(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202192267 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.05.06

(22) Дата подачи заявки
2020.02.24

(51) Int. Cl. *C07K 14/705* (2006.01)
C12N 9/22 (2006.01)
C12N 15/864 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)

(54) ТРАНСАКТИВАТОРЫ ДНК-СВЯЗЫВАЮЩЕГО ДОМЕНА И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

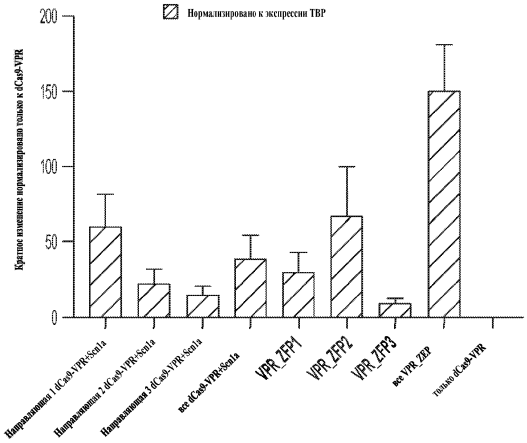
(31) **62/810,005**
(32) **2019.02.25**
(33) **US**
(86) **PCT/US2020/019546**
(87) **WO 2020/176426 2020.09.03**

(71) Заявитель:
ЮНИВЕРСИТИ ОФ МАССАЧУСЕТТС (US)

(72) Изобретатель:
Эстевес Мигель Сена, Волф Скот А. (US)

(74) Представитель:
Гизатуллина Е.М., Угрюмов В.М., Христофоров А.А., Строкова О.В., Гизатуллин Ш.Ф., Костюшенкова М.Ю., Парамонова К.В., Прищепный С.В., Джермакян Р.В. (RU)

(57) В некоторых аспектах изобретение относится к рекомбинантным аденоассоциированным вирусам (rAAV), содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую слитый белок, содержащий ДНК-связывающий домен и домен регулятора транскрипции, и способам их применения. В некоторых вариантах осуществления экспрессия слитого белка приводит к измененной экспрессии гена-мишени в клетке.



202192267 A1

202192267 A1

ТРАНСАКТИВАТОРЫ ДНК-СВЯЗЫВАЮЩЕГО ДОМЕНА И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

ПЕРЕКРЕСТНЫЕ ССЫЛКИ НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

В заявке испрашивается приоритет согласно 35 USC. § 119 (e) даты подачи предварительной заявки США с серийным номером 62/810,005, под названием «ТРАНСАКТИВАТОРЫ БЕЛКОВ «ЦЫНКОВЫЕ ПАЛЬЦЫ» И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ» и поданной 25 февраля 2019 г., полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Регуляция экспрессии гена-мишени стала одной из основных областей биомедицинских исследований. Положительная регуляция экспрессии генов может корректировать гаплонедостаточные состояния, возникающие в результате снижения экспрессии генов. Гаплонедостаточность обычно возникает, когда одна или более мутации с утратой функции присутствуют по крайней мере в одной копии гена. Подходы на основе AAV к увеличению генов для лечения заболеваний, связанных с гаплонедостаточностью, затруднены из-за способности традиционных векторов rAAV к упаковке.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Аспекты описания относятся к выделенным нуклеиновым кислотам и рекомбинантным векторам AAV для доставки генов. Данное изобретение частично основано на композициях (*например*, векторах rAAV и rAAV) и способах регуляции экспрессии генов-мишеней, где ген-мишень является гаплонедостаточным, таким как *SCN1A*. В некоторых вариантах осуществления в изобретении предложено слитые белки, содержащие ДНК-связывающий домен, такой как Cys2-His2 (ZFP) белка «цинковые пальцы», и домен регулятора транскрипции. В некоторых вариантах осуществления композиции, описанные в описании, содержат слитый белок, содержащий ДНК-связывающий домен (*например*, ZFP, домен эффектора, подобного активаторам транскрипции, (TALE) и *т.д.*), слитый с доменом регулятора транскрипции. В некоторых вариантах осуществления слитые белки, описанные в данном изобретении, увеличивают экспрессию гена-мишени (*например*, *SCN1A*) и, следовательно, полезны для лечения заболеваний, характеризующихся недостаточной экспрессией гена-мишени (*например*, заболеваний, связанных с гаплонедостаточностью гена-мишени) в клетке или субъекте по сравнению с нормальной клеткой или субъектом.

Соответственно, в некоторых аспектах изобретения предложена выделенная нуклеиновая кислота, содержащая трансген, сконфигурированный для экспрессии по меньшей мере одного ДНК-связывающего домена, слитого по меньшей мере с одним доменом регулятора транскрипции, где ДНК-связывающий домен связывается с геном-мишенью или регуляторной областью (*например*, с энхансерной последовательностью, промоторной последовательностью, репрессорной последовательностью и т.д.) целевого гена (*например*, в субъекте или клетке), где целевой ген кодирует потенциалзависимый натриевый канал (*например*, $Na_v1.1$). В некоторых вариантах осуществления, ген-мишень представляет собой ген *SCN1A*. В некоторых вариантах осуществления трансген фланкирован инвертированными концевыми повторами (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV). В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один ДНК-связывающий домен связывается с целевым геном (*например*, у субъекта или клетке), а домен регулятора транскрипции модифицирует, *например*, усиливает экспрессию целевого гена.

В некоторых аспектах в изобретении предложен рекомбинантный AAV (rAAV), содержащий: нуклеиновую кислоту, содержащую трансген, кодирующий по меньшей мере один ДНК-связывающий домен, слитый по меньшей мере с одним доменом регулятора транскрипции, при этом ДНК-связывающий домен связывается с целевым геном или регуляторной областью целевого гена (*например*, у субъекта или клетке), где целевой ген кодирует потенциалзависимый натриевый канал (*например*, Nav1.1) и по меньшей мере один капсидный белок. В некоторых вариантах осуществления, ген-мишень представляет собой ген *SCN1A*. В некоторых вариантах осуществления трансген фланкирован инвертированными концевыми повторами (ITR) AAV.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один ДНК-связывающий домен связывается с целевым геном (*например*, у субъекта или клетке), а домен регулятора транскрипции модифицирует, *например*, усиливает экспрессию целевого субъекта в гена у субъекта.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один ДНК-связывающий домен связывается с нетранслируемой областью целевого гена. В некоторых вариантах осуществления ДНК-связывающий домен связывается с регуляторной областью целевого гена, необязательно с энхансерной последовательностью, промоторной последовательностью и/или репрессорной последовательностью.

В некоторых вариантах осуществления ДНК-связывающий домен связывается между 2 и 2000 п.о выше или от 2 до 2000 п.о выше или ниже регуляторной области (*например*, энхансерной последовательности, промоторной последовательности, репрессорной последовательности и т.д.) гена-мишени.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один ДНК-связывающий домен кодирует белок «цинковые пальцы» (ZFP), эффектор, подобный активатору транскрипции (TALE), белок dCas (*например*, dCas9 или dCas12a) и/или гомеодомен. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один ДНК-связывающий домен связывается с последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной в любой из SEQ ID NO: 5-7. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один ДНК-связывающий домен представляет собой белок «цинковые пальцы», содержащий спираль распознавания, кодируемую нуклеиновой кислотой, имеющей последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 11-16, 23-28 или 35-40. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один ДНК-связывающий домен представляет собой белок «цинковые пальцы», содержащий аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 17-22, 29-34 или 41-46.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один ДНК-связывающий домен представляет собой белок «цинковые пальцы», содержащий спираль распознавания, кодируемую нуклеиновой кислотой, содержащей SEQ ID NO: 11, спираль распознавания, кодируемую нуклеиновой кислотой, содержащей SEQ ID NO: 12, спираль распознавания, кодируемую нуклеиновой кислотой, содержащей SEQ ID NO: 13, спираль распознавания, кодируемую нуклеиновой кислотой, содержащей SEQ ID NO: 14, спираль распознавания, кодируемую нуклеиновой кислотой, содержащей SEQ ID NO: 15, или спираль распознавания, кодируемую нуклеиновой кислотой, содержащей SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один ДНК-связывающий домен представляет собой белок «цинковые пальцы», содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57. В некоторых вариантах осуществления ZFP, который связывается с геном *SCN1A*, составляет по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере

85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 57.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один ДНК-связывающий домен представляет собой белок «цинковые пальцы», содержащий спираль распознавания, кодируемую нуклеиновой кислотой, содержащей SEQ ID NO: 23, спираль распознавания, кодируемую нуклеиновой кислотой, содержащей SEQ ID NO: 24, спираль распознавания, кодируемую нуклеиновой кислотой, содержащей SEQ ID NO: 25, спираль распознавания, кодируемую нуклеиновой кислотой, содержащей SEQ ID NO: 26, спираль распознавания, кодируемую нуклеиновой кислотой, содержащей SEQ ID NO: 27, или спираль распознавания, кодируемую нуклеиновой кислотой, содержащей SEQ ID NO: 28. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один ДНК-связывающий домен представляет собой белок «цинковые пальцы», содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59. В некоторых вариантах осуществления ZFP, который связывается с геном *SCN1A*, составляет по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 59.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один ДНК-связывающий домен представляет собой белок «цинковые пальцы», содержащий спираль распознавания, кодируемую нуклеиновой кислотой, содержащей SEQ ID NO: 35, спираль распознавания, кодируемую нуклеиновой кислотой, содержащей SEQ ID NO: 36, спираль распознавания, кодируемую нуклеиновой кислотой, содержащей SEQ ID NO: 37, спираль распознавания, кодируемую нуклеиновой кислотой, содержащей SEQ ID NO: 38, спираль распознавания, кодируемую нуклеиновой кислотой, содержащей SEQ ID NO: 39, или спираль распознавания, кодируемую нуклеиновой кислотой, содержащей SEQ ID NO: 40. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один ДНК-связывающий домен представляет собой белок «цинковые пальцы», содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61. В некоторых вариантах осуществления ZFP, который связывается с геном *SCN1A*, составляет по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 61.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один ДНК-связывающий домен представляет собой белок «цинковые пальцы», содержащий спираль распознавания, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, спираль распознавания, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, спираль распознавания, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, спираль распознавания, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, спираль распознавания, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, и/или спираль распознавания, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один ДНК-связывающий домен представляет собой белок «цинковые пальцы», содержащий спираль распознавания, содержащую SEQ ID NO: 29, спираль распознавания, содержащую SEQ ID NO: 30, спираль распознавания, содержащую SEQ ID NO: 31, спираль распознавания, содержащую SEQ ID NO: 32, спираль распознавания, содержащую SEQ ID NO: 33 и/или спираль распознавания, содержащую SEQ ID NO: 34.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один ДНК-связывающий домен представляет собой белок «цинковые пальцы», содержащий спираль распознавания, содержащую SEQ ID NO: 41, спираль распознавания, содержащую SEQ ID NO: 42, спираль распознавания, содержащую SEQ ID NO: 43, спираль распознавания, содержащую SEQ ID NO: 44, спираль распознавания, содержащую SEQ ID NO: 45 и/или спираль распознавания, содержащую SEQ ID NO: 46.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один ДНК-связывающий домен представляет собой каталитически неактивный белок, связанный с CRISPR (белок Cas). В некоторых вариантах осуществления каталитически неактивный белок Cas (или «мертвый белок Cas») представляет собой белок dCas9 или dCas12. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота или rAAV дополнительно содержит по меньшей мере одну направляющую нуклеиновую кислоту (*например*, направляющую РНК или нРНК). В некоторых вариантах осуществления направляющая нуклеиновая кислота содержит спейсерную последовательность, нацеленную на *SCN1A*. В некоторых вариантах осуществления направляющая нуклеиновая кислота содержит спейсерную последовательность, имеющую нуклеотидную последовательность любой из SEQ ID NO: 85, 86, 89, 90, 93 или 94. В некоторых вариантах осуществления направляющая нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность любой из SEQ ID NO: 83-94. В некоторых вариантах осуществления направляющая нуклеиновая кислота кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной в любой из SEQ ID NO: 83-94.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один домен регулятора транскрипции представляет собой трансактиваторный домен, содержащий домен VP16, домен VP64, домен Rta, домен p65, домен Hsf1 или любую их комбинацию, такую как домен VPR (домены VP64 + p65 + Rta1). В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один домен регулятора транскрипции кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, как указано в SEQ ID NO: 47. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один домен трансактивации содержит аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 48.

В некоторых вариантах осуществления ITR, фланкирующие трансген, содержат ITR, выбранные из группы, состоящей из: AAV1 ITR, AAV2 ITR, AAV3 ITR, AAV4 ITR, AAV5 ITR, AAV6 ITR, AAV8 ITR, AAVrh8 ITR, AAV9 ITR, AAV10 ITR, или AAVrh10 ITR. В некоторых вариантах осуществления ITR представляет собой ΔTR или mTR.

В некоторых вариантах осуществления трансген выделенной нуклеиновой кислоты функционально связан с промотором. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой тканеспецифический промотор. В некоторых вариантах осуществления тканеспецифический промотор представляет собой нейрональный промотор, такой как SST, NYP фосфатактивированная глутаминаза (PAG), везикулярный транспортер глутамата-1 (VGLUT1), декарбоксилаза глутаминовой кислоты 65 и 57 (GAD65, GAD67), синапсин I, a-CamKII, Dock10, Prox1, парвальбумин (PV), соматостатин (SST), холецистокинин (CCK), кальретинин (CR) или нейропептид Y (NPY).

В некоторых вариантах осуществления ДНК-связывающий домен трансгена слит с доменом регулятора транскрипции посредством линкерного домена. В некоторых вариантах осуществления линкерный домен представляет собой гибкий линкер, например, линкер, обогащенный глицином, или глицин-сериновый линкер, или расщепляемый линкер, такой как фоторасщепляемый линкер или расщепляемый ферментом (*например*, протеазой) линкер.

В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит трансген, который кодирует несколько ДНК-связывающих доменов, например 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 ДНК-связывающих доменов. В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит трансген, который кодирует несколько доменов регулятора транскрипции, например 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 доменов регулятора транскрипции.

В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота или rAAV экспрессируется в клетке или субъекте, характеризующемся аберрантной экспрессией или гаплонедостаточностью (*например*, повышенной экспрессией или пониженной экспрессией) гена-мишени по сравнению с нормальной клеткой или субъектом. В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота или rAAV экспрессируется в клетке или субъекте, характеризующемся недостаточной (*например*, сниженной) экспрессией гена-мишени по сравнению с нормальной клеткой или субъектом. В некоторых вариантах осуществления ген-мишень выделенной нуклеиновой кислоты или rAAV представляет собой *SCN1A*.

В некоторых вариантах осуществления серотип капсида AAV выбран из группы, состоящей из AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAV9, AAV10, AAVrh10 или AAV.PHPB.

В некоторых аспектах в изобретении предложены способы регуляции экспрессии гена-мишени. В некоторых вариантах осуществлению способы по данному описанию включают введение выделенной нуклеиновой кислоты или rAAV, как описано в данном документе, в клетку или субъект, экспрессирующий ген-мишень, при этом субъект является гаплонедостаточным по гену-мишени (*например*, гаплонедостаточным по *SCN1A*). Например, в некоторых вариантах осуществления экспрессия гена-мишени, такого как *SCN1A*, в клетке или субъекте недостаточна (*например*, снижена) относительно экспрессии гена-мишени в нормальной клетке или субъекте. В некоторых вариантах осуществления клетка, в которую вводят выделенную нуклеиновую кислоту или rAAV, представляет собой нейрон. В некоторых вариантах осуществления нейрон представляет ГАМКергический нейрон.

В некоторых вариантах осуществления введение выделенной нуклеиновой кислоты или rAAV приводит к экспрессии гена-мишени (*например*, экспрессии *SCN1A*), которая увеличивается по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 20 раз, по меньшей мере в 30 раз, по меньшей мере в 40 раз, по меньшей мере в 50 раз, по меньшей мере в 60 раз, по меньшей мере в 70 раз, по меньшей мере в 80 раз, по меньшей мере в 90 раз или по меньшей мере в 100 раз по сравнению с субъектом, которому не вводили выделенную нуклеиновую кислоту или rAAV. В некоторых вариантах осуществления введение выделенной нуклеиновой кислоты или rAAV приводит к экспрессии гена-мишени (*например*, экспрессии *SCN1A*), которая увеличивается по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 20 раз, по меньшей мере в 30 раз, по меньшей мере в 40 раз, по меньшей мере в 50 раз, по меньшей мере в 60 раз, по меньшей мере в 70 раз, по меньшей мере в 80 раз, по меньшей мере в 90 раз или по меньшей мере в 100 раз относительно экспрессии гена-мишени (*например*, *SCN1A*) у субъекта до введения выделенной нуклеиновой кислоты или rAAV.

В некоторых аспектах в изобретении предложен способ регулирования экспрессии гена (*например*, экспрессии *SCN1A)* у субъекта, где выделенную нуклеиновую кислоту или rAAV, как описано в данном документе, вводят субъекту, экспрессирующему ген-мишень. В некоторых вариантах осуществления экспрессия гена-мишени у субъекта является аберрантной (*например*, увеличенной или пониженной) по

сравнению со здоровым субъектом. В некоторых вариантах осуществления субъект является или подозревается в гаплонедостаточности в отношении экспрессии гена-мишени по сравнению со здоровым субъектом.

В некоторых вариантах осуществления субъект имеет или подозревается в наличии заболевания или патологического состояния, вызванного гаплонедостаточной экспрессией гена-мишени. Например, в некоторых вариантах осуществления субъект, гаплонедостаточный по экспрессии *SCN1A*, страдает синдромом Драве. В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота или rAAV вводится субъекту путем внутривенной инъекции, внутримышечной инъекции, ингаляции, подкожной инъекции и/или внутричерепной инъекции.

В некоторых аспектах в изобретении предложена композиция, содержащая выделенную нуклеиновую кислоту или rAAV, как описано в данном документе. В некоторых вариантах реализации, композиция содержит фармацевтически приемлемый носитель.

В некоторых аспектах в изобретении предложен набор, содержащий контейнер, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту или rAAV, как описано в данном документе. В некоторых вариантах реализации, набор содержит контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота или rAAV и фармацевтически приемлемый носитель содержатся в одном и том же контейнере. В некоторых вариантах осуществления контейнер представляет собой шприц.

В некоторых аспектах в изобретении предложена клетка-хозяин, содержащая выделенную нуклеиновую кислоту или rAAV, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой эукариотическую клетку. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку человека, необязательно нейрон, например ГАМКергический нейрон.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На ФИГ. 1 показаны данные хроматографического секвенирования, указывающие на сохранение последовательности между генами SCN1A человека (HEK) и мыши (HEPG2) (консенсусная последовательность - SEQ ID NO: 98; последовательность-мишень - SEQ ID NO: 99; последовательность Hep-SCN1A_R4 (вверху) - SEQ ID NO: 100; последовательность Hep-SCN1A_R4 (внизу) - SEQ ID NO: 101

На ФИГ. 2 показано выравнивание последовательностей проксимальной промоторной области генов SCN1A человека (SEQ ID NO: 1) и мыши (SEQ ID NO: 2), где выделена консервативная последовательность. Внутри этой консервативной последовательности находится представляющая интерес область-мишень для области связывания белка «цинковые пальцы» (ZFP), выделенная жирным шрифтом (SEQ ID NO: 4).

На ФИГ. 3 схематически показано расположение (SEQ ID NO: 3) трех перекрывающихся сайтов связывания ZFP-мишени (ZFP-1, ZFP-2, ZFP-3) (SEQ ID NO: 5-7) в проксимальной области промотора гена SCN1A.

На ФИГ. 4A-4D показано выравнивание шести последовательностей спиралей распознавания для отдельных цинковых пальцев (от пальца 1 до пальца 6; F1-F6) в ZFP-1, которые распознают отдельные три области оснований (триплеты ДНК обозначены красным, разделенные знаком «•») в проксимальной области промотора гена SCN1A (SEQ ID NO: 2). **На ФИГ. 4A** выделена нуклеотидная последовательность , с

которой будут связываться с 1 по 6 цинковые пальцы (F1-F6) ZFP-1 (SEQ ID NO: 3). **На ФИГ. 4B** показаны три нуклеотидные последовательности, распознаваемые каждой спиралью распознавания (семь аминокислот) с 1 по 6 палец для ZFP-1 (SEQ ID NO: 17-22). **На ФИГ. 4C** показано аминокислотные последовательности ZFP-1, который содержит 6 пальцев, по одному на каждой линии, причем линкеры между пальцами выделены для обозначения канонических (TGEKP) и неканонических (TGSQKP) линкерных последовательностей (SEQ ID NO: 65- 70). **На ФИГ. 4D** показаны нуклеотидные последовательности ZFP-1 (F1-F6) (SEQ ID NO: 102-107).

На ФИГ. 5A-5D показано выравнивание шести последовательностей спиралей распознавания для отдельных цинковых пальцев (от пальца 1 до пальца 6; F1-F6) в ZFP-2, которые распознают отдельные три области оснований (триплеты ДНК обозначены красным, разделенные знаком «») в проксимальной области промотора гена SCN1A (SEQ ID NO: 3). **На ФИГ. 5A** выделена нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 3) с которой будут связываться с 1 по 6 цинковые пальцы (F1-F6) ZFP-2. **На ФИГ. 5B** показаны первые три нуклеотида, распознаваемые каждой спиралью распознавания (семь аминокислот) с 1 по 6 палец для ZFP-2 (SEQ ID NO: 29-34). **На ФИГ. 5C** показано аминокислотные последовательности ZFP-2, который содержит 6 пальцев, по одному на каждой линии (SEQ ID NO: 69-74), причем линкеры между пальцами выделены для обозначения канонических (TGEKP) и неканонических (TGSQKP) линкерных последовательностей. **На ФИГ. 5D** показаны нуклеотидные последовательности ZFP-2 (F1-F6) (SEQ ID NO: 108-113).

На ФИГ. 6A-6D показано выравнивание шести последовательностей спиралей распознавания для отдельных цинковых пальцев (от пальца 1 до пальца 6; F1-F6) в ZFP-3, которые распознают отдельные три области оснований (триплеты ДНК обозначены красным, разделенные знаком «») в проксимальной области промотора гена SCN1A (SEQ ID NO: 4). **На ФИГ. 6A** выделена нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 3) с которой будут связываться с 1 по 6 цинковые пальцы (F1-F6) ZFP-3. **На ФИГ. 6B** показаны первые три нуклеотида, распознаваемые каждой спиралью распознавания (семь аминокислот) с 1 по 6 палец для ZFP-3 (SEQ ID NO: 41-46). **На ФИГ. 6C** показано аминокислотные последовательности ZFP-3, который содержит 6 пальцев, по одному на каждой линии (SEQ ID NO: 75-80), причем линкеры между пальцами выделены для обозначения канонических (TGEKP) и неканонических (TGSQKP) линкерных последовательностей. **На ФИГ. 6D** показаны нуклеотидные последовательности ZFP-3 (F1-F6) (SEQ ID NO: 114-119).

На **ФИГ. 7** показаны данные, указывающие, что ZFP, связывающие SCN1A, описанные на **ФИГ. 4-6** увеличивают экспрессию гена SCN1A в клетках HEK293T, измеренную с помощью количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени (кПЦР в реальном времени). Эти экспрессионные конструкции были доставлены в клетки посредством временной трансфекции экспрессионных плазмид, кодирующих следующие регуляторы транскрипции: Cas9 *Streptococcus pyogenes* + направляющая РНК SCN1A (SpCas9 + Scn1a); Cas9 без эндонуклеазной активности (dCas9); Домен активации VPR + направляющая РНК SCN1A (dCas9_VPR + Scn1a); Домен активации VPR + ZFP1 (VPR_ZFP1); Домен активации VPR + ZPF2 (VPR_ZFP2); Домен активации VPR + ZFP3 (VPR_ZFP3); SpCas9 + направляющая РНК ASCL1 (SpCas9 + Ascl1); три VPR_ZFP (VPR_ZFP1 + VPR_ZFP2 + VPR_ZFP3). Уровни экспрессии нормализовали к уровням экспрессии TBP, определенным с помощью кПЦР в реальном времени в каждом образце.

На ФИГ. 8 показаны данные, указывающие, что ZFP, связывающие SCN1A, описанные на **ФИГ. 4-6** и Cas9 + направляющая РНК SCN1A увеличивают экспрессию гена SCN1A в клетках HEK293T, измеренную с помощью количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени (кПЦР в реальном времени).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Аспекты данного изобретения относятся к способам и композициям для модуляции (*например*, увеличения) экспрессии гена-мишени в клетке или субъекте, где ген-мишень является гаплонедостаточным (*т.е.* ген-мишень содержит одну функциональную копию). В некоторых вариантах осуществления, ген-мишень представляет собой *SCN1A*.

В некоторых вариантах осуществления в изобретении предложено слитые белки, содержащие ДНК-связывающий домен, такой как ZFP и домен регулятора транскрипции. В некоторых вариантах осуществления в изобретении предложено слитые белки, содержащие ДНК-связывающий домен, такой как ZFP и трансактиваторный домен (*например*, домен VPR). В некоторых вариантах осуществления ДНК-связывающий белок связывается с последовательностью гена-мишени или регуляторной областью гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления регуляторная область представляет собой энхансерную последовательность, промоторную последовательность или репрессорную последовательность. В некоторых вариантах осуществления промоторная последовательность может представлять собой внутренний промотор (*например*, расположенный в интроне гена-мишени) или внешний промотор (*например*, расположенный выше сайта начала транскрипции гена-мишени). В некоторых вариантах осуществления ДНК-связывающий домен слитых белков, описанный в данном документе, связывает консервативную последовательность в промоторной области гена-мишени (*например*, *SCN1A*), после чего трансактиваторный домен увеличивает экспрессию гена.

В некоторых аспектах изобретение относится к способам увеличения экспрессии гена-мишени (*например*, *SCN1A*) в клетке или субъекте. В некоторых вариантах осуществления ген-мишень содержит мутации, которые делают клетку или субъекта гаплонедостаточным по гену-мишени. Следовательно, способы и композиции по данному описанию могут быть использованы в некоторых вариантах осуществления для лечения заболеваний и нарушений, связанных с гаплонедостаточностью продукта гена-мишени, например, синдрома Драве, который обычно возникает в результате мутаций в одной копии гена *SCN1A*, приводящих к гаплонедостаточности альфа-субъединицы потенциалзависимого натриевого канала Nav1.1.

Трансактиваторные слитые белки

Некоторые аспекты описания относятся к слитым белкам, содержащим ДНК-связывающий домен (DBD) и трансактиваторный домен. В контексте данного документа слитый белок включает два или более связанных полипептида, которые кодируются двумя или более отдельными аминокислотными последовательностями. Используемые в данном документе химерные белки представляют собой слитые белки, в которых два или более сцепленных гена принадлежат к разным видам. Слитые белки обычно получают рекомбинантно, при этом гены, кодирующие слитый белок, находятся в системе, которая поддерживает экспрессию двух или более сцепленных генов и трансляцию полученных мРНК в рекомбинантные белки. В некоторых вариантах осуществления слитые белки рекомбинантно

продуцируются в прокариотических или эукариотических клетках. Слитые белки могут иметь несколько конфигураций. Например, один белок (белок А) расположен выше второго белка (белок В). В других конфигурациях слитого белка белок В расположен выше белка А. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей ДНК-связывающий домен, расположена выше последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей трансактиваторный домен, и продуцирует слитый белок, содержащий DBD, связанный с трансактиватором. В некоторых вариантах осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей трансактиваторный домен, расположена выше последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей ДНК-связывающий домен, и продуцирует слитый белок, содержащий трансактиваторный домен, связанный с ДНК-связывающим доменом. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит трансактиваторный домен, расположенный выше ДНК-связывающего домена. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит ДНК-связывающий домен, расположенный выше трансактиваторного домена.

В некоторых вариантах осуществления слитый белок, описанный в изобретении, содержит ДНК-связывающий домен. Используемый в данном документе термин «ДНК-связывающий домен (DBD)» относится к независимо свернутому белку, содержащему по меньшей мере один структурный мотив, который распознает двухцепочечную или одноцепочечную ДНК (дцДНК или оцДНК). Некоторые DBD распознают определенные последовательности (последовательность или мотив распознавания), в то время как другие типы DBD обладают общим сродством к ДНК. В некоторых вариантах осуществления слитый белок, описанный в изобретении, содержит последовательность-специфический DBD. В некоторых вариантах осуществления DBD распознает (*например*, специфически связывается с) последовательность нуклеиновой кислоты внутри или рядом с геном, кодирующим белок SCN1A (*например*, Nav1.1). Белки, содержащие DBD, обычно участвуют в клеточных процессах, таких как транскрипция, репликация, репарация и хранение ДНК. DBD в факторах транскрипции распознают специфические последовательности ДНК в промоторной области или в энхансерных элементах для содействия экспрессии генов. DBD факторов транскрипции используются в качестве слитых белков в генной инженерии для регулирования экспрессии генов-мишеней и могут подвергаться мутации для изменения специфичности связывания ДНК или аффинности связывания ДНК и, таким образом, регулирования экспрессии желаемого гена-мишени. Примеры DBD включают, но не ограничиваются ими, мотив спираль-петля-спираль, мотивы цинковых пальцев (включая цинковые пальцы Cys2-His2), эффекторы, подобные активаторам транскрипции (TALE), мотивы "крылатая спираль", HMG-боксы, белки dCas (*например*, dCas9 или dCas12a), гомеодомены и OB-складчатые домены.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к слитым белкам «цинковые пальцы» с DBD. Используемый в данном документе термин «белок «цинковые пальцы (ZFP)» относится к белку, который содержит по меньшей мере один структурный мотив, характеризующийся координацией одного или более ионов цинка, которые стабилизируют складчатую структуру белка. Цинковые пальцы являются одними из самых разнообразных структурных мотивов белков, и до 3% генов человека кодируют цинковые пальцы. Большинство ZFP содержат несколько цинковых пальцев, которые создают тандемные контакты с молекулами-мишенями, включая ДНК, РНК и малый белок убиквитин. «Классические» мотивы цинковых пальцев состоят из 2 аминокислот цистеина и 2 аминокислот гистидина (C_2H_2) и связывают ДНК специфическим для последовательности образом. Эти ZFP, которые включают фактор транскрипции IIIA (TFIIIA), обычно участвуют в экспрессии генов. Множественные мотивы цинковых пальцев в ДНК-

связывающих белках связываются и наматываются снаружи двойной спирали ДНК. Из-за их относительно небольшого размера (*например*, каждый палец состоит примерно из 25-40, обычно 27-35 аминокислот), слитые белки с доменом цинкового пальца используются для создания DBD с новой специфичностью связывания ДНК. Эти DBD могут доставлять другие слитые домены (*например*, домены активации или репрессии транскрипции или домены эпигенетической модификации) для изменения регуляции транскрипции гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления белки с цинковыми пальцами содержат от 2 до 8 пальцев, при этом каждый палец содержит от 27 до 40 аминокислот (*например*, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 или 40 аминокислот).

В некоторых вариантах осуществления ZFP содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 цинковых пальцев. Каждый цинковый палец может содержать 25-40, 25-30, 30-35, 35-40 или 40-45 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления цинковый палец содержит 27-35 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления цинковый палец содержит 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 или 35 аминокислот. Цинковый палец может специфически распознавать или связываться с целевой последовательностью, *например*, с целевым геном или регуляторной областью целевого гена, которая является гаплонедостаточной у субъекта. В некоторых вариантах осуществления цинковый палец связывается с целевой последовательностью гена *SCN1A*, *например*, *SCN1A* человека, например, как указано в SEQ ID NO: 49. В некоторых вариантах осуществления цинковый палец, который связывается с целевой последовательностью гена *SCN1A*, содержит одну или более аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 63-80 или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления цинковый палец специфически распознает последовательность-мишень, содержащую тринуклеотидную последовательность, или связывается с ней.

В некоторых вариантах осуществления цинковый палец содержит спираль распознавания, которая распознает или связывается с целевой последовательностью, *например*, целевой последовательностью, содержащей тринуклеотидную последовательность. В некоторых вариантах осуществления спираль распознавания связывается с тринуклеотидом. В некоторых вариантах осуществления спираль распознавания содержит 4-10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления спираль распознавания содержит 4, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления спираль распознавания связывается с тринуклеотидной последовательностью гена SCN1A. В некоторых вариантах осуществления последовательность распознавания, которая связывается с геном *SCN1A*, включает аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 17-22, 29-34 или 41-46. В некоторых вариантах осуществления последовательность распознавания, которая связывается с геном SCN1A, кодируется любой из SEQ ID NO: 11-16, 23-28 или 35-40. В некоторых вариантах осуществления цинковый палец связывается с той же нуклеотидной последовательностью, что и спираль распознавания, содержащая аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 17-22, 29-34 или 41-46.

В некоторых вариантах осуществления цинковый палец содержит линкерную последовательность на своем С-конце, которая может служить для связывания или соединения указанного цинкового пальца с дополнительным цинковым пальцем. В некоторых вариантах осуществления линкерная последовательность может представлять собой канонический линкер, *например*, содержащий аминокислотную последовательность TGEKP (SEQ ID NO: 120). В некоторых вариантах осуществления линкерная последовательность может представлять собой неканонический линкер, *например*, содержащий аминокислотную последовательность TGSQKP (SEQ ID NO: 121). В некоторых вариантах осуществления

линкерная последовательность может состоять из 2-10 аминокислот, *например*, из 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления ZFP, который связывается с целевым геном, *например*, с геном *SCN1A*, содержит шесть цинковых пальцев, каждый из которых распознает или связывается с другой тринуклеотидной последовательностью целевого гена, *например*, гена *SCN1A*. В некоторых вариантах осуществления ZFP, который связывается с геном *SCN1A*, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57. В некоторых вариантах осуществления ZFP, который связывается с геном *SCN1A*, содержит цинковые пальцы, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 63, 64, 65, 66, 67 и/или 68. В некоторых вариантах осуществления ZFP, которая связывается с геном *SCN1A*, содержит спираль распознавания, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 17, 18, 19, 20, 21 и/или 22. В некоторых вариантах осуществления ZFP, который связывается с геном SCN1A, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 59. В некоторых вариантах осуществления ZFP, который связывается с геном *SCN1A*, содержит цинковые пальцы, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 69, 70, 71, 72, 73 и/или 74. В некоторых вариантах осуществления ZFP, которая связывается с геном *SCN1A*, содержит спираль распознавания, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 29, 30, 31, 32, 33 и/или 34. В некоторых вариантах осуществления ZFP, который связывается с геном *SCN1A*, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61. В некоторых вариантах осуществления ZFP, который связывается с геном *SCN1A*, содержит цинковые пальцы, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 75, 76, 77, 78, 79 и/или 80. В некоторых вариантах осуществления ZFP, которая связывается с геном *SCN1A*, содержит спираль распознавания, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 41, 42, 43, 44, 45 и/или 46. В некоторых вариантах осуществления ZFP, который связывается с геном *SCN1A*, составляет по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 57, 59 или 61, как показано ниже.

<u>SEQ ID NO: 57 (аминокислотная последовательность белка ZFP1)</u>

RPFQCRICMRNFSQRGNLVRHIRTHTGEKPFACDICGKKFALSFNLTRHTKIHTGSQKPFQCRICMRNFSRSD
NLTRHIRTHTGEKPFACDICGKKFADRSHLARHTKIHTGSQKPFQCRICMRNFSQKAHLTAHIRTHTGEKPF
ACDICGRKFARSDNLTRHTKIHLRQKD

<u>SEQ ID NO: 59 (аминокислотная последовательность белка ZFP2)</u>

RPFQCRICMRNFSRSSNLTRHIRTHTGEKPFACDICGKKFADKRTLIRHTKIHTGSQKPFQCRICMRNFSQRG
NLVRHIRTHTGEKPFACDICGKKFALSFNLTRHTKIHTGSQKPFQCRICMRNFSRSDNLTRHIRTHTGEKPFA
CDICGRKFADRSHLARHTKIHLRQKD

SEQ ID NO: 61 (аминокислотная последовательность белка ZFP3)

RPFQCRICMRNFSDRSALARHIRTHTGEKPFACDICGKKFARSDNLTRHTKIHTGSQKPFQCRICMRNFSQS
GDLTRHIRTHTGEKPFACDICGKKFAVRQTLKQHTKIHTGSQKPFQCRICMRNFSAAGNLTRHIRTHTGEKP
FACDICGRKFARSDNLTRHTKIHLRQKD

В некоторых вариантах осуществления DBD представляют собой эффекторные белки, подобные активаторам транскрипции (TALE). TALE может специфически распознавать или связываться с целевой последовательностью, *например*, с целевым геном или регуляторной областью целевого гена. В некоторых вариантах осуществления субъект гаплонедостаточен по гену-мишени. В некоторых вариантах осуществления TALE связывается с целевой последовательностью гена SCN1A, *например*, *SCN1A* человека, как указано в SEQ ID NO: 49. Белки TALE секретируются бактериями и связывают промоторные последовательности в растении-хозяине для активации экспрессии генов растений, которые способствуют бактериальной инфекции. Как правило, белками TALE манипулируют для связывания новых последовательностей ДНК, поскольку распознают последовательности-мишени через центральный домен повтора, состоящий из вариабельного числа ~ 30-35 аминокислотных повторов, при этом каждый повтор распознает одну пару оснований в последовательности-мишени. Массив этих повторов обычно необходим для распознавания последовательности ДНК.

В некоторых вариантах осуществления DBD являются гомеодоменами. Гомеодомен может специфически распознавать или связываться с целевой последовательностью, *например*, с целевым геном или регуляторной областью целевого гена. В некоторых вариантах осуществления субъект гаплонедостаточен по гену-мишени. В некоторых вариантах осуществления гомеодомен связывается с целевой последовательностью гена SCN1A, *например*, *SCN1A* человека, как указано в SEQ ID NO: 49. Гомеодомены — это белки, содержащие три альфа-спирали и N-концевое плечо, которые отвечают за распознавание целевой последовательности. Гомеодомен обычно распознает небольшую последовательность ДНК (от ~ 4 до 8 пар оснований), однако эти домены могут быть объединены в тандеме с другими ДНК-связывающими доменами (либо другими гомеодоменами, либо белками «цинковые пальцы») для распознавания более длинных протяженных последовательностей (от 12 до 24 пар оснований). Следовательно, гомеодомены могут быть компонентами DBD, которые распознают уникальные последовательности в геноме человека.

В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один ДНК-связывающий домен представляет собой каталитически неактивный белок, связанный с CRISPR (белок Cas). Каталитически неактивный белок Cas (также известный как dCas или «мертвый белок Cas») представляет собой белок Cas, который был модифицирован или мутирован таким образом, что он обладает пониженной нуклеазной активностью (*например*, эндонуклеазной активностью) или лишен всей нуклеазной активности (*например*, эндонуклеазной активности). В некоторых вариантах осуществления каталитически неактивный белок Cas представляет собой белок dCas9 или dCas12. В некоторых вариантах осуществления DBD представляют собой белки dCas (также известные как «мертвые Cas»), такие как dCas9 или dCas12a. Белки dCas представляют собой мутантные варианты белков, связанных с CRISPR (Cas, *например*, Cas9 или Cas12a),

которые были мутированы так, что они каталитически инактивированы, *то есть* неспособны к расщеплению нуклеотидов. dCas может специфически распознавать или связываться с целевой последовательностью, *например*, с целевым геном или регуляторной областью целевого гена. Комплекс, содержащий белок dCas и направляющую нуклеиновую кислоту (*например*, нРНК), может нацеливаться и/или связываться с конкретными нуклеотидными последовательностями или генами, которые комплементарны направляющей нуклеиновой кислоте. В некоторых вариантах осуществления субъект гаплонедостаточен по гену-мишени. В некоторых вариантах осуществления dCas связывается с целевой последовательностью гена SCN1A, *например*, SCN1A человека, как указано в SEQ ID NO: 49. Однако белки dCas сохраняют свою способность распознавать и связываться с последовательностями ДНК-мишени при связывании с направляющей нуклеиновой кислотой (*например*, направляющей РНК, нРНК или онРНК), которая комплементарна или частично комплементарна указанной последовательности ДНК-мишени. В некоторых вариантах осуществления направляющая нуклеиновая кислота для нацеливания белков dCas (*например*, dCas9) на SCN1A содержит спейсерную последовательность, имеющую любую из SEQ ID NO: 85, 86, 89, 90, 93 или 94. В некоторых вариантах осуществления направляющая нуклеиновая кислота для нацеливания белков dCas (*например*, dCas9) на SCN1A содержит спейсерную последовательность, содержащую по меньшей мере 15 (*например*, по меньшей мере 16, 17, 18, 19 или 20) последовательных нуклеотидов любой из SEQ ID NO: 85, 86, 89, 90, 93 или 94. В некоторых вариантах осуществления направляющая нуклеиновая кислота для нацеливания белков dCas (*например*, dCas9) на SCN1A содержит любую из SEQ ID NO: 83, 84, 87, 88, 91 или 92. В некоторых вариантах осуществления направляющая нуклеиновая кислота для нацеливания белков dCas (*например*, dCas9) на SCN1A содержит или состоит из любой из SEQ ID NO: 83-94. Следовательно, эндонуклеазы dCas могут быть компонентами DBD, которые распознают уникальные последовательности в геноме человека. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит белок dCas9 и трансактиваторный домен (*например*, домен VPR).

В некоторых аспектах изобретение относится к ДНК-связывающим доменам, которые связываются с геном, кодирующим потенциалзависимый натриевый канал (*например*, $Na_v1.1$). В некоторых вариантах осуществления ген, кодирующий потенциалзависимый натриевый канал, представляет собой ген *SCN1A* и содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 49. В некоторых вариантах осуществления ДНК-связывающий домен связывается с нетранслируемой областью целевого гена, такой как 3'-нетранслируемая область (3'UTR) или 5'-нетранслируемая область (5'UTR). В некоторых вариантах осуществления нетранслируемая область содержит регуляторную последовательность, например энхансер, промотор, интронную или репрессорную последовательность. В некоторых вариантах осуществления ДНК-связывающий домен представляет собой белок «цинковые пальцы», содержащий последовательности, указанные в SEQ ID NO: 57-62. В некоторых вариантах осуществления ДНК-связывающий домен связывается с последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной в любой из SEQ ID NO: 5-7.

Количество ДНК-связывающих доменов, кодируемых трансгеном, может варьироваться. В некоторых вариантах осуществления трансген кодирует 1 ДНК-связывающий домен. В некоторых вариантах осуществления трансген кодирует 2 ДНК-связывающих домена. В некоторых вариантах осуществления трансген кодирует 3 ДНК-связывающих домена. В некоторых вариантах осуществления трансген кодирует 4 ДНК-связывающих домена. В некоторых вариантах осуществления трансген кодирует 5 ДНК-связывающих доменов. В некоторых вариантах осуществления трансген кодирует 6 ДНК-связывающих доменов. В некоторых вариантах осуществления трансген кодирует 7 ДНК-связывающих

доменов. В некоторых вариантах осуществления трансген кодирует 8 ДНК-связывающих доменов. В некоторых вариантах осуществления трансген кодирует 9 ДНК-связывающих домена. В некоторых вариантах осуществления трансген кодирует 10 ДНК-связывающих доменов. В некоторых вариантах реализации трансген кодирует более 10 (*например*, 20, 30, 50, 100 и *т.д.*) ДНК-связывающих доменов. ДНК-связывающие домены могут быть одним и тем же ДНК-связывающим доменом (*например*, множественными копиями одного и того же DBD), разными ДНК-связывающими доменами (*например*, каждый DBD связывает уникальную последовательность) или их комбинацией.

В некоторых аспектах изобретение относится к слитым белкам, содержащим трансактиваторный домен. Используемый в данном документе термин «трансактиваторный домен» относится к каркасному домену фактора транскрипции, который содержит сайты связывания для других белков, которые регулируют экспрессию генов, таких как корегуляторы транскрипции. В некоторых вариантах осуществления трансактиваторный домен (также известный как домен активации транскрипции) действует в сочетании с DBD для активации транскрипции с промотора или энхансера либо напрямую, контактируя с факторами транскрипции, либо опосредованно через коактиваторные белки. Трансактиваторные домены (TAD) обычно называют по их аминокислотному составу, в котором аминокислоты либо необходимы для активности, либо наиболее распространены в TAD. TAD используются в качестве слитых белков в генной инженерии для регулирования экспрессии генов-мишеней и могут подвергаться мутации для изменения активации транскрипции и, следовательно, экспрессии гена-мишени. Примеры трансактиваторных доменов включают, но не ограничиваются ими, GAL4, HAP1, VP16, P65, RTA и GCN4.

В некоторых вариантах осуществления трансактиваторный домен содержит домен VP64. VP64 представляет собой кислый TAD, состоящий из четырех тандемных копий белка VP16, который в естественных условиях экспрессируется вирусом простого герпеса. При слиянии с DBD, который связывается с промотором гена или рядом с ним, VP64 действует как сильный активатор транскрипции и, таким образом, может использоваться для регулирования экспрессии гена-мишени (*например*, *SCN1A*) Домен VP64 обычно состоит из тетрамерного повтора домена минимальной активации белка VP16 простого герпеса. В некоторых вариантах осуществления домен VP64 содержит четыре повтора аминокислотных остатков 437-448 в VP16. В некоторых вариантах осуществления белок VP16 кодируется геном UL48 вируса герпеса 2 человека, который содержит последовательность, изложенную в NCBI: номер доступа эталонной последовательности: NC_001798.2. В некоторых вариантах осуществления ген VP16 содержит нуклеотидную последовательность, которая идентична на 99%, идентична на 95%, идентична на 90%, идентична на 80%, идентична на 70%, идентична на 60% или идентична на 50% аминокислотной последовательности, кодируемой последовательностью нуклеиновой кислоты, изложенной в NCBI: номер доступа эталонной последовательности: YP_009137200.1. В некоторых вариантах осуществления белок VP16 содержит аминокислотную последовательность, которая идентична на 99%, идентична на 95%, идентична на 90%, идентична на 80%, идентична на 70%, идентична на 60% или идентична на 50% аминокислотной последовательности, изложенной в NCBI: номер доступа эталонной последовательности: Q69113-1. В некоторых вариантах осуществления ген VP16 содержит нуклеотидную последовательность, которая идентична на 99%, идентична на 95%, идентична на 90%, идентична на 80%, идентична на 70%, идентична на 60% или идентична на 50% аминокислотной последовательности, кодируемой последовательностью нуклеиновой кислоты, указанной в SEQ ID NO: 51. В некоторых вариантах осуществления белок VP16 содержит аминокислотную последовательность, которая идентична на 99%,

идентична на 95%, идентична на 90%, идентична на 80%, идентична на 70%, идентична на 60% или идентична на 50% аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 52.

В некоторых вариантах осуществления трансактиваторный домен содержит трансактиваторный домен P65. P65 представляет собой субъединицу фактора транскрипции NF-κβ, которая содержит два прилягающих кислых TAD на своем C-конце. При слиянии с DBD, который связывается с промотором гена или рядом с ним, белок p65 действует как сильный активатор транскрипции и, таким образом, может использоваться для регулирования экспрессии гена-мишени, например, как описано Urlinger et al. “The p65 domain from NF-kappaB is an efficient human activator in the tetracycline-regulatable gene expression system,” *Gene,* **2000**. В некоторых вариантах осуществления белок p65 кодируется геном *RELA* человека, который содержит последовательность, изложенную в NCBI: номер доступа эталонной последовательности: NM_001145138.1, NM_001243984.1, NM_001243985.1, или NM_021975.3. В некоторых вариантах осуществления ген *RELA* содержит нуклеотидную последовательность, которая идентична на 99%, идентична на 95%, идентична на 90%, идентична на 80%, идентична на 70%, идентична на 60% или идентична на 50% аминокислотной последовательности, кодируемой последовательностью нуклеиновой кислоты, изложенной в любом из NCBI: номер Seq ID Nos: NM_001145138.1, NM_001243984.1, NM_001243985.1, или NM_021975.3. В некоторых вариантах осуществления белок p65 содержит аминокислотную последовательность, которая идентична на 99%, идентична на 95%, идентична на 90%, идентична на 80%, идентична на 70%, идентична на 60% или идентична на 50% аминокислотной последовательности, изложенной в NP_001138610.1, NP_001230913.1, NP_001230914.1 и NP_068110.3. В некоторых вариантах осуществления ген *RELA* содержит нуклеотидную последовательность, которая идентична на 99%, идентична на 95%, идентична на 90%, идентична на 80%, идентична на 70%, идентична на 60% или идентична на 50% аминокислотной последовательности, кодируемой последовательностью нуклеиновой кислоты, изложенной в SEQ ID NO: 53. В некоторых вариантах осуществления белок p65 содержит аминокислотную последовательность, которая идентична на 99%, идентична на 95%, идентична на 90%, идентична на 80%, идентична на 70%, идентична на 60% или идентична на 50% аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 54.

В некоторых вариантах осуществления трансактиваторный домен содержит домен RTA. RTA представляет собой гидрофобный TAD, полученный из вируса Эпштейна-Барра, который представляет собой мощный трансактиваторный домен, который связывается с энхансерной областью, для содействия экспрессии нескольких вирусных генов. При слиянии с DBD, который связывается с промотором гена или рядом с ним, белок RTA действует как сильный активатор транскрипции и, таким образом, может использоваться для регулирования экспрессии гена-мишени, например, как описано в Miyazawa, et al., “IL-10 promoter transactivation by the viral K-RTA protein involves the host-cell transcription factors, specificity proteins 1 and 3,” *Journal of Biological Chemistry*, **2018**. В некоторых вариантах осуществления белок RTA кодируется геном BRLF1 вируса Эпштейна-Барра, который содержит последовательность, изложенную в NCBI: номер доступа эталонной последовательности: YP_041674.1. В некоторых вариантах осуществления ген BRLF1 содержит нуклеотидную последовательность, которая идентична на 99%, идентична на 95%, идентична на 90%, идентична на 80%, идентична на 70%, идентична на 60% или идентична на 50% аминокислотной последовательности, кодируемой последовательностью нуклеиновой кислоты, изложенной в любом из NCBI: номер ID эталонной последовательности: YP_041674.1. В некоторых вариантах осуществления белок RTA содержит аминокислотную последовательность, которая идентична на 99%,

идентична на 95%, идентична на 90%, идентична на 80%, идентична на 70%, идентична на 60% или идентична на 50% аминокислотной последовательности, изложенной в YP_041674.1. В некоторых вариантах осуществления ген BRLF1 содержит нуклеотидную последовательность, которая идентична на 99%, идентична на 95%, идентична на 90%, идентична на 80%, идентична на 70%, идентична на 60% или идентична на 50% аминокислотной последовательности, кодируемой последовательностью нуклеиновой кислоты, изложенной в SEQ ID NO: 55. В некоторых вариантах осуществления белок RTA содержит аминокислотную последовательность, которая идентична на 99%, идентична на 95%, идентична на 90%, идентична на 80%, идентична на 70%, идентична на 60% или идентична на 50% аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 56.

Данное изобретение частично основано на слитых белках, содержащих гибридный трансактиваторный домен. В контексте данного описания термин «гибридный трансактиваторный домен» относится к слитому белку, содержащему более одного белка, активирующего транскрипцию, или его части (*например*, 2, 3, 4, 5 или более белков, активирующих транскрипцию, или их части). Гибридные домены трансактивации используются в генной инженерии для увеличения экспрессии генов-мишеней. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения трехчастный гибридный домен трансактивации, содержащий нуклеотидную последовательность для VP64-P65-RTA (VPR), как описано у Chavez, et al. “Highly efficient Cas9-mediated transcriptional programming”, *Nat Methods*, **2015,** (SEQ ID NO: 47) используется для увеличения экспрессии гена-мишени (*например, SCN1A*).

В некоторых вариантах осуществления слитые белки, описанные в данном документе, могут содержать DBD (*например*, ZFP) и белок-репрессор транскрипции. В некоторых аспектах изобретение относится к слитым белкам, содержащим домен репрессора транскрипции. Используемый в данном документе термин «репрессор транскрипции» обычно относится к полипептиду, который подавляет экспрессию гена-мишени. Примеры репрессоров транскрипции включают, но не ограничиваются ими, KRAB, SMRT/TRAC-2 и NCoR/RIP-13. В некоторых вариантах осуществления такие слитые белки-репрессоры транскрипции полезны для снижения уровня экспрессии гена-мишени (*например*, гена, который чрезмерно экспрессируется при заболевании с приобретением функции).

Выделенные нуклеиновые кислоты

Выделенная последовательность нуклеиновой кислоты относится к последовательности ДНК или РНК. В некоторых вариантах осуществления белки и нуклеиновые кислоты по данному описанию выделены. Используемый в данном документе термин «выделенный» означает искусственно полученный. Используемый в данном документе в отношении нуклеиновых кислот термин «выделенные» означает: (i) амплифицированные in vitro, например, с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР); (ii) получены рекомбинантно путем клонирования; (iii) очищенные, например, путем расщепления и разделения в геле; или (iv) синтезированы, например, химическим синтезом. Выделенная нуклеиновая кислота - это та, которой легко манипулировать методами рекомбинантной ДНК, хорошо известными в данной области. Таким образом, нуклеотидная последовательность, содержащаяся в векторе, в котором известны 5 'и 3' сайты рестрикции или для которого были описаны праймерные последовательности полимеразной цепной реакции (ПЦР), считается выделенной, но последовательность нуклеиновой кислоты, существующая в нативном состоянии в естественном хозяине, таковой не является. Выделенная нуклеиновая кислота может быть существенно очищена, но в этом нет необходимости. Например, нуклеиновая кислота, выделенная в

пределах вектора клонирования или экспрессии, не является чистой в том смысле, что она может составлять лишь крошечный процент материала клетки, в которой она находится. Однако такая нуклеиновая кислота является выделенной в том смысле, в котором этот термин используется в данном документе, поскольку ею легко манипулировать стандартными методами, известными специалистам в данной области. Используемый в данном документе в отношении белков или пептидов термин «выделенный» относится к белку или пептиду, который был выделен из естественной среды или искусственно получен (*например*, путем химического синтеза, с помощью технологии рекомбинантных ДНК и т. д.).

В некоторых аспектах изобретение относится к выделенным нуклеиновым кислотам (*например*, экспрессирующим конструкциям, таким как векторы rAAV), которые сконфигурированы для экспрессии одного или более слитых белков с ZFP-трансактиваторным доменом. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит от 1 до 10 (*например*, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) DBD и/или от 1 до 10 (*например*, 1, 2 , 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) трансактиваторных доменов. В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит более 10 DBS и/или более 10 трансактиваторных доменов.

В некоторых аспектах данного описания ДНК-связывающие домены сливаются с доменом регулятора транскрипции косвенно через линкер. Используемый в данном документе термин «линкер» обычно представляет собой отрезок полипептидов, который структурно соединяет два различных полипептида в одном трансгене. В некоторых вариантах осуществления линкер является гибким для обеспечения перемещения отдельных полипептидов. В некоторых вариантах осуществления гибкий линкер содержит остатки глицина. В некоторых вариантах осуществления гибкий линкер содержит смесь остатков глицина и серина. В некоторых вариантах осуществления линкер является расщепляемым, что позволяет разделять полипептиды. В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер разрезается протеазой. В некоторых вариантах осуществления протеаза представляет собой трипсин или фактор X.

В некоторых вариантах осуществления линкер содержит от 5 до 30 аминокислот (*например*, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 , 25, 26, 27, 28, 29 или 30 аминокислот). В некоторых вариантах осуществления линкер содержит от 3 до 30 аминокислот (*например*, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 аминокислот). В некоторых вариантах осуществления линкер содержит от 3 до 20 аминокислот (*например*, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислот).

Данное изобретение частично основано на слитых белках, которые сконструированы для увеличения экспрессии гена, кодирующего белок субъединицы потенциалзависимого натриевого ионного канала (также называемого белком SCN), например, *SCN1A*. Используемый в данном документе термин «белок SCN» относится к белку ионного натриевого канала, который обеспечивает потенциалзависимую проницаемость для ионов натрия возбудимых мембран, позволяя ионам натрия проходить через мембрану. Примеры белков SCN человека включают, но не ограничиваются ими, SCN1A, SCN3A, SCN5A, SCN10A и SCN11A. В некоторых вариантах осуществления белок SCN представляет собой SCN1A (также называемый Nav1.1), который кодирует субъединицу ионного канала α_1 типа 1. В некоторых вариантах осуществления белок SCN представляет собой белок SCN1B, который кодирует субъединицу ионного канала β_1 типа 1 или белок SCN1C. В некоторых вариантах осуществления белок SCN представляет собой комбинацию белков SCN1A, SCN1B и/или SCN1C. Как описано в данном документе, белок SCN может быть частью или фрагментом белка SCN. В некоторых вариантах осуществления белок SCN, описанный в данном документе, представляет собой вариант белка SCN, такой как точечный мутант или усеченный мутант.

SCN1A человека кодируется геном SCN1A (Gene ID: 6323, человек), который является консервативным для шимпанзе, макаки-резуса, собаки, коровы, мыши, крысы и курицы. Ген SCN1A у человека в основном экспрессируется в головном мозге, легких и семенниках. В некоторых вариантах осуществления белки SCN1A содержат пять структурных повторов (I, II, III, IV, Q).

В некоторых вариантах осуществления белок SCN1A, кодируется геном SCN1A человека, который содержит последовательность, указанную в NCBI: номер ID эталонной последовательности: NM_001165963.2, NM_00165964.2, NM_001202435.2, NM_001353948.1, NM_001353949.1, NM_001353950.1, NM_00135395.1, NM_001353952.1, NM_001353954.1, NM_00353955.1, NM_001353957.1, NM_001353958.1, NM_001353960.1, NM_001353961.1 или NM_006920.5. В некоторых вариантах осуществления белок SCN1A кодируется геном SCN1A мыши, который содержит последовательность, указанную в NCBI: номер ID эталонной последовательности: NM_001313997.1 или NM_018733.2. В некоторых вариантах осуществления белок SCN1A содержит аминокислотную последовательность, которая идентична на 99%, идентична на 95%, идентична на 90%, идентична на 80%, идентична на 70%, идентична на 60% или идентична на 50% аминокислотной последовательности, кодируемой последовательностью нуклеиновой кислоты, указанной в NCBI: номер ID эталонной последовательности: NG_011906.1, NM_001313997.1 или NM_018733.2. В некоторых вариантах осуществления ген SCN1A содержит аминокислотную последовательность, которая идентична на 99%, идентична на 95%, идентична на 90%, идентична на 80%, идентична на 70%, идентична на 60% или идентична на 50% последовательности, указанной в SEQ ID NO: 50. В некоторых вариантах осуществления белок SCN1A человека содержит последовательность, указанную в NCBI: номер ID эталонной последовательности: NP_001159435.1, NP_0011159436.1, NP_001189364.1, NP_001340877.1, NP_001340878.1, NP_001340879.1, NP_001340880.1, NP_001340881.1, NP_001340883.1, NP_001340884.1, NP_001340886.1, NP_001340887.1, NP_001340889.1, NP_001340890.1, NP_00851.3. В некоторых вариантах осуществления белок SCN1A содержит аминокислотную последовательность, которая идентична на 99%, идентична на 95%, идентична на 90%, идентична на 80%, идентична на 70%, идентична на 60% или идентична на 50% аминокислотной последовательности, кодируемой последовательностью нуклеиновой кислоты, указанной в NCBI: номер ID эталонной последовательности: NG_011906.1, NM_001313997.1 или NM_018733.2. В некоторых вариантах осуществления белок SCN1A мыши содержит последовательность, указанную в NCB: номер ID эталонной последовательности:001300926.1 или NP_061203.2. В некоторых вариантах осуществления белок SCN1A человека содержит аминокислотную последовательность, которая идентична на 99%, идентична на 95%, идентична на 90%, идентична на 80%, идентична на 70%, идентична на 60% или идентична на 50% последовательности нуклеиновой кислоты, указанной в SEQ ID NO: 49.

Выделенные нуклеиновые кислоты по данному описанию могут быть векторами рекомбинантного аденоассоциированного вируса (AAV) (векторами rAAV). В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота, как описано в изобретении, содержит область (*например*, первую область), содержащую инвертированный концевой повтор (ITR) первого аденоассоциированного вируса (AAV) или его вариант. Выделенная нуклеиновая кислота (*например*, рекомбинантный вектор AAV) может быть упакована в капсидный белок и введена субъекту и/или доставлена в выбранную клетку-мишень. «Рекомбинантные векторы AAV (rAAV)» обычно состоят, как минимум, из трансгена и его регуляторных последовательностей, а также 5 'и 3' инвертированных концевых повторов AAV (ITR). Трансген может

содержать область, кодирующую, например, белок и/или последовательность контроля экспрессии (*например*, поли-А-хвост), как описано в других частях данного документа.

Обычно последовательности ITR имеют длину около 145 п.о. Предпочтительно, по существу, в молекуле используются целые последовательности, кодирующие ITR, хотя допустима некоторая степень незначительной модификации этих последовательностей. Способность изменять эти последовательности ITR находится в пределах квалификации специалиста в данной области техники (см., *например*, тексты, такие как Sambrook et al., "Molecular Cloning. A Laboratory Manual", 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989); и K. Fisher et al., J Virol., 70:520 532 (1996)). Пример такой молекулы, используемой в данном описании, представляет собой «действующую в цис-положении» плазмиду, содержащую трансген, в котором выбранная трансгенная последовательность и связанные с ней регуляторные элементы фланкированы 5'- и 3'-последовательностями ITR AAV. Последовательности ITR AAV могут быть получены из любого известного AAV, включая идентифицированные в данное время типы AAV млекопитающих. В некоторых вариантах осуществления выделенная нуклеиновая кислота дополнительно содержит область (*например*, вторую область, третью область, четвертую область и *т.д.*), содержащую второй ITR AAV.

В дополнение к основным элементам, указанным выше для рекомбинантного вектора AAV, вектор также включает в себя традиционные контрольные элементы, которые функционально связаны с элементами трансгеном таким образом, который обеспечивает его транскрипцию, трансляцию и/или экспрессию в клетке, трансфицированной вектором или инфицированной вирусом, полученными по данному изобретению. Как используется в данном документе, «функционально связанные» последовательности включают в себя как регулирующие экспрессию последовательности, которые являются смежными с представляющим интерес геном, так и регулирующими экспрессию последовательностями, которые действуют в транс-положении или дистанционно для контроля представляющего интерес гена. Регулирующие экспрессию последовательности включают в себя соответствующие последовательности инициации транскрипции, последовательности терминации транскрипции, промоторные и энхансерные последовательности; эффективные сигналы процессинга РНК, такие как сигналы сплайсинга и полиаденилирования (поли-А); последовательности, которые стабилизируют цитоплазматическую мРНК; последовательности, которые повышают эффективность трансляции (*например*, консенсусная последовательность Kozak); последовательности, которые повышают стабильность белка; а также при желании последовательности, которые повышают секрецию кодируемого продукта. Ряд последовательностей контроля экспрессии, включая промоторы, которые являются нативными, конститутивными, индуцибельными и/или тканеспецифичными, известны в данной области и могут быть использованы.

В контексте данного описания говорят, что последовательность нуклеиновой кислоты (*например*, кодирующая последовательность) и регуляторные последовательности функционально связаны, когда они ковалентно связаны таким образом, чтобы экспрессия или транскрипция последовательности нуклеиновой кислоты попадает под влияние или контроль регуляторных последовательностей. Если желательно, чтобы последовательности нуклеиновой кислоты транслировались в функциональный белок, две последовательности ДНК функционально связаны, если индукция промотора в 5'-регуляторных последовательностях приводит к транскрипции кодирующей последовательности и если природа связи между двумя последовательностями ДНК не (1) приводит к введению мутации со сдвигом рамки

считывания, (2) препятствует способности промоторной области управлять транскрипцией кодирующей последовательности, или (3) мешает способности соответствующего транскрипта РНК транслироваться в белок. Таким образом, промоторная область была бы функционально связана с последовательностью нуклеиновой кислоты, если промоторная область способна влиять на транскрипцию этой ДНК-последовательности, так что полученный транскрипт мог бы транслироваться в желаемый белок или полипептид. Аналогичным образом две или более кодирующих областей функционально связаны, когда они связаны таким образом, что их транскрипция с общего промотора приводит к экспрессии двух или более белков, транслированных в рамке считывания. В некоторых вариантах осуществления функционально связанные кодирующие последовательности дают слитый белок.

Область, содержащая трансген *(например*, содержащая слитый белок и т.д.), может быть расположена в любом подходящем месте выделенной нуклеиновой кислоты, которое обеспечит экспрессию слитого белка.

Следует понимать, что в случаях, когда трансген кодирует более одного полипептида, каждый полипептид может быть расположен в любом подходящем месте внутри трансгена. Например, нуклеиновая кислота, кодирующая первый полипептид, может быть расположена в интроне трансгена, а последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая второй полипептид, может быть расположена в другой нетранслируемой области (*например*, между последним кодоном последовательности, кодирующей белок, и первым основанием сигнала поли-А трансгена).

Термин «промотор» относится к последовательности ДНК, распознаваемой синтетическим аппаратом клетки, или введенному синтетическому аппарату, необходимому для инициации специфической транскрипции гена. Фразы «функционально связанный», «функционально расположенный», «под контролем» или «под контролем транскрипции» означают, что промотор находится в правильном положении и ориентации по отношению к нуклеиновой кислоте, чтобы контролировать инициацию РНК-полимеразы и экспрессию гена.

Для нуклеиновых кислот, кодирующих белки, последовательность полиаденилирования обычно встраивают после последовательностей трансгена и перед 3‘ ITR-последовательностью AAV. Конструкция rAAV, используемая в данном изобретении, может также содержать интрон, предпочтительно расположенный между промоторной/энхансерной последовательностью и трансгеном. Одна возможная последовательность интрона происходит от SV-40 и называется последовательностью интрона SV-40 T. Другой векторный элемент, который можно использовать, представляет собой внутренний участок посадки рибосомы (IRES). Последовательность IRES используется для получения более одного полипептида из одного транскрипта гена. Последовательность IRES используется для получения белка, содержащего более одной полипептидной цепи. Выбор этих и других распространенных векторных элементов является традиционным, и доступны многие подобные последовательности [см., *например*, Sambrook et al., а также ссылки, цитируемые в нем, например, на страницах 3.18 3.26 и 16.17 16.27 и Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, 1989]. В некоторых вариантах осуществления последовательность вируса ящура 2A включена в полипротеин; это небольшой пептид (приблизительно 18 аминокислот в длину), который, как было показано, опосредует расщепление полипротеинов (Ryan, M D et al., EMBO, 1994; 4: 928-933; Mattion, N. M. et al., J Virology, November 1996; p. 8124-8127; Furler, S et al., Gene Therapy, 2001; 8: 864-873; и Halpin, C. et al., The Plant Journal, 1999; 4: 453-459). Активность расщепления последовательности 2A ранее была продемонстрирована в искусственных системах, включая

плазмиды и векторы для генной терапии (AAV и ретровирусы) (Ryan, M D et al., EMBO, 1994; 4: 928-933; Mattion, N M et al., J Virology, November 1996; p. 8124-8127; Furler, S et al., Gene Therapy, 2001; 8: 864-873; и Halpin, C et al., The Plant Journal, 1999; 4: 453-459; de Felipe, P et al., Gene Therapy, 1999; 6: 198-208; de Felipe, P et al., Human Gene Therapy, 2000; 11: 1921-1931.; и Klump, H et al., Gene Therapy, 2001; 8: 811-817).

Примеры конститутивных промоторов включают, помимо прочего, промотор LTR ретровирусного вируса саркомы Рауса (RSV), (необязательно с энхансером RSV), промотор цитомегаловируса (CMV) (необязательно с энхансером CMV) [см., *например*, Boshart et al., Cell, 41:521-530 (1985)], промотор SV40, промотор дигидрофолатредуктазы, промотор β-актина, промотор фосфоглицеринкиназы (PGK) и промотор EF1α [Invitrogen]. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой промотор P2. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой промотор куриного β-актина (CBA). В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой два промотора CBA. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой два промотора CBA, разделенных энхансером CMV. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой промотор CAG.

Индуцибельные промоторы позволяют осуществлять регуляцию экспрессии генов, и их можно регулировать с помощью экзогенно поставляемых соединений, факторов окружающей среды, таких как температура, или наличия специфического физиологического состояния, *например*, острой фазы, конкретного состояния дифференцировки клетки или только в реплицирующихся клетках. Индуцибельные промоторы и индуцибельные системы доступны из множества коммерческих источников, включая, помимо прочего, компании Invitrogen, Clontech и Ariad. Описаны многие другие системы, которые может легко выбрать специалист в данной области техники. Примеры индуцируемых промоторов, регулируемых экзогенно поставляемыми промоторами, включают индуцируемый цинком промотор овечьего металлотионина (MT), промотор дексаметазон (Dex)-индуцируемого вируса опухоли молочной железы мыши (MMTV), промоторную систему полимеразы T7 (WO 98/10088); промотор экдизона насекомых (No et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:3346-3351 (1996)), тетрациклин-репрессируемую систему (Gossen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5547-5551 (1992)), тетрациклин-индуцируемую систему (Gossen et al., Science, 268: 1766-1769 (1995), см. также Harvey et al. Curr. Opin. Chem. Biol., 2:512-518 (1998)) RU486-индуцируемую систему (Wang et al., Nat. Biotech., 15:239-243 (1997) и Wang et al. Gene Ther., 4:432-441 (1997)), а также рапамицин-индуцируемую систему (Magari et al., J. Clin. Invest., 100:2865-2872 (1997)). Другими типами индуцибельных промоторов, которые могут применяться в настоящем контексте, являются те, которые регулируются с помощью специфического физиологического состояния, *например*, температуры, острой фазы, конкретного состояния дифференцировки клетки или только в реплицирующихся клетках.

В другом варианте осуществления для трансгена будет применяться нативный промотор. Нативный промотор может быть предпочтительным, когда желательно, чтобы экспрессия трансгена имитировала нативную экспрессию. Нативный промотор можно применять, когда экспрессия трансгена должна регулироваться во времени или в процессе развития, или тканеспецифическим образом, или в ответ на специфические транскрипционные стимулы. В дополнительном варианте осуществления данного изобретения другие элементы контроля нативной экспрессии, такие как элементы энхансера, сайты полиаденилирования или консенсусные последовательности Kozak, также могут применяться для имитации нативной экспрессии.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения регуляторные последовательности придают тканеспецифичную экспрессию генов. В некоторых случаях тканеспецифичные регуляторные последовательности связывают тканеспецифичные транскрипционные факторы, которые индуцируют транскрипцию тканеспецифичным образом. Такие тканеспецифические регуляторные последовательности (*например*, промоторы, энхансеры и т.д.) хорошо известны в данной области техники. Типичные тканеспецифичные регуляторные последовательности включают, но не ограничиваются ими, следующие тканеспецифические промоторы: печеночно-специфичный промотор тироксинсвязывающего глобулина (TBG), инсулиновый промотор, промотор глюкагона, промотор соматостатина, промотор панкреатического полипептида (PPY), промотор синапсина-1 (Syn), промотор креатинкиназы (MCK), промотор десмина (DES) млекопитающего, промотор тяжелой цепи α-миозина (α-MHC) или промотор сердечного тропонина T (cTnT). Другие типичные промоторы включают бета-актиновый промотор, основной промотор вируса гепатита B (Sandig et al., Gene Ther. 3:1002-9, (1996)), промотор альфа-фетопротеина (AFP) (Arbuthnot et al., Hum. Gene Ther. 7:1503-14(1996)), промотор остеокальцина костей, (Stein et al., Mol. Biol. Rep. 24:185-96(1997)); промотор сиалопротеина костей (Chen et al., J. Bone Miner. Res., 11:654-64(1996)), промотор CD2 (Hansal et al., J. Immunol., 161:1063-8, 1998); промотор тяжелой цепи иммуноглобулина; промотор α-цепи рецептора T-клеток, нейрональный промотор, такой как промотор нейрон-специфичной енолазы (NSE) (Andersen et al., Cell. Mol. Neurobiol., 13:503-15 (1993)), промотор гена легкой цепи нейрофиламента (Piccioli et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:5611-5 (1991)) и нейрон-специфичный промотор гена vgf (Piccioli et al., Neuron 15:373-84, 1995), среди прочего, которые будут очевидны специалисту в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления трансген, который кодирует слитый белок, содержащий DBD и трансактиватор, функционально связан с промотором. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой конститутивный промотор. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой индуцибельный промотор. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой тканеспецифический промотор. В некоторых вариантах осуществления промотор специфичен для нервной ткани. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой промотор SST или NPY.

Аспекты изобретения относятся к выделенной нуклеиновой кислоте, содержащей более одного промотора (*например*, 2, 3, 4, 5 или более промоторов). Например, в контексте конструкции, содержащей трансген, содержащий первую область, кодирующую белок, и вторую область, кодирующую белок, может быть желательно управлять экспрессией первой области, кодирующей белок, с использованием первой промоторной последовательности (*например*, первой последовательности промотора, функционально связанной с областью, кодирующей белок), и управлять экспрессией второй области, кодирующей белок, с помощью второй промоторной последовательности (*например*, второй последовательности промотора, функционально связанной с второй областью, кодирующей белок). Обычно первая промоторная последовательность и вторая промоторная последовательность могут быть одной и той же промоторной последовательностью или разными промоторными последовательностями. В некоторых вариантах осуществления первая промоторная последовательность (*например*, промотор, управляющий экспрессией области, кодирующей белок) представляет собой промоторную последовательность РНК-полимеразы III (pol III). Неограничивающие примеры промоторных последовательностей pol III включают промоторные последовательности U6 и H1. В некоторых вариантах осуществления вторая промоторная последовательность (*например*, промотор, управляющий экспрессией второго белка) представляет собой

промоторную последовательность РНК-полимеразы II (pol II). Неограничивающие примеры промоторных последовательностей pol II включают промоторные последовательности T7, T3, SP6, RSV и цитомегаловируса. В некоторых вариантах осуществления промоторная последовательность pol III управляет экспрессией первой области, кодирующей белок. В некоторых вариантах осуществления промоторная последовательность pol II управляет экспрессией второй области, кодирующей белок.

Рекомбинантные аденоассоциированные вирусы (rAAV)

В некоторых аспектах в изобретении предложены выделенные аденоассоциированные вирусы (AAV). Используемый в данном документе в отношении AAV термин «выделенный» относится к AAV, который был искусственно продуцирован или получен. Выделенные AAV могут быть получены с использованием рекомбинантных способов. Такие AAV в данном документе называются «рекомбинантными AAV». Рекомбинантные AAV (rAAV) предпочтительно обладают тканеспецифичными способностями нацеливания, так что нуклеаза и/или трансген rAAV будут доставляться специфически в одну или более заранее определенных тканей. Капсид AAV является важным элементом в определении этих тканеспецифичных способностей нацеливания. Таким образом, может быть выбран rAAV, имеющий капсид, подходящий для ткани-мишени.

Способы получения рекомбинантных AAV, содержащих желаемый капсидный белок, хорошо известны в данной области (см., например, US 2003/0138772), содержание которого полностью включено в данный документ посредством ссылки). Обычно способы включают культивирование клетки-хозяина, которая содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок капсида AAV; функциональный ген rep; рекомбинантный вектор AAV, состоящий из инвертированных концевых повторов (ITR) AAV и трансгена; и достаточное количество хелперных функциональных элементов, позволяющих упаковывать рекомбинантный вектор AAV в капсидные белки AAV. В некоторых вариантах осуществления белки капсида представляют собой структурные белки, кодируемые геном кэпа AAV. AAV содержат три капсидных белка, белки вириона с 1 по 3 (названные VP1, VP2 и VP3), все из которых транскрибируются из одного гена кэпа посредством альтернативного сплайсинга. В некоторых вариантах осуществления молекулярные массы VP1, VP2 и VP3 составляют соответственно около 87 кДа, около 72 кДа и около 62 кДа. В некоторых вариантах осуществления при трансляции капсидные белки образуют сферическую 60-членную белковую оболочку вокруг вирусного генома. В некоторых вариантах осуществления функции белков капсида состоят в защите вирусного генома, доставке генома и взаимодействии с хозяином. В некоторых аспектах белки капсида доставляют вирусный геном хозяину тканеспецифичным образом.

В некоторых вариантах осуществления капсидный белок AAV имеет серотип AAV, выбранный из группы, состоящей из AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAV9, AAV10, AAVrh10 и AAV.PHP.B. В некоторых вариантах осуществления капсидный белок AAV имеет серотип, полученный от примата, кроме человека, например, серотип AAVrh8. В некоторых вариантах осуществления капсидный белок AAV имеет серотип, полученный для широкой и эффективной трансдукции ЦНС, например, AAV.PHP.B. В некоторых вариантах осуществления белок капсида относится к серотипу 9 AAV.

Компоненты, которые должны культивироваться в клетке-хозяине для упаковки вектора rAAV в капсид AAV, могут быть доставлены в клетку-хозяина с помощью трансгена. В качестве альтернативы, любой один или более требуемых компонентов (*например*, рекомбинантный вектор AAV,

последовательности *rep* , последовательности *cap* и/или хелперные функциональные элементы) могут быть обеспечены стабильной клеткой-хозяином, которая была сконструирована так, чтобы содержать один или более требуемых компонентов, с использованием методов, известных специалистам в данной области. Наиболее подходяще, такая стабильная клетка-хозяин будет содержать требуемый компонент (-ы) под контролем индуцибельного промотора. Однако требуемый компонент (ы) может находиться под контролем конститутивного промотора. Примеры подходящих индуцибельных и конститутивных промоторов представлены в данном документе при обсуждении регуляторных элементов, подходящих для использования с трансгеном. В качестве еще одной альтернативы выбранная стабильная клетка-хозяин может содержать выбранный компонент (-ы) под контролем конститутивного промотора и другой выбранный компонент (-ы) под контролем одного или более индуцибельных промоторов. Например, может быть получена стабильная клетка-хозяин, которая происходит из 293 клеток (которые содержат хелперные функциональные элементы E1 под контролем конститутивного промотора), но которые содержат белки rep и/или кэпа под контролем индуцибельных промоторов. Еще другие стабильные клетки-хозяева могут быть созданы специалистом в данной области.

В некоторых вариантах осуществления данное изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей нуклеиновую кислоту, которая содержит кодирующую последовательность, кодирующую трансген (*например*, ДНК-связывающий домен, слитый с доменом регулятора транскрипции). В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего, дрожжевую клетку, бактериальную клетку, клетку насекомого, растительную клетку или клетку гриба.

Рекомбинантный вектор AAV, последовательности rep, последовательности кэпа и хелперные функциональные элементы, необходимые для продуцирования rAAV по данному описанию, могут быть доставлены в упаковывающую клетку-хозяин с использованием любого подходящего генетического элемента (вектора). Выбранный генетический элемент может быть доставлен любым подходящим способом, включая описанные в данном документе. Способы, используемые для конструирования любого варианта из данного описания, известны специалистам в области манипуляций с нуклеиновыми кислотами и включают генную инженерию, рекомбинантную инженерию и синтетические методы. См., *например*, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. Точно так же хорошо известны способы получения вирионов rAAV, и выбор подходящего способа не является ограничением данного изобретения. See, *e.g.*, K. Fisher et al., J. Virol., 70:520-532 (1993) и патент США № 5,478,745.

В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные AAV могут быть получены с использованием способа тройной трансфекции (подробно описанного в патенте США № 6001650). Обычно рекомбинантные AAV получают путем трансфекции клетки-хозяина вектором AAV (содержащим трансген, фланкированный элементами ITR) для упаковки в частицы AAV, хелперный функциональный вектор AAV и вспомогательный функциональный вектор. Хелперный функциональный вектор AAV кодирует последовательности «хелперного функционального AAV» (*например*, *rep* и *cap*), которые функционируют в транс-положении для продуктивной репликации и инкапсулирования AAV. Предпочтительно, хелперный функциональный вектор AAV поддерживает эффективное продуцирование вектора AAV без образования каких-либо детектируемых вирионов AAV дикого типа (*например*, вирионов AAV, содержащих функциональные гены rep и cap). Неограничивающие примеры векторов, подходящих для использования с данным изобретением, включают pHLP19, описанный в патенте США № 6001650 и вектор pRep6cap6,

описанный в патенте США № № 6156303, причем оба документа включены в данный документ посредством ссылки. Вспомогательный функциональный вектор кодирует нуклеотидные последовательности для вирусных и/или клеточных функций, не являющихся производными AAV, от которых зависит репликация AAV (*например*, «вспомогательные функции»). Вспомогательные функции включают те функции, которые необходимы для репликации AAV, включая, без ограничения, те части, которые участвуют в активации транскрипции гена AAV, стадийно-специфическом сплайсинге мРНК AAV, репликации ДНК AAV, синтезе продуктов экспрессии кэпа и сборке капсида AAV. Вспомогательные функции на основе вирусов могут быть получены из любого из известных вспомогательных вирусов, таких как аденовирус, вирус герпеса (кроме вируса простого герпеса типа 1) и вирус осповакцины.

В некоторых аспектах изобретение относится к трансфицированным клеткам-хозяевам. Термин «трансфекция» используется для обозначения поглощения чужеродной ДНК клеткой, и клетка «трансфицирована», когда экзогенная ДНК введена внутрь клеточной мембраны. Ряд методов трансфекции обычно известен в данной области техники. См., *например*, Graham et al. (1973) Virology, 52:456, Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning, a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratories, New York, Davis et al. (1986) Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier, and Chu et al. (1981) Gene 13:197. Такие методики можно использовать для введения одной или более экзогенных нуклеиновых кислот, таких как вектор интеграции нуклеотидов и других молекул нуклеиновых кислот, в подходящие клетки-хозяева.

Термин «клетка-хозяин» относится к любой клетке, которая содержит или способна нести интересующее вещество. Часто клеткой-хозяином является клетка млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой нейрон, необязательно ГАМКергический нейрон. В контексте данного документа «ГАМКергический нейрон» представляет собой нервную клетку, которая вырабатывает гамма-аминомасляную кислоту (ГАМК). У млекопитающих ГАМК представляет собой нейромедиатор, широко распространенный в нервной системе, который связывает и подавляет нейроны, которые он связывает. Таким образом, ГАМК участвует в многочисленных расстройствах нервной системы, включая эпилепсию, аутизм и тревогу. Исследования на гемизиготе по *SCN1A* и мышах с нокаутом этого гена выявили значительный дефицит тока натрия в ГАМКергических нейронах головного мозга. Клетка-хозяин может использоваться в качестве реципиента вспомогательной конструкции AAV, минигенной плазмиды AAV, хелперного функционального вектора или другого ДНК-переносчика, связанного с продуцированием рекомбинантных AAV. Термин включает потомство исходной клетки, которая была трансфицирована. Таким образом, используемый в данном документе термин «клетка-хозяин» может относиться к клетке, которая была трансфицирована экзогенной последовательностью ДНК. Понятно, что потомство одной родительской клетки не обязательно может быть полностью идентичным по морфологии или по комплементарной последовательности геномной или общей ДНК с исходной родительской клеткой вследствие природных, случайных или умышленных мутаций.

Используемый в данном документе термин «клеточная линия» относится к популяции клеток, способных к непрерывному или продолжительному росту и делению in vitro. Часто клеточные линии представляют собой клональные популяции, полученные из одной клетки-предшественника. Кроме того, в данной области известно, что спонтанные или индуцированные изменения могут происходить в кариотипе во время хранения или переноса таких клональных популяций. Следовательно, клетки, полученные из

указанной клеточной линии, могут не быть в точности идентичными предковым клеткам или культурам, и указанная клеточная линия включает такие варианты.

Используемый в данном документе термин «рекомбинантная клетка» относится к клетке, в которую был введен экзогенный сегмент ДНК, такой как сегмент ДНК, который приводит к транскрипции биологически активного полипептида или продукции биологически активной нуклеиновой кислоты, такой как РНК.

Используемый в данном документе термин «вектор» включает любой генетический элемент, такой как плазмида, фаг, транспозон, космида, хромосома, искусственная хромосома, вирус, вирион и т. д., который способен к репликации, когда он связан с соответствующими регуляторными элементами и который может переносить последовательности генов между клетками. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой вирусный вектор, такой как вектор rAAV, лентивирусный вектор, аденовирусный вектор, ретровирусный вектор и т.д. Таким образом, термин включает носители для клонирования и экспрессии, а также вирусные векторы. В некоторых вариантах осуществления подходящими векторами считаются те векторы, в которых транскрибируемый сегмент нуклеиновой кислоты расположен под транскрипционным контролем промотора.

Термин «промотор» относится к последовательности ДНК, распознаваемой синтетическим аппаратом клетки, или введенному синтетическому аппарату, необходимому для инициации специфической транскрипции гена. Фразы «функционально связанный», «функционально расположенный», «под контролем» или «под контролем транскрипции» означают, что промотор находится в правильном положении и ориентации по отношению к нуклеиновой кислоте, чтобы контролировать инициацию РНК-полимеразы и экспрессию гена. Термин «экспрессирующий вектор или конструкция» означает любой тип генетической конструкции, содержащей нуклеиновую кислоту, в которой часть или вся последовательность, кодирующая нуклеиновую кислоту, способна транскрибироваться. В некоторых вариантах осуществления экспрессия включает транскрипцию нуклеиновой кислоты, например, для получения биологически активного полипептидного продукта из транскрибированного гена. Вышеупомянутые способы упаковки рекомбинантных векторов в желаемые капсиды AAV для получения rAAV по данному описанию не предназначены для ограничения, и другие подходящие способы будут очевидны специалисту в данной области техники.

Способы регуляции экспрессии гена-мишени

В описании предложены способы регуляции экспрессии генов в клетке или субъекте. Способы обычно включают введение клетке или субъекту выделенной нуклеиновой кислоты или rAAV, содержащих трансген, который кодирует слитый белок, содержащий ДНК-связывающий домен (*например*, домен ZFP) и домен трансактивации. В некоторых вариант осуществления слитый белок содержит ZFP и трансактиватор VP64. В некоторых вариант осуществления слитый белок содержит ZFP и трансактиватор p65. В некоторых вариант осуществления слитый белок содержит ZFP и трансактиватор RTA. В некоторых вариант осуществления слитый белок содержит ZFP и трансактиватор VPR. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение клетке или субъекту белка dCas9 и по меньшей мере одной направляющей нуклеиновой кислоты, которая нацелена на *SCN1A* (*например*, направляющей нуклеиновой кислоты, содержащей любую из SEQ ID NO: 83-94 или кодируемую любой из SEQ ID NO: 83- 94).

Введение выделенной нуклеиновой кислоты или rAAV, кодирующих слитый белок (*например*, слитый белок, содержащий трансактиватор), в клетку или субъекту, в некоторых вариантах осуществления, приводит к повышенной экспрессии гена-мишени (*например*, *SCN1A*). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления композиции и способы, описанные в изобретении, пригодны для лечения состояний, возникающих в результате гаплонедостаточности гена-мишени, таких как синдром Драве, который возникает в результате гаплонедостаточности гена *SCN1A*.

Используемый в данном документе термин «гаплонедостаточность» относится к генетическому состоянию, при котором одна копия гена (*например, SCN1A*) инактивирована, *например*, в результате генетической мутации или делеции, а оставшаяся функциональная копия гена недостаточна для производства количества генного продукта, достаточного для сохранения нормальной функции гена.

Синдром Драве, также известный как тяжелая миоклоническая эпилепсия младенчества, представляет собой редкую пожизненную форму эпилепсии, которая обычно проявляется в первые три года жизни. Синдром Драве характеризуется продолжительными и частыми припадками, задержками в поведении и развитии, проблемами с движением и балансом, задержкой речевого развития и проблемами с речью, а также нарушениями вегетативной нервной системы. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет гаплонедостаточность, связанную с синдромом Драве, такую как мутация одной копии гена *SCN1A*, что приводит к снижению уровня белка SCN1A в клетке или субъекте. Большинство пациентов с синдромом Драве имеют мутации *SCN1A*, которые транслируются в усеченные белки; другие мутации *SCN1A*, связанные с синдромом Драве, включают мутации сайтов сплайсинга и миссенс-мутации, а также мутации, случайно распределенные по всему гену *SCN1A*. В некоторых вариантах осуществления слитый белок по данному описанию содержит домен ZFP, который специфически нацелен (*например*, связывается с) геном *SCN1A* и доменом трансактивации. В некоторых вариантах реализации композиция для нацеливания на *SCNA1* содержит (i) слитый белок, содержащий белок dCas и домен трансактивации, и (ii) направляющую нуклеиновую кислоту (*например*, нРНК), которая специфически нацелена на (*например*, связывается с) ген *SCN1A*.

В некоторых вариантах осуществления субъект имеет гаплонедостаточность, связанную с синдромом гаплонедостаточности MED13L, при этом субъект имеет только одну функциональную копию гена *MED13L*. Субъекты, страдающие синдромом гаплонедостаточности MED13L, обычно имеют мутацию во второй, нефункциональной копии гена *MED13L*. Синдром гаплонедостаточности MED13L характеризуется умственной отсталостью, проблемами речью, характерными чертами лица и задержкой в развитии. В некоторых вариантах осуществления слитый белок по данному описанию содержит домен ZFP, который специфически нацелен (*например*, связывается с) геном *MED13L* и доменом трансактивации. В некоторых вариантах реализации композиция для нацеливания на *MED13L* содержит (i) слитый белок, содержащий белок dCas и домен трансактивации, и (ii) направляющую нуклеиновую кислоту (*например*, нРНК), которая специфически нацелена на (*например*, связывается с) ген *MED13L*.

В некоторых вариантах осуществления субъект имеет гаплонедостаточность, связанную с миелодиспластическими синдромами. Субъекты, страдающие миелодиспластическим синдромом, обычно имеют мутацию в одной копии генов изоцитратдегидрогеназы 1 *(IDH1)*, изоцитратдегидрогеназы 2 *(IDH2)* и/или *GATA2*. Миелодиспластический синдром — это группа раковых заболеваний, при которых незрелые клетки крови в костном мозге не созревают в здоровые клетки крови. Иногда этот синдром может привести к острому миелоидному лейкозу. В некоторых вариантах осуществления слитый белок по данному

описанию содержит домен ZFP, который специфически нацелен (*например*, связывается с) геном *IDH1* и доменом трансактивации. В некоторых вариантах реализации композиция для нацеливания на *IDH1* содержит (i) слитый белок, содержащий белок dCas и домен трансактивации, и (ii) направляющую нуклеиновую кислоту (*например*, нРНК), которая специфически нацелена на (*например*, связывается с) ген *IDH1*. В некоторых вариантах осуществления слитый белок по данному описанию содержит домен ZFP, который специфически нацелен (*например*, связывается с) геном *IDH2* и доменом трансактивации. В некоторых вариантах реализации композиция для нацеливания на *IDH2* содержит (i) слитый белок, содержащий белок dCas и домен трансактивации, и (ii) направляющую нуклеиновую кислоту (*например*, нРНК), которая специфически нацелена на (*например*, связывается с) ген *IDH2*. В некоторых вариантах осуществления слитый белок по данному описанию содержит домен ZFP, который специфически нацелен (*например*, связывается с) геном *GATA2* и доменом трансактивации. В некоторых вариантах реализации композиция для нацеливания на *GATA2* содержит (i) слитый белок, содержащий белок dCas и домен трансактивации, и (ii) направляющую нуклеиновую кислоту (*например*, нРНК), которая специфически нацелена на (*например*, связывается с) ген *GATA2*.

В некоторых вариантах осуществления субъект имеет гаплонедостаточность, связанную с синдромом Ди Джорджи. Субъекты, страдающие синдромом Ди Джорджи, обычно имеют делецию от 30 до 40 генов в середине 22 хромосомы в месте, известном как 22q11.2. В частности, заболевание может характеризоваться гаплонедостаточностью гена *TBX*. Синдром Ди Джорджи характеризуется врожденными проблемами сердца, особенностями лица, частыми инфекциями, задержкой в развитии, проблемами с обучением и волчьей пастью. В некоторых вариантах осуществления слитый белок по данному описанию содержит домен ZFP, который специфически нацелен (*например*, связывается с) геном *TBX* и доменом трансактивации. В некоторых вариантах реализации композиция для нацеливания на *TBX* содержит (i) слитый белок, содержащий белок dCas и домен трансактивации, и (ii) направляющую нуклеиновую кислоту (*например*, нРНК), которая специфически нацелена на (*например*, связывается с) ген *TBX*.

В некоторых вариантах осуществления субъект имеет гаплонедостаточность, связанную с синдромом CHARGE. В большинстве случаев субъекты, страдающие синдромом CHARGE, гаплонедостаточны по гену *CHD7*. Синдром CHARGE характеризуется колобомой глаза, пороками сердца, атрезией носовых хоан, задержкой роста и/или развития, аномалиями гениталий и/или мочеиспускания, а также аномалиями ушей и глухотой. В некоторых вариантах осуществления слитый белок по данному описанию содержит домен ZFP, который специфически нацелен (*например*, связывается с) геном *CHD7* и доменом трансактивации. В некоторых вариантах реализации композиция для нацеливания на *CHD7* содержит (i) слитый белок, содержащий белок dCas и домен трансактивации, и (ii) направляющую нуклеиновую кислоту (*например*, нРНК), которая специфически нацелена на (*например*, связывается с) ген *CHD7*.

В некоторых вариантах осуществления субъект имеет гаплонедостаточность, связанную с синдромом Элерса-Данлоса. Субъекты, страдающие синдромом Элерса-Данлоса, могут быть гаплонедостаточными по генах *COL1A1, COL1A2, COL3A1, COL5A1, COL5A2, TNXB, ADAMTS2, PLOD1, B4GALT7, DSE* и/или *D4ST1/CHST14*. Синдром Элерса-Данлоса характеризуется гиперэластичностью кожи и может приводить к расслоению аорты, сколиозу и раннему остеоартриту. В некоторых вариантах осуществления слитый белок по данному описанию содержит домен ZFP, который специфически нацелен на (*например*, связывается с) любой из генов *COL1A1, COL1A2, COL3A1, COL5A1, COL5A2, TNXB,*

ADAMTS2, PLOD1, B4GALT7, DSE или *D4ST1/CHST14* и домена трансактивации. В некоторых вариантах осуществления композиция для нацеливания на любой из генов *COL1A1, COL1A2, COL3A1, COL5A1, COL5A2, TNXB, ADAMTS2, PLOD1, B4GALT7, DSE* или *D4ST1/CHST14* содержит (i) слитый белок, содержащий белок dCas и домен трансактивации, и (ii) направляющую нуклеиновую кислоту (*например*, нРНК), которая специфически нацеливается на (*например*, связывается с) любой из генов *COL1A1, COL1A2, COL3A1, COL5A1, COL5A2, TNXB, ADAMTS2, PLOD1, B4GALT7, DSE* или *D4ST1 / CHST14*.

В некоторых вариантах осуществления субъект имеет гаплонедостаточность, связанную с лобно-височной деменцией (ЛВД). Субъекты, страдающие ЛВД, гаплонедостаточны по гену *MAPT*, который кодирует тау-белок , и/или по гену *GRN*. ЛВД характеризуется потерей памяти, недостатком социальной осведомленности, плохим контролем над импульсами и трудностями в речи. В некоторых вариантах осуществления слитый белок по данному описанию содержит домен ZFP, который специфически нацелен (*например*, связывается с) геном *MAPT* и доменом трансактивации. В некоторых вариантах реализации композиция для нацеливания на *MAPT* содержит (i) слитый белок, содержащий белок dCas и домен трансактивации, и (ii) направляющую нуклеиновую кислоту (*например*, нРНК), которая специфически нацелена на (*например*, связывается с) ген *MAPT*. В некоторых вариантах осуществления слитый белок по данному описанию содержит домен ZFP, который специфически нацелен (*например*, связывается с) геном *GRN* и доменом трансактивации. В некоторых вариантах реализации композиция для нацеливания на *GRN* содержит (i) слитый белок, содержащий белок dCas и домен трансактивации, и (ii) направляющую нуклеиновую кислоту (*например*, нРНК), которая специфически нацелена на (*например*, связывается с) ген *GRN*.

В некоторых вариантах осуществления субъект имеет гаплонедостаточность, связанную с синдромом Холта-Орама. В большинстве случаев страдающие синдромом Холта-Орама, гаплонедостаточны по гену *TBX5*. Синдром Холта-Орама характеризуется сердечными осложнениями, включая врожденные пороки сердца и нарушение сердечной проводимости. В некоторых вариантах осуществления слитый белок по данному описанию содержит домен ZFP, который специфически нацелен (*например*, связывается с) геном *TBX5* и доменом трансактивации. В некоторых вариантах реализации композиция для нацеливания на *TBX5* содержит (i) слитый белок, содержащий белок dCas и домен трансактивации, и (ii) направляющую нуклеиновую кислоту (*например*, нРНК), которая специфически нацелена на (*например*, связывается с) ген *TBX5*.

В некоторых вариантах осуществления субъект имеет гаплонедостаточность, связанную с синдромом Марфана. Субъекты, страдающие синдромом Марфана, обычно гаплонедостаточны по гену *FBN1*, кодирующего белок фибриллин-1. Синдром Марфана характеризуется непропорциональной длиной конечностей, ранним началом артрита, сердечными осложнениями и/или дисфункцией вегетативной нервной системы. В некоторых вариантах осуществления слитый белок по данному описанию содержит домен ZFP, который специфически нацелен (*например*, связывается с) геном *FBN1* и доменом трансактивации. В некоторых вариантах реализации композиция для нацеливания на *FBN1* содержит (i) слитый белок, содержащий белок dCas и домен трансактивации, и (ii) направляющую нуклеиновую кислоту (*например*, нРНК), которая специфически нацелена на (*например*, связывается с) ген *FBN1*.

Изобретение частично основано на способах введения субъекту слитого белка, как описано в данном документе. В некоторых вариант осуществления слитый белок содержит a DBD и активатор транскрипции. В некоторых вариантах осуществления DBD представляет собой ZNF, TALE, белок dCas

(*например*, dCas9 или dCas12a) или гомеодомен, которые связываются с геном *SCN1A*. В некоторых вариантах осуществления активатор транскрипции представляет собой VP64, p65, RTA или трехчастный активатор транскрипции, содержащий VP64-p65-RTA (VPR). В некоторых вариантах осуществления слитый белок фланкирован последовательностями инвертированного концевого повтора (ITR) AAV. В некоторых вариантах осуществления слитый белок функционально связан с промотором. В некоторых вариантах осуществления у субъекта есть или подозреваются мутации в *SCN1A*, которые приводят к гаплонедостаточности белка SCN1A. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет у него подозревается наличие синдрома Драве.

В некоторых аспектах в изобретении предложены способы модуляции (*например*, увеличения, уменьшения и *т.д.*) экспрессии гена-мишени в клетке. В некоторых аспектах в изобретении предложены способы увеличения экспрессии гена-мишени (*например*, SCN1A) в клетке. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления клетка находится в субъекте (*например*, *in vivo*). В некоторых вариантах осуществления субъектом является млекопитающее, например человек. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку нервной системы (клетку центральной нервной системы или клетку периферической нервной системы), например, нейроны (*например*, ГАМКергические нейроны, униполярные нейроны, биполярные нейроны, тельца Боткина -Гумпрехта, клетки Бетца, клетки Лугаро, шиповатые нейроны, клетки Пуркинье, пиримидные клетки, клетки Реншо, гранулярные клетки, двигательные нейроны, веретеновидные клетки и *т. д.*) или глиальные клетки (*например*, астроциты, олигодендроциты, эпендимные клетки, радиальная глия, шванновские клетки, сателлитные клетки и *т. д.*).

В «нормальной» клетке или субъекте экспрессия гена-мишени (*например*, SCN1A) является достаточной, так что клетка или субъект не являются гаплонедостаточными по отношению к гену-мишени (*например*, SCN1A). В некоторых вариантах осуществления «улучшенная» или «повышенная» экспрессия или активность трансгена измеряется относительно экспрессии или активности этого трансгена в клетке или субъекте, которому не вводили одну или более выделенных нуклеиновых кислот, rAAV или композиций, как описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления «улучшенная» или «повышенная» экспрессия или активность трансгена измеряется относительно экспрессии или активности этого трансгена у субъекта после введения субъекту (*например*, экспрессия гена измеряется до и после введения) одной или более выделенных нуклеиновых кислот, rAAV или композиций, как описано в данном документе. Например, в некоторых вариантах осуществления «улучшенная» или «повышенная» экспрессия *SCN1A* в клетке или субъекте измеряется относительно клетки или субъекта, которым не вводили трансген, кодирующий слитый белок ZFP-трансактиватор. В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в изобретении, приводят к экспрессии и/или активности SCN1A у субъекта, которые увеличиваются от 2 до 100 раз (*например*, в 2, 5, 10, 50, 100 раз и *т.д.*) относительно экспрессии и/или активности SCN1A у субъекта, которому не вводили одну или более композиций, описанных в изобретении

Используемые в данном документе термины «лечение» и «терапия» относятся к терапевтическому лечению и профилактическим или превентивным манипуляциям. Термины дополнительно включают облегчение существующих симптомов, предотвращение дополнительных симптомов, облегчение или предотвращение основных причин симптомов, предотвращение или устранение причин симптомов, например, симптомов, связанных с гаплонедостаточным геном, *например*, гаплонедостаточным геном SCN1A. Таким образом, термины обозначают, что положительный результат был получен у субъекта с

расстройством (*например*, заболеванием или состоянием, связанным с гаплонедостаточным геном, *например*, синдромом Драве) или с возможностью развития такого расстройства. Кроме того, термин «лечение» также включает применение или введение агента (*например*, терапевтического агента или терапевтической композиции, *например*, выделенной нуклеиновой кислоты или rAAV, которая нацелена или связывается с целевым геном или регуляторной областью целевого гена) субъекту или выделенную ткань или клеточную линию субъекта, у которого может быть заболевание, симптом заболевания или предрасположенность к заболеванию, с целью вылечить, лечить, смягчить, облегчить, изменять, устранять, улучшать или влиять на заболевание, симптомы заболевания или предрасположенность к заболеванию.

Терапевтические агенты или терапевтические композиции могут включать соединение в фармацевтически приемлемой форме, которое предотвращает и/или уменьшает симптомы конкретного заболевания (*например*, заболевания или состояния, связанного с гаплонедостаточным геном, *например*, синдром Драве). Например, терапевтическая композиция может быть фармацевтической композицией, которая предотвращает и/или уменьшает симптомы конкретного заболевания или состояния, связанного с гаплонедостаточным геном, *например*, синдром Драве. Подразумевается, что терапевтическая композиция по данному изобретению будет предложена в любой подходящей форме. Форма терапевтической композиции будет зависеть от ряда факторов, включая способ введения, как описано в данном документе. Терапевтическая композиция может содержать разбавители, адъюванты и вспомогательные вещества, среди других ингредиентов, как описано в данном документе.

Способы применения

Выделенные нуклеиновые кислоты, rAAV и композиции по данному описанию могут быть доставлены субъекту в композициях в соответствии с любыми подходящими способами, известными в данной области. Например, rAAV, предпочтительно суспендированный в физиологически совместимом носителе (*например*, в композиции), можно вводить субъекту, то есть животному-хозяину, такому как человек, мышь, крыса, кошка, собака, овца, кролик, лошадь, корова, коза, свинья, морская свинка, хомяк, курица, индейка или примат, не являющийся человеком (*например*, макака). В некоторых вариантах осуществления животное-хозяин не включает человека.

Доставка rAAV субъекту-млекопитающему может быть, например, путем внутримышечной инъекцией или введением в кровоток субъекта-млекопитающего. Введение в кровоток может осуществляться путем инъекции в вену, артерию или любой другой сосуд. В некоторых вариантах осуществления rAAV вводят в кровоток посредством изолированной перфузии конечности, методики, хорошо известной в хирургии, способ, по существу, позволяющий специалисту изолировать конечность из большого круга кровообращения перед введением вирионов rAAV. Вариант способа изолированной перфузии конечности, описанный в патентах США № 6177403, также может быть использован специалистом в данной области техники для введения вирионов в сосудистую сеть изолированной конечности для потенциального усиления трансдукции в мышечные клетки или ткань. Более того, в некоторых случаях может быть желательно доставить вирионы в ЦНС субъекта. Под «ЦНС» подразумеваются все клетки и ткани головного и спинного мозга позвоночного животного. Таким образом, термин включает, без ограничения, нейроны, глиальные клетки, астроциты, спинномозговую жидкость (СМЖ), интерстициальные пространства, кости, хрящи и т.п. Рекомбинантные AAV могут быть доставлены

непосредственно в ЦНС или мозг путем инъекции, *например*, в область желудочков, а также в полосатое тело (*например*, хвостатое ядро или скорлупу полосатого тела), таламус, спинной мозг и нервно-мышечное соединение или дольку мозжечка с помощью иглы, катетера или аналогичного устройства с использованием нейрохирургических способов известных в данной области, таких как стереотаксическая инъекция (см., *например*, Stein et al., J Virol 73:3424-3429, 1999; Davidson et al., PNAS 97:3428-3432, 2000; Davidson et al., Nat. Genet. 3:219-223, 1993; и Alisky and Davidson, Hum. Gene Ther. 11:2315-2329, 2000). В некоторых вариантах осуществления rAAV, как описано в изобретении, вводят посредством внутривенной инъекции. В некоторых вариантах осуществления rAAV вводят посредством интрацеребральной инъекции. В некоторых вариантах осуществления rAAV вводят посредством интратекальной инъекции. В некоторых вариантах осуществления rAAV вводят посредством интрастриатальной инъекции. В некоторых вариантах осуществления rAAV вводят посредством внутричерепной инъекции. В некоторых вариантах осуществления rAAV вводят посредством инъекции в мозжечково-мозговую цистерну. В некоторых вариантах осуществления rAAV вводят посредством инъекции в боковой желудочек головного мозга.

Аспекты данного изобретения относятся к композициям, содержащим рекомбинантный AAV, содержащий белок капсида и нуклеиновую кислоту, кодирующую трансген, где трансген включает последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую один или более белков. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота дополнительно содержит ITR AAV. В некоторых вариантах реализации, композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель.

Композиции по данному описанию могут содержать только rAAV или в комбинации с одним или более вирусами (*например*, второй кодирующий rAAV, имеющий один или более различных трансгенов). В некоторых вариантах осуществления композиция содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более различных rAAV, каждый из которых имеет один или более различных трансгенов.

Подходящие носители могут быть легко выбраны специалистом в данной области с учетом показания, для которого предназначен rAAV. Например, один подходящий носитель включает физиологический раствор, который может быть приготовлен с различными буферными растворами (*например*, натрий-фосфатным буфером). Другие типичные носители включают в себя стерильный физиологический раствор, лактозу, сахарозу, фосфат кальция, желатин, декстран, агар, пектин, арахисовое масло, кунжутное масло и воду. Выбор носителя не является ограничением данного изобретения.

Необязательно, композиция по данному изобретению может содержать, помимо rAAV и носителя(-ей), другие традиционные фармацевтические ингредиенты, такие как консерванты или химические стабилизаторы. К подходящим примерам консервантов относятся хлорбутанол, сорбат калия, сорбиновая кислота, диоксид серы, пропилгаллат, парабены, этилванилин, глицерин, фенол, парахлорфенол и полоксамеры (неионные поверхностно-активные вещества), такие как Pluronic® F-68. К подходящим химическим стабилизаторам относятся желатин и альбумин.

rAAV вводят в количествах, достаточных для трансфекции клеток желаемой ткани и для обеспечения достаточных уровней переноса и экспрессии генов без чрезмерных побочных эффектов. Обычные и их фармацевтически приемлемые способы введения включают, но не ограничиваются ими, прямую доставку до выбранного органа (*например*, интрапортальную доставку в печень), оральный, ингаляционный (включать интраназальную и интратрахеальную доставку), внутриглазной, внутривенный, внутримышечный, подкожный, внутридермальный, внутриопухолевый и другие родственные пути введения. Пути введения при желании можно комбинировать.

Доза вирионов rAAV, необходимая для достижения определенного «терапевтического эффекта», *например*, единицы дозы в копиях генома/на килограмм массы тела (ГК/кг), будет варьироваться в зависимости от нескольких факторов, включая, но не ограничиваясь: путь введения вириона rAAV, уровень экспрессии гена или РНК, необходимый для достижения терапевтического эффекта, конкретное заболевание или нарушение, которое лечат, и стабильность гена или продукта РНК. Специалист в данной области может легко определить диапазон доз вириона rAAV для лечения пациента, страдающего конкретным заболеванием или нарушением, на основе вышеупомянутых факторов, а также других факторов, которые хорошо известны в данной области.

Эффективное количество rAAV — это количество, достаточное для нацеливания на желаемую ткань инфицированого животного. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество rAAV вводят субъекту на предсимптоматической стадии лизосомной болезни накопления. В некоторых вариантах осуществления предсимптоматическая стадия лизосомной болезни накопления происходит между рождением (*например*, перинатальным) и 4-недельным возрастом.

В некоторых вариантах осуществления композиции rAAV составлены для уменьшения агрегации частиц AAV в композиции, особенно в тех случаях, когда присутствуют высокие концентрации rAAV (*например*, ~ 10^{13} ГК/мл или более). Способы уменьшения агрегации rAAV хорошо известны в данной области и включают, например, добавление поверхностно-активных веществ, регулирование pH, регулирование концентрации соли и *т. д.* (См., *например*, Wright FR, et al., Molecular Therapy (2005) 12, 171–178, содержание которого включено в данный документ посредством ссылки.)

Состав фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ и растворов носителей хорошо известен специалистам в данной области, так же как и разработка подходящих режимов дозирования и лечения для использования конкретных композиций, описанных в настоящем документе, в различных схемах лечения.

Как правило, эти составы могут содержать, по меньшей мере, около 0,1% активного соединения или более, хотя процентное содержание активного ингредиента (-ов) может, конечно, варьироваться и обычно может составлять от около1 или 2% до около 70% или 80% или более от веса или объема всей композиции. Естественно, количество активного соединения в каждой терапевтически полезной композиции может быть получено таким образом, чтобы подходящая дозировка была получена в любой - данной стандартной дозе соединения. Такие факторы, как растворимость, биодоступность, биологический период полувыведения, способ введения, срок годности продукта, а также другие фармакологические особенности, будут учтены специалистом в данной области при приготовлении таких фармацевтических составов, и поэтому могут быть желательны различные дозировки и режимы лечения.

При определенных обстоятельствах будет желательно доставлять терапевтические конструкции на основе rAAV в фармацевтических композициях, составленных подходящим образом, описанных в данном документе, подкожно, внутрипанкреатически, интраназально, парентерально, внутривенно, внутримышечно, интратекально или перорально, внутрибрюшинно или путем ингаляции. В некоторых вариантах осуществления способы введения, описанные в патентах США № 5543158; 5641515 и 5399363 (каждый из которых конкретно включен в данный документ посредством ссылки во всей его полноте) могут быть использованы для доставки rAAV. В некоторых вариантах осуществления предпочтительным способом введения является инъекция в воротную вену.

Фармацевтически приемлемые формы, подходящие для инъекционного применения, включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для лекарственных форм немедленного приёма, стерильных инъекционных растворов или дисперсий. Дисперсии также могут быть приготовлены в глицерине, жидких полиэтиленгликолях и их смесях, и в маслах. В обычных условиях хранения и использования эти препараты содержат консервант, предотвращающий рост микроорганизмов. Во многих случаях форма является стерильной и жидкой до такой степени, чтобы ее можно было легко набрать с помощью шприца. Она должна быть стабильной в условиях производства и хранения и должна быть защищена от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибки. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, полиол (*например*, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т. д.), их подходящие смеси и растительные масла. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, путем применения материалов для покрытия, таких как лецитин, путем поддержания необходимого размера частиц в случае дисперсий и путем применения поверхностно-активных веществ. Предотвращение действия микроорганизмов можно достигать с помощью различных антибактериальных и противогрибковых агентов, например парабенов, хлорбутанола, фенола, сорбиновой кислоты, тимеросала и тому подобного. Во многих случаях будет предпочтительно включать изотонические агенты, например сахара или хлорид натрия. Длительное всасывание композиций, вводимых путем инъекции, может быть достигнуто путем использования в композициях агентов, замедляющих всасывание, например моностеарата алюминия и желатина.

Для введения водного раствора для инъекций, например, раствор может быть подходящим образом забуферен , и жидкий разбавитель сначала должен быть доведен до изотонического состояния добавлением достаточного количества физиологического раствора или глюкозы. Такие конкретные водные растворы особенно подходят для внутривенного, внутримышечного, подкожного и внутрибрюшинного введения. В связи с этим специалистам в данной области будет известна стерильная водная среда, которая может быть использована. Например, одна доза может быть растворена в 1 мл изотонического раствора NaCl и либо добавлена к 1000 мл жидкости для гиподермоклиза, либо введена в предлагаемом месте инфузии (см., например, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15th Edition, стр. 1035-1038 и 1570-1580). В зависимости от состояния хозяина дозировка будет определенным образом изменена. Лицо, ответственное за введение, в любом случае будет определять подходящую дозу для каждого хозяина индивидуально.

Стерильные инъекционные растворы готовят путем включения активного rAAV в необходимом количестве в подходящий растворитель с различными другими ингредиентами, перечисленными в данном документе, в соответствии с требованиями и с последующей стерилизацией на фильтрах. Обычно дисперсии готовят путем включения различных стерилизованных активных ингредиентов в стерильный базовый раствор, который содержит основную дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных инъекционных растворов предпочтительными способами приготовления являются технологии вакуумной сушки и сублимационной сушки, которые приводят к получению порошка активного ингредиента плюс любой дополнительный активный ингредиент из его ранее стерильно-профильтрованного раствора.

Композиции rAAV, раскрытые в данном документе, могут также быть составлены в нейтральной или солевой форме. Фармацевтически приемлемые соли включают соли присоединения кислот (образованные со свободными аминогруппами белка) и которые образованы с неорганическими кислотами,

такими как, например, соляная или фосфорная кислоты, или такими органическими кислотами, как уксусная, щавелевая, винная, миндальная и тому подобное. Соли, образованные со свободными карбоксильными группами, также могут быть получены из неорганических оснований, таких как, например, гидроксиды натрия, калия, аммония, кальция или железа, и таких органических оснований, как изопропиламин, триметиламин, гистидин, прокаин и т.п. После приготовления растворы будут вводить способом, совместимым с дозированной композицией, и в таком количестве, которое является терапевтически эффективным. Составы легко вводятся в виде различных лекарственных форм, таких как растворы для инъекций, капсулы для высвобождения лекарственного средства и тому подобное.

Используемый в данном документе термин «носитель» включает в себя любые и все растворители, дисперсионные среды, носители, покрытия, разбавители, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические и замедляющие абсорбцию агенты, буферы, растворы носителей, суспензии, коллоиды и тому подобное. Использование таких сред и агентов для фармацевтически активных веществ хорошо известно в данной области техники. В композиции также могут быть включены дополнительные активные ингредиенты. Фраза «фармацевтически приемлемый» относится к молекулярным веществам и композициям, которые при введении в организм хозяина не вызывают аллергическую или подобную неблагоприятную реакцию.

Носители доставки, такие как липосомы, нанокапсулы, микрочастицы, микросферы, липидные частицы, везикулы и тому подобное, могут быть использованы для введения композиций по данному изобретению в подходящие клетки-хозяева. В частности, трансгены, доставляемые вектором rAAV, могут быть составлены для доставки либо инкапсулированными в липидную частицу, липосому, везикулу, наносферу, либо наночастицу или тому подобное.

Такие составы могут быть предпочтительными для введения фармацевтически приемлемых составов нуклеиновых кислот или конструкций rAAV, раскрытых в данном документе. Образование и использование липосом известно специалистам в данной области. Недавно были разработаны липосомы с улучшенной стабильностью сыворотки и полупериодами циркуляции (патент США № 5741516). Кроме того, были описаны различные способы получения липосом и липосомоподобных препаратов в качестве потенциальных носителей лекарственных средств (патенты США № 5567434; 5552157; 5565213; 5738868 и 5795587).

Липосомы успешно используются с рядом типов клеток, которые обычно устойчивы к трансфекции другими процедурами. Кроме того, липосомы свободны от ограничений по длине ДНК, которые типичны для систем доставки на основе вирусов. Липосомы эффективно используются для введения генов, лекарств, радиотерапевтических агентов, вирусов, факторов транскрипции и аллостерических эффекторов для различных культивируемых клеточных линий и животных. Кроме того, было успешно завершено несколько клинических испытаний, изучающих эффективность доставки лекарств, опосредованной липосомами.

Липосомы образуются из фосфолипидов, которые диспергированы в водной среде и спонтанно образуют многослойные концентрические двухслойные везикулы (также называемые многослойными везикулами (MLV). MLV обычно имеют диаметр от 25 нм до 4 мкм. Обработка MLV ультразвуком приводит к образованию небольших однослойных везикул (SUV) с диаметром в диапазоне от 200 до 500 Å, содержащих водный раствор в ядре.

В качестве альтернативы можно использовать составы rAAV в виде нанокапсул. Нанокапсулы обычно могут удерживать вещества стабильным и воспроизводимым образом. Чтобы избежать побочных

эффектов из-за внутриклеточной полимерной перегрузки, такие ультрамелкие частицы (размером около 0,1 мкм) следует конструировать с использованием полимеров, способных разлагаться in vivo. Предполагается использование биоразлагаемых наночастиц полиалкилцианоакрилата, которые отвечают этим требованиям.

В дополнение к способам доставки, описанным выше, следующие способы также рассматриваются как альтернативные способы доставки композиций rAAV к хозяину. Сонофорез (*т.е.* ультразвук) был использован и описан в патентах США № 5656016 в качестве устройства для увеличения скорости и эффективности проникновения лекарственного средства в систему кровообращения и через нее. Другие предполагаемые альтернативы доставки лекарств включают внутрикостную инъекцию (патент США № 5779708), микрочипы (патент США № 5797898), офтальмологические составы (Bourlais et al., 1998), трансдермальные матрицы (патенты США № 5770219 и 5783208) и доставку, управляемую обратной связью(патент США № 5697899).

Примеры

Пример 1. Дизайн белка «цинковые пальцы» для усиления экспрессии гена SCN1A.

Гомологичные области между последовательностями промотора SCN1A человека (клетки HEK293T) и мыши (клетки HEPG2) идентифицировали путем выравнивания последовательностей, окружающих два выраженных сайта начала транскрипции, идентифицированных в наборе данных RIKEN CAGE-seq для каждого вида (**ФИГ.1**). Высококонсервативная последовательность между человеком (HEK) и мышью (HEPG2) присутствует в проксимальной области промотора SCN1A (**ФИГ. 2**). Три ZFP, состоящие из шести пальцев, были сконструированы для связывания перекрывающихся 15-22 нуклеотидных гомологических областей в проксимальной промоторной области SCN1A посредством сборки одно- и двухпальцевых модулей с заранее определенной ДНК-связывающей специфичностью (**ФИГ. 3**). Три ZFP (ZFP1-ZFP3), состоящие из шести пальцев каждый, были разработаны для связывания перекрывающихся высококонсервативных последовательностей, идентифицированных на **ФИГ. 3.** Каждый палец разработан для связывания области из трех оснований (триплета) в высококонсервативной области проксимального промотора SCN1A.

ZFP-1 распознает отдельные области из трех оснований (триплеты ДНК обозначены красным, разделенные знаком «•») в проксимальной области промотора гена SCN1A (SEQ ID NO: 2), как показано на **ФИГ. 4A.** Каждая спираль распознавания (семь аминокислот) пальцев с 1 по 6 для ZFP-1 связывает три нуклеотидных последовательности, как показано на **ФИГ. 4B.** Аминокислотные последовательности шести пальцев ZFP-1 (SEQ ID NO: 17-22) показаны на **ФИГ. 4C**; линкеры между пальцами выделены для обозначения канонических (TGEKP) и неканонических (TGSQKP) линкерных последовательностей. Нуклеотидные последовательности шести пальцев ZFP-1 (SEQ ID NO: 11-16) показаны на **ФИГ. 4D.**

Таблица 1. *Спирали распознавания ZFP-1, нацеленные на SCN1A*

	Аминокислотная последовательность	Нуклеотидная последовательность
Спираль распознавания 1 ZFP-1	QRGNLVR (SEQ ID NO: 17)	CAGCGGGGAAACCTGGTGAGG (SEQ ID NO: 11)
Спираль распознавания 2 ZFP-1	LSFNLTR (SEQ ID NO: 18)	CTGAGCTTCAATCTAACCAGA (SEQ ID NO: 12)

	Аминокислотная последовательность	Нуклеотидная последовательность
Спираль распознавания 3 ZFP-1	RSDNLTR (SEQ ID NO: 19)	CGGAGTGACAACTTAACGCGG (SEQ ID NO: 13)
Спираль распознавания 4 ZFP-1	DRSHLAR (SEQ ID NO: 20)	GACCGGTCTCACCTTGCCCGA (SEQ ID NO: 14)
Спираль распознавания 5 ZFP-1	QKAHLTA (SEQ ID NO: 21)	CAGAAGGCCCATTTGACTGCC (SEQ ID NO: 15)
Спираль распознавания 6 ZFP-1	RSDNLTR (SEQ ID NO: 22)	CGGTCGGACAACCTCACACGC (SEQ ID NO: 16)

ZFP-2 распознает отдельные области из трех оснований (триплеты ДНК обозначены красным, разделенные знаком «•») в проксимальной области промотора гена SCN1A (SEQ ID NO: 3), как показано на **ФИГ. 5A.** Каждая спираль распознавания (семь аминокислот) пальцев с 1 по 6 для ZFP-2 связывает три нуклеотидных последовательности, как показано на **ФИГ. 5B.** Аминокислотные последовательности шести пальцев ZFP-2 (SEQ ID NO: 29-34) показаны на **ФИГ. 5C**; линкеры между пальцами выделены для обозначения канонических (TGEKP) и неканонических (TGSQKP) линкерных последовательностей. Нуклеотидные последовательности шести пальцев ZFP-1 (SEQ ID NO: 23-28) показаны на **ФИГ. 5D.**

Таблица 2. *Спирали распознавания ZFP-2, нацеленные на SCN1A*

	Аминокислотная последовательность	Нуклеотидная последовательность
Спираль распознавания 1 ZFP-2	RSSNLTR (SEQ ID NO: 29)	CGAAGTTCCAACCTGACACGG (SEQ ID NO: 23)
Спираль распознавания 2 ZFP-2	DKRTLIR (SEQ ID NO: 30)	GACAAGCGGACCTTAATCCGC (SEQ ID NO: 24)
Спираль распознавания 3 ZFP-2	QRGNLVR (SEQ ID NO: 31)	CAGCGGGGAAATCTAGTGCGA (SEQ ID NO: 25)
Спираль распознавания 4 ZFP-2	LSFNLTR (SEQ ID NO: 32)	CTGAGCTTCAACTTGACTCGT (SEQ ID NO: 26)
Спираль распознавания 5 ZFP-2	RSDNLTR (SEQ ID NO: 33)	CGGAGTGACAATCTTACGAGA (SEQ ID NO: 27)
Спираль распознавания 6 ZFP-2	DRSHLAR (SEQ ID NO: 34)	GACCGGAGCCACTTAGCCAGG (SEQ ID NO: 28)

ZFP-3 распознает отдельные области из трех оснований (триплеты ДНК обозначены красным, разделенные знаком «•») в проксимальной области промотора гена SCN1A (SEQ ID NO: 4), как показано на **ФИГ. 6A.** Каждая спираль распознавания (семь аминокислот) пальцев с 1 по 6 для ZFP-3 связывает три нуклеотидных последовательности, как показано на **ФИГ. 6B.** Аминокислотные последовательности шести пальцев ZFP-3 (SEQ ID NO: 41-46) показаны на **ФИГ. 6C**; линкеры между пальцами выделены для обозначения канонических (TGEKP) и неканонических (TGSQKP) линкерных последовательностей. Нуклеотидные последовательности шести пальцев ZFP-1 (SEQ ID NO: 35-40) показаны на **ФИГ. 6D.**

Таблица 3. *Спирали распознавания ZFP-3, нацеленные на SCN1A*

	Аминокислотная последовательность	Нуклеотидная последовательность
Спираль распознавания 1 ZFP-3	DRSALAR (SEQ ID NO: 41)	GACCGGAGCGCGCTGGCACGG (SEQ ID NO: 35)
Спираль распознавания 2 ZFP-3	RSDNLTR (SEQ ID NO: 42)	CGAAGTGACAACTTAACGCGC (SEQ ID NO: 36)
Спираль распознавания 3 ZFP-3	QSGDLTR (SEQ ID NO: 43)	CAGTCAGGGGACCTCACTCGT (SEQ ID NO: 37)
Спираль распознавания 4 ZFP-3	VRQTLKQ (SEQ ID NO: 44)	GTACGACAGACGCTTAAACAA (SEQ ID NO: 38)
Спираль распознавания 5 ZFP-3	AAGNLTR (SEQ ID NO: 45)	GCCGCTGGTAACTTGACACGA (SEQ ID NO: 39)
Спираль распознавания 6 ZFP-3	RSDNLTR (SEQ ID NO: 46)	AGATCTGATAATCTAACGCGT (SEQ ID NO: 40)

Дополнительные ZFP, предназначенные для нацеливания на последовательности, консервативные в проксимальной промоторной области гена SCN1A, содержат домен с пятьма или шестьма пальцами каждый и связываться с областями из 15-22 нуклеотидов, которые являются высококонсервативными между SCN1A человека и мыши.

Таблица 4. *Белки «цинковые пальцы», нацеленные на SCN1A*

	Аминокислотная последовательность	Нуклеотидная последовательность
ZFP-1	RPFQCRICMRNFSQRGNLVRHIRTHTGEKPFACDICGKKFALSFNLTRHTKIHTGSQKPFQCRICMRNFSRSDNLTRHIRTHTGEKPFACDICGKKFADRSHLARHTKIHTGSQKPFQCRICMRNFSQKAHLTAHIRTHTGEKPFACDICGRKFARSDNLTRHTKIHLRQKD (SEQ ID NO: 57)	CGACCATTCCAGTGTCGAATCTGCATGCGCAACTTCAGCCAGCGGGGAAACCTGGTGAGGCATATCCGCACCCACACGGGAGAGAAGCCTTTTGCCTGCGATATTTGTGGAAAGAAGTTTGCTCTGAGCTTCAATCTAACCAGACACACCAAGATTCATACTGGGTCCCAGAAACCGTTCCAGTGTAGGATATGCATGAGGAATTTCTCTCGGAGTGACAACTTAACGCGGCATATAAGGACGCACACAGGTGAAAAACCATTTGCATGCGACATCTGTGGCAAAAAGTTTGCGGACCGGTCTCACCTTGCCCGACACACAAAAATCCATACCGGCAGTCAAAAGCCCTTTCAATGTCGCATTTGCATGCGAAACTTCTCACAGAAGGCCCATTTGACTGCCCATATTCGTACTCATACTGGCGAGAAACCTTTCGCTTGCGATATATGTGGTCGTAAGTTTGCACGGTCGGACAACCTCACACGCCACACTAAGATACACCTGCGGCAGAAGGAC (SEQ ID NO: 58)
ZFP-2	RPFQCRICMRNFSRSSNLTRHI	CGACCATTCCAGTGTCGAATCTGCATGCGCAACTT

	Аминокислотная последовательность	Нуклеотидная последовательность
	RTHTGEKPFACDICGKKFADK RTLIRHTKIHTGSQKPFQCRIC MRNFSQRGNLVRHIRTHTGEK PFACDICGKKFALSFNLTRHTK IHTGSQKPFQCRICMRNFSRSD NLTRHIRTHTGEKPFACDICGR KFADRSHLARHTKIHLRQKD (SEQ ID NO: 59)	CAGCCGAAGTTCCAACCTGACACGGCATATCCGCA CCCACACGGGAGAGAAGCCTTTTGCCTGCGATATT TGTGGAAAGAAGTTTGCTGACAAGCGGACCTTAAT CCGCCACACCAAGATTCATACTGGGTCCCAGAAAC CGTTCCAGTGTAGGATATGCATGAGGAATTTCTCT CAGCGGGGAAATCTAGTGCGACATATAAGGACGC ACACAGGTGAAAAACCATTTGCATGCGACATCTGT GGCAAAAAGTTTGCGCTGAGCTTCAACTTGACTCG TCACACAAAAATCCATACCGGCAGTCAAAAGCCC TTTCAATGTCGCATTTGCATGCGAAACTTCTCACG GAGTGACAATCTTACGAGACATATTCGTACTCATA CTGGCGAGAAACCTTTCGCTTGCGATATATGTGGT CGTAAGTTTGCAGACCGGAGCCACTTAGCCAGGC ACACTAAGATACACCTGCGGCAGAAGGAC (SEQ ID NO: 60)
ZFP-3	RPFQCRICMRNFSDRSALARHI RTHTGEKPFACDICGKKFARSD NLTRHTKIHTGSQKPFQCRICM RNFSQSGDLTRHIRTHTGEKPF ACDICGKKFAVRQTLKQHTKI HTGSQKPFQCRICMRNFSAAG NLTRHIRTHTGEKPFACDICGR KFARSDNLTRHTKIHLRQKD (SEQ ID NO: 61)	CGACCATTCCAGTGTCGAATCTGCATGCGCAACTT CAGCGACCGGAGCGCGCTGGCACGGCATATCCGC ACCCACACGGGAGAGAAGCCTTTTGCCTGCGATAT TTGTGGAAAGAAGTTTGCTCGAAGTGACAACTTAA CGCGCCACACCAAGATTCATACTGGGTCCCAGAA ACCGTTCCAGTGTAGGATATGCATGAGGAATTTCT CTCAGTCAGGGGACCTCACTCGTCATATAAGGACG CACACAGGTGAAAAACCATTTGCATGCGACATCTG TGGCAAAAAGTTTGCGGTACGACAGACGCTTAAA CAACACACAAAAATCCATACCGGCAGTCAAAAGC CCTTTCAATGTCGCATTTGCATGCGAAACTTCTCA GCCGCTGGTAACTTGACACGACATATTCGTACTCA TACTGGCGAGAAACCTTTCGCTTGCGATATATGTG GTCGTAAGTTTGCAAGATCTGATAATCTAACGCGT CACACTAAGATACACCTGCGGCAGAAGGAC (SEQ ID NO: 62)

Пример 2. ZFP увеличивают экспрессию гена SCN1A в клетках человека.

Чтобы изучить способность ZFP1-ZFP3 активировать транскрипцию SCN1A, ДНК-связывающие домены ZFP1-ZFP3 были слиты с гибридным трехчастным доменом сильного активатора транскрипции VP64, p53 и RTA (VPR) с образованием химерного трансактиватора. Домен гибридного активатора VPR действует, рекрутируя комплексы регуляции транскрипции, увеличивая доступность хроматина, и помогает достичь высоких уровней экспрессии генов. Таким образом, домен ZFP будет нацеливать активатор VPR на

высококонсервативную последовательность в проксимальной области промотора для увеличения экспрессии гена SCN1A.

Экспрессионные плазмиды, кодирующие слитые белки VPR-ZFP1, VPR-ZFP2 и/или VPR-ZFP3, трансфицировали посредством временной трансфекции в клетки HEK293, и экспрессию гена SCN1A измеряли с помощью кПЦР в реальном времени (используя экспрессию TBP в качестве стандарта для нормализации). Слитые белки VPR-ZFP включают ZFP1, ZFP2 и/или ZFP3, слитые с VPR. Трансфекция трех конструкций для множественной регуляции, которые содержали ДНК-связывающие домены ZFP1, ZFP2 и ZFP3, каждый из которых слит с VPR, привела к 45-кратному увеличению экспрессии гена SCN1A по сравнению с нетрансфицированными клетками, что указывает на то, что химерные трансактиваторы VPR-ZFP способны увеличивать экспрессию гена SCN1A путем связывания в проксимальной области промотора гена (**ФИГ. 7**).

Слитые белки VPR- [ZFP1-ZFP3], а также слитые белки VPR-ZFP, для которых в настоящее время разрабатывается ДНК-связывающий домен ZFP, трансфицировали в клетки HeLa и HEPG2, обе из которых имеют низкие уровни экспрессии SCN1A. Слитые белки VPR-ZFP содержат как одиночные, так и комбинации нескольких ДНК-связывающих доменов ZFP, слитых с трансактиватором VPR. Экспрессию гена SCN1A измеряли с помощью кПЦР в реальном времени, чтобы определить, способны ли эти слияния VPR-ZFP увеличивать экспрессию гена. Наиболее многообещающие кандидаты слияния VPR-ZFP тестировали на первичных нейронах коры мозга после доставки слитых белков аденоассоциированным вирусом (AAV) на способность увеличивать экспрессию *SCN1A*.

Специфичность доменов ZFP дополнительно оптимизировали с использованием бактериальной одногибридной системы отбора (см., *например*, Meng, et al., «Targeted gene inactivation in zebrafish using engineered zinc-finger nucleases», *Nat Biotechnol,* 2008) для идентификации идеальных ZFP из рандомизированной библиотеки, в которых различаются остатки, важные для связывания ДНК. Вновь выбранные ZFP были слиты с трансактиваторными доменами VPR как по отдельности, так и в комбинации с несколькими ZFP и трансфицированы в клетки HEK293, HeLa и HEPG2, а также в первичные нейроны коры головного мозга мыши для идентификации доменов-кандидатов ZFP, которые максимально увеличивают экспрессию гена *SCN1A* после анализа кПЦР в реальном времени.

Пример 3. Создание серии трансактиваторов ZFP^{SCN1A} с различной активностью.

Наиболее эффективные ZFP для повышения регуляции экспрессии гена SCN1A из примера 2 были слиты с серией человеческих трансактивационных доменов (*например*, Rta, p65, Hsf1 и т. д.) с градиентом ожидаемой активности для идентификации сборки, которая обеспечивает двукратное повышение регуляции экспрессии гена SCN1A в диапазоне множественности заражения (MOI) AAV. Первичные кортикальные нейроны мыши от нормальных мышей и мышей $SCN1A^{+/-}$ инфицировали векторами AAV, экспрессирующими слитые трансактиваторы ZFP^{SCN1A}. Уровни экспрессии белка $Na_V1.1$ оценивали с помощью вестерн-блоттинга и кПЦР. Первичные нейроны, обработанные TGF-α в течение 8 часов, использовали в качестве положительного контроля, поскольку такая обработка увеличивает экспрессию белка $Na_V1.1$ примерно в 6-8 раз (Chen et al., 2015, *Neuroinflammation* 12: 126). Изменения в уровнях экспрессии других генов альфа-субъединицы Na_V также оценивали для демонстрации спецификации трансактивации ZFP^{SCN1A}. Иммунофлуоресценция использовалась, чтобы определить, остается ли экспрессия $Na_V1.1$ ограниченной ГАМКергическими промежуточными нейронами путем двойного

иммунофлуоресцентного окрашивания антителами к ZFP^{SCN1A} (метка HA) и маркерами, специфичными для ГАМКергических нейронов (*например*, парвальбумин$^+$ или соматостатин$^+$) или универсальными маркерами нейронов (*например*, NeuN, TUBIII и/или Map2). Специфичность ZFP^{SCN1A} для трансактивации гена SCN1A также оценивали с помощью ChIP-секвенирования и РНК-секвенирования для картирования сайтов связывания генома и полученный транскриптомный профиль, созданный при переносе гена.

Пример 4. Гистоновая организация и эпигеномный ландшафт промотора SCN1A в ГАМКергических ингибирующих нейронах для направления при разработке трансактиваторов SCN1A-ZFP, зависимых от активности промотора.

Способность ZFP связывать геномные мишени зависит от доступности последовательности-мишени (*например*, наличия области, свободной от нуклеосом). Это требование доступности ДНК используется для разработки трансактиваторов ZFP, которые функционируют только в подмножестве типов клеток на основе наличия доступности последовательности-мишени ДНК. Дополнительное ограничение активности на основе типа клетки достигается за счет использования тканеспецифичных промоторов для экспрессии трансактиватора ZFP. Было показано, что небольшие промоторы генов соматостатина и нейропептида Y рыбы фугу (*Takifugu rubripes*) управляют высокоспецифичной экспрессией трансгена в кортикальных и гиппокампальных ингибирующих интернейронах в контексте как векторов AAV, так и лентивирусов. В некоторых вариантах осуществления комбинация ограничения транскрипции на основе AAV SCN1A-специфичных ZFP, чувствительных к доступности ДНК, приводит к высокоспецифичной повышающей регуляции экспрессии белка $Na_V1.1$ в ингибирующих интернейронах по всему мозгу. Этот двойной подход к регуляции минимизирует побочные эффекты, которые могут возникнуть в результате эктопической экспрессии белка $Na_V1.1$ в клетках, где он обычно не экспрессируется.

Структура нуклеосом и эпигенетический ландшафт промотора SCN1A анализовали как в мышиных, так и в человеческих ГАМКергических ингибирующих и глутамергических возбуждающих нейронах. Эта информация используется для создания трансактиваторов ZFP, ограниченных ГАМКергическими ингибирующими нейронами, посредством нацеливания на последовательности, которые доступны только вокруг локуса SCN1A в этом типе клеток.

ГАМКергические ингибирующие нейроны из трансгенных мышей, экспрессирующих TdTomato под промотором GAD67, и ЗФБ-положительные глутаматерические возбуждающие нейроны, полученные при скрещивании мышей линии Emx1-IRES-Cre с мышами линии ROSA26/stop/EGFP, выделяли с использованием сортировки активированных флуоресценцией клеток (FACS). ГАМКергические и возбуждающие нейроны человека получали из клеток индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPS) и подтверждали с помощью как иммуноокрашивания, так и ОТ-ПЦР для маркеров, специфичных для этих типов клеток, а также электрофизиологической активности. Доступные области генома вокруг промотора SCN1A в популяциях нейронов мыши и человека охарактеризованы с помощью анализа на доступный для транспозаз хроматин (ATAC-Seq).

Трансактиваторы ZFP^{SCN1A}, которые распознают последовательности, доступные только в ГАМКергических нейронах, разрабатывали на основе дифференциальной доступности хроматина геномных областей вокруг промотора SCN1A в ингибирующих и возбуждающих нейронах. Была создана серия слияний трансактиваторов-кандидатов ZFP-VPR для нацеливания на различные доступные области SCN1A, для которых связывание трансактиваторов, как ожидается, будет сильно повышать экспрессию $Na_V1.1$ в

ингибирующих областях, а также выявлять любую нежелательную индуцированную экспрессию $Na_V1.1$ в возбуждающих нейронах.

Исследования экспрессии проводили в культивируемых нейронах, происходящих от iPS человека, и первичных нейронах $SCN1A^{+/-}$ мыши, которые моделируют синдром Драве, чтобы определить, обеспечивают ли трансактиваторы ZFP^{SCN1A}, предназначенные для распознавания последовательностей ДНК, которые доступны только в ингибирующих нейронах, необходимую специфичность при экспрессии из векторов AAV под пан-нейрональным промотором синапсина-1 человека или промотором ингибирующего интернейрона. Уровни экспрессии $Na_V1.1$ измеряли с помощью кПЦР в реальном времени, вестерн-блоттинга и двойной иммунофлуоресценции со специфическими маркерами нейронального типа для ингибирующих ГАМКергических (*например*, $ГАМК^+$, $GAD65/67^+$, соматостатин и/или парвальбумин) и возбуждающих глутаматергических (*например*, Cux1+, FoxG1+, рецепторов $ГАМК_A$, $ГАМК^-$) нейронов. Специфичность трансактиваторов ZFP^{SCN1A} к типу клеток разрабатывается для нацеливания на различные последовательности промотора SCN1A мыши и человека, поскольку структура хроматина и последовательность ДНК в областях сцепления различаются между видами. Контроли в этих экспериментах включают культуры нейронов, инфицированные аналогичными векторами AAV, кодирующими ЗФБ, ZFP без домена трансактивации.

Сайты связывания микроРНК (миРНК) включаются в 3'-нетранслируемую область (3 'UTR) трансактиваторов ZFP^{SCN1A} , которые ограничены типами клеток, в которых происходит нежелательная экспрессия (*например*, глутаматергические возбуждающие нейроны). Этот подход ранее использовался для ограничения экспрессии трансгенов, доставляемых AAV (Xie, et al., "MicroRNA-regulated, systematically delivered rAAV9: a step closer to CNS-restricted transgene expression," *Mol. Ther.* 2011). Различия в профиле экспрессии миРНК ГАМКергических нейронов и других типов клеток определяли с помощью секвенирования малых РНК.

Пример 5. Оценка потенциала генной терапии AAV-ZFP^{SCN1A} для коррекции дефицита тока натрия в iPS-генерируемых ГАМКергических интернейронах, полученных от пациента.

Важным шагом на пути к разработке трансактиватора(-ов) ZFP^{SCN1A} для синдрома Драве является демонстрация того, что эти искусственные трансактиваторы выполняют желаемую функцию в нейронах человека. Для этой цели получали клетки iPS от пациентов с синдромом Драве (n = 4-6) и пациентов без синдрома Драве (n = 4). В этих клетках представлен генетический фон, не связанный с синдромом Драве, что устраняет необходимость искусственного манипулирования экспрессией генов, и, таким образом, клетки iPS стали современной клеточной линией для биомедицинских исследований. Технология редактирования генома с помощью CRISPR-Cas9 используется для создания изогенных клеточных линий путем исправления генетической мутации в SCN1A до последовательности дикого типа или путем введения мутации, связанной с синдромом Драве, в нормальный аллель в пределах контрольной клеточной линии. Таким образом, в изогенных линиях устранена естественная изменчивость, возникающую при сравнении клеточных линий от разных людей, и, таким образом, являются ценными для подтверждения и увеличения специфических для болезни фенотипов. Установленный протокол дифференцировки ингибирующих нейронов и процесс валидации используются для дифференциации клеточных линий iPS в ГАМКергические ингибирующие интернейроны переднего мозга.

Ингибирующие нейроны, полученные от пациентов со синдромом Драве, демонстрируют пониженные натриевые токи и нарушенное возбуждение потенциала действия, как определено электрофизиологическими измерениями с помощью фиксации потенциала клетки. Аналогичные измерения выполняются для подтверждения того, что нейроны, полученные при синдроме Драве, описанные в данном документе, воспроизводят эти связанные с заболеванием фенотипы. Дефекты натриевого тока возникают в ингибирующих, но не возбуждающих нейронах у пациентов со синдромом Драве (Sun et al), и, таким образом, в данном описании используются только ингибирующие нейроны. Вызванные мутацией дефекты натриевых каналов в ингибирующих нейронах , полученных от пациентов со синдромом Драве, могут быть устранены эктопической экспрессией SCN1A дикого типа (ссылка 20). Следовательно, способы, описанные в данном описании, подходят для тестирования эффективности трансактиваторов ZFP^{SCN1A} в восстановлении функции и физиологии натриевых каналов дикого типа в контексте синдрома Драве.

Культуры ГАМКергических ингибирующих нейронов инфицировали векторами AAV, кодирующими трансактиваторы ZFP^{SCN1A} , под универсальными нейрональными или ингибирующими нейрон-специфическими промоторами. Изменения уровней экспрессии $Na_V1.1$ оценивали с помощью вестерн-блоттинга. Восстановление функциональных натриевых токов в ингибирующих нейронах оценивается посредством фиксации потенциала участка целой нетрансфицированных клеток по сравнению с трансфицированными клетками. Связывание трансактиваторов ZFP^{SCN1A} через геном во всех ингибирующих нейронах, полученных от пациента, анализировали с помощью ChIP-секвенирования и определяли корреляцию с любыми идентифицированными изменениями транскриптома, обнаруженными с помощью РНК-секвенирования. Контролями в этих экспериментах являются культуры нейронов, инфицированные аналогичными векторами AAV, кодирующими ЗФБ, ZFP без трансактиваторных доменов VPR и трансактиваторные домены VPR без ДНК-связывающих доменов ZFP.

Пример 6. Оценка терапевтического потенциала вмешательства AAV-ZFP^{SCN1A} при разном возрасте и путях доставки у мышей SCN1A.

Широкий тропизм AAV является критическим свойством для применения в генной терапии широко экспрессируемых генов, но может стать серьезной проблемой, когда интересующий трансген экспрессируется специфическим для типа клеток образом. Это было в значительной степени решено для основных тканей организма, таких как печень, мышцы и сердце, за счет использования тканеспецифических промоторов, таких как тироксинсвязывающий белок (TBP), креатинкиназа и тропонин T соответственно. Дополнительный уровень контроля может быть наложен на тканеспецифические промоторы для достижения более высокой степени отмены нацеливания на определенные ткани путем включения множества копий сайтов связывания для микроРНК, которых очень много в этих тканях, таких как miR-122 в печени и miR- 1 в скелетных мышцах. Недавно описанный серотип AAV-PHP.B исключительно эффективен для переноса гена ЦНС после системной доставки, где он трансформирует широкий спектр типов клеток. Более того, его тропизм к периферическим тканям по большей части такой же широкий, как и у AAV9. Целью генной терапии синдрома Драве является восстановление экспрессии $Na_V1.1$ исключительно в ГАМКергических ингибирующих интернейронах с одновременным предотвращением вредных эффектов эктопической экспрессии в других нейронах и в других местах. Было показано, что AAV и лентивирусные векторы, кодирующие ЗФБ под небольшими промоторами (<2,8 т.п.н.), происходящие из генов соматостатина (fSST) и нейропептида Y (fNPY) рыбы фугу (*Takifugu rubripes*), управляют специфической

экспрессией ингибирующих нейронов в мозгу мыши при внутричерепной инъекции. Векторы AAV-PHP.B, несущие эти промоторы, управляющие экспрессией ЗФБ, сравнивали с контрольными векторами, в которых экспрессия трансгена управляется универсальным сильным промотором CAG и минимальным относительно слабым промотором MeCP2 мыши. Специфичность векторов AAV-PHP.B-GFP с промоторами fSST и fNYP для ГАМКергических ингибирующих интернейронов изучали при доставке в ЦНС путем системного введения мышам в возрасте 6 недель (хвостовая вена) и в первый постнатальный день (ретроорбитально), ЦСЖ доставки новорожденным и, наконец, односторонних инъекций, направленных на зубчатую извилину (DG) (**таблица 5**). Эффективность переноса гена ЦНС значительно зависит от пути доставки, и, поскольку лечили мышей *Scn1a*$^{+/-}$ разного возраста, проводили обширный анализ, чтобы установить исходный уровень эффективности нейрональной трансдукции и специфичность промотора к ГАМКергическим ингибирующим интернейронам по всей ЦНС для каждого пути доставки. Ранее было показано, что векторы AAV, управляющие экспрессией ЗФБ с помощью коротких промоторов fSST и fNYP, обладают высокой специфичностью в отношении ингибирующих интернейронов в гиппокампе после прямой инъекции. Векторы AAV-PHP.B по данному изобретению проходили валидацию таким же образом, как и в последующих исследованиях, при этом оценивали терапевтическое влияние восстановления экспрессии $Na_V1.1$ в ингибирующих нейронах в образовании гиппокампа мышей *Scn1a*$^{+/-}$, конкретно расположенных в зубчатой извилине и внутренней выстилке слоя гранулярных клеток (обоснование изложено ниже). Эксперименты проводили на мышах 129SvJ/C57BL/6, полученных в UMMS путем скрещивания мышей 129SvJ с мышами C57BL/6, полученными от Jackson Laboratories (г. Бар-Харбор, штат Мэн). Через месяц после инъекции мышей подвергают эвтаназии, а головной и спинной мозг собирали для гистологического анализа эффективности и специфичности трансдукции с использованием двойной иммунофлуоресценции с антителами к клеточно-специфическим маркерам и ЗФБ. Эффективность и специфичность переноса генов для ГАМКергических ингибирующих интернейронов оценивали по всему головному и спинному мозгу с помощью двойного иммунофлуоресцентного окрашивания антителами к декарбоксилазе глутаминовой кислоты (GAD; маркер для ГАМКергических нейронов) и ЗФБ. Кроме того, предпочтительная специфичность промоторов и/или AAV-PHP.B для подгрупп ингибирующих интернейронов, экспрессирующих соматостатин (SST), парвальбумин (PV), кальретинин (CR), вазоактивный кишечный пептид (VIP) или нейропептид Y (NPY) с использованием антител, специфичных для этих белков и ЗФБ. Печень, сердце и скелетные мышцы собирали у мышей, получавших системное и ИЦВ-введение, для гистологической оценки экспрессии ЗФБ, и для определения возможности эктопической экспрессии в периферических тканях использовали вестерн-блоттинг.

Таблица 5.*Экспериментальные группы*

	Количество мышей в когорте			
Способ доставки	Системная		ИЦВ	ВЧ
Возраст	6 недель*	PND1 #	PND1 #	8 недель*
Доза (гв/г)	$2x10^{12}$	$4x10^{11}$	$4x10^{10}$	$1x10^{10}$
AAV-fSST-GFP	6	6-8	6-8	4
AAV-fNYP-GFP	6	6-8	6-8	4
AAV-CAG-GFP	6	6-8	6-8	4
AAV-MeCP2-GFP	6	6-8	6-8	-
Носитель (ФСБ)	2	-	-	

* Группы состоят из равного количества мышей обоих полов.
# Один помет на вектор
Сокращения: ИЦВ - интрацеребровентрикулярная инъекция; ВЧ - внутричерепная инъекция; PND1 - первый постнатальный день

5

Шестинедельным мышам *Scn1a*$^{+/-}$ вводили путем двусторонней инъекции в зубчатую извилину векторы AAV-PHP.B, кодирующие различные трансактиваторные белки ZFP^{Scn1a} , конструкцию с доменом активации ZFP^{Scn1a}, но без ДНК-связывающего домена для контроля воздействия одного активатора, или такой же
10 объем фосфатно-солевого буфера (ФСБ) (n = 3 самца + 3 самки/группа). Одноцепочечные векторы AAV, используемые в этих экспериментах, также несут кассету IRES-GFP ниже кДНК ZFP^{Scn1a} для облегчения идентификации трансдуцированных клеток. Тестировали по крайней мере два трансактиватора ZFP^{Scn1a} , которые могут иметь более широкую активацию в различных нейронах, а также два наиболее многообещающих ГАМКергических трансактиватора ZFP^{SCN1A}, ограниченных ингибирующими нейронами,
15 описанных выше. Через месяц после инъекции собирали мозг и гиппокамп из одного полушария мозга вырезали для оценки уровней экспрессии белков ZFP^{Scn1a}, Na_V1.1, Na_V1.3, GAD65, GAD67 с помощью вестерн-блоттинга с использованием бета-актина или тубулина в качестве нагрузки. Контролирует контроля нанесения. Другое полушарие мозга исследовали с помощью гистологических исследований с использованием серийных срезов головного мозга (10 мкм) для анализа % трансдуцированных
20 ингибирующих интернейронов в зубчатой извилине и внутренней выстилке слоя гранулярных клеток путем двойного иммунофлуоресцентного окрашивания антителами к GAD и ЗФБ или GAD и эпитопной метке, включенной во все белки ZFP^{Scn1a} (метка HA или myc). Кроме того, определяли процент GAD-положительных нейронов, экспрессирующих Na_V1.1 и Na_V1.3, чтобы продемонстрировать восстановление нормальных паттернов экспрессии натриевых каналов. Помимо иммунофлуоресцентного обнаружения
25 экспрессии белков Na_V1.1 и Na_V1.3, с помощью зондов RNAScope оценивали изменения уровней мРНК в ГАМКергических интернейронах для Na_V1.1, Na_V1.3, ZFP^{Scn1a} и GAD. RNAScope — это высокочувствительный способ гибридизации *in situ* для анализа уровней мРНК в нейронах головного мозга. Комбинация этих двух подходов для оценки изменений уровней Na_V1.1 в результате экспрессии ZFP^{Scn1a} обеспечивает всестороннее понимание того, какие изменения в интернейронах достигаются с помощью
30 подхода генной терапии, описанного в данном изобретении.

Терапевтическая эффективность генной терапии AAV-PHP.B-ZFP^{Scn1a} анализировали на мышах *Scn1a*$^{+/-}$ обоих полов, лечение начинали в первый постнатальный день или в возрасте 6 недель через хвостовую вену. Контроли включали мышей с введенным вектором AAV, кодирующим ZFP-подобный белок без ДНК-связывающего домена ZFP, а также необработанных мышей *Scn1a*$^{+/-}$ соответствующего возраста и
35 однопометников дикого типа (n = 15 самцов и 15 самок на группу). Подгруппа мышей в каждой группе (n = 3 самца и 3 самки) подвергали эвтаназии в возрасте 12 недель для оценки эффективности переноса генов на ГАМКергические интернейроны с использованием вестерн-блоттинга, а также иммунофлуоресценции с антителами к GAD (и другим маркерам, специфичным для нейронального типа, *например*, GAD65, GAD67) и ZFP, и восстановление экспрессии Na_V1.1 в этих клетках по всему головному и спинному мозгу. Кроме
40 того, оценивали эктопическую экспрессию ZFP наряду с экспрессией Na_V1.1 в периферических тканях. Другая подгруппа животных в каждой группе (n = 24) используется для изучения влияния на выживаемость

(до 1 года), двигательную способность и поведение, которое проверяется каждые два месяца в возрасте от 2 до 12 месяцев. Моторную функцию и координацию оценивали с помощью тестов на вращающемся с ускорением стержне и тестом на пересечение пучков, поскольку у мышей *Scn1a*$^{+/-}$ наблюдается нарушение координации передних и задних конечностей за счет PND21. Кроме того, использовали поведенческие тесты, в которых мыши *Scn1a*$^{+/-}$ демонстрировали сниженную производительность, в том числе: открытое поле, приподнятый крестообразный лабиринт, свивание гнезда, закапывание шариков и лабиринт Барнеса для проверки пространственного обучения и памяти, которые, по-видимому, серьезно нарушены в мышей *Scn1a*$^{+/-}$. Спонтанные припадки, характерные для пациентов с синдромом Драве, также проявляются у мышей *Scn1a*$^{+/-}$, и их частота увеличивается с возрастом и температурой тела. Более того, преждевременная внезапная смерть мышей *Scn1a*$^{+/-}$ происходила сразу после тонико-клонических припадков. Поэтому для оценки частоты и продолжительности приступов использовали непрерывное видеонаблюдение в течение 24 часов в возрасте 2, 6 и 12 месяцев. Рассматривали исследования социального взаимодействия с использованием считывания предпочтений в камере в ответ на новые предметы, запахи и мышей, если обнаруживаются значительные изменения в первичных результатах тестов, описанных выше. Мозг, спинной мозг и периферические органы собирали и оценивали в экспериментальных целях на предмет гуманных конечных точек для выполнения молекулярных и гистологических анализов, описанных выше.

Пример 7. Системы ZFP и dCas9 увеличивают экспрессию гена SCN1A в клетках человека.

Чтобы изучить способность ZFP1-ZFP3 активировать транскрипцию SCN1A, ДНК-связывающие домены ZFP1-ZFP3 были слиты с гибридным трехчастным доменом сильного активатора транскрипции VP64, p53 и RTA (VPR) с образованием химерного трансактиватора. Домен гибридного активатора VPR действует, рекрутируя комплексы регуляции транскрипции, увеличивая доступность хроматина, и помогает достичь высоких уровней экспрессии генов. Таким образом, домен ZFP будет нацеливать активатор VPR на высококонсервативную последовательность в проксимальной области промотора для увеличения экспрессии гена SCN1A.

Кроме того, для изучения способности систем dCas9, нацеленных на SCN1A, повышать регуляцию транскрипции SCN1A, три направляющие РНК, нацеленные на SCN1A, были объединены в комплекс с белком dCas9.

Клетки HEK293T временно трансфицировали с одним из следующих экспериментальных условий - (1) конструкцией VPR-ZFP1; (2) конструкцией VPR-ZFP2; (3) конструкцией VPR-ZFP3; (4) всеми тремя конструкциями VPR-ZFP1, VPR-ZFP2 и VPR-ZFP3; (5) конструкцией dCas9-VPR и направляющей РНК 1 SCN1A; (6) конструкцией dCas9-VPR и направляющей РНК 2 SCN1A; (7) конструкцией dCas9-VPR и направляющей РНК 3 SCN1A; (8) конструкцией dCas9-VPR и всеми тремя: направляющей РНК 1 SCN1A, направляющей РНК 2 SCN1A и направляющей РНК 3 SCN1A; и (9) конструкцией dCas9-VPR без какой-либо направляющей РНК (контроль). Экспрессию гена SCN1A измеряли с помощью кПЦР в реальном времени. Кратная активация SCN1A была нормализована к контролю эксперименту (конструкция dCas9-VPR без какой-либо направляющей РНК).

Все испытанные экспериментальные условия вызывали увеличение активации гена SCN1A по сравнению с контролем эксперимента (ФИГ. 8). Эти данные демонстрируют, что белки «цинковые пальцы», описанные в этом примере и во всем данном описании, способны нацеливаться на SCN1A, влияя на

экспрессию гена. Эти данные дополнительно демонстрируют, что последовательности направляющей РНК этого примера (SEQ ID NO: 83-94) способны нацеливать dCas9 на SCN1A, влияя на экспрессию гена.

Таблица 6. *Направляющие нуклеиновые кислоты, нацеленные на SCN1A (спейсерная последовательность выделена жирным шрифтом)*

	Нуклеотидная последовательность (ДНК)	Нуклеотидная последовательность (РНК)
Направляющая 1 SCN1A	**GAGGTACCATAGAGTGAGGCG**GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC (SEQ ID NO: 83)	**GAGGUACCAUAGAGUGAGGCG**GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC (SEQ ID NO: 84)
Направляющая 2 SCN1A	**ACCGAGGCGAGGATGAAGCCGAG**GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC (SEQ ID NO: 87)	**ACCGAGGCGAGGAUGAAGCCGAG**GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC (SEQ ID NO: 88)
Направляющая 3 SCN1A	**ACCGAAGCCGAGAGGATACTGCAG**GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC (SEQ ID NO: 91)	**ACCGAAGCCGAGAGGAUACUGCAG**GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC (SEQ ID NO: 92)

5 ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Формула изобретения:

1. Выделенная нуклеиновая кислота, содержащая трансген, предназначенный для экспрессии по меньшей мере одного ДНК-связывающего домена, слитого по меньшей мере с одним доменом
10 регулятора транскрипции, причем ДНК-связывающий домен связывается с геном-мишенью или регуляторной областью гена-мишени и причем ген-мишень кодирует потенциал-зависимый натриевый канал.

2. Выделенная нуклеиновая кислота по п. 1, отличающаяся тем, что трансген фланкирован
15 инвертированными концевыми повторами (ITR), полученными из аденоассоциированного вируса (AAV).

3. Выделенная нуклеиновая кислота по п. 1 или п. 2, отличающаяся тем, что домен регулятора транскрипции усиливает экспрессию гена-мишени.

20

4. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из пп. 1-3, отличающаяся тем, что по меньшей мере один ДНК-связывающий домен связывается с нетранслируемой областью гена-мишени.

5. Выделенная нуклеиновая кислота по п. 4, отличающаяся тем, что нетранслируемая область
25 представляет собой энхансер, промотор, интрон и/или репрессор.

6. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из п. 4 или п. 5, отличающаяся тем, что ДНК-связывающий домен связывается на 2-2000 п.н. выше или на 2-2000 п.о. ниже регуляторной области гена-мишени.

30

7. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из пп. 1-6, отличающаяся тем, что по меньшей мере один ДНК-связывающий домен кодирует белок «цинковые пальцы» (ZFP), эффектор, подобный активатору транскрипции (TALE), белок dCas (*например*, dCas9 или dCas12a) и/или гомеодомен.

35 8. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из пп. 1-7, отличающаяся тем, что по меньшей мере один ДНК-связывающий домен связывается с последовательностью нуклеиновой кислоты, указанной в любой из SEQ ID NO: 5-7.

9. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из пп. 1-8, отличающаяся тем, что по меньшей мере
40 один ДНК-связывающий домен представляет собой белок «цинковые пальцы», содержащий спираль

распознавания, кодируемую нуклеиновой кислотой, имеющей последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 11-16, 23-28 или 35-40.

10. Выделенная нуклеиновая кислота по п. 9, отличающаяся тем, что по меньшей мере один ДНК-связывающий домен представляет собой белок «цинковые пальцы», содержащий спираль распознавания, кодируемую нуклеиновой кислотой, содержащей SEQ ID NO: 11, спираль распознавания, кодируемую нуклеиновой кислотой, содержащей SEQ ID NO: 12, спираль распознавания, кодируемую нуклеиновой кислотой, содержащей SEQ ID NO: 13, спираль распознавания, кодируемую нуклеиновой кислотой, содержащей SEQ ID NO: 14, спираль распознавания, кодируемую нуклеиновой кислотой, содержащей SEQ ID NO: 15, и/или спираль распознавания, кодируемую нуклеиновой кислотой, содержащей SEQ ID NO: 16.

11. Выделенная нуклеиновая кислота по п. 9, отличающаяся тем, что по меньшей мере один ДНК-связывающий домен представляет собой белок «цинковые пальцы», содержащий спираль распознавания, кодируемую нуклеиновой кислотой, содержащей SEQ ID NO: 23, спираль распознавания, кодируемую нуклеиновой кислотой, содержащей SEQ ID NO: 24, спираль распознавания, кодируемую нуклеиновой кислотой, содержащей SEQ ID NO: 25, спираль распознавания, кодируемую нуклеиновой кислотой, содержащей SEQ ID NO: 26, спираль распознавания, кодируемую нуклеиновой кислотой, содержащей SEQ ID NO: 27, и/или спираль распознавания, кодируемую нуклеиновой кислотой, содержащей SEQ ID NO: 28.

12. Выделенная нуклеиновая кислота по п. 9, отличающаяся тем, что по меньшей мере один ДНК-связывающий домен представляет собой белок «цинковые пальцы», содержащий спираль распознавания, кодируемую нуклеиновой кислотой, содержащей SEQ ID NO: 35, спираль распознавания, кодируемую нуклеиновой кислотой, содержащей SEQ ID NO: 36, спираль распознавания, кодируемую нуклеиновой кислотой, содержащей SEQ ID NO: 37, спираль распознавания, кодируемую нуклеиновой кислотой, содержащей SEQ ID NO: 38, спираль распознавания, кодируемую нуклеиновой кислотой, содержащей SEQ ID NO: 39, и/или спираль распознавания, кодируемую нуклеиновой кислотой, содержащей SEQ ID NO: 40.

13. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из пп. 1-12, отличающаяся тем, что по меньшей мере один ДНК-связывающий домен представляет собой белок «цинковые пальцы», содержащий аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 17-22, 29-34 или 41-46.

14. Выделенная нуклеиновая кислота по п. 13, отличающаяся тем, что по меньшей мере один ДНК-связывающий домен представляет собой белок «цинковые пальцы», содержащий спираль распознавания, содержащую SEQ ID NO: 17, спираль распознавания, содержащую SEQ ID NO: 18, спираль распознавания, содержащую SEQ ID NO: 19, спираль распознавания, содержащую SEQ ID NO: 20, спираль распознавания, содержащую SEQ ID NO: 21, и/или спираль распознавания, содержащую SEQ ID NO: 22.

15. Выделенная нуклеиновая кислота по п. 13, отличающаяся тем, что по меньшей мере один ДНК-связывающий домен представляет собой белок «цинковые пальцы», содержащий спираль распознавания, содержащую SEQ ID NO: 29, спираль распознавания, содержащую SEQ ID NO: 30, спираль распознавания, содержащую SEQ ID NO: 31, спираль распознавания, содержащую SEQ ID NO: 32, спираль распознавания, содержащую SEQ ID NO: 33, и/или спираль распознавания, содержащую SEQ ID NO: 34.

16. Выделенная нуклеиновая кислота по п. 13, отличающаяся тем, что по меньшей мере один ДНК-связывающий домен представляет собой белок «цинковые пальцы», содержащий спираль распознавания, содержащую SEQ ID NO: 41, спираль распознавания, содержащую SEQ ID NO: 42, спираль распознавания, содержащую SEQ ID NO: 43, спираль распознавания, содержащую SEQ ID NO: 44, спираль распознавания, содержащую SEQ ID NO: 45, и/или спираль распознавания, содержащую SEQ ID NO: 46.

17. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из пп. 1-7, отличающаяся тем, что по меньшей мере один ДНК-связывающий домен представляет собой белок dCas, необязательно белок dCas9, и при этом выделенная нуклеиновая кислота дополнительно содержит по меньшей мере одну направляющую нуклеиновую кислоту.

18. Выделенная нуклеиновая кислота по п. 17, отличающаяся тем, что направляющая нуклеиновая кислота содержит спейсерную последовательность, нацеленную на *SCN1A*.

19. Выделенная нуклеиновая кислота по п. 17 или п. 18, отличающаяся тем, что направляющая нуклеиновая кислота содержит спейсерную последовательность, имеющую нуклеотидную последовательность любой из SEQ ID NO: 85, 86, 89, 90, 93 или 94.

20. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из пп. 17-19, отличающаяся тем, что направляющая нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность любой из SEQ ID NO: 83-94.

21. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из пп. 1-16, отличающаяся тем, что по меньшей мере один домен регулятора транскрипции содержит трансактиватор VPR, Rta, p65 или Hsf1 или любую их комбинацию.

22. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из пп. 1-21, отличающаяся тем, что по меньшей мере один домен трансактивации кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, указанной в SEQ ID NO: 47.

23. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из пп. 1-22, отличающаяся тем, что по меньшей мере один домен трансактивации кодируется аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 48.

24. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из пп. 1-23, отличающаяся тем, что нуклеиновая кислота содержит ITR AAV2.

25. Выделенная нуклеиновая кислота по п. 24, отличающаяся тем, что ITR представляет собой ΔTR и/или mTR.

26. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из пп. 1-25, отличающаяся тем, что трансген функционально связан с промотором.

27. Выделенная нуклеиновая кислота по п. 26, отличающаяся тем, что промотор представляет собой тканеспецифический промотор, причем промотор необязательно представляет собой нейрональный промотор, такой как промотор SST, NPY, фосфатактивированной глутаминазы (PAG), везикулярного транспортера глутамата-1 (VGLUT1), декарбоксилазы глутаминовой кислоты 65 и 57 (GAD65, GAD67), синапсина I, a-CamKII, Dock10, Prox1, парвальбумина (PV), соматостатина (SST), холецистокинина (CCK), кальретинина (CR) или нейропептида Y (NPY).

28. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из пп. 1-27, отличающаяся тем, что по меньшей мере один ДНК-связывающий домен слит с по меньшей мере одним доменом регулятора транскрипции с помощью линкерного домена.

29. Выделенная нуклеиновая кислота по п. 28, отличающаяся тем, что линкерный домен необязательно представляет собой:

(i) гибкий линкер, необязательно состоящий из остатков глицина, или
(ii) расщепляемый линкер.

30. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из пп. 1-29, отличающаяся тем, что трансген кодирует 1 ДНК-связывающий домен, 2 ДНК-связывающих домена, 3 ДНК-связывающих домена, 4 ДНК-связывающих домена, 5 ДНК-связывающих доменов, 6 ДНК-связывающих доменов, 7 ДНК-связывающих доменов, 8 ДНК-связывающих доменов, 9 ДНК-связывающих доменов или 10 ДНК-связывающих доменов.

31. Выделенная нуклеиновая кислота по любому из пп. 1-30, отличающаяся тем, что трансген кодирует 1 домен регулятора транскрипции, 2 домена регулятора транскрипции, 3 домена регулятора транскрипции, 4 домена регулятора транскрипции, 5 доменов регулятора транскрипции, 6 доменов регулятора транскрипции, 7 доменов регулятора транскрипции, 8 доменов регулятора транскрипции, 9 доменов регулятора транскрипции или 10 доменов регулятора транскрипции.

32. Рекомбинантный AAV (rAAV), содержащий:

(i) нуклеиновую кислоту, содержащую трансген, кодирующий по меньшей мере один ДНК-связывающий домен, слитый по меньшей мере с одним доменом регулятора транскрипции, причем ДНК-связывающий домен связывается с геном-мишенью или регуляторной

областью гена-мишени, причем ген-мишень кодирует потенциал-зависимый натриевый канал,

(ii) по меньшей мере, один капсидный белок.

33. rAAV по п. 32, отличающийся тем, что трансген фланкирован инвертированными концевыми повторами (ITR), полученными из аденоассоциированного вируса (AAV).

34. rAAV по п. 32 или п. 33, отличающийся тем, что регулятор транскрипции усиливает экспрессию гена-мишени.

35. rAAV по любому из пп. 32-34, отличающийся тем, что по меньшей мере один ДНК-связывающий домен связывается с нетранслируемой областью гена-мишени.

36. rAAV по п. 35, отличающийся тем, что нетранслируемая область представляет собой энхансер, промотор, интрон и/или репрессор.

37. rAAV по любому из пп. 35-36, отличающийся тем, что ДНК-связывающий домен связывается на 2-2000 п.н. выше или на 2-2000 п.о. ниже регуляторной области гена-мишени.

38. rAAV по любому из пп. 32-37, отличающийся тем, что по меньшей мере один ДНК-связывающий домен кодирует белок «цинковые пальцы» (ZFP), эффектор, подобный активатору транскрипции (TALE), белок dCas (*например*, dCas9 или dCas12a) и/или гомеодомен.

39. rAAV по любому из пп. 32-38, отличающийся тем, что по меньшей мере один ДНК-связывающий домен связывается с последовательностью нуклеиновой кислоты, указанной в любой из SEQ ID NO: 5-7.

40. rAAV по любому из пп. 32-39, отличающийся тем, что по меньшей мере один ДНК-связывающий домен представляет собой белок «цинковые пальцы», содержащий спираль распознавания, кодируемую нуклеиновой кислотой, имеющей последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 11-16, 23-28 или 35-40.

41. rAAV по п. 40, отличающийся тем, что по меньшей мере один ДНК-связывающий домен представляет собой белок «цинковые пальцы», содержащий спираль распознавания, кодируемую нуклеиновой кислотой, содержащей SEQ ID NO: 11, спираль распознавания, кодируемую нуклеиновой кислотой, содержащей SEQ ID NO: 12, спираль распознавания, кодируемую нуклеиновой кислотой, содержащей SEQ ID NO: 13, спираль распознавания, кодируемую нуклеиновой кислотой, содержащей SEQ ID NO: 14, спираль распознавания, кодируемую нуклеиновой кислотой, содержащей SEQ ID NO: 15, и/или спираль распознавания, кодируемую нуклеиновой кислотой, содержащей SEQ ID NO: 16.

42. rAAV по п. 40, отличающийся тем, что по меньшей мере один ДНК-связывающий домен представляет собой белок «цинковые пальцы», содержащий спираль распознавания, кодируемую нуклеиновой кислотой, содержащей SEQ ID NO: 23, спираль распознавания, кодируемую нуклеиновой кислотой, содержащей SEQ ID NO: 24, спираль распознавания, кодируемую нуклеиновой кислотой, содержащей SEQ ID NO: 25, спираль распознавания, кодируемую нуклеиновой кислотой, содержащей SEQ ID NO: 26, спираль распознавания, кодируемую нуклеиновой кислотой, содержащей SEQ ID NO: 27, и/или спираль распознавания, кодируемую нуклеиновой кислотой, содержащей SEQ ID NO: 28.

43. rAAV по п. 40, отличающийся тем, что по меньшей мере один ДНК-связывающий домен представляет собой белок «цинковые пальцы», содержащий спираль распознавания, кодируемую нуклеиновой кислотой, содержащей SEQ ID NO: 35, спираль распознавания, кодируемую нуклеиновой кислотой, содержащей SEQ ID NO: 36, спираль распознавания, кодируемую нуклеиновой кислотой, содержащей SEQ ID NO: 37, спираль распознавания, кодируемую нуклеиновой кислотой, содержащей SEQ ID NO: 38, спираль распознавания, кодируемую нуклеиновой кислотой, содержащей SEQ ID NO: 39, и/или спираль распознавания, кодируемую нуклеиновой кислотой, содержащей SEQ ID NO: 40.

44. rAAV любому из пп. 32-43, отличающийся тем, что по меньшей мере один ДНК-связывающий домен представляет собой белок «цинковые пальцы», содержащий аминокислотную последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 17-22, 29-34 или 41-46.

45. rAAV по п. 44, отличающийся тем, что по меньшей мере один ДНК-связывающий домен представляет собой белок «цинковые пальцы», содержащий спираль распознавания, содержащую SEQ ID NO: 17, спираль распознавания, содержащую SEQ ID NO: 18, спираль распознавания, содержащую SEQ ID NO: 19, спираль распознавания, содержащую SEQ ID NO: 20, спираль распознавания, содержащую SEQ ID NO: 21, и/или спираль распознавания, содержащую SEQ ID NO: 22.

46. rAAV по п. 44, отличающийся тем, что по меньшей мере один ДНК-связывающий домен представляет собой белок «цинковые пальцы», содержащий спираль распознавания, содержащую SEQ ID NO: 29, спираль распознавания, содержащую SEQ ID NO: 30, спираль распознавания, содержащую SEQ ID NO: 31, спираль распознавания, содержащую SEQ ID NO: 32, спираль распознавания, содержащую SEQ ID NO: 33, и/или спираль распознавания, содержащую SEQ ID NO: 34.

47. rAAV по п. 44, отличающийся тем, что по меньшей мере один ДНК-связывающий домен представляет собой белок «цинковые пальцы», содержащий спираль распознавания, содержащую SEQ ID NO: 41, спираль распознавания, содержащую SEQ ID NO: 42, спираль распознавания, содержащую SEQ ID NO: 43, спираль распознавания, содержащую SEQ ID NO: 44, спираль

распознавания, содержащую SEQ ID NO: 45, и/или спираль распознавания, содержащую SEQ ID NO: 46.

48. rAAV по любому из пп. 32-37, отличающийся тем, что по меньшей мере один ДНК-связывающий домен представляет собой белок dCas, необязательно белок dCas9, и при этом rAAV дополнительно содержит по меньшей мере одну направляющую нуклеиновую кислоту.

49. rAAV по п. 48, отличающийся тем, что направляющая нуклеиновая кислота содержит спейсерную последовательность, нацеленную на *SCN1A*.

50. rAAV по п. 48 или 49, отличающийся тем, что направляющая нуклеиновая кислота содержит спейсерную последовательность, имеющую нуклеотидную последовательность любой из SEQ ID NO: 85, 86, 89, 90, 93 или 94.

51. rAAV по любому из пп. 48-50, отличающийся тем, что направляющая нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность любой из SEQ ID NO: 83-94.

52. rAAV по любому из пп. 32-47, отличающийся тем, что по меньшей мере один домен регулятора транскрипции представляет собой трансактиватор, полученный из VRP, Rta, p65, Hsf1 или любой их комбинации.

53. RAAV по любому из пп. 32-52, отличающийся тем, что трансген, кодирующий по меньшей мере один трансген регулятора транскрипции, содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 47.

54. Нуклеиновая кислота по любому из пп. 32-53, отличающаяся тем, что по меньшей мере один домен регулятора транскрипции кодируется аминокислотной последовательностью, указанной в SEQ ID NO: 48.

55. rAAV по любому из пп. 32-54, отличающийся тем, что по меньшей мере один ДНК-связывающий домен слит с по меньшей мере одним доменом регулятора транскрипции с помощью линкерного домена.

56. rAAV по п. 55, отличающийся тем, что линкерный домен необязательно представляет собой:
(i) гибкий линкер, необязательно состоящий из остатков глицина, или
(ii) расщепляемый линкер.

57. rAAV по любому из пп. 32-56, отличающийся тем, что трансген кодирует 1 ДНК-связывающий домен, 2 ДНК-связывающих домена, 3 ДНК-связывающих домена, 4 ДНК-связывающих домена, 5 ДНК-связывающих доменов, 6 ДНК-связывающих доменов, 7 ДНК-связывающих доменов, 8 ДНК-связывающих доменов, 9 ДНК-связывающих доменов или 10 ДНК-связывающих доменов.

58. rAAV по любому из пп. 32-57, отличающийся тем, что трансген кодирует 1 домен регулятора транскрипции, 2 домена регулятора транскрипции, 3 домена регулятора транскрипции, 4 домена регулятора транскрипции, 5 доменов регулятора транскрипции, 6 доменов регулятора транскрипции, 7 доменов регулятора транскрипции, 8 доменов регулятора транскрипции, 9 доменов регулятора транскрипции или 10 доменов регулятора транскрипции.

59. rAAV по любому из пп. 32-58, отличающийся тем, что серотип капсида AAV выбран из группы, состоящей из AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAV9, AAV10, AAVrh10 или AAV.PHPB.

60. rAAV по любому из пп. 32-59, отличающийся тем, что серотип капсида AAV представляет собой AAV9.

61. rAAV по любому из пп. 32-59, отличающийся тем, что серотип капсида AAV представляет собой AAV.PHBP.

62. rAAV по любому из пп. 32-61, отличающийся тем, что нуклеиновая кислота содержит ITR AAV2.

63. rAAV по п. 62, отличающийся тем, что ITR представляет собой ΔTR и/или mTR.

64. rAAV по любому из пп. 32-63, отличающийся тем, что трансген функционально связан с промотором.

65. rAAV по п. 64, отличающийся тем, что промотор представляет собой тканеспецифический промотор.

66. rAAV по п. 64 или п. 65, отличающийся тем, что тканеспецифический промотор представляет собой нейрональный промотор, такой как промотор SST, NPY фосфатактивированной глутаминазы (PAG), везикулярного транспортера глутамата-1 (VGLUT1), декарбоксилазы глутаминовой кислоты 65 и 57 (GAD65, GAD67), синапсина I, a-CamKII, Dock10, Prox1, парвальбумина (PV), соматостатина (SST), холецистокинина (CCK), кальретинина (CR) или нейропептида Y (NPY).

67. Способ увеличения экспрессии гена-мишени, включающий введение в клетку или субъекту, содержащему ген-мишень, выделенной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-31 или rAAV по любому из пп. 32-66.

68. Способ по п. 57, отличающийся тем, что субъект гаплонедостаточен по гену-мишени.

69. Способ по п. 67 или п. 68, отличающийся тем, что ген-мишень представляет собой SCN1A.

70. Способ по любому из пп. 67-69, отличающийся тем, что клетка представляет собой нейрон, необязательно ГАМКергический нейрон.

71. Способ по любому из пп. 67-70, отличающийся тем, что введение выделенной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-31 или rAAV по любому из пп. 32-66 приводит к экспрессии гена-мишени, увеличенной по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 20 раз, по меньшей мере в 30 раз, по меньшей мере в 40 раз, по меньшей мере в 50 раз, по меньшей мере в 60 раз, по меньшей мере в 70 раз, по меньшей мере в 80 раз, по меньшей мере в 90 раз или по меньшей мере в 100 раз относительно экспрессии трансгена у субъекта до введения.

72. Способ лечения синдрома Драве у субъекта, включающий введение субъекту, экспрессирующему ген-мишень, выделенной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-31 или rAAV по любому из пп. 32-66.

73. Способ по п. 72, отличающийся тем, что экспрессия гена-мишени у субъекта снижена по сравнению с нормальным субъектом.

74. Способ по п. 72 или п. 73, отличающийся тем, что субъект является или предположительно является гаплонедостаточным по экспрессии гена-мишени по сравнению с нормальным субъектом.

75. Способ по любому из пп. 72-74, отличающийся тем, что субъект имеет или предположительно имеет состояние, вызванное гаплонедостаточной экспрессией гена-мишени.

76. Способ по любому из пп. 72-75, отличающийся тем, что ген-мишень представляет собой SCN1A.

77. Способ по любому из пп. 72-76, отличающийся тем, что выделенную нуклеиновую кислоту или rAAV вводят путем внутривенной инъекции, внутримышечной инъекции, ингаляции, подкожной инъекции и/или внутричерепной инъекции.

78. Способ по любому из пп. 72-77, отличающийся тем, что введение выделенной нуклеиновой кислоты или rAAV приводит к экспрессии гена-мишени, увеличенной по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 20 раз, по меньшей мере в 30 раз, по меньшей мере в 40 раз, по меньшей мере в 50 раз, по меньшей мере в 60 раз, по меньшей мере в 70 раз, по меньшей мере в 80 раз, по меньшей мере в 90 раз или по меньшей мере в 100 раз относительно экспрессии трансгена у субъекта до введения.

79. Композиция, содержащая выделенную нуклеиновую кислоту по любому из пп. 1-31 или rAAV по любому из пп. 32-66.

80. Композиция по п. 79, дополнительно содержащая фармацевтически приемлемый носитель.

81. Набор, содержащий:
контейнер, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту по любому из пп. 1-31 или rAAV по любому из пп. 32-66.

82. Набор по п. 81, отличающийся тем, что набор дополнительно содержит контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый носитель.

83. Набор по п. 81 или п. 82, отличающийся тем, что выделенная нуклеиновая кислота rAAV и фармацевтически приемлемый носитель содержатся в одном и том же контейнере.

84. Набор по любому из пп. 81-83, отличающийся тем, что контейнер представляет собой шприц.

85. Клетка-хозяин, содержащая выделенную нуклеиновую кислоту по любому из пп. 1-31 или rAAV по любому из пп. 32-66.

86. Клетка-хозяин по п. 85, отличающаяся тем, что клетка-хозяин представляет собой эукариотическую клетку.

87. Клетка-хозяин по п. 85, отличающаяся тем, что клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего.

88. Клетка-хозяин по п. 87, отличающаяся тем, что клетка-хозяин представляет собой клетку человека, необязательно нейрон, необязательно ГАМКергический нейрон.

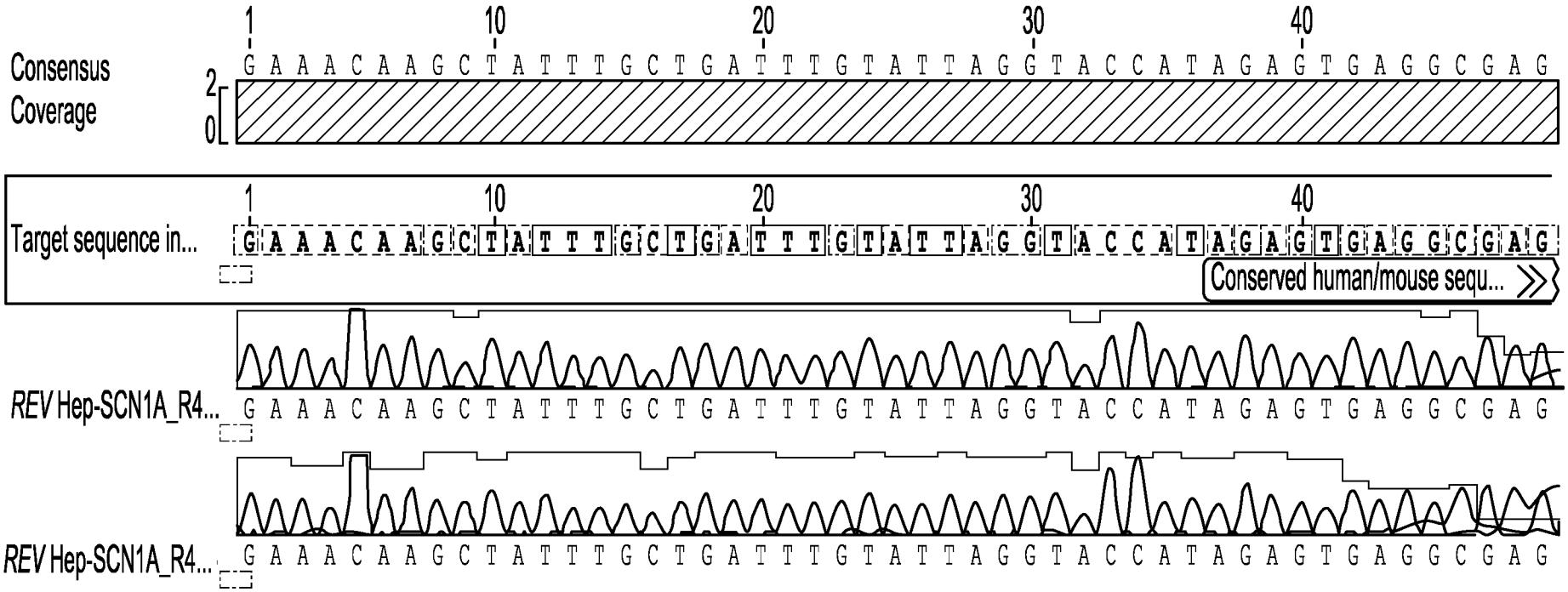

Consensus
Coverage
2
0
1
10
20
30
40
G A A A C A A G C T A T T T G C T G A T T T G T A T T A G G T A C C A T A G A G T G A G G C G A G
Target sequence in...
Conserved human/mouse sequ...
REV Hep-SCN1A_R4...
REV Hep-SCN1A_R4...

FIG. 1

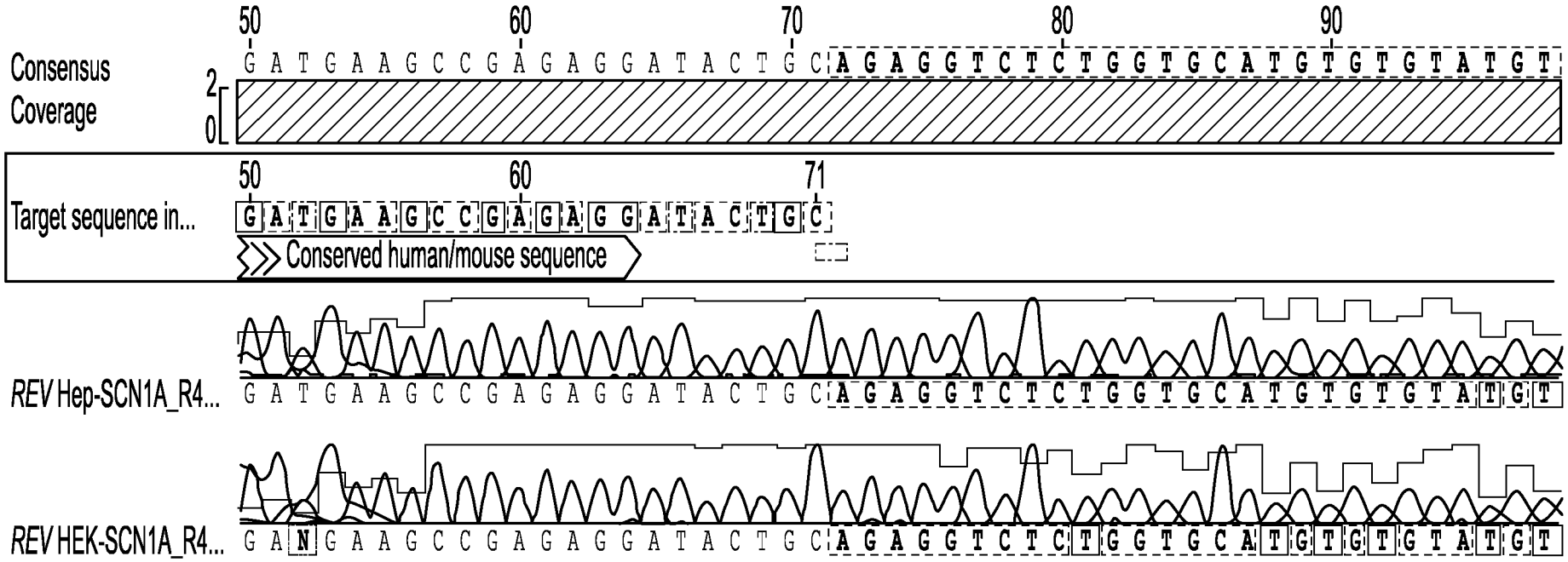


FIG. 1
CONTINUED

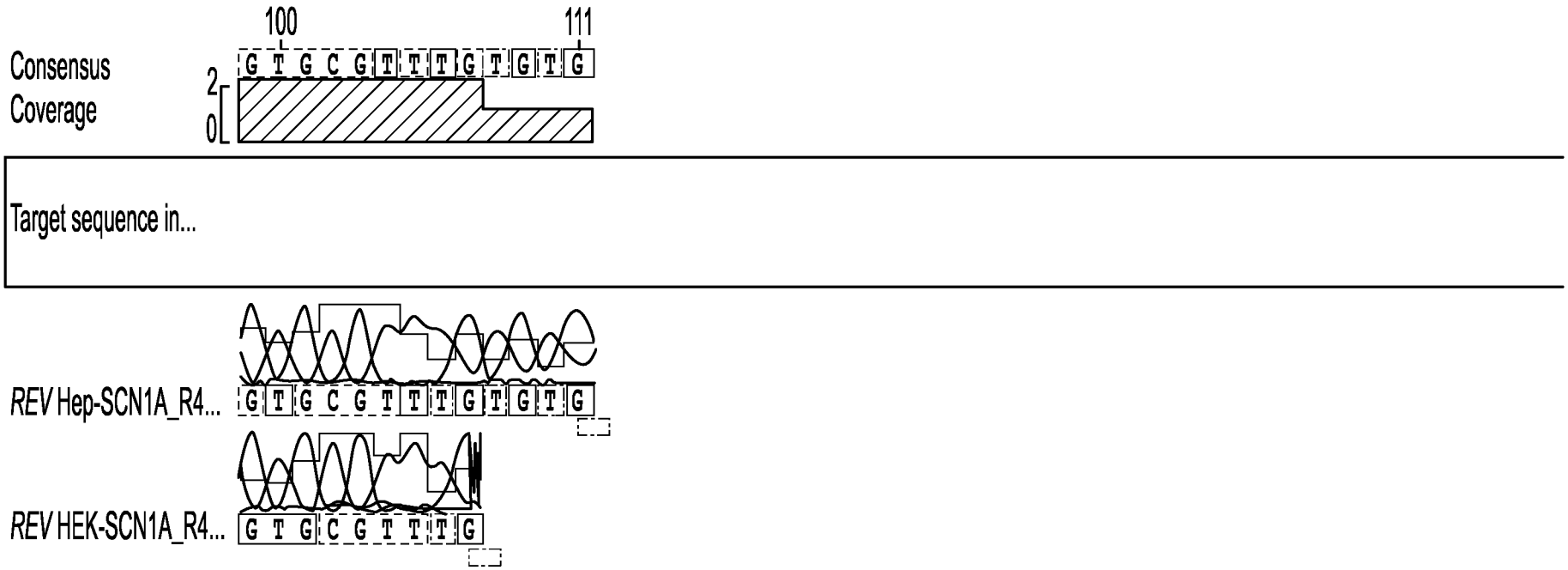


FIG. 1
CONTINUED

Reverse strand

```
Human AATTTCCATGGACTCTTTTTCCAAAGGAATAACT-GGAATGAATAAACT------TAAAATCAAGATGAAACAATTAGATGGCTTACCTGATTAAAAGGAAAATTATCCATCTGCAGTGA
Mouse TATTTCCGTGGGCTCTTCTCCCCAAGGATTTACCAGGTAAGAATTCACCACCAAAGAAGATCACAATGAGATAATCAGATGGCTTACCTGATAAAAAGGAAAATTATCCATCTGCAGTGA

Human GGAACAGCATCACCCAAAGACGAGATGATAACAATGTGCCTTCAGTTGCAATTGTTCAGATTCCTTCTTGCAAAAGGTGTCAAAGTA-TTTACAAGGGCTGCAGTCTCACTGGGGCAGAA
Mouse GGAGCAACATCTCCCCACGACCAGTC--------CGCACCTTCCGTTGCAACGATTCAGATTCCTTCTTGCAAAAGGTGACCAAGTGCTTCACAAGGGCTGCAGCCTCATAGGGGCAGAA

Human CACACAGACACACAAACACACACAAACGCACACATACACACATGCACCAGAGACCTCTGCAGTATCCTCTCGGCTTCATCCTCGCCTCACTCTATGGTACCTAATACAAATCAGCAAATA
Mouse CACAC--GTACACAAACACACGCA----CACACACACACACATGCACCAGAGACCTCTGCAGTATCCTCTCGGCTTCATCCTCGCCTCACTCTATGGTACCTAATACAAATCAGCAAATA

Human GCTTGTTTCAAAAAAAAA------AAAAAAAAGTCAAGACAGCACCTTACATTACATCGCCATCTAGTGGCTAAATATTAAACACTTTCTCACAATCCAGATTTATGATTTCTTCCTCAA
Mouse GCTTGTTTTAAAAAAAAAAGAAAGAAAAAAAAGCGGAGACAGCACCTAACGTTACAGTGCCATCTAGTGGCTACATCGTAAATAGGTTCTCACAGCCTGGATTTCTGTGTTCTTTCTCAA

Human CCTCTTTTCTCTCAGCCTTTTTTCCTTTCTTCTCTGTAATCTCCCAGTATTGCTTCTCC--TTGCTTCTCTTTCATTCCCTATTGCTATATAATATCATGAACCTAATGACTCAAAGAGG
Mouse CCGCTTCCTTCTGGTTCCTTTTTCTTTTTTCCTCTTTATTTTGGTTTTATTACTTCCTCAGATGCCTTTTTTTCATTCCCCTTTGCTCTGC-CTATCATGGAACTATTGACTTAAAGATT

Human AAAAGGTTTGAAAGTAAATATAGCTATTTTCAAGTAGTACTTGAAAAACTTTAGCATTATTTTAGTTTGAAACTGTTACTTTATTCCTAATATG
Mouse AAAACAATCAGAACTGGAGAGCGTTGCTTTTAAGT-----TAAAAAAAAAAAGGTGCTAATTTTGTTTGTAAATGTTACTTTATTTTCTCTATT
```

Conserved region of interest for ZFP design in bold

GAGTGAGGCGAGGATGAAGCCGAGAGGATACTGCAGAGGTC

FIG. 2

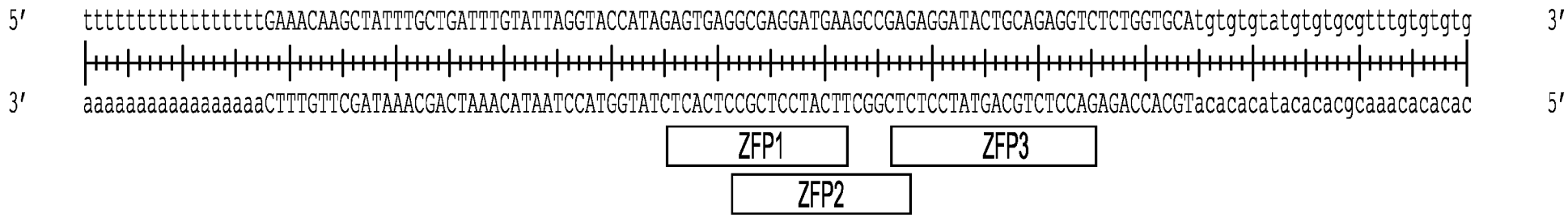


FIG. 3

tttttttttttttttttGAAACAAGCTATT
TGCTGATTTGTATTAGGTACCATA**GAG·TGA·GGC·GAG·GAT·GAA**GCCGAGAGGATACTGCAGAGGTCTCTGGTGCAtgtgtgtatgtgtgcgtttgtgtgtg

FIG. 4A

F1	GAA	QRGNLVR
F2	GAT	LSFNLTR
F3	GAG	RSDNLTR
F4	GGC	DRSHLAR
F5	TGA	QKAHLTA
F6	GAG	RSDNLTR

FIG. 4B

RP
FQCRICMRNFS *QRGNLVR* HIRTHTGEKP
FACDICGKKFA *LSFNLTR* HTKIHTGSQKP
FQCRICMRNFS *RSDNLTR* HIRTHTGEKP
FACDICGKKFA *DRSHLAR* HTKIHTGSQKP
FQCRICMRNFS *QKAHLTA* HIRTHTGEKP
FACDICGRKFA *RSDNLTR* HTKIH*LRQKD*

FIG. 4C

```
CGACCA
TTCCAGTGTCGAATCTGCATGCGCAACTTCAGC CAG CGG GGA AAC CTG GTG AGG CATATCCGCACCCACACGGGAGAGAAGCCT
TTTGCCTGCGATATTTGTGGAAAGAAGTTTGCT CTG AGC TTC AAT CTA ACC AGA CACACCAAGATTCATACTGGGTCCCAGAAACCG
TTCCAGTGTAGGATATGCATGAGGAATTTCTCT CGG AGT GAC AAC TTA ACG CGG CATATAAGGACGCACACAGGTGAAAAACCA
TTTGCATGCGACATCTGTGGCAAAAAGTTTGCG GAC CGG TCT CAC CTT GCC CGA CACACAAAAATCCATACCGGCAGTCAAAAGCCC
TTTCAATGTCGCATTTGCATGCGAAACTTCTCA CAG AAG GCC CAT TTG ACT GCC CATATTCGTACTCATACTGGCGAGAAACCT
TTCGCTTGCGATATATGTGGTCGTAAGTTTGCA CGG TCG GAC AAC CTC ACA CGC CACACTAAGATACACCTGCGGCAGAAGGAC
```

FIG. 4D

```
tttttttttttttttttGAAACAAGCTATT
TGCTGATTTGTATTAGGTACCATAGAGTGAGGC*GAG*GAT*GAA*GCC*GAGAGGATACTGCAGAGGTCTCTGGTGCAtgtgtgtatgtgtgcgtttgtgtgtg
```

FIG. 5A

F1	**GAGa**	**RSSNLTR**
F2	**GCC**	**DKRTLIR (PMID 25593323)**
F3	**GAA**	**QRGNLVR**
F4	**GAT**	**LSFNLTR**
F5	**GAG**	**RSDNLTR**
F6	**GGC**	**DRSHLAR**

FIG. 5B

```
RP
FQCRICMRNFS RSSNLTR HIRTHTGEKP
FACDICGKKFA DKRTLIR HTKIHTGSQKP
FQCRICMRNFS QRGNLVR HIRTHTGEKP
FACDICGKKFA LSFNLTR HTKIHTGSQKP
FQCRICMRNFS RSDNLTR HIRTHTGEKP
FACDICGRKFA DRSHLAR HTKIHLRQKD
```

FIG. 5C

```
CGACCA
TTCCAGTGTCGAATCTGCATGCGCAACTTCAGCCGA AGT TCC AAC CTG ACA CGG CATATCCGCACCCACACGGGAGAGAAGCCT
TTTGCCTGCGATATTTGTGGAAAGAAGTTTGCTGAC AAG CGG ACC TTA ATC CGC CACACCAAGATTCATACTGGGTCCCAGAAACCG
TTCCAGTGTAGGATATGCATGAGGAATTTCTCTCAG CGG GGA AAT CTA GTG CGA CATATAAGGACGCACACAGGTGAAAAACCA
TTTGCATGCGACATCTGTGGCAAAAAGTTTGCGCTG AGC TTC AAC TTG ACT CGT CACACAAAAATCCATACCGGCAGTCAAAAGCCC
TTTCAATGTCGCATTTGCATGCGAAACTTCTCACGG AGT GAC AAT CTT ACG AGA CATATTCGTACTCATACTGGCGAGAAACCT
TTCGCTTGCGATATATGTGGTCGTAAGTTTGCAGAC CGG AGC CAC TTA GCC AGG CACACTAAGATACACCTGCGGCAGAAGGAC
```

FIG. 5D

```
tttttttttttttttttGAAACAAGCTATT
TGCTGATTTGTATTAGGTACCATAGAGTGAGGCGAGGATGAAGCCGAGAC*GAT*ACT*GCA*GAG*GTCTCTGGTGCAtgtgtgtatgtgtgcgtttgtgtgtg
```

FIG. 6A

F1	*GTC*	DRSALAR
F2	*GAG*	RSDNLTR
F3	*GCA*	QSGDLTR
F4	*ACT*	VRQTLKQ
F5	*GAT*	AAGNLTR
F6	*GAG*	RSDNLTR

FIG. 6B

RP
FQCRICMRNFS DRSALAR HIRTHTGEKP
FACDICGKKFA RSDNLTR HTKIHTGSQKP
FQCRICMRNFS QSGDLTR HIRTHTGEKP
FACDICGKKFA VRQTLKQ HTKIHTGSQKP
FQCRICMRNFS AAGNLTR HIRTHTGEKP
FACDICGRKFA RSDNLTR HTKIH*LRQKD*

FIG. 6C

CGACCA
TTCCAGTGTCGAATCTGCATGCGCAACTTCAGC GAC CGG AGC GCG CTG GCA CGG CATATCCGCACCCAC ACGGGAGAGAAGCCT
TTTGCCTGCGATATTTGTGGAAAGAAGTTTGCT CGA AGT GAC AAC TTA ACG CGC CACACCAAGATTCAT ACTGGGTCCCAGAAACCG
TTCCAGTGTAGGATATGCATGAGGAATTTCTCT CAG TCA GGG GAC CTC ACT CGT CATATAAGGACGCAC ACAGGTCAAAAACCA
TTTGCATGCGACATCTGTGGCAAAAAGTTTGCG GTA CGA CAG ACG CTT AAA CAA CACACAAAAATCCAT ACCGGCAGTCAAAAGCCC
TTTCAATGTCGCATTTCCATGCGAAACTTCTCA GCC GCT GGT AAC TTG ACA CGA CATATTCGTACTCAT ACTGGCGAGAAACCT
TTCGCTTGCGATATATGTGGTCGTAAGTTTGCA AGA TCT GAT AAT CTA ACG CGT CACACTAAGATACAC CTGCGGCAGAAGGAC

FIG. 6D

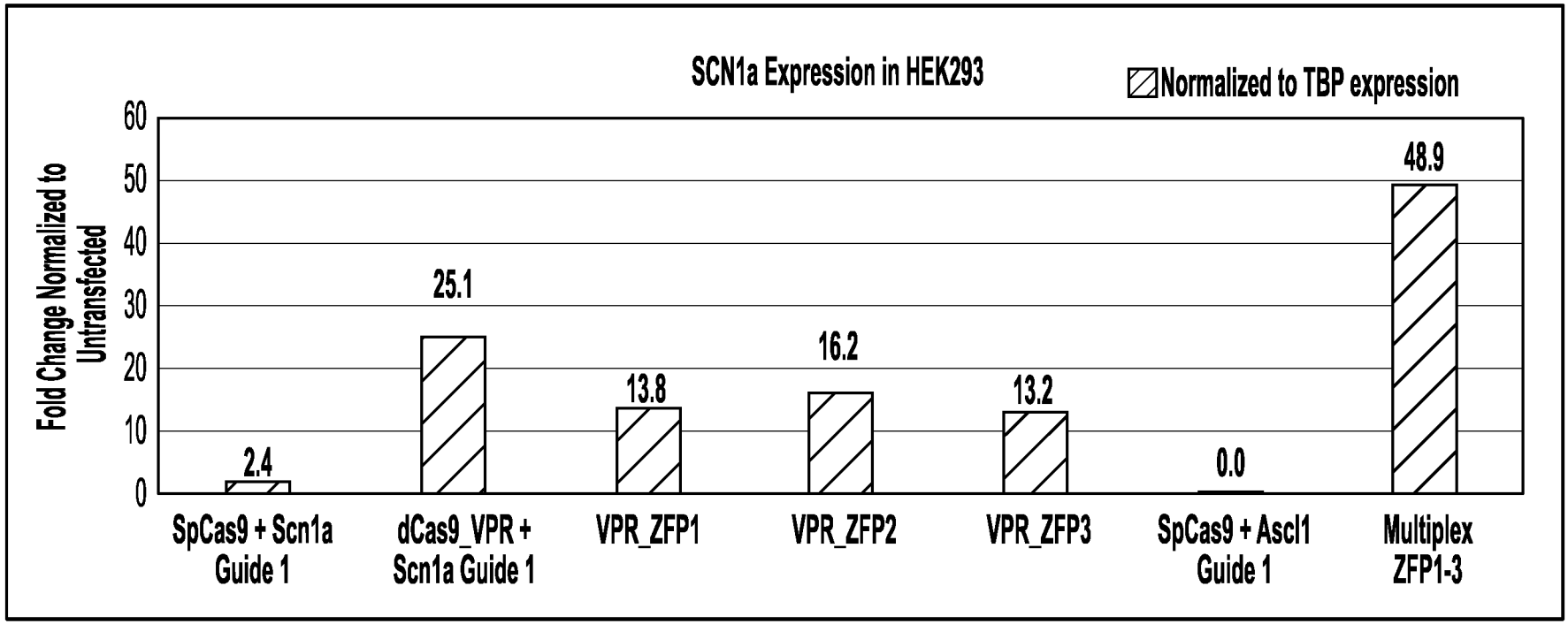

SCN1a Expression in HEK293
Normalized to TBP expression
Fold Change Normalized to Untransfected
60
50
40
30
20
10
0
2.4
25.1
13.8
16.2
13.2
0.0
48.9
SpCas9 + Scn1a Guide 1
dCas9_VPR + Scn1a Guide 1
VPR_ZFP1
VPR_ZFP2
VPR_ZFP3
SpCas9 + Ascl1 Guide 1
Multiplex ZFP1-3

FIG. 7

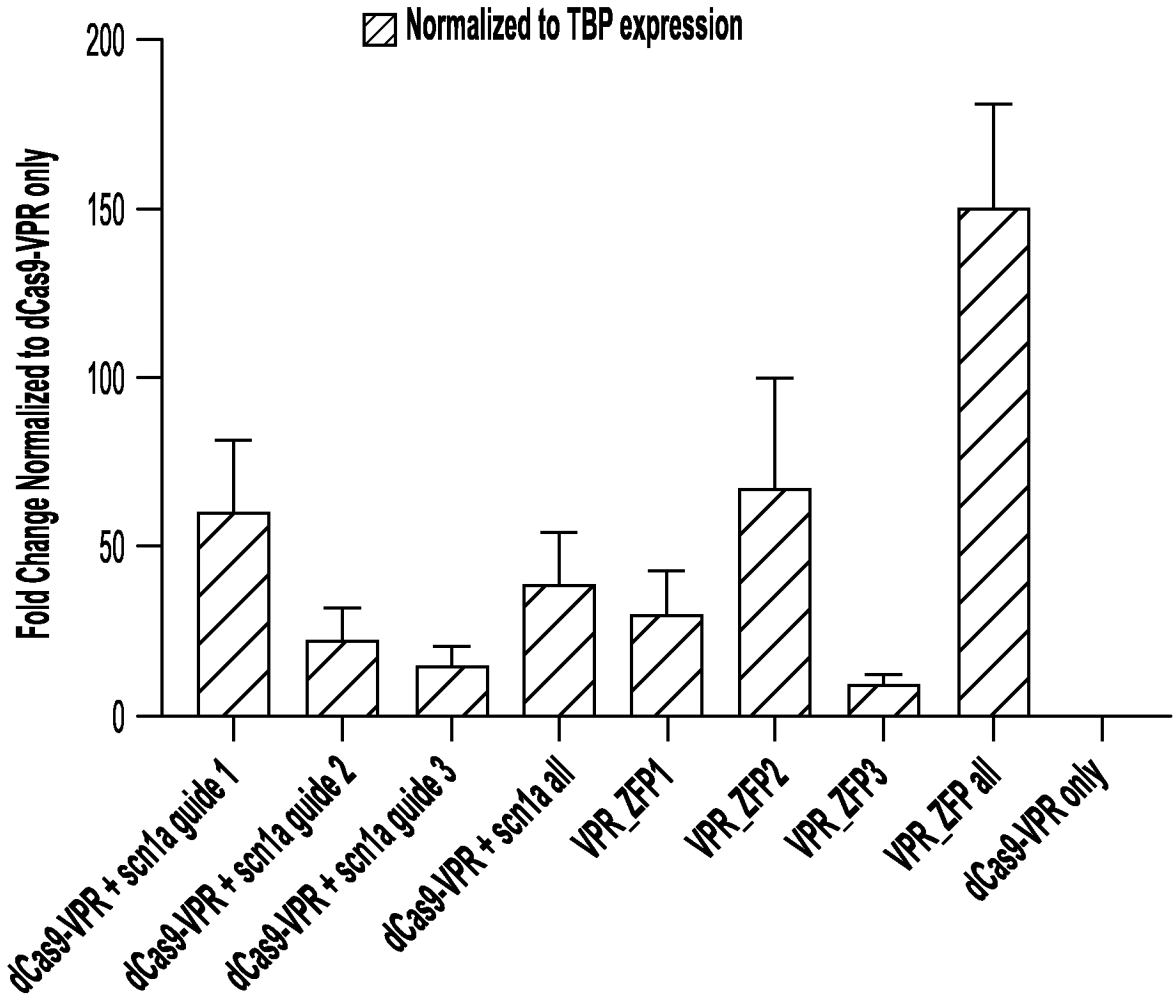

Normalized to TBP expression
Fold Change Normalized to dCas9-VPR only
200
150
100
50
0
dCas9-VPR + scn1a guide 1
dCas9-VPR + scn1a guide 2
dCas9-VPR + scn1a guide 3
dCas9-VPR + scn1a all
VPR_ZFP1
VPR_ZFP2
VPR_ZFP3
VPR_ZFP all
dCas9-VPR only

FIG. 8