей последовательностью, если регуляторная последовательность транскрипции контролирует уровень транскрипции кодирующей последовательности в ответ на наличие или отсутствие одного или большего количества регуляторных факторов транскрипции. Регуляторная последовательность транскрипции, как правило, является функционально связанной в цис с кодирующей последовательностью, но не обязательно является непосредственно примыкающей к ней. Например, энхансер представляет собой регуляторную последовательность транскрипции, которая функционально связана с кодирующей последовательностью, хотя они не являются смежными.

Что касается слитых полипептидов, термин "функционально связанный" может относиться к тому факту, что каждый из компонентов выполняет ту же функцию, что и связь с другим компонентом, как если бы он был не связан. Например, в отношении слитого полипептида, в котором ДНК-связывающий домен ZFP или TALE является слитым с доменом активации, ДНК-связывающий домен ZFP или TALE и домен активации находятся в функциональной связи, если в слитом полипептиде ДНК-связывающий домен ZFP или TALE способен связывать свой целевой участок и/или свой участок связывания, тогда как домен активации способен повышающе регулировать экспрессию гена. ZFP, слитые с доменами, способными регулировать экспрессию генов, в совокупности называются "ZFP-TF" или "транскрипционными факторами с "цинковыми пальцами", тогда как TALE, слитые с доменами, способными регулировать экспрессию генов, в совокупности называются "TALE-TF" или "транскрипционными факторами TALE". Когда слитый полипептид, в котором ДНК-связывающий домен ZFP является слитым с доменом расщепления ("ZFN" или "нуклеаза с "цинковыми пальцами"), ДНК-связывающий домен ZFP и домен расщепления находятся в функциональной связи, если в слитом полипептиде часть ДНК-связывающего домена ZFP способна связывать свой целевой участок и/или свой участок связывания, тогда как домен расщепления способен расщеплять ДНК вблизи целевого участка. Когда слитый полипептид, в котором ДНК-связывающий домен TALE является слитым с доменом расщепления ("TALEN" или "нуклеаза TALE"), ДНК-связывающий домен TALE и домен расщепления находятся в функциональной связи, если в слитом полипептиде часть ДНК-связывающего домена TALE способна связывать свой целевой участок и/или свой участок связывания, тогда как домен расщепления способен расщеплять ДНК вблизи целевого участка. В отношении слитого полипептида, в котором ДНК-связывающий домен Cas является слитым с доменом активации, ДНК-связывающий домен Cas и домен активации находятся в функциональной связи, если в слитом полипептиде ДНК-связывающий домен Cas способен связывать свой целевой участок и/или свой участок связывания, тогда как домен активации способен усиливать экспрессию гена. Когда слитый полипептид, в котором ДНК-связывающий домен Cas является слитым с доменом расщепления, ДНК-связывающий домен Cas и домен расщепления находятся в функциональной связи, если в слитом полипептиде часть ДНК-связывающего домена Cas способна связывать свой целевой участок и/или свой участок связывания, тогда как домен расщепления способен расщеплять ДНК вблизи целевого участка.

"Функциональный фрагмент" белка, полипептида или нуклеиновой кислоты представляет собой белок, полипептид или нуклеиновую кислоту, последовательность которых не идентична полноразмерному белку, полипептиду или нуклеиновой кислоте, но которые при этом сохраняют ту же функцию, которой обладает полноразмерный белок, полипептид или нуклеиновая кислота. Функциональный фрагмент может обладать большим, меньшим или таким же количеством остатков, что и соответствующая нативная молекула, и/или может содержать одну или большее количество аминокислот или нуклеотидных замен. Способы определения функции нуклеиновой кислоты (например, кодирующей функции, способности к гибридизации с другой нуклеиновой кислотой) хорошо известны в данной области техники. Аналогично, способы определения функции белка также хорошо известны. Например, ДНК-связывающую функцию полипептида можно определить, например, с помощью метода связывания на фильтрах, сдвига электрофоретической подвижности или анализов иммунопреципитации. Расщепление ДНК можно проанализировать с помощью гель-электрофореза. См. Ausubel et al., выше. Способность белка взаимодействовать с

другим белком можно определить, например, путем ко-иммунопреципитации, двугибридных анализов или комплементации, как генетических, так и биохимических. См., например, Fields et al. (1989) Nature 340:245-246; патент США № 5585245 и PCT WO 98/44350.

"Вектор" способен переносить последовательности генов в целевые клетки. Как правило, "векторная конструкция", "экспрессионный вектор" и "вектор переноса гена" означают любую конструкцию нуклеиновой кислоты, способную направлять экспрессию представляющего интерес гена и которая может переносить последовательности генов в целевые клетки. Таким образом, этот термин включает клонирование и экспрессионные носители, а также интегрирующие векторы.

"Репортерный ген" или "репортерная последовательность" относится к любой последовательности, которая продуцирует белковый продукт, количество которого легко измерить, предпочтительно, хотя и не обязательно, с помощью обычного анализа. Пригодные репортерные гены включают, но не ограничиваются ими, последовательности, кодирующие белки, которые опосредуют устойчивость к антибиотикам (например, устойчивость к ампициллину, устойчивость к неомицину, устойчивость к G418, устойчивость к пурамицину), последовательности, кодирующие окрашенные или флуоресцентные или люминесцирующие белки (например, зеленый флуоресцентный белок, усиленный зеленый флуоресцентный белок, красный флуоресцентный белок, люцифераза) и белки, которые опосредуют усиленный рост клеток и/или амплификацию генов (например, дигидрофолатредуктаза). Теги эпитопа включают, например, одну или большее количество копий FLAG, His, мус, Tap, HA или любую обнаруживаемую аминокислотную последовательность. Термин "экспрессионные тэги" включает в себя последовательности, кодирующие репортеры, которые могут быть функционально связаны с желаемой последовательностью гена, с целью контроля экспрессии гена, представляющего интерес.

ДНК-связывающие домены

В способах, описанных в данном документе, применяются композиции, например Htt-модулирующие факторы транскрипции, содержащие ДНК-связывающий домен, который специфически связывается с целевой последовательностью в гене Htt, в частности, который связывается с мутантным Htt-аллелем, содержащим множество тринуклеотидных повторов. Любой полинуклеотидный или полипептидный ДНК-связывающий домен можно применять в описанных в данном документе композициях и способах, например, ДНК-связывающие белки (например, ZFP или TALE) или ДНК-связывающие полинуклеотиды (например, единичные направляющие РНК). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения ДНК-связывающий домен связывается с целевым сайтом, содержащим от 9 до 28 (или любое значение между ними, включая 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26 или 27) смежных нуклеотидов SEQ ID NO: 6.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения Htt-модулирующий фактор транскрипции или ДНК-связывающий домен в нем содержит белок с "цинковыми пальцами". Выбор целевых участков; ZFP и способы разработки и конструирования слитых белков (и кодирующих их полинуклеотидов) известны специалистам в данной области техники и подробно описаны в патентах США №№ 6140081; 5789538; 6453242; 6534261; 5925523; 6007988; 6013453; 6200759; WO 95/19431; WO 96/06166; WO 98/53057; WO 98/54311; WO 00/27878; WO 01/60970 WO 01/88197; WO 02/099084; WO 98/53058; WO 98/53059; WO 98/53060; WO 02/016536 и WO 03/016496. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения ZFP могут избирательно связываться либо с мутантным аллелем Htt, либо с последовательностью Htt дикого типа. Целевые участки Htt обычно включают в себя по меньшей мере один "цинковый палец", но могут включать в себя множество "цинковых пальцев" (например, 2, 3, 4, 5, 6 или более "пальцев"). Как правило, ZFP включают в себя по меньшей мере три "пальца". Некоторые из ZFP включают в себя четыре, пять или шесть "пальцев", в то время как некоторые ZFP включают в себя 8, 9, 10, 11 или 12 "пальцев". ZFP, которые включают три "пальца", как правило, распознают целевой участок, который включает в себя 9 или 10 нуклеотидов; ZFP, которые включают в себя четыре "пальца", как правило, распознают целевой участок, который включает в себя от 12 до 14 нуклеотидов; тогда как ZFP, имеющие шесть "пальцев", могут распознавать целевые участки, которые включают в себя от 18 до 21 нуклеотидов. ZFP также могут быть слитыми белками, которые включают один или большее количество регулирующих доменов, причем домены могут быть доменами активации транскрипции или доменами репрессии транскрипции. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения слитый белок содержит два ДНК-связывающих домена ZFP, соединенных вместе. Таким образом, эти белки с "цинковыми пальцами" могут содержать 8, 9, 10, 11, 12 или большее количество "пальцев". В некоторых вариантах осуществления данного изобретения два ДНК-связывающих домена связаны посредством расширяемого гибкого линкера, так что один ДНК-связывающий домен содержит 4, 5 или 6 "цинковых пальцев", а второй ДНК-связывающий домен содержит дополнительные 4, 5 или 5 "цинковых пальцев". В некоторых вариантах осуществления данного изобретения линкер является стандартным линкером, расположенным между "пальцами" таким образом, что матрица "пальца" содержит один ДНК-связывающий домен, содержащий 8, 9, 10, 11 или 12 или большее количество "пальцев". В других вариантах осуществления данного изобретения линкер представляет собой нетипичный линкер, такой как гибкий линкер. ДНК-связывающие домены слиты с по меньшей мере одним регуляторным доменом и могут рассматриваться как архитектура "ZFP-ZFP-TF". Конкретные примеры этих вариантов осуществления данного изобретения

могут относиться к "ZFP-ZFP-KOX", который включает в себя два ДНК-связывающих домена, связанных посредством гибкого линкера, и слитых с KOX-репрессором, и "ZFP-KOX-ZFP-KOX", в котором два слитых белка ZFP-KOX являются слитыми вместе посредством линкера.

В альтернативном варианте ДНК-связывающий домен может быть производным от нуклеазы. Например, известны последовательности распознавания хоуминг-эндонуклеаз и мегануклеаз, таких как I-SceI, I-CeuI, PI-PspI, PI-Sce, I-SceIV, I-CsmI, I-PanI, I-SceII, I-PpoI, I-SceIII, I-CreI, I-TevI, I-TevII и I-TevIII. См. также патент США № 5420032; патент США № 6833252; Belfort et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3379-3388; Dujon et al. (1989) *Gene* 82:115-118; Perler et al. (1994) *Nucleic Acids Res.* 22, 1125-1127; Jasin (1996) *Trends Genet.* 12:224-228; Gimble et al. (1996) *J. Mol. Biol.* 263:163-180; Argast et al. (1998) *J. Mol. Biol.* 280:345-353 и каталог New England Biolabs. К тому же, ДНК-связывающую специфичность хоуминг-эндонуклеаз и мегануклеаз можно сконструировать для связывания нестерчающихся в природе целевых участков. См., например, Chevalier et al. (2002) *Molec. Cell* 10:895-905; Epmat et al. (2003) *Nucleic Acids Res.* 31:2952-2962; Ashworth et al. (2006) *Nature* 441:656-659; Paques et al. (2007) *Current Gene Therapy* 7:49-66; патентная публикация США № 20070117128.

"Двулучие" белки с "цинковыми пальцами"- это те белки, в которых два кластера ДНК-связывающих доменов цинка разделены промежуточными аминокислотами, вследствие чего два домена "цинковый палец" связываются с двумя прерывистыми целевыми участками. Примером двулучевого связывающего белка с "цинковыми пальцами" является SIP1, в котором кластер четырех "цинковых пальцев" расположен на аминоконце белка, а кластер из трех "пальцев" расположен на карбоксильном конце (см. Remade et al. (1999) *EMBO Journal* 18 (18): 5073-5084). Каждый кластер "цинковых пальцев" в этих белках способен связываться с уникальной целевой последовательностью, а расстояние между двумя целевыми последовательностями может содержать много нуклеотидов. Двулучие ZFP могут включать в себя функциональный домен, например, объединенный с одним или обоими ZFP. Таким образом, будет очевидно, что функциональный домен может быть прикреплен к внешней стороне одного или обоих ZFP (см. фиг. 1С) или может быть расположен между ZFP (прикреплен к обоим ZFP) (см. фиг. 4).

Конкретные примеры Htt-нацеленных ZFP описаны в публикации патента США № 20130253040, которая включена в данный документ посредством ссылки для всех целей в полном объеме, а также приведены в табл. 1 ниже. Первый столбец в этой таблице является внутренним ссылочным именем (номером) для ZFP и соответствует одному и тому же имени в столбце 1 табл. 2. "F" означает "палец", а число, следующее за "F", обозначает номер "цинкового пальца" (например, "F1" означает "палец" 1).

Таблица 1. Htt-нацеленные белки с "цинковыми пальцами"

SBS #	Разработка					
	F1	F2	F3	F4	F5	F6
45643	QSGDLTR (SEQ ID NO:1)	QSGDLTR (SEQ ID NO:1)	QSGDLTR (SEQ ID NO:1)	KHGNSLSE (SEQ ID NO:2)	KRCNLRC (SEQ ID NO:3)	
46025	CPSHLTR (SEQ ID NO:4)	QSGDLTR (SEQ ID NO:1)	KHGNSLSE (SEQ ID NO:2)	KRCNLRC (SEQ ID NO:3)	RQFNHRHQ (SEQ ID NO:5)	

Последовательность и местоположение целевых участков этих белков описаны в табл. 2. Нуклеотиды в целевом участке, которые находятся в контакте со спиралью распознавания ZFP, указаны заглавными буквами; неконтактирующие нуклеотиды указаны прописными буквами.

Таблица 2. Целевые участки на Htt человека и мыши

SBS #	Целевой участок
45643	agCAGCAGCaGCAGCAGCAgcagcagca (SEQ ID NO:6)
46025	agCAGCAGCAGCaGCAGCAGCAgcagcagca (SEQ ID NO:6)

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения ДНК-связывающий домен содержит встречающийся в природе или сконструированный (не встречающийся в природе) ДНК-связывающий домен TAL-эффектора (TALE). См., например, патент США № 8586526, включенный в данное описание посредством ссылки в полном объеме. Патогенные бактерии растений рода *Xanthomonas*, как известно, вызывают множество заболеваний у важных сельскохозяйственных культур.

Патогенность *Xanthomonas* зависит от консервативной системы секреции III типа (T3S), которая вводит в клетку растения более 25 различных эффекторных белков. Среди этих вводимых белков есть эффекторы, подобные активатору транскрипции (TALE), которые имитируют активаторы транскрипции растений и манипулируют транскриптом растения (см. Kay et al. (2007) *Science* 318:648-651). Эти белки содержат ДНК-связывающий домен и домен активации транскрипции. Одним из наиболее полно охарактеризованных TALE является AvrBs3 из *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria* (см. Bonas et al. (1989) *Mol Gen Genet* 218: 127-136 и WO2010079430). TALE содержат централизованный домен тандемных повторов, каждый повтор содержит приблизительно 34 аминокислоты, которые являются ключевыми для специфичности ДНК-связывания этих белков. Кроме того, они содержат последовательность ядерной локализации и домен кислотной активации транскрипции (для обзора см. Schornack S, et al.

(2006) *J Plant Physiol* 163(3): 256-272). Кроме того, в фитопатогенных бактериях *Ralstonia solanacearum* были обнаружены два гена, обозначенные как *brg11* и *hrx17*, которые являются гомологичными семейству *AvrBs3 Xanthomonas* в штамме GM1000 биовара 1 и в штамме RS1000 биовара 4 *R. solanacearum* (см. Heuer et al. (2007) *Appl and Envir Micro* 73(13): 4379-4384). Эти гены на 98,9% идентичны в нуклеотидной последовательности друг к другу, но отличаются делецией 1575 пар оснований в повторном домене *hrx17*. Однако оба генные продукта характеризуются менее 40% идентичностью последовательностей с белками семейства *AvrBs3 Xanthomonas*. Специфичность этих TALE зависит от последовательностей, определяющихся в tandemных повторах. Повторяющаяся последовательность содержит приблизительно 102 пар оснований, а повторы, как правило, характеризуются 91-100% гомологичностью друг с другом (Bonas et al., там же). Как правило, полиморфизм повторов находится в положениях 12 и 13, и, как представляется, существует взаимно однозначное соответствие между идентичностью гипервариабельных диостатков в положениях 12 и 13 с идентичностью смежных нуклеотидов в целевой последовательности TALE (см. Moscou and Bogdanove (2009) *Science* 326:1501 и Boch et al. (2009) *Science* 326:1509-1512). В эксперименте при определении кода для распознавания ДНК этих TALE установлено, что последовательность БХ в положениях 12 и 13 приводит к связыванию с цитозином (С), NG связывается с Т, NI-A, С, G или Т, NN связывается с А или G, а NG связывается с Т. Эти ДНК-связывающие повторы были собраны в белки с новыми комбинациями и количеством повторов с целью создания искусственных факторов транскрипции, которые способны взаимодействовать с новыми последовательностями. Кроме того, в патенте США № 8586526 и публикации США № 20130196373, включенных посредством ссылки в полном их объеме, описаны TALE с полипептидами N-кэп, полипептидами С-кэп (например, +63, +231 или +278) и/или новые (нетипичные) RVD.

Типовые TALE описаны в патентной публикации США № 20130253040, включенной посредством ссылки в полном ее объеме. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения ДНК-связывающие домены включают домен димеризации и/или мультимеризации, например суперспираль (СС) и димеризующий "цинковый палец" (DZ). См. патентную публикацию США № 20130253040. В других вариантах осуществления данного изобретения ДНК-связывающий домен содержит единичную направляющую РНК системы CRISPR/Cas, например *sgRNAs*, как описано в 20150056705. В последнее время появились убедительные доказательства существования РНК-опосредованного пути защиты генома в археях и многих бактериях, который предположительно является параллельным пути эукариотической РНКи (для обзоров см. Godde and Bickerton, 2006). *J. Mol. Evol.* 62: 718-729; Lillestol et al., 2006. *Archaea* 2: 59-72; Makarova et al., 2006. *Biol. Direct* 1: 7.; Sorek et al., 2008. *Nat. Rev. Microbiol.* 6: 181-186). Предполагается, что путь, который известен как система CRISPR-Cas или прокариотическая РНКи (пРНКи), состоит из двух эволюционно и часто физически связанных локусов генов: локус CRISPR (кластеризированные короткие палиндромные повторы с регулярным интервалом), который кодирует РНК-компоненты системы, и *cas*-локус (ассоциированный с CRISPR), который кодирует белки (Jansen et al., 2002. *Mol. Microbiol* 43: 1565-1575; Makarova et al., 2002. *Nucleic Acids Res.* 30: 482-496; Makarova et al., 2006. *Biol. Direct* 1: 7; Haft et al., 2005. *PLoS Comput. Biol.* 1: e60). Локусы CRISPR в микробных хозяевах содержат комбинацию CRISPR-ассоциированных (Cas) генов, а также некодирующих РНК-элементов, способных программировать специфичность CRISPR-опосредованного расщепления нуклеиновой кислоты. Отдельные белки Cas не имеют существенного сходства последовательностей с белковыми компонентами системы эукариотической РНКи, но имеют аналогичные ожидаемые функции (например, связывание РНК, нуклеаза, геликаза и т. д.), (Makarova et al., 2006. *Biol. Direct* 1: 7). CRISPR-ассоциированные (*cas*) гены часто являются ассоциированными с матрицами повторов-спейсеров CRISPR. Описано более сорока различных семейств белка Cas. Из этих семейств белков, Cas1, по-видимому, является повсеместно распространенным среди различных систем CRISPR/Cas. Конкретные комбинации генов Cas и повторяющихся структур применяли для определения 8 подтипов CRISPR (*Ecoli*, *Ypest*, *Nmeni*, *Dvulg*, *Tnear*, *Hmari*, *Apern* и *Mtube*), некоторые из которых ассоциированы с дополнительным модулем гена, кодирующим ассоциированные с повторами "гаинственные" белки (RAMP). В одном геноме может встречаться более одного подтипа CRISPR. Спорадическое распространение подтипов CRISPR/Cas предполагает, что система подвергается горизонтальному переносу генов в процессе микробной эволюции.

Система CRISPR типа II, первоначально описанная в *S. ruogenes*, является одной из наиболее хорошо охарактеризованных систем и выполняет целенаправленный двухцепочечный разрыв ДНК на четырех последовательных этапах. Во-первых, две некодирующие РНК, матрица *pre-crPНК* и *tracrPНК* транскрибируются из локуса CRISPR. Во-вторых, *tracrPНК* гибридизуется с повторяющимися областями *pre-crRNA* и опосредует процессинг *pre-crPНК* в зрелые *crPНК*, содержащие отдельные спейсерные последовательности, причем процессинг происходит с помощью РНКазы III, являющейся специфической к двойной цепи, в присутствии белка Cas9. В-третьих, зрелый комплекс "*crPНК:tracrPНК*" направляет Cas9 в целевую ДНК посредством спаривания оснований по Уотсону-Крику (Watson-Strick) между спейсером на *crPНК* и протоспейсером на целевой ДНК рядом с мотивом, примыкающим к протоспейсеру (PAM), что является дополнительным требованием для распознавания цели. Кроме того, *tracrPНК* также должна присутствовать в качестве пар оснований с *crPНК* на своем 3'-конце, и эта связь активирует активность Cas9. Наконец, Cas9 опосредует расщепление целевой ДНК для создания двухцепочечного разрыва в

протоспейсере. Функционирование системы CRISPR/Cas состоит из трех этапов: (i) введение чужеродных последовательностей ДНК в матрицу CRISPR для предотвращения будущих атак в процессе, называемом "адаптация", (ii) экспрессия соответствующих белков, а также экспрессия и процессинг матрицы, за которым следует (iii) РНК-опосредованная интерференция с чужеродной нуклеиновой кислотой. Таким образом, в бактериальной клетке некоторые из так называемых белков "Cas" вовлечены в процесс естественного функционирования системы CRISPR/Cas. Системы CRISPRII типа были обнаружены во многих различных бактериях. Поиск BLAST в общедоступных геномах от Fonfara et al. ((2013) *Nuc Acid Res* 42(4):2377-2590) обнаружил ортологи Cas9 у 347 видов бактерий. Кроме того, эта группа продемонстрировала CRISPR/Cas-расщепление целевой ДНК *in vitro* с применением ортологов Cas9 из *S. pyogenes*, *S. mutans*, *S. therophilus*, *C. jejuni*, *N. meningitidis*, *P. multocida* а также *F. novicida*. Таким образом, термин "Cas9" относится к РНК-направляемой ДНК-нуклеазе, содержащей ДНК-связывающий домен и два домена нуклеазы, в которых ген, кодирующий Cas9, может быть получен из любых пригодных бактерий. Белок Cas9 имеет по меньшей мере два домена нуклеазы: один домен нуклеазы подобен эндонуклеазе HNH, в то время как другой напоминает домен эндонуклеазы Ruv. Домен типа HNH, по-видимому, ответственен за расщепление цепи ДНК, которая является комплементарной для crPHK, в то время как домен Ruv расщепляет некомплементарную цепь. Нуклеазу Cas 9 можно сконструировать таким образом, чтобы функционировал только один из доменов нуклеазы, создавая никазу Cas (см. Jinek et al., *ibid*). Никазы можно получить с помощью специфической мутации аминокислот в каталитическом домене фермента или путем усечения части или всего домена, в результате чего он больше не будет проявлять своих функций. Поскольку Cas 9 содержит два домена нуклеазы, этот подход может быть применен в любом домене. Двухцепочечного разрыва можно достичь в целевой ДНК с применением двух таких никаз Cas 9. Одна никаза будет расщеплять одну цепь ДНК, а при применении двух никаз будет происходить двухцепочечный разрыв. Необходимости в комплексе "crPHK-tracrPHK" можно избежать с помощью сконструированной "единичной направляющей РНК" (sgPHK), которая содержит шпильку, обычно образованную с помощью отжига crPHK и tracrPHK (см. Jinek et al. (2012) *Science* 337:816 и Cong et al. (2013) *Scienceexpress/10.1126/science.1231143*). В *S. pyogenes*, сконструированное слияние "tracrPHK :crPHK", или sgRNA, направляет Cas9 для расщепления целевой ДНК, когда между Cas-ассоциированными РНК и целевой ДНК формируется гетеродимер двухцепочечной РНК ДНК. Эта система, включающая в себя белок Cas9 и сконструированную sgPHK, содержащую последовательность PAM, применялась для направляемого РНК редактирования генома (см. Ramalingam, там же) и была пригодной для редактирования генома эмбрионов рыбок данио *in vivo* (см. Hwang et al. (2013) *Nature Biotechnology* 31 (3):227) с эффективностью редактирования, подобной ZFN и TALEN.

Первичные продукты локусов CRISPR, по-видимому, представляют собой короткие РНК, которые содержат последовательности нацеливания на внедренный агент, и называются направляющими РНК или прокариотическими сайлесинговыми РНК (psiPHK) на основе их гипотетической роли в указанном пути (Makarova et al., 2006. *Biol. Direct* 1: 7; Hale et al., 2008. *RNA*, 14: 2572-2579). Анализ РНК показывает, что транскрипты локуса CRISPR расщепляются в повторяющихся последовательностях для высвобождения промежуточных РНК от ~ 60 до 70 нуклеотидов, которые содержат индивидуальные последовательности нацеливания на внедренный агент и фланкирующие повторяющиеся фрагменты (Tang et al., 2002. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99: 7536-7541; Tang et al., 2005. *Mol. Microbiol.* 55: 469-481; Lillestol et al., 2006. *Archaea* 2: 59-72; Brouns et al., 2008. *Science* 321: 960-964; Hale et al., 2008. *RNA*, 14: 2572-2579). В археобактерии *Pyrococcus furiosus* эти промежуточные РНК далее подвергают процессингу до многокопийных, стабильных зрелых psiPHK ~ 35-45 нуклеотидов (Hale et al., 2008. *RNA*, 14: 2572-2579).

Необходимости в комплексе "crPHK-tracrPHK" можно избежать с помощью сконструированной "единичной направляющей РНК" (sgPHK), которая содержит шпильку, обычно образованную с помощью отжига crPHK и tracrPHK (см. Jinek et al. (2012) *Science* 337:816 и Cong et al. (2013) *Scienceexpress/10.1126/science.1231143*). В *S. pyogenes*, сконструированное слияние "tracrPHK :crPHK", или sgRNA, направляет Cas9 для расщепления целевой ДНК, когда между Cas-ассоциированными РНК и целевой ДНК формируется гетеродимер двухцепочечной РНК:ДНК. Эта система, включающая в себя белок Cas9 и сконструированную sgPHK, содержащую последовательность PAM, применялась для направляемого РНК редактирования генома (см. Ramalingam, там же) и была пригодной для редактирования генома эмбрионов рыбок данио *in vivo* (см. Hwang et al. (2013) *Nature Biotechnology* 31 (3):227) с эффективностью редактирования, подобной ZFN и TALEN.

Химерные или sgRNA можно сконструировать так, чтобы они содержали последовательность, комплементарную любой желаемой мишени. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения направляющая последовательность составляет около или больше, чем около 5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 75 или больше нуклеотидов в длину. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения направляющая последовательность составляет менее чем около 75, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 12 или меньше нуклеотидов в длину. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения РНК включают 22 основания комплементарности к мишени и формы G[n19], за которой следует примыкающий к протоспейсеру мотив (PAM) формы NGG или NAG для применения с системой CRISPR/Cas *S. pyogenes*. Таким образом, в одном способе sgPHK могут быть

сконструированы путем применения известной цели ZFN в гене, представляющем интерес, путем (i) выравнивания последовательности распознавания гетеродимера ZFN с эталонной последовательностью соответствующего генома (человека, мыши или отдельных видов растений); (ii) идентификации области спейсера между полуучастками ZFN; (iii) определения местоположения мотива G[N20]GG, ближайшего к области спейсера (в случаях, когда спейсер перекрывается более чем одним таким мотивом, выбирают мотив, центрированный относительно спейсера); (iv) применения этого мотива в качестве ядра sgРНК. Этот способ преимущественно основывается на доказавших свою пригодность целях нуклеазы. В альтернативном варианте sgРНК могут быть сконструированы таким образом, чтобы нацеливаться на любую область, представляющую интерес, определяя лишь пригодную целевую последовательность, соответствующую формуле G[n20]GG. Наряду с областью комплементарности sgРНК может содержать дополнительные нуклеотиды, которые могут простираются до хвостовой области tracrРНК-части sgRNA (см. Hsu et al. (2013) Nature Biotech doi: 10.1038/nbt.2647). Хвосты могут иметь от +67 до +85 нуклеотидов или любое число между ними с предпочтительной длиной +85 нуклеотидов. Также можно применять усеченные sgРНК, так называемые "tru-gРНК" (см. Fu et al. (2014) Nature Biotech 32(3): 279). В tru-gРНК область комплементарности уменьшается до 17 или 18 нуклеотидов в длину. Кроме того, также можно применять альтернативные последовательности PAM, при этом последовательность PAM может быть NAG в качестве альтернативы NGG (Hsu 2014, там же) с использованием Cas9 *S. pyogenes*. Дополнительные последовательности PAM могут также включать те, которые не имеют начального G (Sander and Joung (2014) Nature Biotech 32(4):347). В дополнение к кодированным последовательностям Cas9 PAM *S. pyogenes*, могут применяться другие последовательности PAM, которые специфичны для белков Cas9, из других бактериальных источников. Например, последовательности PAM, показанные ниже (согласно Sander and Joung, там же, и Esvelt et al. (2013) Nat Meth 10(11): 1116) являются специфическими для этих белков Cas9:

Вид	PAM
<i>S. pyogenes</i>	NGG
<i>S. pyogenes</i>	NAG
<i>S. mutans</i>	NGG
<i>S. thermophilus</i>	NGGNG
<i>S. thermophilus</i>	NNAAAW
<i>S. thermophilus</i>	NNAGAA
<i>S. thermophilus</i>	NNNGATT
<i>C. jejuni</i>	NNNNACA
<i>N. meningitides</i>	NNNNGATT
<i>P. multocida</i>	GNNNCNNA
<i>F. novicida</i>	NG

Таким образом, пригодную целевую последовательность для применения с системой CRISPR/Cas *S. pyogenes* можно выбрать согласно следующей формуле: [n17, n18, n19 или n20] (G/A)G. В альтернативном варианте, последовательность PAM можно выбрать согласно следующей формуле: G [n17, n18, n19, n20] (G/A)G. Для белков Cas9, не являющихся производными от *S. pyogenes*, такие же формулы можно применять, когда альтернативные PAM заменяются на последовательности PAM *S. pyogenes*. Наиболее предпочтительным является выбор целевой последовательности с наивысшей вероятностью специфичности, которая позволяет избежать потенциальных нецелевых последовательностей. Эти нежелательные целевые последовательности можно идентифицировать, учитывая следующие признаки: i) сходство в целевой последовательности, за которой следует последовательность PAM, которая, как известно, функционирует с помощью белка Cas9; ii) сходная целевая последовательность с менее чем тремя несоответствиями из желаемой целевой последовательности; iii) сходная целевая последовательность, как в ii), в которой несоответствия расположены в дистальной области PAM, а не в проксимальной области PAM (имеются некоторые данные о том, что нуклеотиды 1-5, непосредственно смежные или расположенные проксимальнее к PAM, иногда называются "затравочной" областью (Wu et al. (2014) Nature Biotech doi: 10.1038/nbt2889) и являются наиболее важными для распознавания, поэтому предполагаемые нецелевые участки с несоответствиями, расположенными в "затравочной" области, могут с наименьшей вероятностью быть распознанными sg РНК); и iv) сходная целевая последовательность, в которой несоответствия не расположены последовательно или расположены на расстоянии более четырех нуклеотидов (Hsu

2014, там же). Таким образом, проведя анализ количества потенциальных нецелевых участков в геноме в зависимости от того, какая из систем CRISPR/Cas применяется, с помощью вышеуказанных критериев можно идентифицировать пригодную целевую последовательность для sgРНК. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения белок Cas может быть "функциональным производным" встречающегося в природе Cas. "Функциональное производное" полипептида с нативной последовательностью представляет собой соединение, обладающее качественным биологическим свойством, общим с полипептидом с нативной последовательностью. "Функциональные производные" включают, но не ограничиваются ими, фрагменты нативной последовательности и производные полипептида с нативной последовательностью и его фрагменты при условии, что они имеют биологическую активность, общим с соответствующим полипептидом с нативной последовательностью. Описываемая в данном документе биологическая активность представляет собой способность функционального производного гидролизовать ДНК-субстрат на фрагменты. Термин "производное" охватывает как варианты аминокислотной последовательности полипептида, ковалентные модификации, так и их слияния. В некоторых аспектах функциональное производное может содержать одно биологическое свойство встречающегося в природе белка Cas. В других аспектах функциональное производное может содержать подмножество биологических свойств встречающегося в природе белка Cas. Пригодные производные полипептида Cas или его фрагмента включают, но не ограничиваются ими, мутанты, слияния, ковалентные модификации белка Cas или его фрагмента. Белок Cas, который включает белок Cas или его фрагмент, а также производные белка Cas или его фрагмента, можно получить из клетки или синтезировать химическим способом или получить с помощью комбинации этих двух процедур. Клетка может представлять собой клетку, которая в природных условиях продуцирует белок Cas, или клетку, которая в природных условиях продуцирует белок Cas, и является генетически модифицированной для продуцирования эндогенного белка Cas с более высоким уровнем экспрессии или для получения белка Cas из экзогенно введенной нуклеиновой кислоты, причем нуклеиновая кислота кодирует Cas, который является таким же или отличается от эндогенного Cas. В некоторых случаях клетка в природных условиях не продуцирует белок Cas и является генетически модифицированной для продуцирования белка Cas.

Типовые системы нуклеаз CRISPR/Cas, нацеленные на специфические гены, описаны, например, в публикации США № 20150056705. Таким образом, нуклеаза содержит ДНК-связывающий домен, который специфически связывается с целевым участком в любом гене, в который желательно ввести донор (трансген) в комбинации с доменом нуклеазы, который расщепляет ДНК.

Слитые молекулы

ДНК-связывающие домены могут быть слиты с любыми дополнительными молекулами (например, полипептидами) для применения в описанных в данном документе способах. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения в способах применяются слитые молекулы, содержащие по меньшей мере одну ДНК-связывающую молекулу (например, ZFP, TALE или единичную направляющую РНК) и гетерологичный регуляторный (функциональный) домен (или его функциональный фрагмент). В некоторых вариантах данного изобретения осуществления функциональный домен содержит регуляторный домен транскрипции. Общие домены включают, например, домены фактора транскрипции (активаторы, репрессоры, коактиваторы, корепрессоры), сайленсеры, онкогены (например, *myc*, *jun*, *fos*, *myb*, *max*, *mad*, *rel*, *ets*, *bcl*, *myb*, *mos* и т. д.); ферменты для репарации ДНК и ассоциированные с ними факторы и модификаторы; ферменты для реаранжировки ДНК и связанные с ними факторы и модификаторы; ассоциированные с хроматином белки и их модификаторы (например, киназы, ацетилазы и деацетилазы); и ферменты для модификации ДНК (например, метилтрансферазы, топоизомеразы, геликазы, лигазы, киназы, фосфатазы, полимеразы, эндонуклеазы) и ассоциированные с ними факторы и модификаторы. См., например, публикацию США № 20130253040, включенную в данное описание посредством ссылки в полном объеме. Пригодные домены для достижения активации включают домен активации HSV VP16 (см., например, Hagmann et al., *J. Virol.* 71, 5952-5962 (1997)) рецепторы ядерных гормонов (см., например, Torchia et al., *Curr. Opin. Cell. Biol.* 10: 373-383 (1998)); субъединицу p65 ядерного фактора каппа В (Bitko & Bank, *J. Virol.* 72:5610-5618 (1998) и Doyle & Hunt, *Neuroreport* 8:2937-2942 (1997)); Liu et al., *Cancer Gene Ther.* 5:3-28 (1998) или искусственные химерные функциональные домены, такие как VP64 (Beerli et al. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:14623-33), а также дегрон (Molinari et al. (1999) *EMBO J.* 18, 6439-6447). Дополнительные иллюстративные домены активации включают: Oct 1, Oct-2A, Sp1, AP-2, and CTF1 (Seipel et al., *EMBO J.* 11, 4961-4968 (1992) а также p300, CBP, PCAF, SRC1 PVALF, AtHD2A и ERF-2. См., например, Roberg et al. (2000) *Mol. Endocrinol* 14:329-347; Collingwood et al. (1999) *J. Mol. Endocrinol* 23:255-275; Leo et al. (2000) *Gene* 245:1-11; Manteuffel-Cymborowska (1999) *Acta Biochim. Pol.* 46:77-89; McKenna et al. (1999) *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 69:3-12; Malik et al. (2000) *Trends Biochem. Sci.* 25:277-283; и Lemon et al. (1999) *Curr. Opin. Genet. Dev.* 9:499-504. Дополнительные иллюстративные домены активации включают, но не ограничиваются ими, OsGAI, HALF-1, C1, AP1, ARF-5, -6, -7 и -8, CPRF1, CPRF4, MYC-RP/GP и TRAB1. См., например, Ogawa et al. (2000) *Gene* 245:21-29; Okanami et al. (1996) *Genes Cells* 1:87-99; Goff et al. (1991) *Genes Dev.* 5:298-309; Cho et al. (1999) *Plant Mol. Biol.* 40:419-429; Ulmason et al. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:5844-5849; Sprenger-Haussels et al. (2000) *Plant J.* 22:1-8; Gong et al. (1999) *Plant Mol. Biol.* 41:33-44; and Hobo et al. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*

96:15,348-15,353. Типовые домены репрессии включают, но не ограничиваются ими, KRAB A/B, KOX, TGF-бета-индуцируемый ранний ген (TIEG), *v-erbA*, SID, MBD2, MBD3, представителей семейства DNMT (например, DNMT1, DNMT3A, DNMT3B), Rb и MeCP2. См., например, Bird et al. (1999) Cell 99:451-454; Tyler et al. (1999) Cell 99:443-446; Knoepfler et al. (1999) Cell 99:447-450; и Robertson et al. (2000) Nature Genet. 25:338-342. Дополнительные типовые домены репрессии включают, но не ограничиваются ими, ROM2 и AtHD2A. См., например, Chem et al. (1996) Plant Cell 8:305-321; и Wu et al. (2000) Plant J. 22:19-27.

Слитые молекулы конструируют с помощью способов клонирования и биохимической конъюгации, которые хорошо известны специалистам в данной области техники. Слитые молекулы содержат ДНК-связывающий домен и функциональный домен (например, домен активации транскрипции или домен репрессии). Слитые молекулы также необязательно содержат сигналы ядерной локализации (такие как, например, из Т-антигена среды SV40) и теги эпитопа (такие как, например, FLAG и гемагглютинин). Слитые белки (и кодирующие их нуклеиновые кислоты) разработаны таким образом, что трансляционная рамка считывания сохраняется среди компонентов слияния.

Слияния между полипептидным компонентом функционального домена (или его функциональным фрагментом) с одной стороны и небелковым ДНК-связывающим доменом (например, антибиотиком, интеркалятором, белком, связывающимся с малой бороздой, нуклеиновой кислотой) с другой стороны, сконструированы с помощью способов биохимической конъюгации, известных специалистам в данной области техники. См., например, каталог Pierce Chemical Company (Рокфорд, штат Иллинойс). Описаны способы и композиции для изготовления слияния между белком, связывающимся с малой бороздой, и полипептидом. Mapp et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:3930-3935.

Слитую молекулу можно составить с фармацевтически приемлемым носителем, как известно специалистам в данной области техники. См., например, Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., 1985; и совместную заявку WO 00/42219.

Функциональный компонент/домен слитой молекулы можно выбрать из любого из множества различных компонентов, способных влиять на транскрипцию гена, когда слитая молекула связывается с целевой последовательностью посредством своего ДНК-связывающего домена. Следовательно, функциональный компонент может включать, но не ограничивается ими, различные домены фактора транскрипции, такие как активаторы, репрессоры, коактиваторы, корепрессоры и сайленсеры. В определенных вариантах осуществления данного изобретения слитый белок содержит ДНК-связывающий домен и домен нуклеазы для создания функциональных объектов, которые способны распознавать целевую целевую нуклеиновую кислоту посредством своих сконструированных (ZFP или TALE) ДНК-связывающих доменов и создания нуклеаз (например, нуклеазы с "цинковыми пальцами" или TALE-нуклеазы), которые обуславливают разрез ДНК вблизи участка связывания ДНК посредством активности нуклеазы. Таким образом, описанные в данном документе способы и композиции широко применимы и могут включать любую нуклеазу, представляющую интерес. Неограничивающие примеры нуклеаз включают в себя мегануклеазы, TALEN и нуклеазы с "цинковыми пальцами". Нуклеаза может содержать гетерологичные ДНК-связывающие домены и домены расщепления (например, нуклеазы с "цинковыми пальцами"; TALEN; мегануклеазы; ДНК-связывающие домены с гетерологичными доменами расщепления); или, в альтернативном варианте, ДНК-связывающий домен встречающейся в природе нуклеазы можно изменить для связывания с выбранным целевым участком (например, мегануклеаза, которая была сконструирована таким образом, чтобы связываться с участком, отличным от узнаваемого ею участка связывания).

Домен нуклеазы можно получить из любой нуклеазы, например, любой эндонуклеазы или экзонуклеазы. Неограничивающие примеры пригодных доменов нуклеазы (расщепления), которые можно слить с ДНК-связывающими доменами Htt, как описано в данном документе, включают в себя домены из любого рестрикционного фермента, например, рестрикционного фермента типа IIS (например, FokI). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения домены расщепления представляют собой полудомены расщепления, для активности которых необходима димеризация. См., например, патенты США №№ 8586526; 8409861 и 7888121, включенные в данное описание посредством ссылки в полном объеме. В большинстве случаев, для расщепления необходимы два слитых белка, если слитые белки содержат полудомены расщепления. В альтернативном варианте можно применять один белок, содержащий два полудомена расщепления. Два полудомена расщепления могут быть производными от одной и той же эндонуклеазы (или ее функциональных фрагментов), или каждый полудомен расщепления может быть производным от разных эндонуклеаз (или их функциональных фрагментов). Кроме того, целевые участки для двух слитых белков предпочтительно расположены один относительно другого таким образом, что связывание двух слитых белков с их соответствующими целевыми участками помещает полудомены расщепления в пространственную ориентацию один относительно другого, что позволяет полудоменам расщепления образовывать домен функционального расщепления, например, путем димеризации.

Домен нуклеазы также может быть производным от любого домена мегануклеазы (хоуминг-эндонуклеазы) с активностью расщепления, которая также может быть характерна для описанных в данном документе нуклеаз, включая, но не ограничиваясь ими, I-SceI, I-CeuI, PI-PspI, PI-Sce, I-SceIV, I-CsmI,

I-PanI, I-SceII, I-PpoI, I-SceIII, I-CreI, I-TevI, I-TevII и I-TevIII. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения нуклеаза содержит компактный TALEN (сTALEN). Это одноцепочечные слитые белки, связывающие ДНК-связывающий домен TALE с доменом нуклеазы TevI. Слитый белок может либо функционировать как нуклеаза, ограниченная областью TALE, либо может создавать двухцепочечный разрыв, в зависимости от того, где находится ДНК-связывающий домен TALE относительно нуклеазного домена мегануклеазы (например, TevI) (см. Beurdeley et al. (2013) Nat Comm: 1-8 DOI: 10.1038/ncomms2782).

В других вариантах осуществления данного изобретения TALE-нуклеаза представляет собой мега-TAL. Эти мега-TAL нуклеазы представляют собой слитые белки, содержащие ДНК-связывающий домен TALE и домен мегануклеазного расщепления. Домен мегануклеазного расщепления является активным в качестве мономера и не требует димеризации для активности. (См. Boissel et al. (2013) Nucl Acid Res: 1-13, doi: 10.1093/nar/gkt1224). Кроме того, нуклеазный домен мегануклеазы может также обладать функциональной возможностью ДНК-связывания. Любые TALEN можно применять в комбинации с дополнительными TALEN (например, одним или большим количеством TALEN (сTALEN или FokI-TALEN) с одним или большим количеством мега-TAL) и/или ZFN.

Кроме того, домены расщепления могут включать одно или большее количество изменений по сравнению с диким типом, например, для образования обязательных гетеродимеров, которые ослабляют или устраняют нецелевые эффекты расщепления. См., например, патенты США №№ 7914796; 8034598; и 8623618, включенные в данное описание посредством ссылки в полном объеме.

Нуклеазы, как описано в данном документе, могут образовывать двух- или одноцепочечные разрывы в двухцепочечной мишени (например, гене). Образование одноцепочечных разрывов ("ников") описано, например, в патенте США № 8703489, включенном в данный документ посредством ссылки, в котором описано, как мутация каталитического домена одного из доменов нуклеазы приводит к образованию нуклеазы.

Таким образом, домен нуклеазы (расщепления) или полудомен расщепления может представлять собой любую часть белка, которая сохраняет активность расщепления или которая сохраняет способность к мультимеризации (например, димеризации) с целью формирования домена функционального расщепления.

В альтернативном варианте нуклеазы могут быть собраны *in vivo* на целевом участке нуклеиновой кислоты с помощью так называемой технологии "сплит-фермент" (см., например, патентную публикацию США № 20090068164). Компоненты таких сплит-ферментов могут быть экспрессированы либо на отдельных экспрессионных конструкциях, либо могут быть связаны в одной открытой рамке считывания, в которой отдельные компоненты разделяют, например, с помощью саморасщепляющегося пептида 2A или IRES-последовательности. Компоненты могут быть доменами, связывающими отдельные "цинковые пальцы", или доменами, связывающими нуклеиновую кислоту мегануклеазы.

Перед применением нуклеазы можно скринировать на активность, например, в хромосомной системе на основе дрожжей, как описано в публикации США № 20090111119. Конструкции экспрессии нуклеазы можно легко разработать с помощью способов, известных в данной области техники. Экспрессия слитых белков может находиться под контролем конститутивного промотора или индуцибельного промотора, например, промотора галактокиназы, который активируется (дерепрессируется) в присутствии раффинозы и/или галактозы и репрессируется в присутствии глюкозы. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения промотор саморегулирует экспрессию слитого белка, например, посредством включения участков с высокой аффинностью связывания. См., например, заявку США № 61955002, поданную 18 марта 2014 года.

Доставка

Белки и/или полинуклеотиды (например, репрессоры Htt) и композиции, содержащие белки и/или полинуклеотиды, описанные в данном документе, могут быть доставлены в целевую клетку с помощью любых пригодных способов, включая, например, инъекционное введение белков, доставка с помощью мРНК и/или экспрессионной конструкции (например, плазмиды, лентивирусного вектора, вектора AAV, вектора Ad и т.д.). В предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения репрессор доставляется с помощью AAV9.

Способы доставки белков, содержащих белки с "цинковыми пальцами", как описано в данном документе, описаны, например, в патентах США №№ 6453242; 6503717; 6534261; 6599692; 6607882; 6689558; 6824978; 6933113; 6979539; 7013219; и 7163824, описание всех из которых включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме. Можно применять любые системы векторов, включая, но не ограничиваясь ими, плазмидные векторы, ретровирусные векторы, лентивирусные векторы, аденовирусные векторы, поксвирусные векторы, герпесвирусные векторы и векторы адено-ассоциированного вируса и т.д. См. также, патенты США №№ 8586526; 6534261; 6607882; 6824978; 6933113; 6979539; 7013219; и 7163824, включенные в данный документ посредством ссылки в полном объеме. Кроме того, будет очевидно, что любой из этих векторов может содержать одну или большее количество последовательностей, кодирующих ДНК-связывающие белки. Таким образом, когда один или большее репрессоров Htt вводят в клетку, последовательности, кодирующие белковые компоненты и/или полинуклеотид-

ные компоненты, могут переноситься на одном и том же векторе или на разных векторах. Когда применяют множество векторов, каждый вектор может содержать последовательность, кодирующую один или большее количество репрессоров Htt или их компонентов.

Для введения нуклеиновых кислот, кодирующих сконструированные репрессоры Htt, в клетки (например, клетки млекопитающих) и ткани-мишени можно применять общеизвестные способы переноса генов на основе вирусов и на невирусной основе. Такие способы можно также применять для введения нуклеиновых кислот, кодирующих такие репрессоры (или их компоненты) в клетки *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения нуклеиновые кислоты, кодирующие репрессоры, вводят в составе генной терапии *in vivo* или *ex vivo*. Системы доставки на основе невирусных векторов включают ДНК-плазмиды, оголенную нуклеиновую кислоту и нуклеиновую кислоту, входящую в состав носителя для доставки, такого как липосома или полочкамер. Системы доставки на основе вирусных векторов включают ДНК и РНК-вирусы, которые после доставки в клетку имеют либо эписомальные, либо интегрированные геномы. Для обзора методов генной терапии см. Anderson, *Science* 256:808-813 (1992); Nabel & Feigner, *TIBTECH* 11:211-217 (1993); Mitani & Caskey, *TIBTECH* 11:162-166 (1993); Dillon, *TIBTECH* 11:167-175 (1993); Miller, *Nature* 357:455-460 (1992); Van Brunt, *Biotechnology* 6(10): 1149-1154 (1988); Vigne, *Restorative Neurology and Neuroscience* 8:35-36 (1995); Kremer & Perricaudet, *British Medical Bulletin* 51(1):31-44 (1995); Haddada et al., в *Current Topics in Microbiology and Immunology Doerfler and Bohm (eds.)* (1995); и Yu et al., *Gene Therapy* 1:13-26 (1994).

Способы невирусной доставки нуклеиновых кислот включают электропорацию, липофекцию, микроинъекцию, биолистику, виросомы, липосомы, иммунолипосомы, конъюгаты "поликатион или липид: нуклеиновая кислота", оголенную ДНК, оголенную РНК, искусственные вирионы и усиленное агентом поглощение ДНК. Для доставки нуклеиновых кислот также может применяться порация ультразвуком, например, система Sonitron 2000 (Rich-Mar). В предпочтительном варианте осуществления данного изобретения одну или большее количество нуклеиновых кислот доставляют в виде мРНК. Также предпочтительным является применение кэпированных мРНК для повышения эффективности трансляции и/или стабильности мРНК. Особенно предпочтительными являются кэпы ARCA (анти-реверсный аналог кэпа) или их варианты. См. патенты США US7074596 и US8153773, включенные в данное описание посредством ссылки.

Дополнительные иллюстративные системы доставки нуклеиновой кислоты включают системы, предоставляемые Amaha Biosystems (Кельн, Германия), Maxcyte, Inc. (Роквилл, штат Мэриленд), системы молекулярной доставки ВТХ (Холлистон, штат Массачусетс) и Copernicus Therapeutics Inc, (см., например, US6008336). Липофекция описана, например, в патентах США №№ 5049386; 4946787; и 4897355), а липофекционные реагенты являются коммерчески доступными (например, трансфектам и липофектин,™ а™ также липофектамин™ RNAiMAX). Катионные и нейтральные липиды, которые пригодны для эффективной рецепторно-распознаваемой липофекции полинуклеотидов, включают катионные и нейтральные липиды, согласно Feigner, WO 91/17424, WO 91/16024. Доставка может осуществляться в клетки (введение *ex vivo*) или целевые ткани (введение *in vivo*). Приготовление комплексов "липид:нуклеиновая кислота", включая целенаправленные липосомы, такие как иммунолипидные комплексы, хорошо известно специалисту в данной области техники (см., например, Crystal, *Science* 270:404-410 (1995); Blaese et al., *Cancer Gene Ther.* 2:291-297 (1995); Behr et al., *Bioconjugate Chem.* 5:382-389 (1994); Remy et al., *Bioconjugate Chem.* 5:647-654 (1994); Gao et al., *Gene Therapy* 2:710-722 (1995); Ahmad et al., *Cancer Res.* 52:4817-4820 (1992); патенты США. №№ 4186183, 4217344, 4235871, 4261975, 4485054, 4501728, 4774085, 4837028 и 4946787).

Дополнительные способы доставки включают применение упаковывания нуклеиновых кислот, которые необходимо доставить, в носители для доставки EnGeneIC (EDV). Эти EDV специфически доставляются в целевые ткани с применением биспецифических антител, при этом одно плечо антитела характеризуется специфичностью для целевой ткани, а другое плечо характеризуется специфичностью для EDV. Антитело доставляет EDV к поверхности целевой клетки, а затем EDV проникает в клетку с помощью эндоцитоза. Сразу после проникновения в клетку содержимое высвобождается (см. MacDiarmid et al. (2009) *Nature Biotechnology* 27(7):643). Применение РНК- или ДНК-вирусных систем для доставки нуклеиновых кислот, кодирующих сконструированные ZFP, TALE или системы CRISPR/Cas, основано на высокоэффективных процессах нацеливания вируса на специфические клетки организма и передачи вирусной полезной нагрузки в ядро. Вирусные векторы можно вводить непосредственно пациентам (*in vivo*), или их можно применять для обработки клеток *in vitro*, после чего вводить модифицированные клетки пациентам (*ex vivo*). Общеизвестные вирусные системы для доставки ZFP, TALE или системы CRISPR/Cas включают, но не ограничиваются ими, ретровирусные, лентивирусные, аденовирусные векторы, векторы адено-ассоциированного вируса, вируса осповакцины и простого герпеса для переноса генов. Интеграция в геном хозяина возможна с помощью методов переноса генов с помощью векторов ретровирусов, лентивирусов и адено-ассоциированных вирусов, что часто обуславливает длительную экспрессию введенного трансгена. Кроме того, высокая эффективность трансдукции наблюдалась во многих разных типах клеток и целевых тканях. Тропизм ретровируса можно изменить путем включения чужеродных белков оболочки, расширяя потенциальную целевую популяцию целевых клеток. Лентиви-

русные векторы представляют собой ретровирусные векторы, которые способны трансформировать или инфицировать не делящиеся клетки и, как правило, продуцировать высокие вирусные титры. Выбор ретровирусной системы переноса генов зависит от целевой ткани. Ретровирусные векторы состоят из цис-функционирующих длинных концевых повторов с упаковочной емкостью до 6-10 т.н. чужеродной последовательности. Минимальные цис-функционирующие LTR являются достаточными для репликации и упаковки векторов, которые затем применяются для интеграции терапевтического гена в целевую клетку для обеспечения постоянной трансгенной экспрессии. Широко используемые ретровирусные векторы включают те, которые основаны на вирусе лейкозы мыши (MuLV), вирусе лейкоза гиббонов (GaLV), вирусе иммунодефицита обезьян (SIV), вирусе иммунодефицита человека (HIV) и их комбинации (см., например, Buchscher et al., *J. Virol.* 66:2731-2739 (1992); Johann et al., *J. Virol.* 66:1635-1640 (1992); Sommerfelt et al., *Virol.* 176:58-59 (1990); Wilson et al., *J. Virol.* 63:2374-2378 (1989); Miller et al., *J. Virol.* 65:2220-2224 (1991); PCT/US94/05700). В ситуациях, когда предпочтительной является транзистентная экспрессия, можно применять системы на основе аденовируса. Аденовирусные векторы способны к очень высокоэффективной трансдукции во многих типах клеток и не требуют деления клеток. С помощью таких векторов получают высокий титр и высокий уровень экспрессии. Этот вектор можно получить в больших количествах в относительно простой системе. Векторы адено-ассоциированного вируса ("AAV") также применяются для трансдукции клеток с целевыми нуклеиновыми кислотами, например, при продуцировании нуклеиновых кислот и пептидов *in vitro*, а также для методов генной терапии *in vivo* и *ex vivo* (см., например, West et al., *Virology* 160:38-47 (1987); U.S. Patent No. 4,797,368; WO 93/24641; Kotin, *Human Gene Therapy* 5:793-801 (1994); Muzyczka, *J. Clin. Invest.* 94:1351 (1994). Конструкции рекомбинантных векторов AAV описаны в ряде публикаций, включая патент США № 5173414; Tratschin et al., *Mol. Cell. Biol.* 5:3251-3260 (1985); Tratschin, et al., *Mol. Cell. Biol.* 4:2072-2081 (1984); Hermonat & Muzyczka, *PNAS* 81:6466-6470 (1984); и Samulski et al., *J. Virol.* 63:03822-3828 (1989).

В настоящее время в клинических исследованиях для переноса генов доступны по меньшей мере шесть схем вирусных векторов, основанных на принципах, которые включают комплементацию дефектных векторов генами, вставленными в линии клеток-хелперов, для генерации трансдуцирующего агента.

pLASN и MFG-S являются примерами ретровирусных векторов, которые применялись в клинических исследованиях (Dunbar et al., *Blood* 85:3048-305 (1995); Kohn et al., *Nat. Med.* 1:1017-102 (1995); Malech et al., *PNAS* 94:22 12133-12138 (1997)). PA317/pLASN был первым терапевтическим вектором, который применялся в исследовании генной терапии. (Blaese et al., *Science* 270:475-480 (1995)). Эффективность трансдукции, составляющая 50% или выше, наблюдалась при применении MFG-S-упакованных векторов. (Ellem et al., *Immunol Immunother.* 44(1):10-20 (1997); Dranoff et al., *Hum. Gene Ther.* 1:111-2(1997).

Рекомбинантные векторы адено-ассоциированного вируса (rAAV) представляют собой перспективные альтернативные системы доставки генов, на основе дефектного и непатогенного адено-ассоциированного парвовируса 2 типа. Все векторы являются производными от плазмиды, которая сохраняет только инвертированные концевые повторы AAV 145 п.о., фланкирующие с касетой экспрессии трансгена. Ключевыми особенностями этой векторной системы являются эффективный перенос гена и стабильная доставка трансгена, благодаря интеграции в геномы трансдуцированной клетки. (Wagner et al., *Lancet* 351:9117 1702-3 (1998), Keams et al., *Gene Ther.* 9:748-55 (1996)). Другие серотипы AAV, включая AAV1, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV8AAV 8.2, AAV9 и AAV rh10 и псевдотипированные AAV, такие как AAV2/8, AAV2/5 и AAV2/6, также можно применять в соответствии с данным изобретением. В предпочтительных вариантах осуществления данного изобретения применяют AAV9.

Дефектные по репликации рекомбинантные аденовирусные векторы (Ad) можно получить в высоком титре и легко инфицировать ими множество разных типов клеток. Большинство аденовирусных векторов сконструированы таким образом, что трансген заменяет гены Ad E1a, E1b и/или E3; впоследствии дефектный по репликации вектор распространяется в клетках человека 293, которые обеспечивают функционирование удаленного гена в транс-положении. Векторы Ad могут трансформировать несколько типов тканей *in vivo*, включая неделящиеся, дифференцированные клетки, такие как обнаруженные в печени, почках и мышцах. Обычные векторы Ad характеризуются возможностью переносить большой объем. Пример применения вектора Ad в клиническом исследовании включал полинуклеотидную терапию с целью противоопухолевой иммунизации с помощью внутримышечного введения (Sternan et al., *Hum. Gene Ther.* 7:1083-9 (1998)). Дополнительные примеры применения аденовирусных векторов для переноса генов в клинических исследованиях включают Rosenecker et al., *Infection* 24:1 5-10 (1996); Sternan et al., *Hum. Gene Ther.* 9:7 1083-1089 (1998); Welsh et al., *Hum. Gene Ther.* 2:205-18 (1995); Alvarez et al., *Hum. Gene Ther.* 5:597-613 (1997); Topf et al., *Gene Ther.* 5:507-513 (1998); Sternan et al., *Hum. Gene Ther.* 7:1083-1089 (1998).

Упаковочные клетки применяются для образования вирусных частиц, которые способны инфицировать клетку-хозяина. Такие клетки включают клетки 293, которые упаковывают аденовирус, и клетки ψ 2 или клетки PA317, которые упаковывают ретровирус. Как правило, вирусные векторы, применяемые в генной терапии, генерируются линией клеток-продуцентов, которая упаковывает вектор нуклеиновой кислоты в вирусную частицу. Векторы обычно содержат минимальные вирусные последовательности,

необходимые для упаковки и последующей интеграции в хозяина (если применимо), причем другие вирусные последовательности заменяются кассетой экспрессии, кодирующей белок, который должен быть экспрессирован. Отсутствующие вирусные функции обеспечиваются в транс-положении линией упаковочных клеток. Например, векторы AAV, применяемые в генной терапии, как правило, имеют только последовательности инвертированного концевой повтора (ITR) из генома AAV, которые необходимы для упаковки и интеграции в геном хозяина. Вирусную ДНК упаковывают в линию клеток, которая содержит плазмиду-хелпер, кодирующую другие AAV гены, а именно рэп и кэп, но не содержит последовательности ITR. Линию клеток также инфицируют аденовирусом в качестве хелпера. Вирус-хелпер способствует репликации вектора AAV и экспрессии генов AAV из плазмиды-хелпера. Плаزمиды-хелпер не упаковывается в значительных количествах из-за отсутствия последовательности ITR. Уровень контаминации аденовирусом можно снизить, например, при термической обработке, к которой аденовирус более чувствителен, чем AAV.

При применении многих методов генной терапии является желательным, чтобы вектор генной терапии был доставлен к определенному типу ткани с высокой степенью специфичности. Соответственно, вирусный вектор можно модифицировать, чтобы получить специфичность для данного типа клеток, путем экспрессии лиганда в виде слитого белка с белком вирусной оболочки на внешней поверхности вируса. Лиганд выбирают на основе его аффинности к рецептору, о котором известно, что он присутствует на типе клеток, представляющем интерес. Например, в публикации Han et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:9141-9151 (1995), сообщается, что вирус мышинного лейкоза Молони можно модифицировать для экспрессии герегулина человека, слитого с gp70, при этом рекомбинантный вирус инфицирует определенные клетки рака молочной железы человека, экспрессирующие рецептор к эпидермальному фактору роста человека. Этот принцип можно распространить на другие пары "вирус - целевая клетка", в которых целевая клетка экспрессирует рецептор, а вирус экспрессирует слитый белок, содержащий лиганд для рецептора клеточной поверхности. Например, можно сконструировать филаментный фаг с целью отображения фрагментов антител (например, FАВ или Fv), обладающих специфической аффинностью связывания для практически любого выбранного клеточного рецептора. Хотя вышеприведенное описание относится в первую очередь к вирусным векторам, те же самые принципы могут быть применены к не-вирусным векторам. Такие векторы могут быть сконструированы так, чтобы содержать специфические последовательности поглощения, которые способствуют поглощению вектора определенными целевыми клетками.

Векторы для применения в генной терапии могут доставляться *in vivo* путем введения отдельному пациенту, как правило, при системном введении (например, с помощью внутривенной, внутрибрюшной, внутримышечной, подкожной или внутричерепной инфузии, в том числе непосредственной инъекции в головной мозг) или при местном применении, как описано ниже. В альтернативном варианте, векторы могут быть доставлены в клетки *ex vivo*, такие как клетки, эксплантированные от отдельного пациента (например, лимфоциты, клетки аспирата костного мозга, биопсии тканей), или универсальные донорские гемопоэтические стволовые клетки с последующей реимплантацией клеток в организм пациента, как правило, после отбора клеток, в которые был включен вектор.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения композиции, как описано в данном документе (например, полинуклеотиды и/или белки), доставляются непосредственно *in vivo*. Композиции (клетки, полинуклеотиды и/или белки) можно вводить непосредственно в центральную нервную систему (ЦНС), с помощью, но не ограничиваясь этим, непосредственной инъекции в головной мозг или спинной мозг. Композиции могут быть нацелены на одну или большее количество областей головного мозга, включая, но не ограничиваясь ими, гиппокамп, черную субстанцию, базальные ядра Мейнерта (NBM), стриатум и/или кору. Альтернативно или в дополнение к доставке в ЦНС, композиции можно вводить системно (например, путем внутривенной, внутрибрюшной, внутрисердечной, внутримышечной, интратекальной, подкожной и/или внутричерепной инфузии). Способы и композиции для непосредственной доставки композиций в организм субъекта, как описано в данном документе (включая, доставку непосредственно в ЦНС), включают, но не ограничиваются ими, непосредственную инъекцию (например, стереотаксическую инъекцию) с применением комплектов игл. Такие способы описаны, например, в патентах США №№ 7837668; 8092429, относящихся к доставке композиций (включая экспрессионные векторы) в головной мозг, и в патентной публикации США № 20060239966, включенных в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

Эффективное количество, которое необходимо ввести, будет индивидуальным для каждого пациента и будет зависеть от схемы введения и места введения. Соответственно, эффективные количества лучше всего определит врач, назначающий указанные композиции, а соответствующие дозы сможет легко определить специалист в данной области техники. После истечения достаточного времени для интеграции и экспрессии (как правило, 4-15 дней, например), с помощью анализа уровня терапевтического полипептида в сыворотке или других тканях, а также сравнение с начальным уровнем до введения, будут определять, является ли вводимое количество слишком низкой, находится в правильном диапазоне, или является слишком высокой. Пригодные схемы для начального и последующего введений также являются переменными, но типичны для начального введения, после которого при необходимости осуществляют

последующие введения. Последующие введения могут осуществляться с переменными интервалами: от ежедневного введения до ежегодного введения, а также введения один раз в нескольких лет. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения при применении вирусного вектора, такого как AAV, вводимая доза составляет от 1×10^{10} до 5×10^{15} вг/мл (или любое значение в этом диапазоне), еще более предпочтительно от 1×10^{11} до 1×10^{14} вг/мл (или любое значение в этом диапазоне), еще более предпочтительно от 1×10^{12} до 1×10^{13} вг/мл (или любое значение в этом диапазоне).

Для доставки ZFP с помощью векторов адено-ассоциированного вируса (AAV) непосредственно в головной мозг человека может применяться диапазон дозы от 1×10^{10} до 5×10^{15} (или любое значение в этом диапазоне, включая, например, 1×10^{11} и 1×10^{14} вг/мл или 1×10^{12} и 1×10^{13} вг/мл) векторных геномов на стриатум. Как отмечается, дозы могут варьироваться в зависимости от тех или иных структур головного мозга и протоколов доставки. Способы доставки векторов AAV непосредственно в головной мозг известны в данной области техники. См., например, патенты США №№ 9089667; 9050299; 8337458; 8309355; 7182944; 6953575; и 6309634. Клеточное трансфицирование *ex vivo* для диагностики, исследовательских целей или для генной терапии (например, путем реинфузии трансфицированных клеток в организм хозяина) хорошо известно специалистам в данной области техники. В предпочтительном варианте осуществления данного изобретения клетки выделяют из организма субъекта, трансфицируют по меньшей мере одним репрессором Htt или его компонентом и повторно вводят обратно в организм субъекта (например, пациента). В предпочтительном варианте осуществления данного изобретения одну или большее количество нуклеиновых кислот репрессора Htt доставляют с помощью AAV9. В других вариантах осуществления данного изобретения одну или большее количество нуклеиновых кислот репрессора Htt доставляют в виде мРНК. Также предпочтительным является применение экспрессированных мРНК для повышения эффективности трансляции и/или стабильности мРНК. Особенно предпочтительными являются экзпы ARCA (анти-реверсный аналог экзпа) или их варианты. См. патенты США №№ 7074596 и 8153773, включенные в данное описание посредством ссылки в полном объеме. Различные типы клеток, пригодные для трансфицирования *ex vivo*, хорошо известны специалистам в данной области техники (см., например, публикацию Freshney et al., *Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique* (3rd ed. 1994)) и ссылки, приведенные в ней, для обсуждения того, как выделять и культивировать клетки от пациентов).

В одном варианте осуществления данного изобретения стволовые клетки применяются в способах *ex vivo* для клеточного трансфицирования и генной терапии. Преимущество применения стволовых клеток заключается в том, что они могут быть дифференцированы в другие типы клеток *in vitro*, или могут быть введены в организм млекопитающих (таких как доноры указанных клеток), в котором они будут внедряться в костный мозг. Методы дифференцировки CD34⁺ клеток *in vitro* в клинически значимые типы иммунных клеток с помощью цитокинов, таких как GM-CSF, IFN- γ и TNF- α , хорошо известны (см. Inaba et al., *J. Exp. Med.* 176:1693-1702 (1992)). Стволовые клетки выделяют для трансдукции и дифференцировки с помощью известных методов. Например, стволовые клетки выделяют из клеток костного мозга путем пэннинга клеток костного мозга с применением антител, которые связывают нежелательные клетки, такие как CD4⁺ и CD8⁺ (Т-клетки), CD45⁺ (panB-клетки), GR-1 (гранулоциты) и Iad (дифференцированные антигенпредставляющие клетки) (см. Inaba et al., *J. Exp. Med.* 176:1693-1702(1992)).

Стволовые клетки, которые были модифицированы, также могут применяться в некоторых вариантах осуществления данного изобретения. Например, нейронные стволовые клетки, которые были продуцированы устойчивыми к апоптозу, можно применять в качестве терапевтических композиций, в которых стволовые клетки также содержат ZFP TF по данному изобретению. Устойчивость к апоптозу можно получить, например, путем "выбивания" BAX и/или BAK с помощью BAX- или BAK-специфичных TALEN или ZFN (см. патент США № 8597912) в стволовых клетках или тех, в которых разрушена каспаза 6, как и в предыдущем примере, с помощью, например, ZFN, специфических к каспазе 6. Эти клетки могут трансфицироваться с помощью ZFP TF или TALE TF, которые, как известно, регулируют мутантный или дикий тип Htt.

Векторы (например, ретровирусы, аденовирусы, липосомы и т.д.), содержащие терапевтические нуклеиновые кислоты ZFP, также можно вводить непосредственно в организм для трансдукции клеток *in vivo*. В альтернативном варианте можно вводить оголенную ДНК. Введение осуществляют с помощью любого из путей, обычно применяемых для приведения молекулы в итоговый контакт с кровью или клетками ткани, включая, но не ограничиваясь ими, инъекцию, инфузию, местное применение и электропорацию. Пригодные способы введения таких нуклеиновых кислот доступны и хорошо известны специалистам в данной области техники, и, несмотря на то, что для введения конкретной композиции можно применять более одного пути, конкретный маршрут может часто обеспечивать более быстрый и более эффективный ответ по сравнению с другим путем.

Способы введения ДНК в гемопоэтические стволовые клетки описаны, например, в патенте США № 5928638. Векторы, пригодные для введения трансгенов в гемопоэтические стволовые клетки, например, CD34⁺ клетки, включают векторы аденовируса типа 35.

Векторы, пригодные для введения трансгенов в иммунные клетки (например, Т-клетки), включают

неинтегрирующие лентивирусные векторы. См., например, Naldini et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:11382-11388; Dull et al. (1998)7. Virol. 72:8463-8471; Zuffery et al. (1998)7. Virol. 72:9873-9880; Follenzi et al. (2000) Nature Genetics 25:217-222.

Фармацевтически приемлемые носители частично определяются конкретной вводимой композицией, а также конкретным способом, применяемым для введения указанной композиции. Соответственно, существует широкий спектр пригодных составов доступных фармацевтических композиций, как описано ниже (см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., 1989).

Как отмечено выше, описанные способы и композиции могут применяться в клетках любого типа, включая, но не ограничиваясь ими, прокариотические клетки, грибковые клетки, археальные клетки, клетки растений, клетки насекомых, клетки животных, клетки позвоночных, клетки млекопитающих и клетки человека. Пригодные линии клеток для экспрессии белка известны специалистам в данной области техники и включают, но не ограничиваются ими, COS, CHO (например, CHO-S, CHO-K1, CHO-DG44, CHO-DUXB11), VERO, MDCK, WI38, V79, B14AF28-G3, BHK, HaK, NS0, SP2/0-Ag14, HeLa, HEK293 (например, HEK293-F, HEK293-H, HEK293-T), perC6, клетки насекомых, таких как *Spodoptera fugiperda* (Sf) и грибковые клетки, такие как *Saccharomyces*, *Pischia* и *Schizosaccharomyces*. Также можно применять потомство, варианты и производные этих линий клеток. В предпочтительном варианте осуществления данного изобретения способы и композицию доставляют непосредственно в клетку головного мозга, например, в стриатум.

Область применения

Htt-связывающие молекулы (например, ZFP, TALE, CRISPR/Cas, Ttago и т.д.), как описано в данном документе, и нуклеиновые кислоты, кодирующие их, могут применяться для различных целей. Эти применения включают терапевтические методы, в которых Htt-связывающая молекула (включая нуклеиновую кислоту, кодирующую ДНК-связывающий белок) вводится субъекту (например, с помощью AAV, такого как AAV9) и используется для модуляции экспрессии целевого гена в организме субъекта. Модуляция может быть в форме репрессии, например, репрессии mHtt, которая способствует патологическому состоянию БХ. В альтернативном варианте модуляция может быть в форме активации, при этом активация экспрессии или повышенный уровень экспрессии эндогенного клеточного гена может облегчать патологическое состояние. В других вариантах осуществления данного изобретения модуляция может быть расщеплением (например, с помощью одной или большего количества нуклеаз), например, для инактивации мутантного гена Htt. Как отмечено выше, для таких применений Htt-связывающие молекулы или, более типично, нуклеиновые кислоты, кодирующие их, составлены с фармацевтически приемлемым носителем в виде фармацевтической композиции.

Htt-связывающие молекулы или векторы, кодирующие их, отдельно или в комбинации с другими пригодными компонентами (например, липосомами, наночастицами или другими компонентами, известными в данной области техники), могут быть составлены в аэрозольные композиции (т.е., они могут быть "небулизированными"), которые можно вводить путем ингаляции. Аэрозольные композиции можно поместить в пригодные находящиеся под давлением пропелленты, такие как дихлордифторметан, пропан, азот и тому подобное. Составы, пригодные для парентерального введения, с помощью, например, таких путей, как внутривенный, внутримышечный, внутрикостный и подкожный, включают водные и неводные, изотонические стерильные инъекционные растворы, которые могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостатические агенты и растворенные вещества, которые делают композицию изотоничной по отношению к крови предполагаемого реципиента; и водные и неводные стерильные суспензии, которые могут включать суспендирующие агенты, солюбилизаторы, загустители, стабилизаторы и консерванты. Композиции можно вводить, например, путем внутривенной инфузии, перорально, местно, внутрибрюшинно, внутрипузырно, интракраниально или интратекально. Составы соединений могут быть представлены в герметичных контейнерах с одной или множеством доз, таких как ампулы и флаконы. Инъекционные растворы и суспензии можно приготовить из стерильных порошков, гранул и таблеток, описанных выше. Доза, вводимая пациенту, должна быть достаточной для осуществления полезного терапевтического ответа у пациента в динамике. Доза определяется эффективностью, а K_d конкретной применяемой Htt-связывающей молекулы, целевой клеткой и состоянием пациента, а также веса или площади поверхности тела пациента, подлежащего лечению. Количество дозы также определяется наличием, характером и степенью любых нежелательных побочных эффектов, которые сопровождают введение конкретного соединения или вектора конкретному пациенту.

Полезный терапевтический ответ можно измерить с помощью нескольких способов. Например, можно оценить положительную динамику моторных нарушений при болезни Хантингтона, таких как непроизвольные подергивания или извивающиеся движения, проблемы с мышцами, такие как жесткость или контрактура мышц (дистония), медленные или аномальные движения глаз, нарушение походки, позы и равновесия, трудности с физическим произведением речи или глотанием, нарушения произвольных движений. Также можно проводить мониторинг других нарушений, таких как когнитивные и психические расстройства, на предмет признаков улучшения, связанных с лечением. Для количественной оценки клинических особенностей заболевания можно применять шкалу UHDRS.

Для пациентов в предсимптомном периоде заболевания, лечение может быть особенно важным, по-

сколькo оно дает возможность воздействовать на заболевание до развития обширной нейродегенерации, которая возникает при БХ. Это поражение начинается до развития описанных выше явных симптомов. В патогенезе БХ ключевую роль имеет токсический эффект мутантного Htt в средних шипиковых нейронах стриатума. Эти средние шипиковые нейроны экспрессируют высокие уровни фосфодиэстеразы 10A (PDE10A), регулирующей сигнальные каскады cAMP и cGMP, которые вовлечены процесс функционирования факторов транскрипции гена, рецепторов нейротрансмиттеров и потенциалзависимых каналов (Niccolini et al. (2015) Brain 138:3016-3029), при этом было продемонстрировано, что у мышей с БХ уровень экспрессии PDE10A снижается; аналогичные результаты были получены при посмертных исследованиях у людей. Недавно были разработаны лиганды позитронной эмиссионной томографии (ПЭТ), которые являются лигандами для фермента PDE10A (например, ^{11}C -IMA107, (Niccolini et al., там же; ^{18}F MNI-659 (Russell et al. (2014) JAMA Neurol 71(12): 1520-1528), и эти молекулы применяли для оценки состояния пациентов в предсимптомном периоде БХ. Проведенные исследования показали, что уровни PDE10A изменяются у пациентов с БХ даже до появления симптомов. Таким образом, определение уровней PDE10A с помощью ПЭТ может быть выполнена до, во время и после лечения для оценки терапевтической эффективности композиций по данному изобретению. "Терапевтическая эффективность" может означать улучшение клинических и молекулярных показателей и может также означать защиту пациента от любого дальнейшего снижения функции средних шипиковых нейронов или увеличения гибели шипиковых нейронов или дальнейшего развития явных клинических проявлений, связанных с БХ.

Следующие примеры относятся к типовым вариантам осуществления данного изобретения, в которых Htt-модулятор содержит белок с "цинковыми пальцами". Следует понимать, что примеры приведены только в целях иллюстрации и что можно применять другие Htt-модуляторы (например, репрессоры), включая, но не ограничиваясь ими, TALE-TF, систему CRISPR/Cas, дополнительные ZFP, ZFN, TALEN, дополнительные системы CRISPR/Cas (например, системы Cfp), хоуминг-эндонуклеазы (мегануклеазы), имеющие сконструированные ДНК-связывающие домены.

Примеры

Пример 1. Репрессоры Htt.

Белки с "цинковыми пальцами" 45643 и 46025 (см. табл. 1), нацеленные на Htt, были сконструированы, как описано в патенте США № 6534261; патентных публикациях США №№ 20150056705; 20110082093; 20130253040; и заявке США № 14/706747. В табл. 1 приведены спирали распознавания ДНК-связывающего домена этих ZFP, тогда как в табл. 2 приведены целевые последовательности этих ZFP. ZFP оценивались и показаны как связанные с их целевыми участками.

ZFP 45643 и 46025 функционально связывали с доменом репрессии KRAB с целью образования ZFP-TF, которые репрессируют Htt. ZFP TF трансфицировали в клетки человека (например, клетки, полученные от пациентов с БХ), после чего проводили мониторинг уровня экспрессии Htt с помощью от-ПЦР в реальном времени. Было установлено, что оба ZFP-TF являются эффективными при селективном подавлении экспрессии мутантного Htt. ZFP-TF являются функциональными репрессорами, когда они составлены в виде плазмид, в форме мРНК, в векторах Ad, лентивирусных векторах и/или в векторах AAV (например, AAV9).

Пример 2. Материалы и методы.

Животные.

В это исследование были включены два макака резус (*Macaca mulatta*, в возрасте 4-15 лет, с массой тела > 4 кг). Эксперименты проводили в соответствии с руководящими принципами Национального института здравоохранения и протоколами, одобренными Комитетом по содержанию и использованию лабораторных животных при Калифорнийском университете в Сан-Франциско.

Приготовление векторов.

AAV9-содержащий зеленый флуоресцентный белок (GFP) под контролем цитомегаловирусного промотора генерировали с помощью тройной трансфекции клеток HEK-293, как описано ранее в публикации Matsushita et al. (1998) Gene Ther 5: 938-945. AAV9-GFP разводили непосредственно перед применением до концентрации $1,4 \times 10^{13}$ вг/мл (высокая доза) или $1,4 \times 10^{12}$ вг/мл (низкая доза) в забуференном фосфатом солевом растворе и 0,001% (об./об.) плуоронике F-68.

Хирургическое вмешательство и инфузия вектора.

Каждый ПНЧ подвергался стереотаксическому размещению монтируемых на черепе временных МРТ-совместимых пластиковых разъемов. Животное затем помещали на спину в МРТ-совместимую стереотаксическую рамку. После краниэктомии катетер-направляющие прикрепляли к черепу над обоими полушариями. После размещения разъемов интубированное животное перемещали на инструментальный стол в МРТ-модуль и помещали в ингаляционный изофлуран (1-3%). Направляющие в стерильных условиях заполняли МРТ-видимым индикатором (Prohance, Зинген, Германия), чтобы локализовать разъемы в МРТ-изображениях с целью расчета траектории к целевым структурам внутри головного мозга. Затем ПНЧ перемещали в МРТ-магнит, и для идентификации цели и планирования хирургической операции производили анатомическое МРТ-сканирование с высоким разрешением. После выбора цели, для инфузии вектора, использовали специально разработанный, керамический, устойчивый к рефлюксу катетер из плавящего кварца со ступенчатым наконечником 3мм, как описано ранее в публикации Richardson et al.

(2011) *Mol Ther* 19: 1048-1057; Krauze et al. (2005) *J Neurosurg* 103: 923-929; and Fiandaca et al. (2008). *Neurotherapeutics* 5: 123-127.

Катетер присоединяли к шприцу 1 мл, установленному на МРТ-совместимом инфузионном насосе (Harvard Apparatus, Бостон, штат Массачусетс). Вливание начинали со скорости 1 мкл/мин, и после визуализации инфузата на кончике катетера, катетер вводили через направляющий стержень в головной мозг. Когда ограничитель глубины натолкнулся на кончик направляющего стержня, проводили фиксацию стопорным винтом. Скорость инфузии повышали от начальных 1 мкл/мин до заключительных 5 мкл/мин. Каждый ПНЧ получал инфузии с проникновением вещества в пре- и пост-коммиссуральные области скорлупы, одновременно в каждую область (билатерально). Общий объем инфузии на полушарие составлял 100 μ л в обоих полушариях. Сразу же после окончания инфузии, направляющие устройства удаляли из черепа, и животных возвращали в их домашние клетки и проводили мониторинг во время восстановления после анестезии.

Получение МРТ.

Животным проводили МРТ-сканирование на аппарате Siemens Verio Magnetom 3.0T (Siemens, Мальверн, штат Пенсильвания). В результате T1-взвешенного захвата с быстрой экспозицией, малым углом отклонения (FLASH) и углом наклона вектора 4° при первом сканировании, получали изображение, взвешенное по протонной плотности, для отслеживания гадолиния в области кончика катетера (8 мс TE, 28 мс TR, 3 возбуждения, матрица 256×3×192, поле зрения 14×14 мм, срезы 1 мм). Все последующие сканирования серийно проводили с углом наклона вектора 40° с целью повышения T1-взвешивания и выделения усиления сигнала Gd.

Обработка тканей.

Животных, которым вводили AAV9, примерно через 3 недели после инфузии AAV-GFP транскрипционно перфузировали холодным физиологическим раствором, а затем - 4% параформальдегидом. Ткани головного мозга собирали и гистологически анализировали с помощью ранее описанных способов. Вкратце, 6-миллиметровые фронтальные блоки собирали через матрикс головного мозга и сразу же проводили пост-фиксацию в параформальдегиде в течение ночи, затем - криопротекцию в 30% (мас./об.) сахарозе на следующий день. Для получения серийных срезов 40 мкм применяли скользящий микротом. Хромогенное окрашивание проводили на свободно плавающих срезах для визуализации экспрессии GFP с помощью способов, которые были определены ранее.

Иммуногистохимия.

Для каждого серотипа, срезы собирали последовательно, хранили в 100-луночных контейнерах в криопротекторном растворе (0,5 М натрийфосфатный буфер, pH 7,4, 30% глицерин и 30% этиленгликоль) при 4°C до дальнейшей обработки. Иммуногистохимический анализ проводили на свободно плавающих срезах. Вкратце, промывание с применением ФСБ для процедуры на основе пероксидазы хрена (HRP), или в ФСБ с 0,1% Твин 20 (PBST) для флуоресцентного окрашивания, проводили между каждым этапом иммуногистохимического анализа. Активность эндогенной пероксидазы (для процедур на основе пероксидазы) подавляли в течение 30 минут при комнатной температуре. Блокирование неспецифического окрашивания осуществляли путем инкубации срезов в 20% лошадиной сыворотке в ФСБТ в течение 60 мин при комнатной температуре. После этого срезы инкубировали в течение ночи со специфическими первичными антителами. Первичные антитела, применяемые в иммуногистохимических анализах, были следующими: поликлональные кроличьи анти-Iba1, PAb, 1:500 (www.biocare.net/); моноклональные мышинные и анти-GFAP, 1:10000 для окрашивания на основе HRP и поликлональные кроличьи и анти-GFAP 1:1000 для флуоресценции (www.millipore.com); моноклональные мышинные анти-NeuN, 1: 5000 для окрашивания на основе HRP и 1:500 для флуоресцентного окрашивания (Millipore); моноклональные и мышинные анти-TH, 1:1000 (Millipore, MAB318); поликлональные мышинные и моноклональные кроличьи анти-GFP, 1:200 и 1:500 соответственно (Life Technologies, Millipore). Все антитела растворяли в разбавителе Da Vinci (Biocare). После трех прополоскиваний в ФСБ в течение 5 мин при комнатной температуре срезы для окрашивания на основе HRP инкубировали либо с анти-мышинным HRP полимером Mac 2 (Biocare), либо с анти-кроличьим HRP полимером March 2 (Biocare) в течение 1 ч при комнатной температуре. Активность связанной HRP визуализировали с помощью коммерчески доступного набора с 3,3'-диаминобензидиновым пероксидным субстратом (Vectro Labs). NeuN-окрашенные срезы докрашивали красителем крезилвиолетом. Наконец, иммуноокрашенные срезы устанавливали на желатинизированных стеклах, обезвоживали в спирте и ксилоле и покрывали агентом Cytoseal™ (Fisher Scientific).

Для двойного флуоресцентного иммуноокрашивания различных антигенов (GFP/GFAP, GFP/NeuN, GFP/TH, and GFP/Iba1) комбинацию первичных антител применяли к срезам в виде смеси первичных антител путем инкубации в течение ночи при 4°C. Все первичные антитела растворяли в разбавителе Da Vinci (Biocare). После трех промываний в ФСБТ моноклональные первичные антитела визуализировали путем инкубации в темноте в течение 2 ч с соответствующими вторичными конъюгированными с флуорохромом антителами: козым антимышиным DyLight 549 (красный) (Biocare), козым антикроличьим DyLight 549, ослиным антикроличьим Alexa Fluor 555 (Life Technologies), козым антимышиным DyLight 488 (зеленый), козым антикроличьим DyLight 488 и ослиным антикроличьим Alexa Fluor 488. Все вто-

ричные антитела растворяли при разбавлении 1:1000 в разбавителе антител для флуоресценции (Fluorescence Antibody Diluent) (Bioscience Resource Project). Срезы покрывали с помощью Vectashield Hard Set, фиксирующей среды для флуоресценции (Vector Labs). Контрольные срезы обрабатывали без первичных антител, и в этих случаях существенного иммунного окрашивания не наблюдали.

Полуколичественный анализ.

Анализ распределения объема (Vd) выполняли с помощью Brainlab iPlan Flow Suite (Brainlab, Мюнхен, Германия, www.brainlab.com). Места инфузии, тракты катетера и наконечник катетера идентифицировали на T1-взвешенных МРТ-изображениях в фронтальной, аксиальной и сагиттальной плоскостях. Области, представляющие интерес (ROI), были очерчены для обозначения T1-сигнала гадолиния и скорлупы-мишени. Трехмерную объемную реконструкцию серии изображений и ROI анализировали для определения расчетного Vd инфузий и его соотношения к общему объему инфузата (Vi).

Анализ срезов головного мозга.

Все обработанные срезы исследовали и проводили цифровое фотографирование на микроскопе Zeiss Axioskop (Zeiss), оснащенный цветной видеокамерой CCD и системой анализа изображений (Axiovision Software, Zeiss). У каждой обезьяны количество GFP-позитивных и NeuN-позитивных клеток определяли в обоих полушариях из фронтальных срезов через скорлупу. Флуоресцентную микроскопию применяли для определения количества дважды меченых клеток в срезах. Микрофотографии дважды меченых срезов получали путем наложения изображений от двух отдельных каналов (красный-родамин и зеленый флуоресцинизотиоцианат, совместная локализация выглядит желтой) без изменения положения срезов или фокуса (объективы $\times 20$ и $\times 40$, микроскоп Carl Zeiss в режиме ApoTome). Для каждого двойного окрашивания срезы отбирали спереди и сзади на расстоянии ~ 500 мкм от места инъекции. Для идентификации доли клеток, экспрессирующих GFP/NeuN, GFP/GFAP, GFP/TH и GFP/Iba1, каждый срез анализировали сначала с использованием одного канала на наличие фенотип-специфических клеток (TH, GFAP, Iba1 или NeuN) и второго комбинированного канала - для определения количества совместно-окрашенных клеток.

Срезы, окрашенные для выявления NeuN и GFP, брали для подсчета в количестве трех образцов из трех разных уровней места инъекции в скорлупе (билатерально). NeuN-позитивные и GFP-позитивные клетки подсчитывали при 200-кратном увеличении из 5 случайно полученных блоков (350 мкм^2) в обеих трансдуцированных областях. В нетрансдуцированной области 5 случайных блоков отбирали на расстоянии 350 мкм от определенной границы экспрессии. С помощью этих анализов существует возможность количественного сравнения векторов, хотя они не отражают общего количества трансдуцированных клеток *in vivo*. Количество клеток в каждой отобранной области усредняли с учетом всех срезов от каждого животного, а конечные данные представляли как среднее число NeuN-позитивных и GFP-позитивных клеток.

Пример 3. Эффективность инфузии и трансдукции.

Ранее мы продемонстрировали, что AAV2 представляет собой нейротропный вектор, который переносится в антероградном направлении вдоль нейронов, при введении его в паренхиму головного мозга крысы и примата, не относящегося к человеку (ПНЧ). См., например, Ciesielska et al. (2011). *Mol Ther* 19: 922-927; Kells et al. (2012) *Neurobiol Dis* 48: 228-235. Этот транспорт интактных вирусных частиц является достаточно устойчивым, настолько, что вектор, по-видимому, высвобождается из проекционных нервных окончаний, где он способен трансдуцировать дистальные нейроны. Таким образом, инфузия AAV2 в таламус ПНЧ приводила к устойчивой трансдукции кортикальных нейронов, содержащих исключительно в коре. Напротив, AAV6 транспортируется вдоль аксонов в ретроградном направлении и практически является нейротропным, как AAV2. См., например, Salegio et al. (2012) *Gene Ther*. 20(3):348-52; San Sebastian et al. (2013) *Gene Ther* 20: 1178-1183. Например, трансдукция скорлупы ПНЧ приводит к транскрипционной экспрессии кортико-стриальных нейронов.

В этом исследовании 2 ПНЧ получали инфузии AAV9-GFP в скорлупу в высокой дозе (ВД, левое полушарие, $1,5 \times 10^{13}$ вг/мл) или в низкой дозе (НД, правое полушарие, $1,5 \times 10^{12}$ вг/мл). Послеоперационный прижизненный этап намеренно сокращали (3 недели), чтобы ограничить возможные искажения результатов, возникающие в результате опосредуемых клетками ответов на GFP, как описано ранее в публикации Ciesielska et al. (2013) *Mol Ther* 21: 158-166; Samaranch et al. (2014) *Mol Ther* 22: 329-337. Распределение сигнала, усиленного гадолинием, при МРТ визуализации, оценивали волюмометрически, как описано ранее в публикации Richardson et al. (2011) *Stereotact Funct Neurosurg* 89:141-151. Результаты приведены на фиг. 1. Следует отметить, что приблизительная форма скорлупы приматов несколько коническая в сагиттальной ориентации с более широким поперечным сечением спереди, сужающимся к задней части. Покрытие скорлупы реагентом для контрастной МРТ визуализации, однако, было практически полным. Наложение между сигналом GFP и гадолиния показало, что инфузат хорошо удерживался с небольшой утечкой в передней и медиальной частях скорлупы и распространялся на область, в три раза превышающую область контрастности МРТ-изображения. Иммуногистохимическое окрашивание для выявления экспрессии GFP было очерчено и наложено на контур скорлупы, воссозданный из исходной последовательности МРТ-изображений на разных фронтальных уровнях в пределах простран-

ственных границ инфузии. Это сильно отличается от того, что было замечено при применении AAV2, когда экспрессия трансгена практически полностью коррелировала с сигналом МРТ визуализации (Fian-daca et al. (2009) *Neuroimage* 47 Suppl 2: T27-35).

Кроме того, устойчивая репортерная экспрессия проявлялась в скорлупе как при ВД, так и при НД с обилием клеточных тел и нейронных волокон (фиг. 2А-2D). Мы подсчитали нейроны GFP+/NeuN+ с помощью иммунофлюоресценции по всей первичной области трансдукции (РАТ; мм²) в плоскости тракта катетера на основе ранее описанных методов (Ciesielska et al. (2013) *Mol Ther* 21:158-166). Интенсивность GFP-позитивной экспрессии в нейронах быстро уменьшалась вдоль отчётливого периметра ≤ 350 мкм от трансдуцированных областей, в дальнейшем описываемых как "внешние" РАТ (oРАТ). В этой части исследования мы проводили подсчет тел клеток NeuN+ в РАТ и oРАТ, а также в срезах скорлупы, полученных от двух здоровых, не получавших лечения обезьян, с тем чтобы установить вектор-зависимые эффекты.

Мы также проанализировали, зависит ли эффективность трансдукции в РАТ и oРАТ от дозы с учетом NeuN-позитивных и GFP-позитивных меток, которые, по-видимому, наглядно демонстрируют AAV9-опосредованную трансдукцию и экспрессию GFP в телах нейронов. Мы не обнаружили никаких признаков гибели нейронов из-за трансдукции AAV9-GFP, что согласуется с нашими предыдущими наблюдениями относительно медленного наращивания ответов анти-GFP, проявляющихся через 6 недель после инфузии AAV9-GFP, а не через 3 недели, хотя мы отмечали признаки активации микроглии и повышающей регуляции МНС-II (фиг. 2Е-2Н). Существует целый ряд механизмов для представления антигена в головном мозге, главным образом в астроцитах (Cornet et al. (2000) *J Neuroimmunol* 106:69-77 and microglia (Nelson et al. (2002) *Ann Med* 34:491-500). С целью определения клеточной специфичности AAV9 для нейронных и глиальных мишеней в месте инфузии, мы проводили иммуноокрашивание срезов мозга для выявления трансгенных и клеточноспецифических маркеров, включая нейронный маркер NeuN для нейронов, глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP) для астроцитов, и Iba1, маркер, специфичный для микроглии.

Как изображено на фиг. 3, двойное иммунофлюоресцентное окрашивание в отношении GFP каждым из клеточных маркеров наглядно демонстрировало трансген, который легко экспрессировался как в нейронах, так и в астроцитах, тогда как микроглия не трансдуцировалась, несмотря на массивную экспрессию GFP в соседних клеточных телах и нейронных волокнах. Тем не менее активацию микроглии в трансдуцированных областях было легко обнаружить (фиг. 2Е-2Н), что свидетельствует о способности микроглии воспринимать врожденный иммунный статус локальной среды.

Пример 4. Аксональный транспорт.

Инфузия AAV9-GFP в скорлупу обуславливала трансдукцию в дистальных структурах. Окрашивание GFP наблюдали, например, в клеточных телах прелобной, лобной и теменной коры (фиг. 4). GFP-позитивные клеточные тела и волокна также присутствовали в таламусе и компонентах базальных ганглиев, включая компактный слой (SNc) и сетчатый слой (SNr) черной субстанции, а также субталамическое ядро (STN) и волокон медиального пучка переднего мозга (MFB) (фиг. 5). Наблюдали сильную дозозависимость вектора от аксонального транспорта в дистальные локусы (фиг. 7). Таким образом, высокая, но не низкая доза AAV9 обуславливала мечение клеточного тела в STN, несмотря на то, что непосредственной нейронной связи между скорлупой и STN не существует. Ранее мы отмечали такой опосредованный антероградный транспорт в базальных ганглиях при применении AAV2 (Ciesielska et al. (2011) *Mol Ther* 19:922-927, and Kells (2012), *ibid* and from thalamus to cortex (Kells et al. (2009) *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 2407-2411). Однако значительная дозозависимость транспорта AAV9-GFP предполагает двухступенчатый транспорт вектора сначала на бледный шар, а затем в STN. Антероградный транспорт AAV9 был дополнительно подтвержден наличием GFP-позитивных клеточных тел в сетчатом слое черной субстанции (SNr) с наличием волокон, маркирующих нейроны с выростами в SNr из скорлупы (фиг. 6). Неожиданно было обнаружено, что клеточные тела в компактном слое черной субстанции (SNc) также были GFP-позитивными, что свидетельствует о ретроградном транспорте из скорлупы, к которой SNc посылает сильно разветвленные выросты. Хотя и не в такой степени, как в STN, наблюдался явный дозозависимый эффект AAV9-GFP на трансдукцию в этих областях.

Таким образом, мы можем сделать вывод, что AAV9 транспортируется вдоль аксонов в обоих направлениях, что по меньшей мере частично объясняется значительным распространением AAV9 в головном мозге приматов. AAV9 заметно отличался от AAV2 и AAV6 в том, что касается аксонального транспорта и клеточной специфичности. AAV9 трансдуцировал астроциты и нейроны, но не микроглию. Вектор транспортировался аксонально как в антероградном, так и в ретроградном направлениях. Эти данные подтверждают наше понимание относительно распространения AAV9 в головном мозге приматов и являются обоснованием его применения при лечении неврологических заболеваний с выраженными кортико-стриальными поражениями, таких как болезнь Хантингтона.

Поскольку клинические исследования неврологической генной терапии с применением векторов на основе адено-ассоциированного вируса (AAV) становится более распространенным, изучение характеристик конкретных серотипов AAV в головном мозге приматов становится все более важным. Это особенно актуально в контексте более эффективных и передовых технологий инфузии векторов, которые обу-

славливают проведение клинических исследований нейрохирургических вмешательств при таких заболеваниях, как болезнь Паркинсона (Richardson et al. (2011) *Mol Ther* 19: 1048-1057) и редких неврологических нарушений, таких как дефицит декарбоксилазы ароматической L-аминокислоты (AADC) (San Sebastian et al. (2014) *Mol Ther Methods Clin Dev* 3). В этом новом клинически применяемом методе используется интраоперационная МРТ для визуализации инфузий AAV2 в паренхиме. Пригодность этого метода обусловлена выраженной корреляцией между распространением контрастного реагента для МРТ визуализации и возможной экспрессией трансгена. Однако эта близкая корреляция несколько отличается от AAV9. Экспрессия GFP значительно расширялась (~ 3 раза) за пределы объема инфузий, подчеркивая важную роль интерстициальных или периваскулярных транспортных процессов, возникающих в результате первичной инфузий под давлением (CED) (Hadaczek et al. (2006) *Mol Ther* 14: 69-78). В случае с AAV2, мы хотели бы привести аргументы в пользу того, что avidность вектора для многочисленных гепарансульфатных протеогликанов (Summerford et al. (1998). *J Virol* 72: 1438-1445) помогает ограничить AAV2 местом инфузий и сопоставляет распространение экспрессии трансгена близко к распространению контрастного реагента при МРТ визуализации. Напротив, первичный рецептор для AAV9 не является HSPG (Shen et al. (2011) *J Biol Chem* 286:13532-13540), и этот вектор может, таким образом, задействовать периваскулярные ткани для достижения гораздо большего объема экспрессии при применении данного объема инфузий. AAV9 проявляет широкий тропизм в нервной ткани (Gray et al. (2011) *Mol Ther* 19:1058-1069; Hinderer et al. (2014) *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development* 1; Foust et al. (2009) *Nat Biotechnol* 27: 59-65, трансдуцируя как нейроны, так и астроциты, а также, возможно, другие типы клеток. Способность AAV9 трансдуцировать антигенпредставляющие клетки (АПК) в головном мозге вызывает беспокойство, учитывая экспрессию чужеродных ("не своих") белков (Ciesielska et al. (2013) *Mol Ther* 21: 158-166; Samaranch et al. (2014) *Mol Ther* 22: 329-337; Forsayeth and Bankiewicz (2015) *Mol Ther* 23:612) в АПК с последующим включением нейротоксических адаптивных иммунных реакций. Это, конечно, вряд ли будет проблемой при экспрессии "своих" белков, но в настоящем исследовании мы наблюдали, как и ранее, активацию Iba1 и повышающую регуляцию МНС-II на астроцитах и микроглии. Оба типа глий представляют собой мозговые АПК которые имеют уникальные индивидуальные функции. Тем не менее, мы не наблюдали каких-либо признаков трансдукции микроглии AAV9-GFP, хотя эти клетки явно реагировали на представление GFP. Наш вывод заключается в том, что астроциты являются ключевым АПК в отношении адаптивных ответов на экспрессию GFP.

Одним из самых ярких открытий относительно характеристик серотипов AAV в головном мозге был феномен аксонального транспорта. Способность нейронов транспортировать интактные частицы AAV на большие расстояния была впервые описана для AAV2, хотя этот же феномен был описан для вируса Herpes simplex (Costantini et al. (1999) *Hum Gene Ther* 10: 2481-2494; Diefenbach et al. (2008) *Rev Med Virol* 18:35-51; Lilley et al. (2001) *J Virol* 75: 4343-4356; и McGraw and Friedman (2009) *J Virol* 83:4791-4799) и вируса бешенства (Gillet et al. (1986) *J Neuropathol Exp Neurol* 45:619-634; Kelly and Strick (2000) *J Neurosci Methods* 103:63-71; Klingen et al. (2008) *J Virol* 82: 237-245; Larsen et al. (2007) *Front Neural Circuits* 1:5). В отличие от первичного ретроградного транспорта вышеуказанных вирусов, AAV2 подвергается anteretrogradному транспорту в нейронах ЦНС; т.е. частицы AAV2 транспортируются интактными от тел нейронных клеток к синаптическим окончаниям, где они высвобождаются и впоследствии поглощаются нейронами в дистальных локализациях. См., Ciesielska, et al. (2011) *Mol Ther* 19:922-927; Kells et al. (2012) *Neurobiol Dis* 48: 228-235; Kells et al. (2009) *Proc Natl Acad Sci USA* 106:2407-2411. Этот феномен требует очень эффективного распространения и трансдукции в месте первичной трансдукции, и этим можно объяснить тот факт, почему указанный феномен не был обнаружен ранее, поскольку только CED может фактически достичь этой степени эффективности. Инфузия AAV2 в таламус ПНЧ приводит к распространенной кортикальной экспрессии трансгена, прежде всего пирамидальных нейронов, расположенных в кортикальной пластинке V/VI. Аналогичным образом, трансдукция скорлупы ПНЧ или стриатума крысы вектором AAV2 приводит к экспрессии трансгена в телах клеток внутри SNr, который получает выросты ГАМКергических нейронов из стриатума, но не SNc, нейроны которого направляют свои выросты в стриатум. В отличие от anteretrogradного транспорта AAV2, AAV6 транспортируется в исключительно ретроградном направлении и практически является нейротропным, как AAV2 (Salegio et al. (2012) *Gene Ther.* 20(3):348-52; San Sebastian et al. (2013) *Gene Ther* 20: 1178-1183). Аксональный транспорт AAV9 был обнаружен в этом исследовании как двунаправленный. Инфузия AAV9-GFP в скорлупу обуславливала экспрессию трансгена в кортико-стриальных нейронах, которые направляли свои выросты в скорлупу, при этом экспрессию GFP также обнаруживали в нейронах SNc, тем самым подтверждая ретроградный транспорт этого серотипа. Этот феномен, значительно более эффективный, чем у AAV6 (San Sebastian et al. (2013) *Gene Ther* 20: 1178-1183), является важным при разработке методов лечения болезни Хантингтона, в патогенезе которой дегенерация как базальных ганглиозных, так и кортико-стриальных нейронов является основным невропатологическим механизмом (Berardelli et al. (1999) *Mov Disord* 14:398-403). Эффективная трансдукция скорлупы человека с применением терапевтического AAV9 позволяет также нацеливать кортикальные выросты в стриатум.

Кроме того, однако, вектор транспортировался в anteretrogradном направлении к SNr и к STN. Мечение нейронов в STN сильно зависело от дозы вектора, в большей степени, чем в SNr, что отражает

потребность в транспорте AAV9-GFP по опосредованному пути через бледный шар (GP) посредством аксонального и/или периваскулярного транспорта. Способность AAV9 эффективно распространяться за пределы первоначального объема инфузии в скорлупу предполагает наличие мощного периваскулярного механизма. Тем не менее, феномен двунаправленного аксонального транспорта AAV9 может частично объяснить, почему этот вектор с таким интересом рассматривается для применений, для которых является значимым очень широкое распространение вектора.

Пример 5. Доставка репрессоров Htt.

Репрессоры Htt (ZFP-TF, TALE-TF, CRISPR/Cas-TF), например, как описано в публикациях US №№20150056705; 20110082093; 20130253040; и 20150335708 и в данном документе, доставляли в стриатум моделей мышей с БХ, ПНЧ или людей с помощью вирусов (например, AAV, такого как AAV9), как указано в примере 1.

Репрессоры Htt демонстрировали широко распространенную экспрессию, уменьшали образование экспрессии Htt и агрегатов Htt; уменьшали апоптоз; и/или ослабляли двигательные нарушения (например, хватательные движения) у субъектов и являлись эффективными для предотвращения и/или лечения БХ.

Пример 6. Репрессия мутантного Htt в фибробластах пациента с БХ и в нейронах, полученных из стволовых клеток пациента с БХ.

ZFP 46025 и 45643 выборочно репрессировали мутантный НТТ в фибробластах CAG18/45, полученных от пациентов с БХ (фиг. 8). мРНК, кодирующую контрольный GFP; ZFP 46025 и ZFP 45643 (0,1, 1, 10 или 100 нг на 50000 клеток) трансфицировали в фибробласты БХ GM02151 (репозиторий клеток Coriell) с применением нуклеофактора (Lonza). Через 24 ч после трансфекции, с помощью колПЦР в реальном времени измеряли уровни экспрессии НТТ. Уровни дикого типа Htt (CAG18) и мутантного Htt (CAG45) в каждом образце измеряли с помощью специально разработанного аллель-специфического анализа колПЦР на основе SNP rs363099 C/T (экзон 29) в трех повторах и нормировали к уровням ГАФДГ. Соотношение Htt/ГАФДГ для образцов ZFP масштабировали к соотношению Htt/ГАФДГ для образцов трансфицированных пустым вектором (принимаемого за 1). Данные выражали как среднее \pm СО. Полученные данные демонстрировали избирательную репрессию мутантного аллеля Htt (CAG45) как при воздействии ZFP 46025, так HZFP45643.

ZFP 46025 и 45643 избирательно репрессировали мутантный Htt в фибробластах CAG21/38, полученных от пациентов с БХ (фиг. 9). мРНК для контрольного GFP; ZFP 46025 и ZFP 45643 (0,1, 1, 10 или 100 нг на 50 000 клеток) трансфицировали в фибробласты БХ ND30259 (репозиторий клеток Coriell) с применением нуклеофактора (Lonza). Через 24 ч после трансфекции, с помощью колПЦР в реальном времени измеряли уровни экспрессии Htt. Уровни дикого типа Htt (CAG21) и мутантного Htt (CAG38) в каждом образце измеряли с помощью специально разработанного аллель-специфического анализа колПЦР на основе SNP rs362331 C/T (экзон 50) в трех повторах и нормировали к уровням ГАФДГ. Соотношение Htt/ГАФДГ для образцов ZFP масштабировали к соотношению Htt/ГАФДГ для образцов трансфицированных пустым вектором (принимаемого за 1). Данные выражали как среднее \pm СО. Полученные данные демонстрировали избирательную репрессию мутантного аллеля НТТ (CAG45) как при воздействии ZFP 46025, так и 45643.

Данные на фиг. 8 и 9 демонстрируют, что ZFP 46025 и 45643 могут избирательно репрессировать транскрипцию из мутантных аллелей Htt в клетках, полученных от пациента, которые содержат разные длины повторов CAG как на аллелях дикого типа, так и на мутантных аллелях Htt. ZFP 46025 и 45643 избирательно репрессировали мутантный Htt в нейронах CAG17/48 путем транзиентной трансфекции мРНК (фиг. 10). мРНК для контрольного GFP; ZFP 46025 и ZFP 45643 (15, 150, 300 или 1500 нг на 150 000 клеток) трансфицировали в нейроны, отдифференцированные из эмбриональных стволовых клеток БХ (ЭСК) GENEА020 (GENEA/CHDI) с применением нуклеофактора (Lonza). Через два дня после трансфекции, с помощью колПЦР в реальном времени измеряли уровни экспрессии Htt. Уровни дикого типа Htt (CAG17) и мутантного Htt (CAG48) в каждом образце измеряли с помощью аллель-специфического анализа колПЦР на основе SNP rs362307 в экзоне 67 (Applied Biosystems) в трех повторах и нормировали к уровням ГАФДГ. Соотношение Htt/ГАФДГ для образцов ZFP масштабировали к соотношению Htt/ГАФДГ для образцов трансфицированных пустым вектором (принимаемого за 1). Данные выражали как среднее \pm СО. Полученные данные демонстрировали избирательную репрессию мутантного аллеля Htt (CAG48) как при воздействии ZFP 46025, так и 45643 в нейронах БХ. Эксперименты также проводили на отдифференцированных нейронах CAG17/48, при этом воздействие ZFP осуществляли с применением вирусных векторов AAV6 или AAV9. Векторы AAC6, кодирующие ZFP 46025, 45643 или контроль GFP, применяли для инфицирования нейронов, отдифференцированных из эмбриональных стволовых клеток БХ (ЭСК) GENEА020 (GENEA/CHDI) в двух повторностях. Применяемые дозы AAV составляли $1E+4$, $5E+4$ или $1E+5$ векторных геномов (вг) на клетку для ZFP и $1E+5$ вг на клетку для GFP. Через двадцать один день после инфицирования, с помощью колПЦР в реальном времени измеряли уровни экспрессии НТТ. Уровни дикого типа Htt (CAG17) и мутантного Htt (CAG48) в каждом образце измеряли с помощью аллель-специфического анализа колПЦР на основе SNP rs362307 в

экзоне 67 (Applied Biosystems) в трех повторах и нормировали к уровням ГАФДГ. Соотношение Htt/ГАФДГ для образцов ZFP масштабировали к соотношению Htt/ГАФДГ для образцов трансфицированных пустым вектором (принимаемого за 1). Данные выражали как среднее \pm CO (фиг. 11А).

Векторы AAC9, кодирующие ZFP 46025, 45643 или контроль GFP, применяли для инфицирования нейронов, отдифференцированных от эмбриональных стволовых клеток БХ (ЭСК) GENEА020 (GENEA/CHDI) в двух повторностях. Применяемые дозы AAV составляли $1E+5$, $5E+5$ или $5E+6$ векторных геномов (вг) на клетку для ZFP и $5E+6$ вг на клетку для GFP. Через двадцать один день после инфицирования, с помощью колПЦР в реальном времени измеряли уровни экспрессии НТТ. Уровни дикого типа Htt (CAG17) и мутантного Htt (CAG48) в каждом образце измеряли с помощью аллель-специфического анализа колПЦР на основе SNP rs362307 в экзоне 67 (Applied Biosystems) в трех повторах и нормировали к уровням ГАФДГ. Соотношение Htt/ГАФДГ для образцов ZFP масштабировали к соотношению Htt/ГАФДГ для образцов трансфицированных пустым вектором (принимаемого за 1). Данные выражали как среднее \pm CO (фиг. 11В).

Пример 7. Восстановление клеточных фенотипов, связанных с БХ, посредством ZFP 46025 и 45643.

Предыдущие исследования продемонстрировали фенотипические изменения, связанные с увеличением числа повторов CAG в клетках, полученных от пациентов с БХ (Jung-il et al. (2012) *Biochemical Journal*, 446(3), 359-371; HD IPSC Consortium, (2012) *Cell Stem Cell*, 11(2), 264-278; An et al. (2012) *Cell Stem Cell*, 11(2), 253-263). Без противоречий с этими опубликованными результатами мы обнаружили, что нейроны CAG17/48 характеризовались значительным снижением уровней внутриклеточного АТФ по сравнению с не-БХ (нормальными) нейронами (фиг. 12А). Спустя двадцать один день после того, как нейроны были инфицированы лентивирусными векторами, кодирующими ZFP 46025 или ZFP 45643, уровни внутриклеточного АТФ увеличились в 1,7 и 1,8 раза по сравнению с контрольными клетками соответственно, что указывает на то, что сайлесинг мутантного Htt восстанавливает энергетический дефект в нейронах БХ. Другой фенотип нейронов БХ *in vitro* представляет собой повышенную восприимчивость к запрограммированной гибели клеток. При удалении фактора роста процентное количество нейронов CAG17/48, подвергающихся апоптозу, было в 4-5 раз выше, чем у нормальных нейронов (фиг. 12В). Через 12 дней после инфицирования лентивирусом, с последующим удалением фактора роста через два дня, ZFP 46025 и 45643 уменьшали количество апоптотических клеток до уровня, наблюдаемого в клетках дикого типа.

Уровни внутриклеточного АТФ в культивируемых нейронах, полученных от пациента с БХ (CAG17/48) или здорового субъекта, измеряли с помощью люминесцентного анализа CellTiter-Glo® (Promega), при этом количество клеток в каждом образце определяли с помощью анализа ApoLive-Glo® (Promega). Нейроны инфицировали в трех повторностях с помощью LV, экспрессирующего либо YFP-Venus, либо ZFP-TF (45643 или 46025-KOX-2A-Venus) при показателе множественности заражения (МОИ), равном 500. Через 21 день после инфицирования лентивирусом уровни внутриклеточного [АТФ] в нейронах измеряли с помощью люминесцентного анализа CellTiter-Glo (Promega) в соответствии с инструкциями производителя. Значения люминесценции нормировали к числу клеток в каждом образце. Значения уровня АТФ на клетку из разных клеток/видов воздействия затем нормализовали к уровню АТФ у нейронов БХ трансфицированных пустым вектором (принимаемого за 1). Данные (фиг. 12А) выражали как среднее \pm CO.

Гибель клеток нейронов БХ и не-БХ, индуцированная удалением фактора роста, измеряли с применением анализа с терминальным дезоксиридиновым мечением концов разорванной нити ДНК (TUNEL). Нейроны инфицировали в трех повторностях с помощью LV, экспрессирующего либо YFP-Venus, либо ZFP-TF (45643 или 46025-KOX-2A-Venus) при показателе множественности заражения (МОИ), равном 500. Клетки культивировали в течение 12 дней, затем среду заменяли на свежую нейробазальную среду без какой-либо добавки (факторов роста). Клетки выдерживали в этой среде для удаления фактора роста в течение 48 часов. Анализ TUNEL проводили с применением набора для фрагментации ДНК ApoBrdU Red (BioVision). Нейроны фиксировали 4% параформальдегидом на льду в течение 15 мин. Апоптоз оценивали путем количественного определения TUNEL-позитивных клеток в соответствии с рекомендациями производителя (набор для фрагментации ДНК ApoBrdU Red, BioVision). Поточковую цитометрию применяли для измерения апоптоза путем окрашивания анти-BrdU-Red. Данные (фиг. 12В) выражали как среднее \pm CO.

Таким образом, репрессоры, как описано в данном документе, обеспечивают терапевтические преимущества путем восстановления фенотипов, связанных с БХ, включая, но не ограничиваясь этим, посредством уменьшения гибели клеток, повышения функции клеток (что измеряли уровнями внутриклеточного АТФ) и снижения чувствительности клеток к апоптозу по сравнению с клетками, не получавшими воздействия.

Пример 8. Репрессия мутантного Htt в стриатуме мыши посредством ZFP 46025 и ZFP 45643.

Активность ZFP *in vivo* анализировали на гетерозиготных мышах HdhQ50/Hdh + (Q50) (White et al. (1997) *Nature Genetics* 17: 404-410) путем инъекции в стриатум векторов AAV9, кодирующих ZFP 46025, ZFP 45643 или контроль GFP. Мыши Q50 содержат аллель, в котором экзон 1 эндогенного гена Hdh мы-

ши заменен экзоном 1 гена Htt человека с 48 CAG. Через 5 недель после инъекции, аллель-специфичный анализ обработанного стриатума методом колПЦР в реальном времени показал, что ZFP 45643 и ZFP 46025 репрессируют мутантный аллель Htt (Q50) на 79% и 74% соответственно по сравнению с носителем, вводимым в качестве контроля; при этом аллель дикого типа (Q7) не регулировался никаким ZFP (фиг. 13A и 13B). Активность ZFP 45643 также анализировали через 12 недель после инъекции (фиг. 13C), и наблюдали значительную репрессию (70%) мутантного Htt (Q50) без репрессии аллеля дикого типа (Q7). В ходе исследования явной токсичности не наблюдали ни у одного из животных. Поведенческие исследования (например, исследования хватательных движений) также показывают, что репрессоры, как описано в данном документе, обеспечивают терапевтическое (клиническое) преимущество *in vivo*.

Гетерозиготные мыши HdhQ50/Hdh⁺ (Q50) (смешанного пола) в возрасте 10-11 недель билатерально в стриатум получали инъекцию векторов AAV9 (ZFP 46025, 45643 или GFP, n = 4 на группу) или буферный состав (носитель, n = 3). В каждый стриатум осуществляли две инъекции по 3 мкл (в общей сложности 6 мкл и 1,1E +10 векторных геномов на стриатум). Координаты, используемые для инфузии в переднюю область, были следующими A/P +1.4, M/L +/-1.7, D/V -3.5, в заднюю область - A/P +0.2, M/L +/-23, D/V -3.2. Через пять недель (ZFP 46025 и 45643) и 12 недель (ZFP 45643) после инъекции мышей умерщвляли, и каждый стриатум рассекали на три (передний, средний и задний) среза для выделения РНК и анализа колПЦР в реальном времени. Экспрессию от мутантного аллеля Htt (Q50) и аллеля дикого типа (Q7) измеряли с помощью аллель-специфических анализов колПЦР, уровни Htt нормировали к среднему геометрическому уровню ATP5B, RPL38 и EIF4A2. (ns: p > 0,05, *: p < 0,05, **: p < 0,01, ***: p < 0,001, ****: p < 0,0001, однофакторный анализ ANOVA с критерием Sidak).

Как проиллюстрировано на фиг. 13, аллель-специфичный анализ обработанного стриатума методом колПЦР в реальном времени показал, что ZFP 45643 и ZFP 46025 репрессируют мутантный аллель Htt (Q50) на 79% и 74% соответственно по сравнению с вводимым носителем в качестве контроля; при этом аллель дикого типа (Q7) не регулировался никаким ZFP. Активность ZFP 45643 также анализировали через 12 недель после инъекции, и наблюдали значительную репрессию (70%) мутантного Htt (Q50) без репрессии аллеля дикого типа (Q7).

Таким образом, репрессоры Htt, как описано в данном документе, демонстрировали широко распространенную экспрессию, уменьшали образование экспрессии Htt и агрегатов Htt; уменьшали апоптоз; и/или ослабляли двигательные нарушения (например, хватательные движения) у субъектов и являлись эффективными для предотвращения и/или лечения БХ.

Пример 9. Измерение терапевтической эффективности ZFP 46025 и ZFP 45643.

Пациентам с БХ вводили ZFP 46025 или ZFP 45643 в различных дозах. Состояние пациентов с БХ оценивали с помощью шкалы UHDRS, и наблюдали улучшение после лечения. Эффективность также измеряли с помощью ПЭТ-визуализации с применением ¹⁸FMNI-659, ПЭТ-индикатора для PDE10A, а также МРТ. Вкратце, области головного мозга (например, области внутри скорлупы), которые подвергались воздействию ZFP (например, вектора AAV9, кодирующего ZFP), идентифицировали с применением контрастного агента гадолиния, который смешивали с составом ZFP и визуализировали с помощью МРТ; до и после воздействия пациентам вводили около 5 мКи ¹⁸FMNI-659 в массовой дозе около 5 мкг в течение трехминутного периода инфузии. Последовательные 3D ПЭТ-изображения получали в течение 90 минут с помощью ПЭТ-сканера. Изображения МРТ также получали с помощью МРТ-сканера, после чего ПЭТ-изображения совмещали с МРТ-изображениями для создания анатомических визуализаций для анализа. Стандартные значения поглощения рассчитывали для ядер базальных ганглиев (которые включают бледный шар, каудальную часть и скорлупу (стриатум)) и нормализовали к значениям эталонной области, такой как мозжечок (Russell et al., *ibid*). PDE10A ПЭТ-сигналы в областях головного мозга, которые подвергались воздействию ZFP, идентифицировали с помощью МРТ во время воздействия, измеряли после воздействия и сравнивали с уровнями сигнала в той же области до воздействия. Введение ZFP46025 или ZFP45643 пациентам с БХ защищало их от любой дополнительной гибели средних шипиковых нейронов (что измеряли уровнями PDE10A) и от дальнейшего развития явных клинических симптомов. У некоторых пациентов введение ZFP обуславливало регресс симптомов БХ. Все публикации, патенты и патентные заявки, цитируемые в данном документе, включены в настоящее описание посредством ссылки во всей своей полноте и для всех целей.

Несмотря на то, что настоящее изобретение было подробно описано в качестве иллюстрации и примера в целях ясности понимания, специалистам в данной области техники будет очевидно, что различные изменения и модификации могут быть реализованы на практике без отхода от сущности или объема изобретения. Соответственно, приведенные выше описания и примеры не должны рассматриваться как ограничивающие.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Не встречающийся в природе белок с "цинковыми пальцами", который связывается с геном хантингтина (Htt), причем белок с "цинковыми пальцами" содержит 5 доменов "цинковый палец", пронуме-

рованных от F1 до F5, при этом домены "цинковый палец" содержат последовательности областей спиралей распознавания, расположенные в порядке, показанном в одном ряду табл. 1, и при этом указанный не встречающийся в природе белок с "цинковыми пальцами" связывается с целевой последовательностью в гене Htt, показанной в SEQ ID NO: 6.

2. Слитый белок для репрессирования или активации экспрессии гена Htt, содержащий белок с "цинковыми пальцами" по п.1 и функциональный домен, отличающийся тем, что функциональный домен выбран из группы, состоящей из домена активации транскрипции, домена репрессии транскрипции и домена нуклеазы.

3. Полинуклеотид, кодирующий по меньшей мере один белок с "цинковыми пальцами" по п.1 или по меньшей мере один слитый белок по п.2.

4. Вектор AAV, содержащий полинуклеотид по п.3.

5. Клетка-хозяин, содержащая по меньшей мере один белок с "цинковыми пальцами" по п.1, по меньшей мере один слитый белок по п.2, по меньшей мере один полинуклеотид по п.3 и/или по меньшей мере один вектор AAV по п.4.

6. Фармацевтическая композиция для репрессирования или активации экспрессии гена Htt, содержащая по меньшей мере один полинуклеотид согласно п.3 и/или по меньшей мере один вектор AAV по п.4.

7. Способ репрессирования или активации экспрессии гена Htt в клетке, включающий введение в клетку по меньшей мере одного полинуклеотида согласно п.3, по меньшей мере одного вектора AAV согласно п.4 и/или по меньшей мере одной фармацевтической композиции по п.6.

8. Способ по п.7, отличающийся тем, что ген Htt содержит по меньшей мере аллель дикого типа и/или один мутантный аллель.

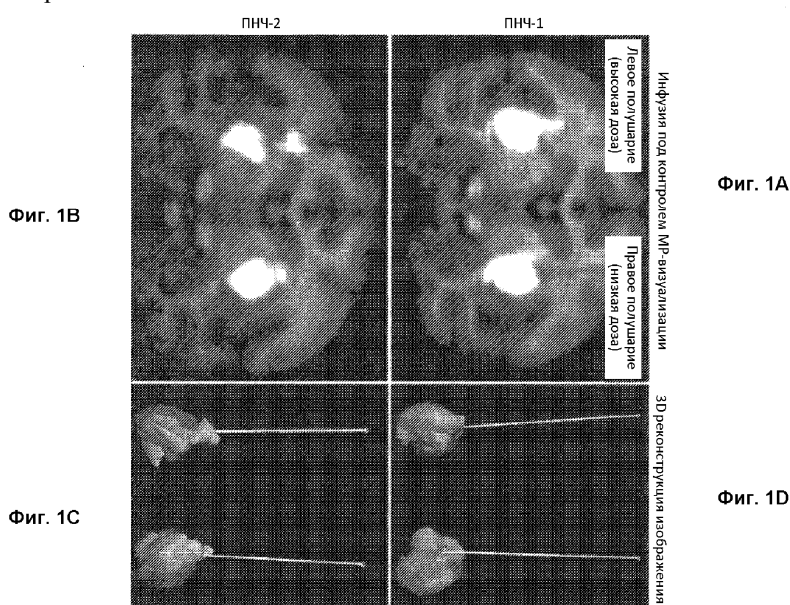
9. Способ по п.7 или п.8, отличающийся тем, что слитый белок содержит домен репрессии, и экспрессия гена Htt репрессирована.

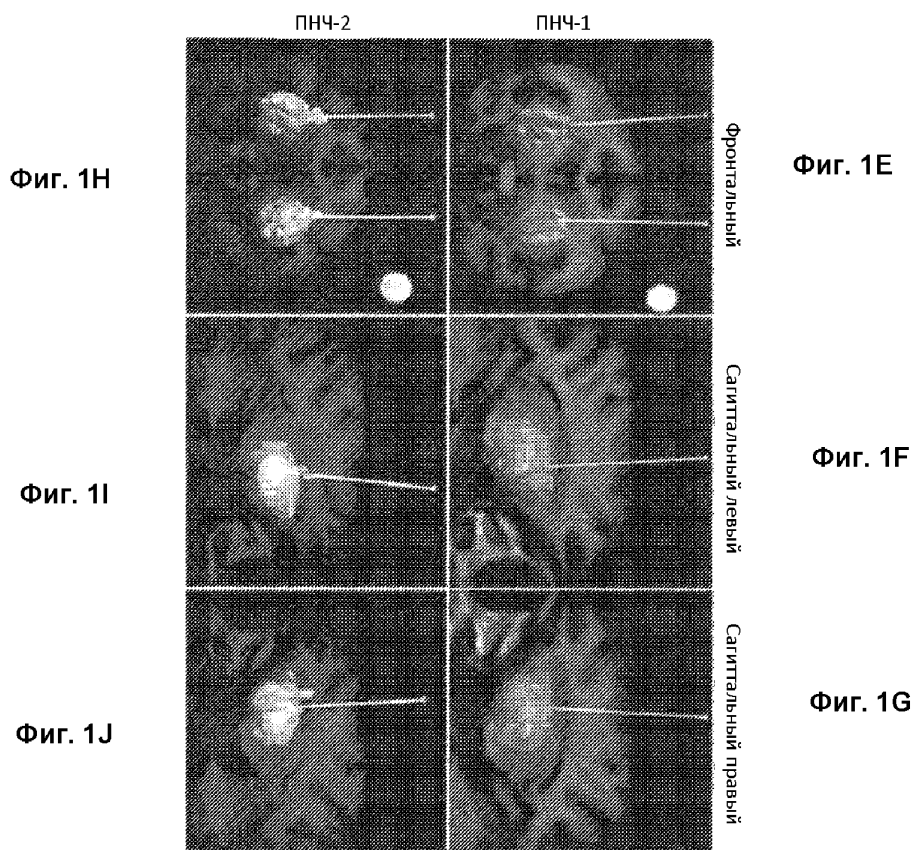
10. Способ по любому из пп.7-9, отличающийся тем, что клетка представляет собой нейронную клетку.

11. Способ по п.10, отличающийся тем, что нейронная клетка обязательно находится в стриатуме головного мозга.

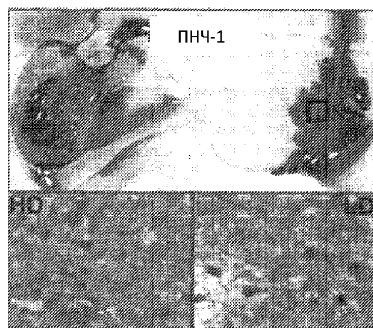
12. Способ лечения или предотвращения болезни Хантингтона у субъекта, нуждающегося в этом, при этом способ включает введение по меньшей мере одного полинуклеотида согласно п.3, по меньшей мере одного вектора AAV согласно п.4 и/или по меньшей мере одной фармацевтической композиции согласно п.6 субъекту, нуждающемуся в этом.

13. Применение по меньшей мере одного полинуклеотида согласно п.3, по меньшей мере одного вектора AAV согласно п.4 и/или по меньшей мере одной фармацевтической композиции согласно п.6 для репрессирования экспрессии гена Htt в клетке.

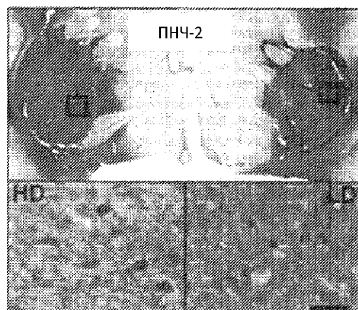




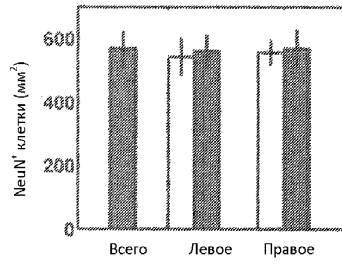
Фиг. 1



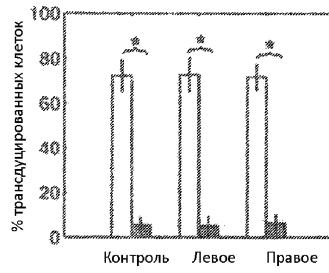
Фиг. 2А



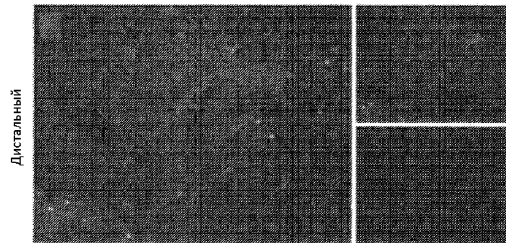
Фиг. 2В



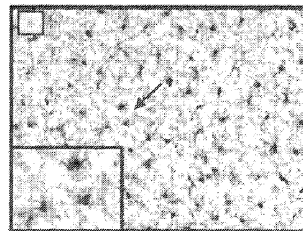
Фиг. 2С



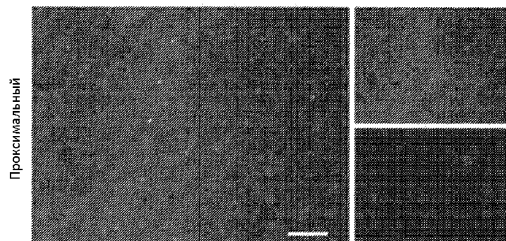
Фиг. 2D



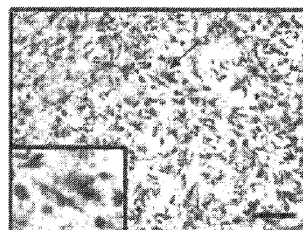
Фиг. 2E



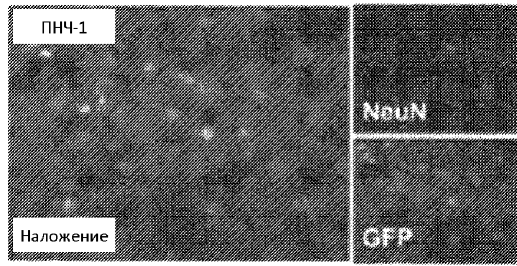
Фиг. 2F



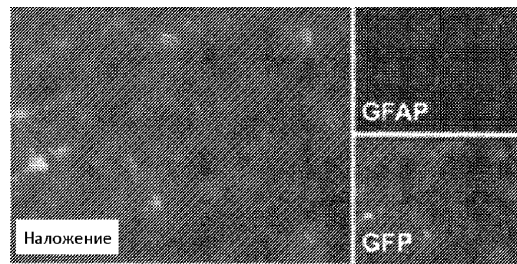
Фиг. 2G



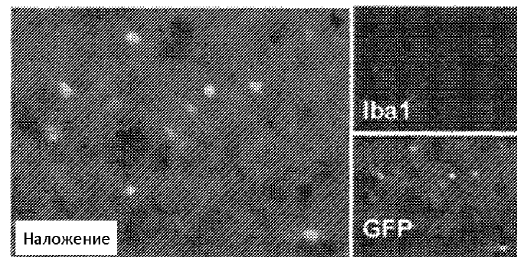
Фиг. 2H



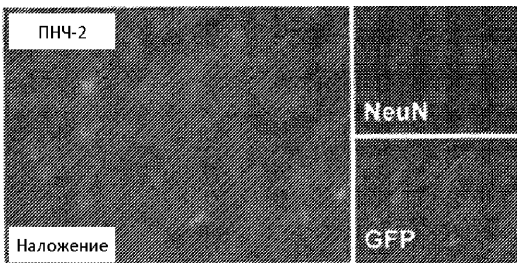
Фиг. 3А



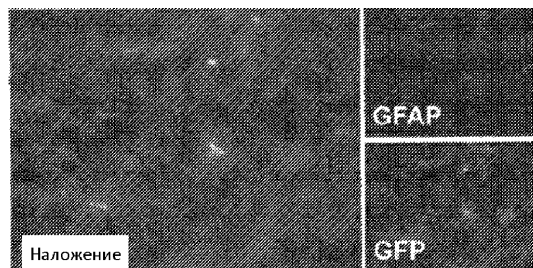
Фиг. 3В



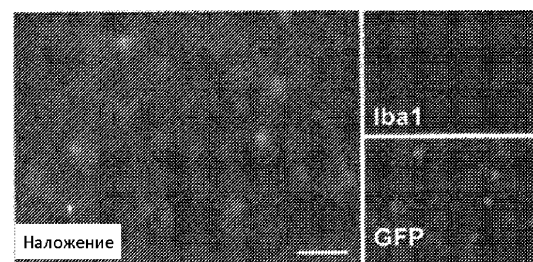
Фиг. 3С



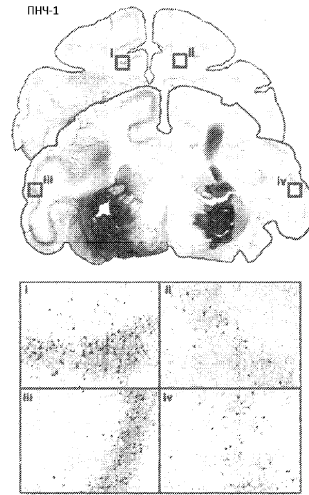
Фиг. 3D



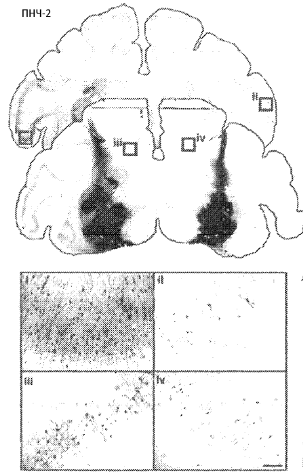
Фиг. 3Е



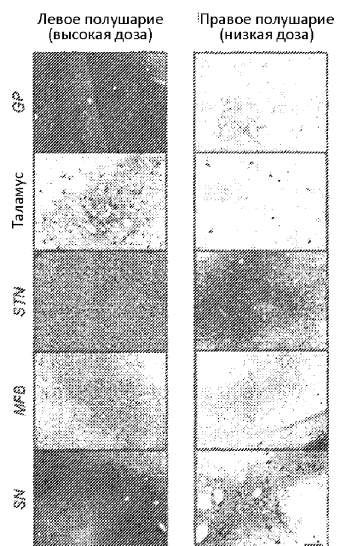
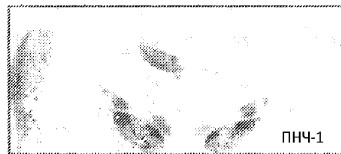
Фиг. 3F



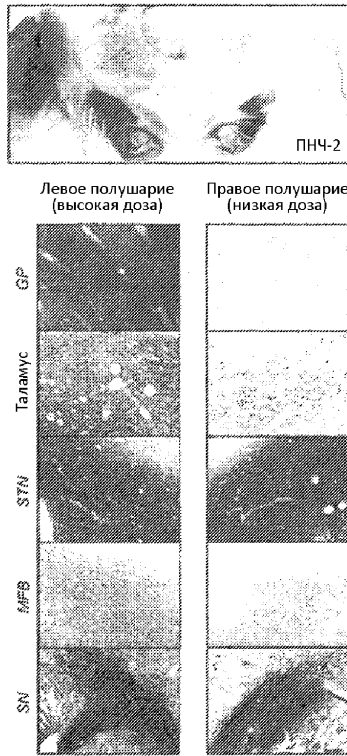
Фиг. 4А



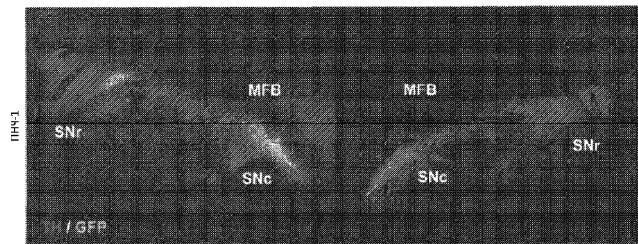
Фиг. 4В



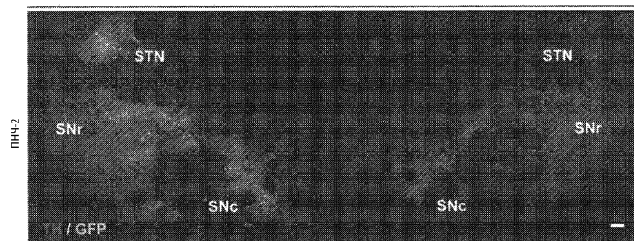
Фиг. 5А



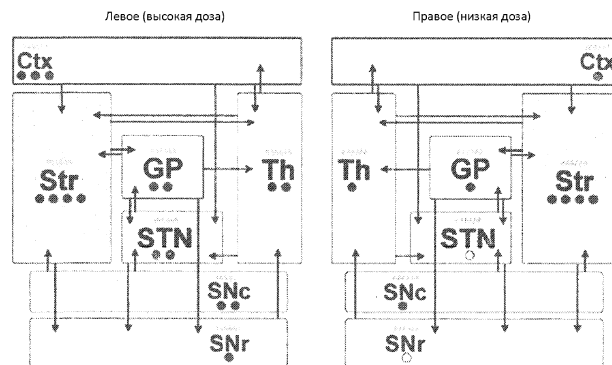
Фиг. 5B



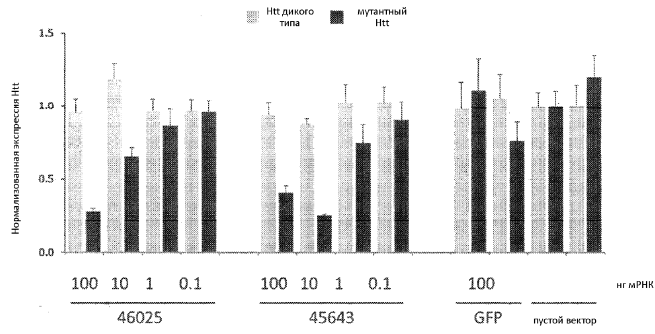
Фиг. 6A



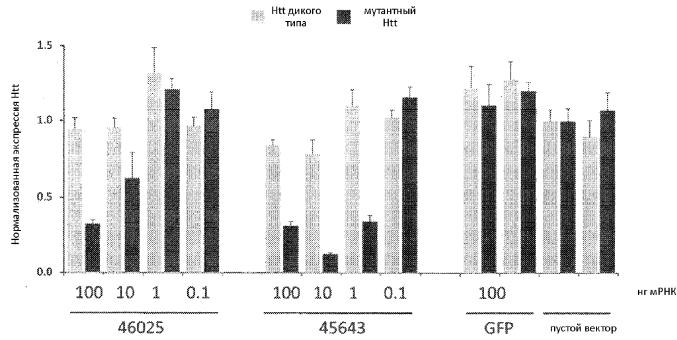
Фиг. 6B



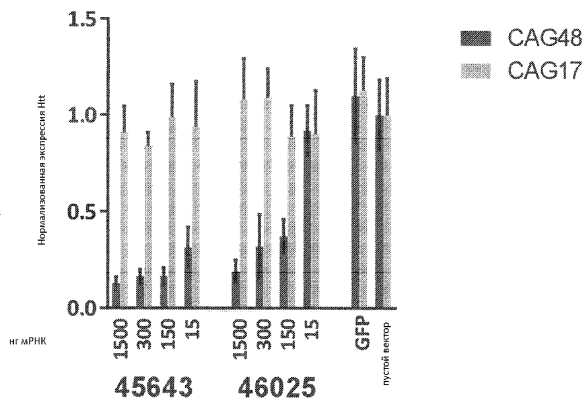
Фиг. 7



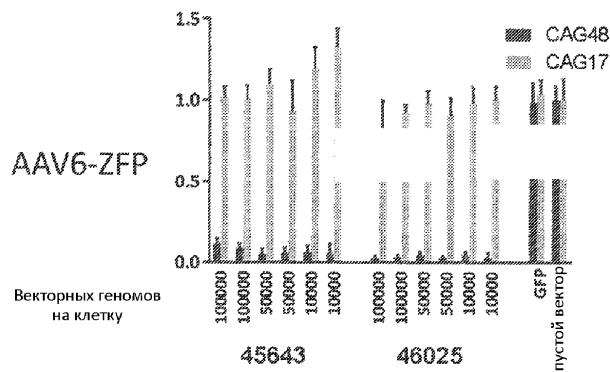
Фиг. 8



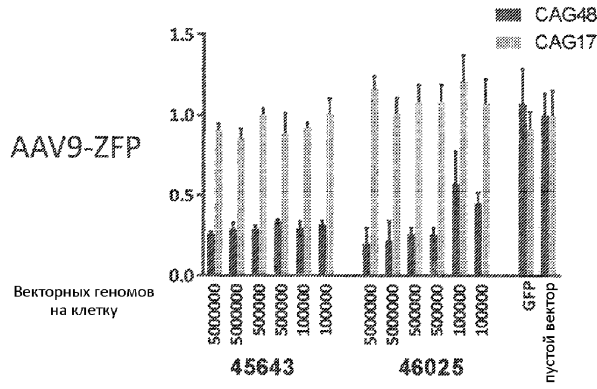
Фиг. 9



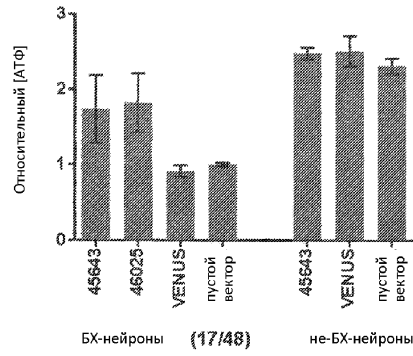
Фиг. 10



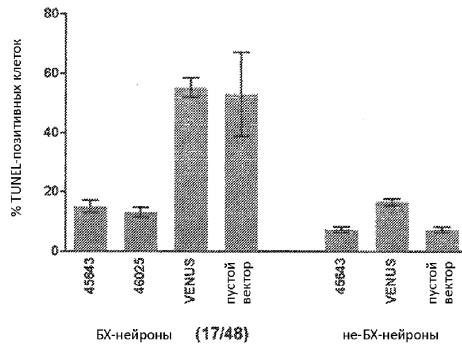
Фиг. 11А



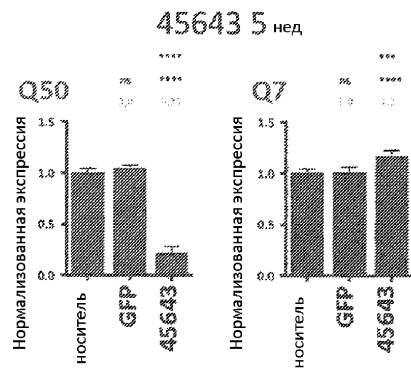
Фиг. 11В



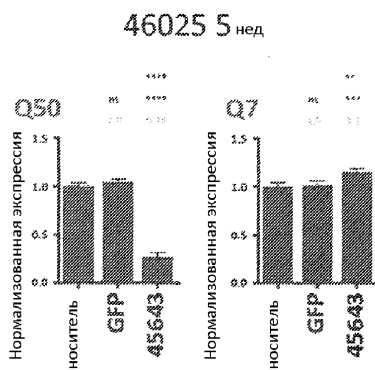
Фиг. 12А



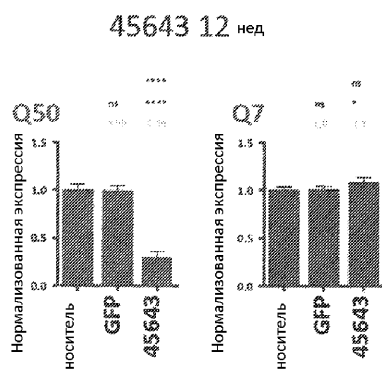
Фиг. 12В



Фиг. 13А



Фиг. 13В



Фиг. 13С

