

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **043766**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.06.21

(21) Номер заявки
201891192

(22) Дата подачи заявки
2016.11.15

(51) Int. Cl. *A61K 9/00* (2006.01)
A61K 38/46 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)

(54) **СРЕДСТВА И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ МИОПАТИЙ, СВЯЗАННЫХ С ТИТИНОМ, И ДРУГИХ ТИТИНОПАТИЙ**

(31) **62/255,887**

(32) **2015.11.16**

(33) **US**

(43) **2019.01.31**

(86) **PCT/US2016/062052**

(87) **WO 2017/087395 2017.05.26**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**РИСЁРЧ ИНСТИТЬЮТ ЭТ
НЕЙШНВАЙД ЧИЛДРЕН'С
ХОСПИТАЛ (US)**

(72) Изобретатель:
**Родио-Калапак Луис, Поттер Рэчел
(US)**

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

(56) US-A1-20150232883
US-A1-20150238627
US-A1-20100112694
ZOU et al.: "An internal promoter underlies the difference in disease severity between N- and C-terminal truncation mutations of Titin in zebrafish", eLife, 16 October 2015 (16.10.2015), vol. 4, pgs. 1-22, entire document
US-A1-20110023139

(57) Предложены средства и способы лечения пациента, страдающего миопатией, связанной с титином, в частности кардиомиопатией, связанной с титином, и/или другой титинопатией. Помимо этого, предложены средства и способы для редактирования гена титина в клетке путем редактирования генома.

043766
B1

043766
B1

Настоящая заявка испрашивает приоритет согласно предварительной заявке на патент США № 62/255887, поданной 16 ноября 2015 г., которая полностью включена в настоящую заявку посредством ссылки.

Область техники

Настоящая заявка относится к средствам и способам лечения пациента, страдающего миопатией, связанной с титином, в частности кардиомиопатией, связанной с титином, и/или другими титинопатиями. Помимо этого, настоящая заявка относится к средствам и способам редактирования гена титина в клетке путем редактирования генома.

Уровень техники

Белок титин, ранее называемый "коннектин", является самым большим белком в организме человека. Он выполняет функцию молекулярной пружины скелетных мышц. Ген титина человека расположен на хромосоме 2q31. Кодирующая область гена титина содержит 364 экзона, 363 из которых кодируют 38138 остатков аминокислот (4200 кДа) (номер доступа в GenBank AJ277892). Размер белка титина скелетных мышц составляет 3700 кДа, и его физическая длина в условиях *in vivo* составляет 2 мкм. Титин обладает механической, онтогенетической и регуляторной активностью в поперечнополосатых мышцах. Четыре области этого белка (Z-диск, I-полоса, A-полоса и M-линейный участок) простираются на длину половины основного строительного блока мышц, саркомера. См. фиг. 1, панель А (воспроизведенную из Cheveau et al., *Human Mutation*, 35(9):1046-1059 (2014)). Одна из основных функций титина заключается в том, чтобы удерживать сократительные элементы саркомера на месте, он также отвечает за эластичность мышц.

Титин имеет несколько сайтов для альтернативного сплайсинга, в результате этого в разных мышцах присутствуют изоформы различной длины (Bang et al., *Circ. Res.*, 89:1065-1072 (2001)). Было обнаружено, что изоформы I-полосы являются более длинными в скелетной мышце (3700 кДа), чем в сердечной мышце (2970-3300 кД), тогда как в Z-диске титины сердечной мышцы содержат больше повторяющихся мотивов, чем титины скелетных мышц (Gautel et al., *J. Cell Sci.*, 109:2747-2754, 1996; Sorimachi et al., *J. Mol. Biol.*, 270:688-695, 1997). Изоформа титина массой 700 кДа, усеченная на С-конце, экспрессируется в сердечной мышце (Bang et al., см. выше). Область M-линии титина также дифференциально экспрессируется, и идентифицированы две различные сплайс-изоформы: Mex5⁺ и Mex5⁻ (Labeit and Kolmerer, *Science*, 270:293-296, 1995; Kolmerer et al., *J. Mol. Biol.*, 256:556-563 1996; Sorimachi et al., см. выше). На ультраструктурном уровне карбокси-концевой эпитоп Mex6 титина и каталитический домен титинкиназы локализованы на периферии решетки M-линии (Obermann et al., *EMBO J.*, 16:211-220, 1997). Эпитопы титина Mex5/Mex6, каталитический домен титинкиназы, а также p94 и специфичный для мышц белок 1 безымянного пальца (MURF-1), которые связаны с указанной областью титина, могут образовывать сигнальный комплекс (Sorimachi et al., см. выше; Centner et al., *J. Mol. Biol.*, 306:717-726, 2001). Возникновение нескольких различных изоформ титина может иметь значение для селективного участия мышц в анатомически ограниченных миопатиях (Sorimachi et al., см. выше). Недавно было показано, что аутосомно-доминантная дилатационная кардиомиопатия связана с мутациями A-полосы титина в экзоне 326, которые вызывают сдвиг рамки считывания, и с мутацией в Z-диске титина (Siu et al., *Circulation*, 99:1022-1026 (1999); Gerull et al., *Nat. Genet.*, 30:201-204 (2002)).

Титин обеспечивает сайты связывания лигандов для большого количества других мышечных белков. См. фиг. 1, панель В (воспроизведенную из Cheveau et al., см. выше).

Альтернативный сплайсинг гена титина в различных клетках приводит к измененному составу изоформ и изменению пассивной жесткости белка, что, в свою очередь, влияет на функциональность и стабильность мышцы. В частности, в сердечной мышце фетальный сердечный титин имеет очень длинный пружинный сегмент; изоформа N2B у взрослых имеет более короткую и жесткую пружину; изоформа N2BA у взрослых имеет промежуточную и более эластичную пружину, и специфичная для скелетных мышц изоформа N2A имеет длинную пружину (LeWinter, *Circulation*, Jul 13 2004, 110(2):109-111). В нормальном сердце титин является основным определяющим фактором пассивной жесткости миокарда при физиологической длине саркомеров (Granzier et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Oct 7 2014, 111(40):14589-14594).

Снижающиеся количества изоформы N2BA в сердечной мышце характерны для мышц на конечной стадии сердечной недостаточности (McNally et al., *Cell metabolism*, Feb 3 2015, 21(2):174-182) и при ишемической дилатационной кардиомиопатии (DCM) (LeWinter & Granzier, *Journal of cardiovascular pharmacology*, Mar 2014, 63(3):207-212.; Makarenko et al., *Circulation research*, Oct 1 2004, 95(7):708-716; Jaber et al., *Circulation. Heart failure*, Sep 2008, 1(3):192-199). Пассивное напряжение саркомеров снижается примерно на 30% у взрослых пациентов с DCM, и такое снижение напряжения возникает в результате потери титина и увеличения фиброза (Makarenko et al., см. выше). Недавно у 5200 пациентов было проведено секвенирование титина для выявления патогенных мутаций, приводящих к DCM (Roberts et al., *Science translational medicine*, Jan 14 2015, 7(270):270ra276), и было выявлено, что 30% случаев семейной DCM обусловлены мутациями, связанными с титином, в частности мутациями, ведущими к усечению С-конца (Herman et al., *The New England Journal of Medicine*, 2012, 366(7):619-628; Gerull et al., см. выше; Itoh-Satoh et al., *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2002, 291(2):385-393; Gerull et al.,

Journal of Molecular Medicine, 2006, 84(6):478-483). Неишемическая форма DCM встречается у 1 из 250 человек и является важной причиной сердечных аритмий, сердечной недостаточности и трансплантаций сердца.

Поскольку ранее отсутствовали способы устранения или лечения миопатий, связанных с титином, или других титинопатий, в данной области техники существует потребность в продуктах и способах для лечения миопатий, связанных с титином, и/или других титинопатий.

Краткое описание изобретения

Согласно настоящему изобретению предложены способы создания постоянных изменений в геноме путем коррекции одной или более мутаций в гене титина с помощью редактирования генома и восстановления активности белка титина в условиях *ex vivo* и в условиях *in vivo*, которые можно применять для лечения кардиомиопатий, связанных с титином, и других титинопатий, а также компоненты, наборы и композиции для осуществления указанных способов, и клетки, полученные с их помощью.

Согласно одному аспекту предложены способы редактирования гена титина в клетке человека путем редактирования генома, включающие введение в клетку одной или более эндонуклеаз дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) для осуществления одного или более двухцепочечных разрывов (DSB) в пределах гена титина, что приводит к постоянной коррекции одной или более мутаций в гене титина и восстановлению активности белка титина.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения способы согласно настоящему изобретению представляют собой способы лечения пациента с кардиомиопатией, связанной с титином, или другой титинопатией в условиях *ex vivo*, включающие следующие этапы:

выполнение биопсии сердца пациента;

выделение сердечной клетки-предшественника, включая, но не ограничиваясь указанными, эндогенную сердечную стволовую клетку (eCSC) или первичный кардиомиоцит;

редактирование гена титина eCSC или первичного кардиомиоцита; и

имплантацию eCSC или первичного кардиомиоцита пациенту.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения этап выделения eCSC или первичного кардиомиоцита включает перфузию свежей ткани сердца расщепляющими ферментами, дифференциальное центрифугирование клеток и культивирование клеток.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения этап редактирования гена титина из eCSC или первичного кардиомиоцита включает введение в клетку-предшественника или первичный кардиомиоцит одной или более эндонуклеаз дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) для осуществления одного или более двухцепочечных разрывов (DSB) в гене титина, что приводит к постоянной коррекции одной или более мутаций в гене титина и восстановлению активности белка титина.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения этап имплантации eCSC или первичного кардиомиоцита пациенту включает имплантацию eCSC или первичного кардиомиоцита пациенту с помощью местной инъекции или системной инфузии.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложен способ лечения пациента с кардиомиопатией, связанной с титином, и/или другой титинопатией, включающий этап редактирования гена титина в клетке пациента.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения этап редактирования гена титина в клетке пациента в условиях *in vivo* включает введение в клетку одной или более эндонуклеаз дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) для осуществления одного или более двухцепочечных разрывов (DSB) в гене титина, что приводит к постоянной коррекции одной или более мутаций в гене титина и восстановлению активности белка титина.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения одна или более ДНК-эндонуклеаз представляют собой

эндонуклеазы Cas1, Cas1B, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8, Cas9 (также известную как Csn1 and Csx12), Cas100, Csy1, Csy2, Csy3, Cse1, Cse2, Csc1, Csc2, Csa5, Csn2, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csm6, Cmr1, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Csb1, Csb2, Csb3, Csx17, Csx14, Csx10, Csx16, CsaX, Csx3, Csx1, Csx15, Csf1, Csf2, Csf3, Csf4 или Cpf1; или

видовой гомолог, оптимизированный по кононам вариант или модифицированный вариант.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения ДНК-эндонуклеаза представляет собой эндонуклеазу Cas9. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения эндонуклеаза Cas9 представляет собой эндонуклеазу Cas9 *S. aureus*. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения эндонуклеаза Cas9 содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50% идентична эндонуклеазе Cas9 *S. aureus* и сохраняет по меньшей мере 90, 95 или 98% идентичность домену HNH и по меньшей мере 90, 95 или 98% идентичность домену RuvC. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения ДНК-эндонуклеаза представляет собой эндонуклеазу Cpf1. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения эндонуклеаза Cpf1 представляет собой эндонуклеазу Cpf1 из *Acidaminosoccus* sp. BV3L6. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения эндонуклеаза Cpf1 бактерии *Lachnospiraceae* ND2006. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобре-

тения эндонуклеаза Cpf1 содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 50% идентична эндонуклеазе из *Acidaminococcus* sp. BV3L6 или бактерии *Lachnospiraceae* ND2006 и сохраняет по меньшей мере 90, 95 или 98% идентичность домену RuvC.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения способ включает введение в клетку одного или более полинуклеотидов, кодирующих эндонуклеазу ДНК. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения способ включает введение в клетку одной или более рибонуклеиновых кислот (РНК), кодирующих эндонуклеазу ДНК. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения один или более полинуклеотидов или одна или более РНК представляют собой модифицированный полинуклеотид или РНК, необязательно включая модифицированные остовы, фрагменты сахаров, межнуклеозидные связи и модифицированные или универсальные основания.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения способ дополнительно включает введение в клетку одной или более направляющих рибонуклеиновых кислот (нРНК). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения одна или более нРНК представляют собой одноцепочечную молекулу нРНК (онРНК). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения одна или более нРНК или одна или более онРНК представляют собой модифицированную РНК, необязательно содержащую модифицированные остовы, фрагменты сахаров, межнуклеозидные связи и модифицированные или универсальные основания.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения одна или более ДНК-эндонуклеаз предварительно комбинированы с одной или более нРНК или онРНК.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения способ дополнительно включает введение в клетку полинуклеотидной донорной матрицы, содержащей часть гена титина дикого типа или кДНК.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения способ дополнительно включает введение в клетку одной направляющей рибонуклеиновой кислоты (нРНК) и полинуклеотидной донорной матрицы, содержащей часть гена титина дикого типа, при этом одна или более ДНК-эндонуклеаз представляют собой одну или более эндонуклеаз Cas9, которые осуществляют двухцепочечные разрывы (DSB) в локусе DSB в гене титина, что облегчает введение новой последовательности из полинуклеотидной донорной матрицы в хромосомную ДНК в локусе DSB, что приводит к постоянной коррекции части хромосомной ДНК гена титина, проксимально относительно локуса DSB, и восстановлению активности белка титина, и при этом указанная нРНК содержит последовательность спейсера, которая комплементарна сегменту локуса DSB. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения проксимальное положение обозначает нуклеотиды, расположенные в направлении как 5'-конца, так и 3'-конца относительно локуса DSB.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения способ дополнительно включает введение в клетку двух направляющих рибонуклеиновых кислот (нРНК) и полинуклеотидной донорной матрицы, содержащей часть гена титина дикого типа, при этом одна или более ДНК-эндонуклеаз представляют собой две или более эндонуклеаз Cas9, которые осуществляют пару двухцепочечных разрывов (DSB), первый в 5'-локусе DSB и второй в 3'-локусе DSB, внутри гена титина, что облегчает введение новой последовательности из полинуклеотидной донорной матрицы в хромосомную ДНК между 5'-локусом DSB и 3'-локусом DSB, что приводит к постоянной коррекции хромосомной ДНК между 5'-локусом DSB и 3'-локусом DSB в гене титина и восстановлению активности белка титина, при этом первая направляющая РНК содержит спейсерную последовательность, которая комплементарна сегменту 5'-локуса DSB, и вторая направляющая РНК содержит спейсерную последовательность, которая комплементарна сегменту 3'-локуса DSB.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения одна или две нРНК представляют собой одноцепочечную молекулу РНК (онРНК). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения одна или две нРНК или одна или две онРНК представляют собой модифицированную нРНК или модифицированную онРНК, необязательно содержащую модифицированные остовы, фрагменты сахаров, межнуклеозидные связи и модифицированные или универсальные основания.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения одна или более ДНК-эндонуклеаз предварительно комбинированы с одной или двумя нРНК или онРНК.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения DSB находится в экзоне титина 219, экзоне титина 242 или экзоне титина; или 5'-концевой DSB и 3'-концевой DSB находятся соответственно в интроне 218 и интроне 219 или соответственно в интроне 325 и интроне 327 гена титина.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения нРНК или онРНК направлена к одному или более из следующих патологических вариантов с.32854G>C, с.37112G>A и с.4362insAT.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения коррекция осуществляется путем гомологичной репарации (HDR).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения каждую из мРНК Cas9, нРНК и донорной матрицы по отдельности помещают в липидные наночастицы или все вместе помещают в липидную наночастицу. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения доставку

осуществляют посредством местной инъекции или системной инфузии.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения мРНК Cas9 представлена в виде липидной наночастицы, и нРНК и донорную матрицу доставляют с помощью аденоассоциированного вируса (AAV). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения доставку осуществляют посредством местной инъекции или системной инфузии.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения ген титина расположен на хромосоме 2q31 (Консорциум референсного генома - GRCh38/hg38).

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложена одна или более направляющих рибонуклеиновых кислот (нРНК), содержащих спейсерную последовательность, выбранную из группы, состоящей из спейсерных последовательностей, представленных на фигурах, для редактирования гена титина в клетке у пациента с кардиомиопатией, связанной с титином, или титинопатией. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения одна или более нРНК представляют собой одноцепочечные РНК (онРНК). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения одна или более нРНК или онРНК представляют собой модифицированную нРНК или модифицированную онРНК, необязательно содержащую модифицированные остовы, фрагменты сахаров, межнуклеозидные связи и модифицированные или универсальные основания.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложены клетки, которые были модифицированы с помощью вышеупомянутых способов, для постоянной коррекции одной или более мутаций в гене титина и восстановления активности белка титина. Помимо этого, согласно настоящему изобретению предложены способы облегчения кардиомиопатий, связанных с титином, и/или титинопатий путем введения пациенту клеток, геном которых был модифицирован с помощью вышеупомянутых способов.

Другие различные аспекты и варианты реализации описаны и приведены в настоящем документе в качестве примера.

Подробное описание изобретения

Титинопатии.

Титинопатия представляет собой состояние, связанное с гомозиготной или сложной гетерозиготной мутацией, которая инактивирует обе копии гена титина.

Существуют различные мутации, связанные с титинопатиями, которые представляют собой комбинацию миссенс-мутаций, нонсенс-мутаций, сдвига рамки считывания и других мутаций. Различные мутации распределены по экзонам гена. Основные мутации включают, но не ограничиваются указанными, с.32854G>C, с.37112G>A, с.4362insAT, с.43628insAT, р.ЕЕ3359 W33362delinsVKEK (публикация патента США № 20130171172 A1), с.62890delG, мутации, расположенные в экзонах 112-225, которые расположены в области PEVK титина, мутации в экзоне 48 (изоформа Novek 3) и мутации в сердечной изоформе N2B.

Миопатия, связанная с титином, представляет собой титинопатию, при которой мутация(и) в гене титина приводит к нарушению функции мышц. Нарушение функции мышц включает, но не ограничивается указанными, по меньшей мере одно из патологической мышечной усталости, мышечной слабости, повреждения мышц и/или фиброза мышц. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения миопатия, связанная с титином, представляет собой кардиомиопатию, связанную с титином.

Миопатии, связанные с титином, включают, но не ограничиваются указанными, центронукулярные миопатии, дистрофию Лейдена типа 2J, дилатационные кардиомиопатии, наследственную миопатию с ранней дыхательной недостаточностью, миопатию с ранним началом с фатальной кардиомиопатией, гипертрофическую кардиомиопатию и дистрофию большеберцовой мышцы.

Терапевтические подходы.

Согласно настоящему изобретению предложены способы использования инструментов модификации генома в условиях *ex vivo* и в условиях *in vivo*, чтобы создать постоянные изменения в геноме путем коррекции одной или более мутаций в гене титина и восстановить активность белка титина. Указанные способы основаны на применении эндонуклеаз, таких как нуклеазы CRISPR/Cas9, для постоянного восстановления природного сплайсинга или природной кодирующей области в геномном локусе гена титина.

Согласно настоящему изобретению предложены способы лечения пациента с кардиомиопатией, связанной с титином, или титинопатией. Вариант реализации указанного способа представляет собой терапию на основе клеток в условиях *ex vivo*.

Согласно некоторым вариантам реализации терапии на основе клеток в условиях *ex vivo* проводят биопсию сердца пациента. Затем из материала биопсии выделяют eCSC или первичный кардиомиоцит. Затем хромосомную ДНК из eCSC или первичного кардиомиоцита корректируют с использованием материалов и способов, описанных в настоящем документе. Наконец, eCSC или первичный кардиомиоцит с отредактированным геномом имплантируют пациенту.

Другой вариант реализации указанного способа представляет собой терапию в условиях *in vivo*. Согласно указанному способу хромосомную ДНК из клетки пациента корректируют с использованием материалов и способов, описанных в настоящем документе.

Преимущество генной терапии в условиях *in vivo* заключается в простоте терапевтического получения и введения. Аналогичный терапевтический подход и терапия будут перспективными при примене-

нии для лечения более чем одного пациента, например, ряда пациентов, которые имеют один и тот же или аналогичный генотип или аллель. Напротив, клеточная терапия в условиях *ex vivo* обычно требует использования собственных клеток пациента, которые выделены, обработаны и возвращены этому же пациенту.

Способы согласно настоящему изобретению, независимо от того, осуществляют ли указанный способ в условиях *ex vivo* или *in vivo*, включают любой из указанных этапов: коррекцию одной или более специфичных мутаций в гене или введение экзогенной последовательности кДНК титина или ее фрагмента в локус гена или в гетерологичное положение в геноме (например, безопасный участок закрепления, такой как AAVS1). Стратегии коррекции и введения нуклеотидов основаны на использовании донорной матрицы ДНК при гомологичной репарации (HDR). HDR в любой стратегии можно осуществлять путем создания одного или более двухцепочечных разрывов (DSB) в специфичных сайтах в геноме с использованием одной или более эндонуклеаз.

Например, стратегия коррекции включает коррекцию специфичной мутации в гене путем индукции одного двухцепочечного разрыва в гене, представляющем интерес, с использованием Cas9 и онРНК или двух или более двухцепочечных разрывов в гене, представляющем интерес, с использованием двух или более подходящих онРНК, в присутствии донорной матрицы ДНК, введенной экзогенно, чтобы направлять клеточный ответ на DSB на гомологичную репарацию (донорная матрица ДНК может представлять собой короткий одноцепочечный олигонуклеотид, короткий двухцепочечный олигонуклеотид, длинную одноцепочечную или двухцепочечную молекулу ДНК). Упомянутый подход требует разработки и оптимизации молекул нРНК и донорных молекул ДНК для всех основных вариантов гена титина.

Например, стратегия введения нуклеотидов включает введение кДНК титина дикого типа в локус гена с использованием онРНК или пары онРНК, нацеленных выше или в пределах экзона и/или интрона гена титина, или в безопасном сайте закрепления (например, AAVS1). Донорная ДНК будет представлять собой одно- или двухцепочечную ДНК, имеющую плечи, гомологичные области вставки.

Преимущества обеих стратегий (коррекции и введения нуклеотидов) сходны, включая в принципе краткосрочные и долгосрочные положительные клинические и лабораторные эффекты. Помимо этого, может оказаться, что для обеспечения терапевтического эффекта требуется только низкий процент активности титина. Другим преимуществом обеих стратегий является то, что большинство пациентов имеют низкий уровень активности гена и белка, в этой связи, как предполагают, дополнительная экспрессия белка, например, после коррекции гена, не обязательно должна приводить к иммунному ответу на целевой продукт гена. Подход введения нуклеотидов обеспечивает одно преимущество по сравнению с подходом коррекции, которое заключается в возможности лечения всех пациентов, в сравнении с подгруппой пациентов. Несмотря на то что в указанном гене имеются распространенные мутации, существует также много других возможных мутаций, и использование способа введения нуклеотидов может обеспечить лечение их всех.

В другом варианте стратегия удаления гена включает удаление экзона или экзонов гена титина, которые несут мутацию, для того чтобы вызвать сдвиг рамки считывания для коррекции рамки считывания и восстановления белка титина. Указанная стратегия основана на применении нРНК или пары нРНК для вырезания экзона (или "пропуска" экзона) с мутацией. В данной стратегии не применяется донорная матрица ДНК.

Клетки человека.

Для облегчения кардиомиопатий, связанных с титином, и/или титинопатий, описанных и проиллюстрированных в настоящем документе, основными мишенями редактирования генома являются клетки человека.

При проведении редактирования генома в аутологичных клетках, которые получены от пациента и, следовательно, уже полностью соответствуют пациенту, нуждающемуся в этом, можно создавать клетки, которые можно безопасно повторно вводить пациенту и эффективно создавать популяцию клеток, которые будут эффективными в устранении одного или более клинических состояний, связанных с заболеванием пациента.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетки человека с отредактированным геномом представляют собой клетки-предшественники скелетных мышц. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетки человека с отредактированным геномом представляют собой клетки скелетных мышц.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетки человека с отредактированным геномом представляют собой эндогенные сердечные стволовые клетки (eCSC) (идентификация: Torella et al., Cellular Molecular Life Science, 2007, 64:661-673; и Bearzi et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 2007, 104:14068-14073; типы клеток-предшественников, включая eCSCs: Sanganalmath and Bolli, Circulation Research, 2013, 113:810-834; выделение eCSC из биопсий сердца: D'Amario et al., Circ Res., 2011, 108:857-861). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетки человека с отредактированным геномом представляют собой первичные кардиомиоциты. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетки человека с отредактированным геномом представляют собой кардиомиоциты.

Выполнение биопсии.

Биопсия представляет собой образец ткани, взятый из организма. Биопсия может быть выполнена в соответствии с любым из способов, известных в данной области техники. Например, иглу вводят в сердце, чтобы захватить клетки сердца.

Выделение eCSC или первичного кардиомиоцита.

eCSC и первичные кардиомиоциты могут быть выделены в соответствии с любым способом, известным в данной области техники.

Редактирование генома.

Редактирование генома в целом относится к способу модификации нуклеотидной последовательности генома, предпочтительно точным или предварительно определенным способом. Примеры способов редактирования генома, описанные в настоящем документе, включают способы использования сайт-направленных нуклеаз, чтобы вырезать дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК) в точных целевых местах в геноме, создавая тем самым двухцепочечные или одноцепочечные разрывы ДНК в определенных местах в геноме. Такие разрывы могут быть и регулярно восстанавливаются с помощью природных эндогенных клеточных процессов, таких как гомологичная репарация (HDR) и негомологичное соединение концов (NHEJ), недавно рассмотренное в Cox et al., *Nature Medicine*, 21(2), 121-31 (2015). NHEJ обеспечивает непосредственное соединение концов ДНК, возникающих в результате разрыва двух нитей, иногда с потерей или добавлением нуклеотидной последовательности, которая может нарушить или усилить экспрессию гена. При HDR гомологичная последовательность, или донорная последовательность, используется в качестве матрицы для введения определенной последовательности ДНК в точке разрыва. Гомологичная последовательность может находиться в эндогенном геноме, таком как сестринская хроматида. В другом варианте донор может представлять собой экзогенную нуклеиновую кислоту, такую как плаزمид, одноцепочечный олигонуклеотид, двухцепочечный олигонуклеотид, дуплексный олигонуклеотид или вирус, который имеет области высокой гомологии с локусом, расщепленным нуклеазой, но который может также содержать дополнительную последовательность или изменения последовательности, включая делеции, которые могут быть включены в расщепленный целевой локус. Третий механизм восстановления представляет собой опосредованное микрогомологией соединение концов (MMEJ), также называемое "альтернативный NHEJ", при котором генетический результат аналогичен NHEJ в том, что небольшие делеции и вставки могут происходить в сайте расщепления. При MMEJ гомологичные последовательности нескольких пар оснований, фланкирующих сайт разрыва ДНК, используются для того чтобы стимулировать более благоприятный результат соединения концов ДНК, и последние сообщения дополнительно прояснили молекулярный механизм указанного процесса; см., например, Cho & Greenberg, *Nature*, 518, 174-76 (2015); Kent et al., *Nature Structural and Molecular Biology*, Adv. Online, DOI: 10.1038/nsmb.2961 (2015); Mateos-Gomez et al., *Nature*, 518, 254-57 (2015); Ceccaldi et al., *Nature*, 528, 258-62 (2015). В некоторых случаях можно предсказать вероятные результаты восстановления на основе анализа потенциальных микрогомологий в месте разрыва ДНК.

Каждый из указанных механизмов редактирования генома может быть использован для создания желательных геномных изменений. Один из этапов процесса редактирования генома заключается в создании одного или двух разрывов ДНК, причем последние представляют собой двухцепочечные разрывы или два одноцепочечных разрыва, в целевом локусе как можно ближе к месту предполагаемой мутации. Это может быть достигнуто с использованием сайт-направленных полипептидов, описанных и проиллюстрированных в настоящем документе.

Сайт-направленные полипептиды, такие как ДНК-эндонуклеаза, могут ввести двухцепочечные разрывы или одноцепочечные разрывы в нуклеиновые кислоты, например, геномную ДНК. Двухцепочечный разрыв может стимулировать эндогенные пути восстановления ДНК клеток (например, гомологичная репарация или негомологичное соединение концов или альтернативное негомологичное соединение концов (A-NHEJ) или соединение, опосредованное микрогомологией). NHEJ может восстанавливать расщепленную нуклеиновую кислоту-мишень без гомологичной матрицы. Иногда это может приводить к небольшим делециям или вставкам (indels) в целевой нуклеиновой кислоте в сайте расщепления, и может привести к нарушению или изменению экспрессии генов. HDR может происходить при наличии гомологичной матрицы для восстановления или донора. Гомологичная донорная матрица содержит последовательности, которые гомологичны последовательностям, фланкирующим целевой сайт расщепления нуклеиновой кислоты. Сестринская хроматида обычно используется клеткой в качестве матрицы для восстановления. Однако для целей редактирования генома матрица для восстановления часто обеспечивается в виде экзогенной нуклеиновой кислоты, такой как плазмид, дуплексный олигонуклеотид, одноцепочечный олигонуклеотид, двухцепочечный олигонуклеотид или вирусная нуклеиновая кислота. В случае применения экзогенных донорных матриц дополнительную последовательность нуклеиновой кислоты (например, трансген) или модификацию (такую как замена или делеция одного или более оснований) обычно вводят между фланкирующими областями гомологии так, что дополнительная или измененная последовательность нуклеиновой кислоты также встраивается в целевой локус. Сходство генетического результата MMEJ и NHEJ заключается в том, что небольшие делеции и вставки могут происходить в сайте расщепления. При MMEJ используются гомологичные последовательности нескольких пар осно-

ваний, фланкирующих сайт расщепления, чтобы стимулировать благоприятный результат восстановления ДНК путем соединения концов. В некоторых случаях можно предсказать вероятные результаты восстановления на основании анализа потенциальных микргомологий в областях расщепления нуклеазами.

Следовательно, в некоторых случаях гомологичная рекомбинация используется для вставки экзогенной полинуклеотидной последовательности в сайт расщепления нуклеиновой кислоты-мишени. Экзогенная полинуклеотидная последовательность называется донорным полинуклеотидом (или донором или донорной последовательностью или полинуклеотидной донорной матрицей). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения донорный полинуклеотид, часть донорного полинуклеотида, копию донорного полинуклеотида или часть копии донорного полинуклеотида вводят в сайт расщепления нуклеиновой кислоты-мишени. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения донорный полинуклеотид представляет собой экзогенную полинуклеотидную последовательность, т.е. последовательность, которая в природных условиях не встречается в сайте расщепления нуклеиновой кислоты-мишени.

Модификации ДНК-мишени в результате NHEJ и/или HDR могут приводить, например, к мутациям, делециям, изменениям, интеграциям, коррекции гена, замене гена, введению метки в гены, вставке трансгена, делеции нуклеотида, разрушению гена, транслокациям и/или мутации гена. Способы удаления геномной ДНК и интеграции ненативной нуклеиновой кислоты в геномную ДНК являются примерами редактирования генома.

Системы для модификации генома, такие как ZFN, TALEN, HE и MegaTAL, позволяют модифицировать определенную область ДНК. Совсем недавно были описаны системы CRISPR/Cas.

Эндонуклеазная система CRISPR.

В геноме многих прокариот (например, бактерий и архей) можно обнаружить геномные локусы CRISPR (кластерные короткие палиндромные повторы, разделенные регулярными промежутками). У прокариот локус CRISPR кодирует продукты, которые функционируют как тип иммунной системы, чтобы облегчить защиту прокариот от чужеродных патогенов, таких как вирус и фаг. Выделяют три этапа функционирования локуса CRISPR: интеграция новых последовательностей в локус, биогенез РНК CRISPR (сгРНК) и подавление нуклеиновой кислоты чужеродного патогена. Было идентифицировано пять типов систем CRISPR (например, тип I, тип II, тип III, тип U и тип V).

Локус CRISPR содержит несколько коротких повторяющихся последовательностей, называемых "повторы". Повторы могут образовывать шпильчатые структуры и/или содержат неструктурированные одноцепочечные последовательности. Повторы обычно встречаются в кластерах и часто различаются между видами. Повторы регулярно разделены уникальными вставочными последовательностями, называемыми "спейсеры", в результате структура локуса имеет вид повтор-спейсер-повтор. Спейсеры являются идентичными или имеют высокую степень гомологии с известными последовательностями чужеродного патогена. Блок спейсер-повтор кодирует сгсрРНК (сгРНК), которая подвергается процессингу с образованием зрелой формы блока спейсер-повтор. СгРНК содержит "затравку" или спейсерную последовательность, которая участвует в нацеливании нуклеиновой кислоты-мишени (у прокариот спейсерная последовательность в природной форме нацелено воздействует на нуклеиновую кислоту чужеродного патогена). Спейсерная последовательность находится на 5'-конце или 3'-конце сгРНК.

Локус CRISPR также содержит полинуклеотидные последовательности, кодирующие гены, связанные с CRISPR (Cas). Гены Cas кодируют эндонуклеазы, участвующие в биогенезе и этапах интерференции с участием сгРНК у прокариот. Некоторые гены Cas содержат гомологичные вторичные и/или третичные структуры.

Системы CRISPR типа II.

Биогенез сгРНК в системе CRISPR типа II в природных условиях требует транс-активирующей РНК CRISPR (трасгРНК). ТрасгРНК модифицируется эндогенной РНКазой III и затем гибридизуется с повтором сгРНК в матрице-предшественнике сгРНК. Эндогенная РНКаза III привлекается для расщепления пре-кРНК. Расщепленные сгРНК подвергаются обрезке экзорибонуклеазами, чтобы получить зрелую форму сгРНК (например, 5'-концевая обрезка). ТрасгРНК остается гибридизованной с сгРНК, и трасгРНК и сгРНК связываются с сайт-направленным полипептидом (например, Cas9). СгРНК комплекса сгРНК-трагсРНК-Cas9 направляет комплекс к нуклеиновой кислоте-мишени, с которой может гибридизоваться сгРНК. Гибридизация сгРНК с нуклеиновой кислотой-мишенью активирует Cas9 для нацеленного расщепления нуклеиновой кислоты. Нуклеиновая кислота-мишень в системе CRISPR типа II называется мотивом, прилегающим к протоспейсеру (PAM). В природе PAM имеет большое значение для облегчения связывания сайт-направленного полипептида (например, Cas9) с нуклеиновой кислотой-мишенью. Системы типа II (также называемые NmeII или CASS4) дополнительно подразделяются на тип II-A (CASS4) и II-B (CASS4a). Jinek et al., Science, 337(6096):816-821 (2012) показали, что систему CRISPR/Cas9 можно применять для РНК-программируемого редактирования генома, в публикации международной заявки на патент WO 2013/176772 представлены многочисленные примеры и способы применения эндонуклеазной системы CRISPR/Cas для сайт-специфичного редактирования генома.

Системы CRISPR типа V.

Системы CRISPR типа V имеют несколько важных отличий от систем типа II. Например, Cpf1

представляет собой единственную эндонуклеазу, направляемую РНК, которая, в отличие от систем типа II, лишена tracrPНК. Zetsche et al., Cell, 163:1-13 (2015). Действительно Cpf1-ассоциированные матрицы CRISPR подвергаются процессингу с образованием зрелых crPНК без потребности в дополнительной транс-активирующей tracrPНК. Матрица CRISPR типа V подвергается процессингу с образованием коротких зрелых kPНК, содержащих 42-44 нуклеотида, причем каждая зрелая kPНК начинается с 19 нуклеотидов прямого повтора, за которыми следуют 23-25 нуклеотидов спейсерной последовательности. Напротив, зрелые kPНК в системах типа II начинаются с 20-24 нуклеотидов спейсерной последовательности, за которыми следуют приблизительно 22 нуклеотида прямого повтора. Кроме того, Cpf1 использует Т-обогащенный мотив, прилегающий к протоспейсеру, так, что комплексы Cpf1-crPНК эффективно расщепляют ДНК-мишень, перед которой расположен Т-обогащенный PAM, в отличие от G-обогащенного PAM после ДНК-мишени для систем типа II. Следовательно, системы типа V расщепляют в точке, удаленной от PAM, в то время как системы типа II расщепляют в точке, расположенной рядом с PAM. Помимо этого, в отличие от систем типа II, Cpf1 расщепляет ДНК посредством ступенчатого двухцепочечного разрыва ДНК с образованием 4 или 5 нуклеотидного 5'-концевого выступа. Системы типа II расщепляют посредством тупого двухцепочечного разрыва. Подобно системам типа II Cpf1 содержит предсказанный RuvC-подобный эндонуклеазный домен, но в отличие от систем типа II не содержит второго эндонуклеазного домена HNH.

Гены/полипептиды Cas и мотивы, прилегающие к протоспейсеру.

Примеры полипептидов CRISPR/Cas включают полипептиды Cas9 на фиг. 1, описанные в Fonfara et al., Nucleic Acids Research, 42: 2577-2590 (2014). Система наименования генов CRISPR/Cas подверглась обширной переработке, поскольку были обнаружены гены Cas. На фиг. 5 из Fonfara, выше, представлены последовательности PAM для полипептидов Cas9 из разных видов.

Сайт-направленные полипептиды.

Сайт-направленный полипептид представляет собой нуклеазу, используемую для расщепления ДНК при редактировании генома. Сайт-направленный полипептид может быть введен в клетку или пациенту в виде одного или более полипептидов или одной или более мPНК, кодирующих полипептид.

Применительно к системе CRISPR/Cas или CRISPR/Cpf1 сайт-направленный полипептид может связываться с направляющей РНК, которая, в свою очередь, определяет сайт в ДНК-мишени, к которой направлен полипептид. В вариантах реализации систем CRISPR/Cas или CRISPR/Cpf1 в настоящем документе сайт-направленный полипептид представляет собой эндонуклеазу, такую как ДНК-эндонуклеаза.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения сайт-направленный полипептид содержит множество доменов, расщепляющих нуклеиновую кислоту (т.е. нуклеазных доменов). Два или более доменов, расщепляющих нуклеиновую кислоту, могут быть связаны между собой посредством линкера. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения линкер содержит гибкий линкер. Линкеры могут содержать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40 или более аминокислот.

Природные ферменты Cas9 дикого типа содержат два нуклеазных домена, нуклеазный домен HNH и домен RuvC. В настоящей заявке "Cas9" относится к природным и рекомбинантным Cas9. Ферменты Cas9, включенные в область настоящего изобретения, включают HNH или HNH-подобный нуклеазный домен и/или RuvC или RuvC-подобный нуклеазный домен.

HNH или HNH-подобные домены содержат McrA-подобную складку. HNH или HNH-подобные домены содержат две антипараллельные β-цепи и α-спираль. HNH или HNH-подобные домены содержат сайт связывания металла (например, сайт связывания двухвалентного катиона). HNH или HNH-подобные домены могут расщеплять одну цепь нуклеиновой кислоты-мишени (например, комплементарную цепь для цепи-мишени crPНК).

RuvC или RuvC-подобные домены содержат РНКазу Н или РНКазу Н-подобную складку. Домены RuvC/РНКазы Н вовлечены в разнообразные функции с участием нуклеиновых кислот, включая воздействие на РНК и ДНК. Домен РНКазы Н содержит 5 β-цепей, окруженных множеством α-спиралей. RuvC/РНКазы Н или RuvC/РНКазы Н-подобные домены содержат сайт связывания металла (например, сайт связывания двухвалентного катиона). RuvC/РНКазы Н или RuvC/РНКазы Н-подобные домены могут расщеплять одну цепь нуклеиновой кислоты-мишени (например, некомплементарную цепь двухцепочечной ДНК-мишени).

Сайт-направленные полипептиды могут вводить двухцепочечные разрывы или одноцепочечные разрывы в нуклеиновых кислотах, например в геномной ДНК. Двухцепочечный разрыв может стимулировать эндогенные пути восстановления ДНК клеток (например, гомологичная репарация (HDR) или негомологичное соединение концов (NHEJ) или альтернативное негомологичное соединение концов (A-NHEJ) или опосредованное микрогомологией соединение концов (MMEJ)). NHEJ может восстанавливать расщепленную нуклеиновую кислоту-мишень без необходимости в гомологичной матрице. Иногда это может приводить к небольшим делециям или вставкам (indels) в нуклеиновой кислоте-мишени в сайте расщепления и может вызвать нарушение или изменение экспрессии генов. HDR может происходить при наличии матрицы для гомологичной репарации или донора. Гомологичная донорная матрица содержит

последовательности, которые гомологичны последовательностям, фланкирующим сайт расщепления нуклеиновой кислоты-мишени. Сестринская хроматида обычно используется клеткой в качестве матрицы для восстановления. Однако для целей редактирования генома матрица для восстановления часто обеспечивается в виде экзогенной нуклеиновой кислоты, такой как плаزمид, дуплексный олигонуклеотид, одноцепочечный олигонуклеотид или вирусная нуклеиновая кислота. В случае экзогенных донорных матриц обычно вводят дополнительную последовательность нуклеиновой кислоты (например, трансген) или модификацию (например, замену или делецию одного или более оснований) между гомологичными фланкирующими областями так, что дополнительная или измененная последовательность нуклеиновой кислоты также встраивается в целевой локус. Сходство генетического результата ММЕJ и NHEJ заключается в том, что в сайте расщепления могут происходить небольшие делеции и вставки. ММЕJ использует гомологичные последовательности из нескольких пар оснований, фланкирующие сайт расщепления, чтобы стимулировать благоприятное восстановление ДНК путем соединения концов. В некоторых случаях возможно предсказать вероятные результаты восстановления на основе анализа потенциальных микрогомологий в областях-мишенях нуклеаз.

Следовательно, в некоторых случаях гомологичная рекомбинация используется для вставки экзогенной полинуклеотидной последовательности в сайт расщепления нуклеиновой кислоты-мишени. Экзогенная полинуклеотидная последовательность называется в настоящем документе донорным полинуклеотидом (или донором или донорной последовательностью). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения донорный полинуклеотид, часть донорного полинуклеотида, копию донорного полинуклеотида или часть копии донорного полинуклеотида вводят в сайт расщепления нуклеиновой кислоты-мишени. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения донорный полинуклеотид представляет собой экзогенную полинуклеотидную последовательность, т.е. последовательность, которая в природных условиях не встречается в сайте расщепления нуклеиновой кислоты-мишени.

Модификации ДНК-мишени вследствие NHEJ и/или HDR могут привести, например, к мутациям, делециям, изменениям, интеграциям, коррекции гена, замене гена, введению метки в ген, вставке трансгена, делеции нуклеотида, разрушению гена, транслокации и/или мутации гена. Способы удаления геномной ДНК и интеграции ненативной нуклеиновой кислоты в геномную ДНК являются примерами редактирования генома.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения сайт-направленный полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична примерной аминокислотной последовательности сайт-направленного полипептида дикого типа (например, Cas9 из *S. aureus*, описанной в Ran et al., *Nature*, 520(7546):186-191 (2015), Crpf1 из *Acidaminococcus* sp. BV3L6 или эндонуклеазы бактерии *Lachnospiraceae* ND2006, описанных в Zetsche et al., *Cell*, 163:1-13 (2015); и различных других сайт-направленных полипептидов).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения сайт-направленный полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична аминокислотной последовательности нуклеазного домена дикого типа типичного сайт-направленного полипептида.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения сайт-направленный полипептид по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 99 или 100% идентичен сайт-направленному полипептиду дикого типа на протяжении участка из 10 последовательных аминокислот. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения сайт-направленный полипептид не более чем на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 99 или 100% идентичен сайт-направленному полипептиду дикого типа на протяжении участка из 10 последовательных аминокислот. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения сайт-направленный полипептид по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 99 или 100% идентичен сайт-направленному полипептиду дикого типа на протяжении участка из 10 последовательных аминокислот в нуклеазном домене HNH сайт-направленного полипептида. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения сайт-направленный полипептид не более чем на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 99 или 100% идентичен сайт-направленному полипептиду дикого типа на протяжении участка из 10 последовательных аминокислот в нуклеазном домене HNH сайт-направленного полипептида. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения сайт-направленный полипептид по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 99 или 100% идентичен сайт-направленному полипептиду дикого типа на протяжении участка из 10 последовательных аминокислот в нуклеазном домене RuvC сайт-направленного полипептида. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения сайт-направленный полипептид не более чем на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 99 или 100% идентичен сайт-

направленному полипептиду дикого типа на протяжении участка из 10 последовательных аминокислот в нуклеазном домене RuvC сайт-направленного полипептида.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения сайт-направленный полипептид содержит модифицированную форму примерного сайт-направленного полипептида дикого типа. Модифицированная форма примерного сайт-направленного полипептида дикого типа содержит мутацию, которая снижает активность сайт-направленного полипептида, направленную на расщепление нуклеиновой кислоты. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения модифицированная форма примерного сайт-направленного полипептида дикого типа имеет менее 90%, менее 80%, менее 70%, менее 60%, менее 50%, менее 40%, менее 30%, менее 20%, менее 10%, менее 5% или менее 1% активности примерного сайт-направленного полипептида дикого типа, направленной на расщепление нуклеиновой кислоты. Модифицированная форма сайт-направленного полипептида может не иметь существенной активности, направленной на расщепление нуклеиновой кислоты. Если сайт-направленный полипептид представляет собой модифицированную форму, которая не имеет существенной активности, направленной на расщепление нуклеиновой кислоты, он называется в настоящем документе "ферментативно неактивный".

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения модифицированная форма сайт-направленного полипептида содержит мутацию так, что он может индуцировать одноцепочечный разрыв (SSB) на нуклеиновой кислоте-мишени (например, путем разрезания только одного из сахарофосфатных остовов двухцепочечной нуклеиновой кислоты). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения мутация приводит к менее чем 90%, менее чем 80%, менее чем 70%, менее чем 60%, менее чем 50%, менее чем 40%, менее чем 30%, менее чем 20%, менее чем 10%, менее чем 5% или менее чем 1% активности, направленной на расщепление нуклеиновой кислоты, в одном или более из множества доменов, расщепляющих нуклеиновую кислоту, сайт-направленного полипептида дикого типа. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения мутация приводит к сохранению способности одного или более из множества доменов, расщепляющих нуклеиновую кислоту, расщеплять комплементарную цепь нуклеиновой кислоты-мишени, но к снижению его способности расщеплять некомплементарную цепь нуклеиновой кислоты-мишени. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения мутация приводит к сохранению способности одного или более из множества доменов, расщепляющих нуклеиновую кислоту, расщеплять некомплементарную цепь нуклеиновой кислоты-мишени, но к снижению его способности расщеплять комплементарную цепь нуклеиновой кислоты-мишени. Специалист в данной области техники поймет, что подходящими являются мутации, отличные от замены аланином.

Сайт-направленные полипептиды, которые содержат один по существу неактивный нуклеазный домен, называются "никазы".

Варианты никазы Cas9 могут быть использованы для повышения специфичности CRISPR-опосредованного редактирования генома. Cas9 дикого типа, как правило, направляется одной направляющей РНК, предназначенной для гибридизации со специфичной ~20-нуклеотидной последовательностью в целевой последовательности (такой как эндогенный геномный локус). Однако несколько несовпадений могут быть допущены между направляющей РНК и локусом-мишенью, эффективно уменьшая длину требуемой гомологичной последовательности в сайте-мишени, например, всего 13 гомологичных нуклеотидов, что тем самым приводит к повышенной вероятности связывания и двухцепочечного расщепления нуклеиновой кислоты комплексом CRISPR/Cas9 в другом месте в целевом геноме, этот процесс также известен как нецелевое расщепление. Поскольку каждый из вариантов никазы Cas9 разрезает только одну цепь, то для создания двухцепочечного разрыва пара никак должна связаться в непосредственной близости и на противоположных цепях нуклеиновой кислоты-мишени, создавая тем самым пару надрезов, что является эквивалентом двухцепочечного разрыва. Для осуществления этого процесса необходимо, чтобы две отдельные направляющие РНК, по одной для каждой никазы, связались в непосредственной близости и на противоположных цепях нуклеиновой кислоты-мишени. Данное требование существенно удваивает минимальную длину гомологичной области, необходимую для осуществления двухцепочечного разрыва, уменьшая тем самым вероятность того, что событие двухцепочечного разрыва будет происходить в другом месте в геноме, где сайты двух направляющих РНК, если они существуют, маловероятно могут быть расположены достаточно близко друг к другу, чтобы обеспечить образование двухцепочечного разрыва. Как описано в данной области техники, никазы также можно использовать, чтобы стимулировать HDR, в сравнении с NHEJ. HDR можно использовать для введения выбранных изменений в целевые сайты в геноме путем использования специфичных донорных последовательностей, которые эффективно опосредуют желательные изменения. Описания различных систем CRISPR/Cas для использования в редактировании генома можно найти, например, в публикации международной заявки на патент WO 0201/176772; Ran et al., см. выше; и в Nature Biotechnology, 32, 347-355 (2014), а также в ссылках, процитированных в настоящем документе.

Мутации, включенные в область настоящего изобретения, включают замены, добавления и делеции или любую их комбинацию. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения мутация превращает мутированную аминокислоту в аланин. Согласно некоторым вариантам реализации на-

стоящего изобретения мутация превращает мутированную аминокислоту в другую аминокислоту (например, глицин, серин, треонин, цистеин, валин, лейцин, изолейцин, метионин, пролин, фенилаланин, тирозин, триптофан, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, аспарагины, глутамин, гистидин, лизин или аргинин). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения мутация превращает мутированную аминокислоту в неприродную аминокислоту (например, селенометионин). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения мутация превращает мутированную аминокислоту в миметики аминокислот (например, фосфомиметики). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения мутация представляет собой консервативную мутацию. Например, мутация может превращать мутированную аминокислоту в аминокислоты, которые сходны по размеру, форме, заряду, полярности, конформации и/или сходны с ротамерами мутированных аминокислот (например, мутация цистеин/серин, мутация лизин/аспарагин, мутация гистидин/фенилаланин). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения мутация вызывает сдвиг в рамке считывания и/или создание преждевременного стоп-кодона. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения мутации вызывают изменения в регуляторных областях генов или локусов, которые влияют на экспрессию одного или более генов.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения сайт-направленный полипептид (например, вариант, мутированный, ферментативно неактивный и/или условно ферментативно неактивный сайт-направленный полипептид) нацелен на нуклеиновую кислоту. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения сайт-направленный полипептид (например, вариант, мутированная, ферментативно неактивная и/или условно ферментативно неактивная эндорибонуклеаза) нацелен на РНК.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения сайт-направленный полипептид содержит одну или более ненативных последовательностей (например, сайт-направленный полипептид представляет собой гибридный белок).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения сайт-направленный полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 15% идентична аминокислотной последовательности Cas9 из бактерии (например, *S. aureus*), домен, связывающий нуклеиновую кислоту, и два домена, расщепляющих нуклеиновую кислоту (т.е. домен HNH и домен RuvC).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения сайт-направленный полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 15% идентична аминокислотной последовательности Cas9 из бактерии (например, *S. aureus*), и два домена, расщепляющих нуклеиновую кислоту (т.е. домен HNH и домен RuvC).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения сайт-направленный полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 15% идентична аминокислотной последовательности Cas9 из бактерии (например, *S. aureus*), и два домена, расщепляющих нуклеиновую кислоту, при этом один или оба из доменов, расщепляющих нуклеиновую кислоту, по меньшей мере на 50% идентичны аминокислотной последовательности нуклеазного домена из Cas9 из бактерии (например, *S. aureus*).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения сайт-направленный полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 15% идентична аминокислотной последовательности Cas9 из бактерии (например, *S. aureus*), два домена, расщепляющих нуклеиновую кислоту (т.е. домен HNH и домен RuvC), и ненативную последовательность (например, сигнал ядерной локализации) или линкер, соединяющий сайт-направленный полипептид с ненативной последовательностью.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения сайт-направленный полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 15% идентична аминокислотной последовательности Cas9 из бактерии (например, *S. aureus*), два домена, расщепляющих нуклеиновую кислоту (т.е. домен HNH и домен RuvC), при этом сайт-направленный полипептид содержит мутацию в одном или обоих доменах, расщепляющих нуклеиновую кислоту, что снижает активность расщепления нуклеазных доменов по меньшей мере на 50%.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения сайт-направленный полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 15% идентична аминокислотной последовательности Cas9 из бактерии (например, *S. aureus*), и два домена, расщепляющих нуклеиновую кислоту (т.е. домен HNH и домен RuvC), при этом один из нуклеазных доменов содержит мутацию аспарагиновой кислоты в положении 10, и/или при этом один из нуклеазных доменов содержит мутацию гистидина в положении 840, причем указанная мутация снижает активность расщепления нуклеазного домена (доменов) по меньшей мере на 50%.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения один или более сайт-направленных полипептидов, например, ДНК-эндонуклеаз, включают две никазы, которые совместно осуществляют один двухцепочечный разрыв в специфичном локусе в геноме, или четыре никазы, которые совместно осуществляют два двухцепочечных разрыва в специфичных локусах в геноме. В другом варианте один сайт-направленный полипептид, например, ДНК-эндонуклеаза, осуществляет один двух-

цепочечный разрыв в специфичном локусе в геноме.

Нуклеиновая кислота, нацеленная на геном.

Согласно настоящему изобретению предложена нуклеиновая кислота, нацеленная на геном, которая может направлять различные виды активности ассоциированного полипептида (например, сайт-направленного полипептида) на конкретную целевую последовательность в нуклеиновой кислоте-мишени. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения нуклеиновая кислота, нацеленная на геном, представляет собой РНК. РНК, нацеленная на геном, называется "направляющая РНК" или "нРНК". Направляющая РНК содержит по меньшей мере спейсерную последовательность, которая гибридизуется с нуклеиновой кислотой-мишенью, представляющей интерес, и последовательность повторов CRISPR. В системах типа II нРНК также содержит последовательность tracrRНК. В направляющей РНК типа II последовательность повторов CRISPR и последовательность tracrRНК гибридизуются друг с другом с образованием дуплекса. В направляющей РНК типа V crRНК образует дуплекс. В обеих системах дуплекс связывается с сайт-направленным полипептидом так, что направляющая РНК и сайт-направленный полипептид образуют комплекс. Нуклеиновая кислота, нацеленная на геном, обеспечивает комплексу направленную специфичность посредством связи с сайт-направленным полипептидом. Следовательно, нуклеиновая кислота, нацеленная на геном, направляет активность сайт-направленного полипептида.

Примерные направляющие РНК содержат спейсерные последовательности, представленные на фигурах, показанные с указанием расположения в геноме их целевой последовательности и связанного сайта расщепления Cas9, при этом расположение в геноме основано на сборке генома человека GRCh38/hg38. Специалист в данной области техники поймет, что каждая направляющая РНК предназначена для включения спейсерной последовательности, комплементарной ее геномной целевой последовательности. Например, каждая из спейсерных последовательностей на фигурах может быть помещена в нРНК или онРНК.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения нуклеиновая кислота, нацеленная на геном, представляет собой двухцепочечную направляющую РНК. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения нуклеиновая кислота, нацеленная на геном, представляет собой одноцепочечную направляющую РНК.

Двухцепочечная направляющая РНК содержит две цепи РНК. Первая цепь содержит в направлении от 5'-конца к 3'-концу необязательную продленную спейсерную последовательность, спейсерную последовательность и минимальную последовательность повторов CRISPR. Вторая цепь содержит минимальную последовательность tracrRНК (комплементарную минимальной последовательности повторов CRISPR), 3'-концевую последовательность tracrRНК и необязательную продленную последовательность tracrRНК.

Одноцепочечная направляющая РНК в системе типа II содержит в направлении от 5'-конца к 3'-концу необязательную продленную спейсерную последовательность, спейсерную последовательность, минимальную последовательность повторов CRISPR, одноцепочечный направляющий линкер, минимальную последовательность tracrRНК, 3'-концевую последовательность tracrRНК и необязательную продленную последовательность tracrRНК. Необязательная продленная последовательность tracrRНК может содержать элементы, которые придают направляющей РНК дополнительную функциональность (например, стабильность). Одноцепочечный направляющий линкер связывается с минимальным повтором CRISPR и минимальной последовательностью tracrRНК с образованием шпильчатой структуры. Необязательная продленная последовательность tracrRНК содержит одну или более шпилек.

Одноцепочечная направляющая РНК в системе типа V содержит в направлении от 5'-конца к 3'-концу минимальную последовательность повтора CRISPR и спейсерную последовательность.

В качестве иллюстрации направляющие РНК, используемые в системе CRISPR/Cas, или другие меньшие РНК могут быть легко синтезированы с помощью химических средств, как проиллюстрировано ниже и описано в данной области техники. В то время как спектр процедур химического синтеза постоянно расширяется, способы очистки таких РНК с помощью таких процедур как высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ, которая позволяет избежать использования гелей, таких как ПААГ), как правило, становятся более сложными, поскольку длины полинуклеотидов значительно увеличиваются более ста нуклеотидов или приблизительно в этом диапазоне. Один из подходов, используемых для получения РНК большой длины, заключается в получении двух или более молекул, которые лигируют вместе. Гораздо более длинные РНК, такие как РНК, кодирующие эндонуклеазу Cas9, легче получить ферментативными способами. Различные типы модификаций РНК могут быть введены во время или после химического синтеза и/или ферментативного получения РНК, например, модификации, которые повышают стабильность, уменьшают вероятность или степень ответа врожденной иммунной системы и/или усиливают другие признаки, описанные в данной области техники.

Продленная спейсерная последовательность.

Согласно некоторым вариантам реализации нуклеиновых кислот, нацеленных на геном, продленная спейсерная последовательность может обеспечить стабильность и/или обеспечить место для модификаций нуклеиновой кислоты, нацеленной на геном. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего

изобретения предложена продленная спейсерная последовательность. Продленная спейсерная последовательность может содержать более 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000 или 7000 или более нуклеотидов. Продленная спейсерная последовательность может содержать менее 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000 или более нуклеотидов. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения продленная спейсерная последовательность содержит менее 10 нуклеотидов. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения продленная спейсерная последовательность содержит от 10 до 30 нуклеотидов. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения продленная спейсерная последовательность содержит от 30 до 70 нуклеотидов.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения продленная спейсерная последовательность содержит другой фрагмент (например, последовательность, контролирующую стабильность, последовательность связывания эндорибонуклеазы, рибозим). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения фрагмент увеличивает стабильность нуклеиновой кислоты, нацеленной на нуклеиновую кислоту. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения фрагмент представляет собой сегмент терминатора транскрипции (т.е. последовательность терминации транскрипции). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения фрагмент функционирует в эукариотической клетке. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения фрагмент функционирует в прокариотической клетке. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения фрагмент функционирует в эукариотических и прокариотических клетках. Неограничивающие примеры подходящих фрагментов включают 5'-кэп (например, 7-метилгуанилатный кэп (m7G)), последовательность РНК-переключателя (например, чтобы обеспечить регулируемую стабильность и/или регулируемую доступность с помощью белков и белковых комплексов), последовательность, которая образует дуплекс дцРНК (т.е. шпильку), последовательность, которая нацеливает РНК на субклеточное положение (например, ядро, митохондрии, хлоропласта и т.п.), модификацию или последовательность, которая обеспечивает отслеживание (например, прямая конъюгация с флуоресцентной молекулой, конъюгация с фрагментом, который облегчает флуоресцентное детектирование, последовательность, которая обеспечивает флуоресцентное детектирование и т.д.), и/или модификацию или последовательность, которая обеспечивает сайт связывания для белков (например, белков, которые действуют на ДНК, включая активаторы транскрипции, репрессоры транскрипции, ДНК-метилтрансферазы, ДНК-деметилазы, гистонацетилтрансферазы, гистондеацетилазы и т.п.).

Спейсерная последовательность.

Спейсерная последовательность гибридизуется с последовательностью в нуклеиновой кислоте-мишени, представляющей интерес. Спейсер нуклеиновой кислоты, нацеленной на геном, взаимодействует с нуклеиновой кислотой-мишенью специфичным в отношении последовательности способом посредством гибридизации (т.е. спаривания оснований). Нуклеотидная последовательность спейсера, следовательно, изменяется в зависимости от последовательности нуклеиновой кислоты-мишени, представляющей интерес.

В системе CRISPR/Cas в настоящем документе спейсерная последовательности предназначена для гибридизации с нуклеиновой кислотой-мишенью, которая расположена на 5'-конце PAM для фермента Cas9, используемого в системе. Каждый фермент Cas9 распознает определенную последовательность PAM в ДНК-мишени. Например, *S. aureus* распознает PAM, который содержит последовательность 5'-NNGRRT-3', в нуклеиновой кислоте-мишени, где R содержит A или G, где N представляет собой любой нуклеотид и 5' N расположен в непосредственной близости от 3'-конца целевой последовательности нуклеиновой кислоты, которая является мишенью спейсерной последовательности.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения последовательность нуклеиновой кислоты-мишени содержит 21 нуклеотид. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения последовательность нуклеиновой кислоты-мишени содержит менее 21 нуклеотида. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения нуклеиновая кислота-мишень содержит по меньшей мере 5, 10, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30 или более нуклеотидов. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения нуклеиновая кислота-мишень содержит не более 5, 10, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30 или более нуклеотидов. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения последовательность нуклеиновой кислоты-мишени содержит 21 пару оснований в непосредственной близости от 5'-конца первого нуклеотида PAM. Например, в последовательности, содержащей 5'-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGRRT-3' (SEQ ID NO: 78), нуклеиновая кислота-мишень содержит последовательность, которая соответствует 5'-Ns, где N представляет собой любой нуклеотид.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения спейсерная последовательность, которая гибридизуется с нуклеиновой кислотой-мишенью, содержит по меньшей мере приблизительно 6 нуклеотидов (нт.). Спейсерная последовательность может содержать по меньшей мере приблизительно 6 нт., по меньшей мере приблизительно 10 нт., по меньшей мере приблизительно 15 нт., по меньшей мере приблизительно 18 нт., по меньшей мере приблизительно 19 нт., по меньшей мере при-

близительно 20 нт., по меньшей мере приблизительно 25 нт., по меньшей мере приблизительно 30 нт., по меньшей мере приблизительно 35 нт. или по меньшей мере приблизительно 40 нт., от приблизительно 6 нт. до приблизительно 80 нт., от приблизительно 6 нт. до приблизительно 50 нт., от приблизительно 6 нт. до приблизительно 45 нт., от приблизительно 6 нт. до приблизительно 40 нт., от приблизительно 6 нт. до приблизительно 35 нт., от приблизительно 6 нт. до приблизительно 30 нт., от приблизительно 6 нт. до приблизительно 25 нт., от приблизительно 6 нт. до приблизительно 20 нт., от приблизительно 6 нт. до приблизительно 19 нт., от приблизительно 10 нт. до приблизительно 50 нт., от приблизительно 10 нт. до приблизительно 45 нт., от приблизительно 10 нт. до приблизительно 40 нт., от приблизительно 10 нт. до приблизительно 35 нт., от приблизительно 10 нт. до приблизительно 30 нт., от приблизительно 10 нт. до приблизительно 25 нт., от приблизительно 10 нт. до приблизительно 20 нт., от приблизительно 10 нт. до приблизительно 19 нт., от приблизительно 19 нт. до приблизительно 25 нт., от приблизительно 19 нт. до приблизительно 30 нт., от приблизительно 19 нт. до приблизительно 35 нт., от приблизительно 19 нт. до приблизительно 40 нт., от приблизительно 19 нт. до приблизительно 45 нт., от приблизительно 19 нт. до приблизительно 50 нт., от приблизительно 20 нт. до приблизительно 30 нт., от приблизительно 20 нт. до приблизительно 35 нт., от приблизительно 20 нт. до приблизительно 40 нт., от приблизительно 20 нт. до приблизительно 45 нт., от приблизительно 20 нт. до приблизительно 50 нт. или от приблизительно 20 нт. до приблизительно 60 нт. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения спейсерная последовательность содержит 20 нуклеотидов. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения спейсер содержит 19 нуклеотидов.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения процент комплементарности между спейсерной последовательностью и нуклеиновой кислотой-мишенью составляет по меньшей мере приблизительно 30%, по меньшей мере приблизительно 40%, по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95%, по меньшей мере приблизительно 97%, по меньшей мере приблизительно 98%, по меньшей мере приблизительно 99% или 100%. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения процент комплементарности между спейсерной последовательностью и нуклеиновой кислотой-мишенью составляет не более приблизительно 30%, не более приблизительно 40%, не более приблизительно 50%, не более приблизительно 60%, не более приблизительно 65%, не более приблизительно 70%, не более приблизительно 75%, не более приблизительно 80%, не более приблизительно 85%, не более приблизительно 90%, не более приблизительно 95%, не более приблизительно 97%, не более приблизительно 98%, не более приблизительно 99% или 100%. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения процент комплементарности между спейсерной последовательностью и нуклеиновой кислотой-мишенью составляет 100% на участке из шести смежных 5'-концевых нуклеотидов целевой последовательности комплементарной цепи нуклеиновой кислоты-мишени. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения процент комплементарности между спейсерной последовательностью и нуклеиновой кислотой-мишенью составляет по меньшей мере 60% на участке из приблизительно 20 смежных нуклеотидов.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения спейсерная последовательность сконструирована или выбрана с использованием компьютерной программы. Компьютерная программа может использовать переменные, такие как предсказанная температура плавления, формирование вторичной структуры, прогнозируемая температура ренатурации, идентичность последовательности, геномный контекст, доступность хроматина, % GC, частота встречаемости в геноме (например, последовательностей, которые идентичны или сходны, но изменяются в одном или более участках вследствие несоответствия, вставки или удаления), статус метилирования, присутствие SNP и т.п.

Минимальная последовательность повторов CRISPR.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения минимальная последовательность повторов CRISPR представляет собой последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 30%, приблизительно на 40%, приблизительно на 50%, приблизительно на 60%, приблизительно на 65%, приблизительно на 70%, приблизительно на 75%, приблизительно на 80%, приблизительно на 85%, приблизительно на 90%, приблизительно на 95% или 100% идентична эталонной последовательности повторов CRISPR (например, crPHK из *S. aureus*).

Минимальная последовательность повторов CRISPR содержит нуклеотиды, которые могут гибридизоваться с минимальной последовательностью tracrPHK в клетке. Минимальная последовательность повторов CRISPR и минимальная последовательность tracrPHK образуют дуплекс, т.е. двухцепочечную структуру со спаренными основаниями. Минимальная последовательность повторов CRISPR и минимальная последовательность tracrPHK вместе связываются с сайт-направленным полипептидом. По меньшей мере часть минимальной последовательности повторов CRISPR гибридизуется с минимальной последовательностью tracrPHK. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения по меньшей мере часть минимальной последовательности повторов CRISPR по меньшей мере приблизи-

приблизительно 30 нт. или от приблизительно 15 нт. до приблизительно 25 нт. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения минимальная последовательность *tracrPНК* содержит приблизительно 9 нуклеотидов. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения минимальная последовательность *tracrPНК* содержит приблизительно 12 нуклеотидов. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения минимальная *tracrPНК* состоит из 23-48 нт. *tracrPНК*, описанной в Jinek et al., см. выше.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения минимальная последовательность *tracrPНК* по меньшей мере приблизительно на 60% идентична эталонной минимальной последовательности *tracrPНК* (например, *tracrPНК* дикого типа из *S. aureus*) на протяжении участка, содержащего по меньшей мере 6, 7 или 8 последовательных нуклеотидов. Например, минимальная последовательность *tracrPНК* по меньшей мере приблизительно на 65% идентична, приблизительно на 70% идентична, приблизительно на 75% идентична, приблизительно на 80% идентична, приблизительно на 85% идентична, приблизительно на 90% идентична, приблизительно на 95% идентична, приблизительно на 98% идентична, приблизительно на 99% идентична или на 100% идентична эталонной минимальной последовательности *tracrPНК* на протяжении участка, содержащего по меньшей мере 6, 7 или 8 последовательных нуклеотидов.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения дуплекс между минимальной *ПНК CRISPR* и минимальной *tracrPНК* содержит двойную спираль. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения дуплекс между минимальной *ПНК CRISPR* и минимальной *tracrPНК* содержит по меньшей мере приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 или более нуклеотидов. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения дуплекс между минимальной *ПНК CRISPR* и минимальной *tracrPНК* содержит не более 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 или более нуклеотидов.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения дуплекс содержит несоответствие (т.е. две нити дуплекса не являются комплементарными на 100%). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения дуплекс содержит по меньшей мере приблизительно 1, 2, 3, 4 или 5 несоответствий. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения дуплекс содержит не более 1, 2, 3, 4 или 5 несоответствий. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения дуплекс содержит не более двух несоответствий.

Петли.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения в дуплексе имеется "петля" между минимальной *ПНК CRISPR* и минимальной *tracrPНК*. Петля представляет собой область неспаренных нуклеотидов внутри дуплекса. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения петля способствует связыванию дуплекса с сайт-направленным полипептидом. Петля содержит, на одной стороне дуплекса, неспаренный участок 5'-XXX \bar{Y} -3', где X представляет собой любой пурин и Y содержит нуклеотид, который может образовывать неустойчивую пару с нуклеотидом на противоположной цепи, и участок неспаренных нуклеотидов на другой стороне дуплекса. Количество неспаренных нуклеотидов на двух сторонах дуплекса может быть разным.

В одном примере петля содержит неспаренный пурин (например, аденин) на цепи минимальной последовательности повторов *CRISPR* из петли. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения петля содержит неспаренный участок 5'-AAGY-3' цепи минимальной последовательности *tracrPНК* из петли, где Y содержит нуклеотид, который может образовывать неустойчивую пару с нуклеотидом на цепи минимальной последовательности повторов *CRISPR*.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения петля на стороне минимальной последовательности повторов *CRISPR* дуплекса содержит по меньшей мере 1, 2, 3, 4 или 5 или более неспаренных нуклеотидов. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения петля на стороне минимальной последовательности повторов *CRISPR* дуплекса содержит не более 1, 2, 3, 4 или 5 или более неспаренных нуклеотидов. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения петля на стороне минимальной последовательности повторов *CRISPR* дуплекса содержит 1 неспаренный нуклеотид.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения петля на стороне минимальной последовательности *tracrPНК* дуплекса содержит по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 или более неспаренных нуклеотидов. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения петля на стороне минимальной последовательности *tracrPНК* дуплекса содержит не более 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 или более неспаренных нуклеотидов. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения петля на второй стороне дуплекса (например, сторона минимальной последовательности *tracrPНК* дуплекса) содержит 4 неспаренных нуклеотида.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения петля содержит по меньшей мере одну неустойчивую пару. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения петля содержит не более одной неустойчивой пары. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения петля содержит по меньшей мере один пуриновый нуклеотид. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения петля содержит по меньшей мере 3 пуриновых нуклеотида. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения последовательность петли содержит

по меньшей мере 5 пуриновых нуклеотидов. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения последовательность петли содержит по меньшей мере один гуаниновый нуклеотид. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения последовательность петли содержит по меньшей мере один адениновый нуклеотид.

Шпильки.

Согласно различным вариантам реализации одна или более шпилек расположены на 3'-конце минимальной tracrPНК в 3'-концевой последовательности tracrPНК.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения шпилька начинается с по меньшей мере приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 или 20 или более нуклеотидов с 3'-конца относительно последнего спаренного нуклеотида в дуплексе минимальной последовательности повторов CRISPR и минимальной последовательности tracrPНК. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения шпилька может начинаться не более чем с приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 или более нуклеотидов с 3'-конца относительно последнего спаренного нуклеотида в дуплексе минимальной последовательности повторов CRISPR и минимальной последовательности tracrPНК.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения шпилька содержит по меньшей мере приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 или 20 или более последовательных нуклеотидов. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения шпилька содержит не более 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 или более последовательных нуклеотидов.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения шпилька содержит динуклеотид CC (т.е. два последовательных цитозинового нуклеотида).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения шпилька содержит дуплексные нуклеотиды (например, нуклеотиды в шпильке, гибридованные вместе). Например, шпилька содержит динуклеотид CC, который гибридизуется с динуклеотидом GG в шпилечном дуплексе 3'-концевой последовательности tracrPНК.

Одна или более шпилек могут взаимодействовать с областями, взаимодействующими с направляющими РНК, сайт-направленного полипептида.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения присутствуют две или более шпилек, и согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения присутствуют три или более шпилек.

3'-концевая последовательность tracrPНК.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения 3'-концевая последовательность tracrPНК содержит последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 30%, приблизительно на 40%, приблизительно на 50%, приблизительно на 60%, приблизительно на 65%, приблизительно на 70%, приблизительно на 75%, приблизительно на 80%, приблизительно на 85%, приблизительно на 90%, приблизительно на 95% или на 100% идентична эталонной последовательности tracrPНК (например, tracrPНК из *S. aureus*).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения 3'-концевая последовательность tracrPНК содержит от приблизительно 6 нуклеотидов до приблизительно 100 нуклеотидов. Например, 3'-концевая последовательность tracrPНК может содержать от приблизительно 6 нуклеотидов (нт.) до приблизительно 50 нт., от приблизительно 6 нт. до приблизительно 40 нт., от приблизительно 6 нт. до приблизительно 30 нт., от приблизительно 6 нт. до приблизительно 25 нт., от приблизительно 6 нт. до приблизительно 20 нт., от приблизительно 6 нт. до приблизительно 15 нт., от приблизительно 8 нт. до приблизительно 40 нт., от приблизительно 8 нт. до приблизительно 30 нт., от приблизительно 8 нт. до приблизительно 25 нт., от приблизительно 8 нт. до приблизительно 20 нт., от приблизительно 8 нт. до приблизительно 15 нт., от приблизительно 15 нт. до приблизительно 100 нт., от приблизительно 15 нт. до приблизительно 80 нт., от приблизительно 15 нт. до приблизительно 50 нт., от приблизительно 15 нт. до приблизительно 40 нт., от приблизительно 15 нт. до приблизительно 30 нт. или от приблизительно 15 нт. до приблизительно 25 нт. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения 3'-концевая последовательность tracrPНК содержит приблизительно 14 нуклеотидов.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения 3'-концевая последовательность tracrPНК по меньшей мере приблизительно на 60% идентична эталонной 3'-концевой последовательности tracrPНК (например, 3'-концевой последовательности tracrPНК дикого типа из *S. aureus*) на протяжении участка, содержащего по меньшей мере 6, 7 или 8 последовательных нуклеотидов. Например, 3'-концевая последовательность tracrPНК по меньшей мере приблизительно на 60% идентична, приблизительно на 65% идентична, приблизительно на 70% идентична, приблизительно на 75% идентична, приблизительно на 80% идентична, приблизительно на 85% идентична, приблизительно на 90% идентична, приблизительно на 95% идентична, приблизительно на 98% идентична, приблизительно на 99% идентична или на 100% идентична эталонной 3'-концевой последовательности tracrPНК (например, 3'-концевой последовательности tracrPНК дикого типа из *S. aureus*) на протяжении участка, содержащего по меньшей мере 6, 7 или 8 последовательных нуклеотидов.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения 3'-концевая последовательность tracrPНК содержит более одной дуплексной области (например, шпильку, гибридованную об-

ласть). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения 3'-концевая последовательность *tracrRNA* содержит две дуплексные области.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения 3'-концевая последовательность *tracrRNA* содержит структуру петля-на-стебле. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения структура петля-на-стебле в 3'-концевой *tracrRNA* содержит по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 или 20 или более нуклеотидов. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения структура петля-на-стебле в 3'-концевой *tracrRNA* содержит не более 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 или более нуклеотидов. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения структура петля-на-стебле содержит функциональный фрагмент. Например, структура петля-на-стебле может содержать аптамер, рибозим, связывающую белок шпильку, матрицу CRISPR, интрон или экзон. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения структура петля-на-стебле содержит по меньшей мере приблизительно 1, 2, 3, 4 или 5 или более функциональных фрагментов. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения структура петля-на-стебле содержит не более 1, 2, 3, 4 или 5 или более функциональных фрагментов.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения шпилька в 3'-концевой последовательности *tracrRNA* содержит Р-домен. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения Р-домен содержит двухцепочечную область в шпильке.

Продленная последовательность *tracrRNA*.

Продленная последовательность *tracrRNA* может быть предложена в настоящем изобретении независимо от того, является ли *tracrRNA* одноцепочечной направляющей или двухцепочечной направляющей. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения продленная последовательность *tracrRNA* содержит от приблизительно 1 нуклеотида до приблизительно 400 нуклеотидов. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения продленная последовательность *tracrRNA* содержит более 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380 или 400 нуклеотидов. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения продленная последовательность *tracrRNA* содержит от приблизительно 20 до приблизительно 5000 или более нуклеотидов. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения продленная последовательность *tracrRNA* содержит более 1000 нуклеотидов. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения продленная последовательность *tracrRNA* содержит менее 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400 или более нуклеотидов. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения продленная последовательность *tracrRNA* может содержать менее 1000 нуклеотидов. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения продленная последовательность *tracrRNA* содержит менее 10 нуклеотидов. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения продленная последовательность *tracrRNA* содержит 10-30 нуклеотидов. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения продленная последовательность *tracrRNA* содержит 30-70 нуклеотидов.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения продленная последовательность *tracrRNA* содержит функциональный фрагмент (например, последовательность, контролирующую стабильность, рибозим, последовательности связывания с эндорибонуклеазой). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения функциональный фрагмент содержит сегмент терминатора транскрипции (т.е. последовательность терминации транскрипции). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения функциональный фрагмент имеет общую длину от приблизительно 10 нуклеотидов (нт.) до приблизительно 100 нуклеотидов, от приблизительно 10 нт. до приблизительно 20 нт., от приблизительно 20 нт. до приблизительно 30 нт., от приблизительно 30 нт. до приблизительно 40 нт., от приблизительно 40 нт. до приблизительно 50 нт., от приблизительно 50 нт. до приблизительно 60 нт., от приблизительно 60 нт. до приблизительно 70 нт., от приблизительно 70 нт. до приблизительно 80 нт., от приблизительно 80 нт. до приблизительно 90 нт. или от приблизительно 90 нт. до приблизительно 100 нт., от приблизительно 15 нт. до приблизительно 80 нт., от приблизительно 15 нт. до приблизительно 50 нт., от приблизительно 15 нт. до приблизительно 40 нт., от приблизительно 15 нт. до приблизительно 30 нт. или от приблизительно 15 нт. до приблизительно 25 нт. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения функциональный фрагмент функционирует в эукариотической клетке. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения функциональный фрагмент функционирует в прокариотической клетке. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения функциональный фрагмент функционирует в эукариотических и прокариотических клетках.

Неограничивающие примеры подходящих функциональных фрагментов продленной *tracrRNA* включают 3'-полиаденилированный хвост, последовательность РНК-переключателя (например, чтобы обеспечить регулируемую стабильность и/или регулируемую доступность для белков и белковых комплексов), последовательность, которая образует дуплекс дцРНК (т.е. шпильку), последовательность, которая нацеливает РНК в субклеточное положение (например, ядро, митохондрии, хлоропласта и т.п.), модификацию или последовательность, которая обеспечивает отслеживание (например, прямая конъюгация с флуоресцентной молекулой, конъюгация с фрагментом, который облегчает флуоресцентное де-

тектирование, последовательность, которая обеспечивает флуоресцентное детектирование и т.д.), и/или модификацию или последовательность, которая обеспечивает сайт связывания для белков (например, белков, которые действуют на ДНК, включая активаторы транскрипции, транскрипционные репрессоры, ДНК-метилтрансферазы, ДНК-деметилазы, гистонацетилтрансферазы, гистондеацетилазы и т.п.). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения продленная последовательность *trans*РНК содержит сайт связывания праймера или молекулярный индекс (например, нуклеиновую последовательность-штрихкод). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения продленная последовательность *trans*РНК содержит одну или более аффинных меток.

Одноцепочечная направляющая линкерная последовательность.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения линкерная последовательность одноцепочечной направляющей нуклеиновой кислоты содержит в длину от приблизительно 3 нуклеотидов до приблизительно 100 нуклеотидов. В Jinek et al., см. выше, например, использовали простую 4-нуклеотидную "тетрапетлю" (-GAAA-), Science, 337(6096):816-821 (2012). Иллюстративный линкер содержит в длину от приблизительно 3 нуклеотидов (нт.) до приблизительно 90 нт., от приблизительно 3 нт. до приблизительно 80 нт., от приблизительно 3 нт. до приблизительно 70 нт., от приблизительно 3 нт. до приблизительно 60 нт., от приблизительно 3 нт. до приблизительно 50 нт., от приблизительно 3 нт. до приблизительно 40 нт., от приблизительно 3 нт. до приблизительно 30 нт., от приблизительно 3 нт. до приблизительно 20 нт., от приблизительно 3 нт. до приблизительно 10 нт. Например, линкер может содержать от приблизительно 3 нт. до приблизительно 5 нт., от приблизительно 5 нт. до приблизительно 10 нт., от приблизительно 10 нт. до приблизительно 15 нт., от приблизительно 15 нт. до приблизительно 20 нт., от приблизительно 20 нт. до приблизительно 25 нт., от приблизительно 25 нт. до приблизительно 30 нт., от приблизительно 30 нт. до приблизительно 35 нт., от приблизительно 35 нт. до приблизительно 40 нт., от приблизительно 40 нт. до приблизительно 50 нт., от приблизительно 50 нт. до приблизительно 60 нт., от приблизительно 60 нт. до приблизительно 70 нт., от приблизительно 70 нт. до приблизительно 80 нт., от приблизительно 80 нт. до приблизительно 90 нт. или от приблизительно 90 нт. до приблизительно 100 нт. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения линкер одноцепочечной направляющей нуклеиновой кислоты содержит от 4 до 40 нуклеотидов. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения линкер содержит по меньшей мере приблизительно 100, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500 или 7000 или более нуклеотидов. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения линкер содержит не более 100, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500 или 7000 или более нуклеотидов.

Линкеры могут содержать любую из множества последовательностей, хотя предпочтительно линкер не будет содержать последовательности, которые имеют обширные области гомологии с другими частями направляющей РНК, что может вызвать внутримолекулярное связывание, которое может препятствовать другим функциональным областям направляющей РНК. В Jinek et al., см. выше, использовали простую 4-нуклеотидную последовательность -GAAA-, Science, 337(6096):816-821 (2012), также могут быть использованы другие многочисленные последовательности, включая более длинные последовательности.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения линкерная последовательность содержит функциональный фрагмент. Например, линкерная последовательность может содержать аптамер, рибозим, связывающую белок шпильку, матрицу CRISPR, интрон или экзон. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения линкерная последовательность содержит по меньшей мере приблизительно 1, 2, 3, 4 или 5 или более функциональных фрагментов. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения линкерная последовательность содержит не более 1, 2, 3, 4 или 5 или более функциональных фрагментов.

Стратегии модификации генома для коррекции клеток с помощью замены одной или более мутаций в гене путем введения нуклеотидов кДНК титина в локус соответствующего гена или путем удаления экзонов в гене.

Один из этапов способов в условиях *ex vivo* согласно настоящему изобретению включает редактирование/коррекцию мутации в гене титина, например, в клетке-предшественнике (согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения в *eCSC* или первичном кардиомиоците). Аналогичным образом этап способов в условиях *in vivo* согласно настоящему изобретению включает редактирование/коррекцию гена титина в клетках у пациента с использованием модификации генома.

Пациенты с кардиомиопатиями на основе титина или другими титинопатиями проявляют широкий спектр мутаций в гене титина. В этой связи разные пациенты обычно нуждаются в разных стратегиях коррекции. Любая эндонуклеаза CRISPR может быть использована в способах согласно настоящему изобретению, каждая эндонуклеаза CRISPR имеет свой собственный связанный с ней PAM, который может быть специфичным для заболевания или может не быть специфичным. Примерные спейсерные последовательности нРНК для нацеливания на ген титина с использованием эндонуклеазы CRISPR/Cas9 из *S. aureus* приведены на фигурах.

Стратегия модификации генома включает замену одной или более мутаций в гене или удаление

кДНК титина в локусе соответствующего гена путем гомологичной репарации (HDR), которая также известна как гомологичная рекомбинация (HR). Восстановление, опосредованное гомологией, является одной из стратегий лечения пациентов с инактивирующими мутациями в белке титина. Эти стратегии приведут к восстановлению белка титина и полному обращению патологического состояния. Указанная стратегия потребует более индивидуального подхода, основанного на местоположении инактивирующей мутации (мутаций) пациента. Донорные нуклеотиды для коррекции мутаций являются небольшими (<300 пар оснований). Это обеспечивает преимущества, поскольку эффективность HDR может быть обратно пропорциональна размеру донорной молекулы. Также ожидается, что донорные матрицы могут быть помещены в молекулы аденоассоциированных вирусов (AAV), имеющие ограниченный размер, которые, как было показано, являются эффективным средством доставки донорных матриц.

Восстановление, опосредованное гомологией, является клеточным механизмом восстановления двухцепочечных разрывов (DSB). Наиболее распространенной формой является гомологичная рекомбинация. Существуют дополнительные пути HDR, включая одноцепочечный отжиг и альтернативный вариант HDR. Инструменты для модификации генома позволяют исследователям манипулировать клеточными путями гомологичной рекомбинации для создания сайт-специфичных модификаций в геноме. Было обнаружено, что клетки могут восстанавливать двухцепочечный разрыв с использованием синтетической донорной молекулы, обеспеченной в транс-активирующей конфигурации. Следовательно, в геноме могут быть сделаны целенаправленные изменения путем введения двухцепочечного разрыва вблизи конкретной мутации и обеспечения подходящего донора. Специфичное расщепление увеличивает скорость HDR более чем в 1000 раз выше скорости 1 в 10^6 клеток, получающих только гомологичный донор. Скорость восстановления, опосредованного гомологией (HDR), в конкретном нуклеотиде зависит от расстояния до сайта разреза, поэтому важно выбирать перекрывающиеся или ближайшие сайты-мишени. Редактирование гена обеспечивает преимущество по сравнению с добавлением генов, поскольку коррекция в условиях *in situ* оставляет остальную часть генома интактной.

Поставляемые доноры для редактирования путем HDR существенно различаются, но обычно содержат предполагаемую последовательность с небольшими или большими фланкирующими гомологичными областями, обеспечивающими ренатурацию с геномной ДНК. Области гомологии, фланкирующие введенные генетические изменения, могут содержать 30 п.о. или менее или могут представлять собой кассету, содержащую несколько тысяч пар оснований, которая может содержать промоторы, кДНК и т.д. Были использованы как одноцепочечные, так и двухцепочечные олигонуклеотидные доноры. Подходящие олигонуклеотиды имеют размер от менее 100 нт. до более 500 нт., хотя может быть получена и использована более длинная оцДНК. Часто используют двухцепочечные доноры, включая ампликоны ПЦР, плазмиды и мини-кольца. В целом было обнаружено, что AAV-вектор является очень эффективным средством доставки донорной матрицы. Несмотря на то что пределы упаковки для отдельных доноров составляют <5 тыс. п.н. Активная транскрипция донора увеличивала HDR в три раза, это указывает на то, что включение промотора может увеличивать конверсию. Напротив, CpG-метилование донора уменьшало экспрессию гена и HDR.

Помимо эндонуклеаз дикого типа, таких как Cas9, существуют варианты нуклеаз, у которых инактивирован один или другой нуклеазный домен, что приводит к разрезанию только одной цепи ДНК. HDR может быть направлена индивидуальными никазами Cas или с использованием пар нуклеаз, которые фланкируют целевую область. Донорами могут быть одноцепочечные, надрезанные или дцДНК.

Донорная ДНК может быть получена совместно с нуклеазой или по отдельности различными способами, например, путем трансфекции, наночастицы, микроинъекции или вирусной трансдукции. Был предложен ряд вариантов закрепления для увеличения доступности доноров для HDR. Примеры включают присоединение донора к нуклеазе, прикрепление к связывающим ДНК белкам, которые связываются вблизи, или присоединение к белкам, которые вовлечены в связывание или восстановление концов ДНК.

Выбор пути восстановления может определяться рядом условий культивирования, таких как те, которые влияют на клеточный цикл, или путем нацеливания на восстановление ДНК и связанные с этим белки. Например, для увеличения HDR могут быть подавлены ключевые молекулы NHEJ, такие как KU70, KU80 или ДНК-лигаза IV, известная как Scr7.

В отсутствие донора концы разрыва ДНК или концы различных разрывов могут быть соединены с использованием нескольких путей нехомологичного восстановления, при которых концы ДНК соединяются с незначительным спариванием оснований на стыке или без спаривания. В дополнение к каноническому NHEJ существуют аналогичные механизмы восстановления, такие как alt-NHEJ. В случае если присутствуют два разрыва, промежуточный сегмент может быть удален или инвертирован. Пути восстановления NHEJ могут приводить к вставкам, удалениям или мутациям на стыках.

В дополнение к редактированию генома путем NHEJ или HDR были проведены сайт-специфичные вставки генов, в которых использовался путь NHEJ и HR. Комбинированный подход можно применять в определенных условиях, возможно, включая границы интрона и экзона. Путь NHEJ может оказаться эффективным для лигирования в интроне, в то время как лишенный ошибок путь HDR лучше всего подходит в кодирующей области.

Как было указано ранее, ген титина содержит 363 экзона, кодирующих белок. Любой один или более из 331 экзона может быть восстановлен, чтобы скорректировать мутацию и восстановить активность титина. В другом варианте кДНК титина можно вставить в локус соответствующего гена или вставить в безопасный участок закрепления, такой как AAVS1. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения способы обеспечивают одну нРНК или пару нРНК, которые могут быть использованы для облегчения включения новой последовательности из полинуклеотидной донорной матрицы для восстановления одной или более мутаций.

Согласно некоторым вариантам реализации способов предложены пары нРНК, которые создают делецию, разрезая ген дважды, одна нРНК делает разрез на 5'-конце одной или более мутаций и другая нРНК делает разрез на 3'-конце одной или более мутаций, что облегчает вставку новой последовательности из полинуклеотидной донорной матрицы для замены одной или более мутаций. Разрез может быть выполнен с помощью пары ДНК-эндонуклеаз, каждая из которых создает DSB в геноме, или с помощью нескольких нРНК, которые совместно создают DSB в геноме.

Альтернативно, согласно некоторым вариантам реализации способов предложена одна нРНК, чтобы создать один двухцепочечный надрез вокруг одной или более мутаций, который облегчает введение новой последовательности из полинуклеотидной донорной матрицы для замены одной или более мутаций. Двухцепочечный разрез может быть выполнен с помощью одной ДНК-эндонуклеазы или нескольких нРНК, которые совместно создают DSB в геноме.

Иллюстративные модификации в гене титина включают замены внутри или в непосредственной близости от упомянутых выше мутаций, например, в области, которая расположена на расстоянии менее 3 тыс. п.о., менее 2 тыс. п.о., менее 1 тыс. п.о., менее 0,5 тыс. п.о. в направлении 5'-конца или 3'-конца относительно конкретной мутации. Учитывая относительно широкие вариации мутаций в гене титина, следует понимать, что многочисленные вариации упомянутых выше замен (включая, но не ограничиваясь указанными, более крупные, а также меньшие делеции) приведут к восстановлению активности белка титина.

Упомянутые варианты включают замены, которые больше в направлении 5'-конца и/или 3'-конца, чем конкретная рассматриваемая мутация, или меньше в любом направлении. Соответственно "проксимальный" по отношению к конкретным заменам относится к локусу DSB, связанному с желательной границей замены (также называемой в настоящем документе конечной точкой), который может находиться в пределах области, которая расположена на расстоянии менее чем приблизительно 3 тыс. п.о. от отмеченного эталонного локуса. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения локус DSB является более проксимальным и находится в пределах 2 тыс. п.о., в пределах 1 тыс. п.о., в пределах 0,5 тыс. п.о. или в пределах 0,1 тыс. п.о. В случае небольшой замены желательная конечная точка находится в пределах или "рядом с" эталонным локусом, это означает, что конечная точка находится в пределах 100 п.о., в пределах 50 п.о., в пределах 25 п.о. или менее приблизительно от 10 п.о. до 5 п.о. от эталонного локуса.

Предполагается, что варианты реализации, включающие более крупные или более мелкие замены, будут обеспечивать аналогичное преимущество, если будет восстановлена активность титина. Следовательно, предполагается, что многие вариации замен, описанных и проиллюстрированных в настоящем документе, будут эффективными для облегчения кардиомиопатий или других титинопатий.

Выбор целевой последовательности.

Предпочтительно сдвиги местоположения 5'- и/или 3'-границы относительно конкретных эталонных локусов используют для облегчения или усиления конкретных вариантов применения редактирования генома, которые частично зависят от системы эндонуклеаз, выбранной для редактирования, как подробно описано и проиллюстрировано в настоящем документе.

Согласно первому аспекту выбора подходящей целевой последовательности многие системы эндонуклеаз имеют правила или критерии, которые определяют первоначальный выбор потенциальных сайтов-мишеней для расщепления, такие как потребность в присутствии последовательности мотива PAM в определенном положении, смежном с сайтами расщепления ДНК в случае эндонуклеаз CRISPR типа II или типа V.

Согласно другому аспекту выбора или оптимизации частота неспецифичной активности для конкретной комбинации последовательности-мишени и эндонуклеазы, редактирующей геном (т.е. частота DSB, происходящих в сайтах, отличных от выбранной последовательности-мишени), оценивается относительно частоты специфичной активности. В некоторых случаях клетки, которые были отредактированы надлежащим образом в желательном локусе, могут иметь селективное преимущество по сравнению с другими клетками. Иллюстративные, но не ограничивающие, примеры селективного преимущества включают приобретение таких признаков как повышенная скорость репликации, стойкость, устойчивость к определенным условиям, повышенная скорость успешного приживания или стойкость в условиях *in vivo* после введения пациенту и другие признаки, связанные с поддержанием или увеличением количества или жизнеспособности указанных клеток. В других случаях клетки, которые были отредактированы надлежащим образом в нужном локусе, могут быть положительно отобраны с помощью одного или более способов скрининга, используемых для идентификации, сортировки или отбора других клеток,

которые были отредактированы надлежащим образом. Селективное преимущество и способы направленного отбора могут быть основаны на фенотипе, связанном с коррекцией. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения клетки могут быть отредактированы два или более раз, чтобы создать вторую модификацию, которая создает новый фенотип, используемый для отбора или очистки желательной популяции клеток. Указанная вторая модификация может быть создана путем добавления второй нРНК для маркера, который отбирают или подвергают скринингу.

Вне зависимости от применимости какого-либо селективного преимущества или необходимости применения какого-либо направленного отбора в конкретном случае выбор целевой последовательности также определяется путем рассмотрения величин частоты неспецифичной активности, чтобы повысить эффективность применения и/или уменьшить вероятность нежелательных изменений в сайтах, отличных от желательной мишени. Как описано далее и проиллюстрировано в настоящем документе и в данной области техники, на наличие неспецифичной активности влияет ряд факторов, включая сходства и различия между сайтом-мишенью и различными нецелевыми участками, а также используемая конкретная эндонуклеаза. Во многих случаях доступны инструменты биоинформатики, которые облегчают прогнозирование нецелевой активности, и часто такие инструменты также могут быть использованы для идентификации наиболее вероятных участков нецелевой активности, которые затем могут быть оценены в экспериментальных условиях для оценки относительной частоты нецелевой активности в сравнении с целевой активностью, что позволяет выбирать последовательности, которые имеют более высокую относительную целевую активность. Иллюстративные примеры подходящих методик приведены в настоящем документе, и другие известны в данной области техники.

Другой аспект выбора целевой последовательности относится к событиям гомологичной рекомбинации. Хорошо известно, что последовательности, содержащие гомологичные области, могут служить центрами для событий гомологичной рекомбинации, которые приводят к удалению промежуточных последовательностей. Упомянутые события рекомбинации происходят во время нормальной репликации хромосом и других последовательностей ДНК, а также в другое время при синтезе последовательности ДНК, например, в случае восстановления двухцепочечных разрывов (DSB), которые регулярно происходят в течение нормального цикла, но также могут быть усилены появлением различных событий (таких как ультрафиолетовый свет и другие индукторы разрыва ДНК) или присутствием определенных агентов (таких как различные химические индукторы). Многие такие индукторы приводят к беспорядочному возникновению DSB в геноме, и DSB регулярно индуцируются и восстанавливаются в нормальных клетках. Во время восстановления исходная последовательность может быть восстановлена с исчерпывающей точностью, однако в некоторых случаях в сайт DSB вводятся небольшие мелкие вставки или делеции (называемые "indels").

DSB также могут быть специально индуцированы в определенных местах, как в случае систем эндонуклеаз, описанных в настоящем документе, которые могут быть использованы для индукции направленных или предпочтительных событий модификации генов в выбранных местах хромосом. Способность гомологичных последовательностей к рекомбинации в случае репарации ДНК (а также репликации) может быть использована в ряде случаев и является основой для одного варианта применения систем редактирования генома, таких как CRISPR, в которых восстановление, обусловленное гомологией, используется для вставки последовательности, представляющей интерес, полученной с помощью "донорного" полинуклеотида, в желаемое место хромосомы.

Области гомологии между конкретными последовательностями, которые могут представлять собой небольшие области "микрогомологии", которые могут содержать всего лишь десять пар оснований или менее, также могут быть использованы для создания желательных делеций. Например, один DSB вводится в сайт, который проявляет микрогомологию с близлежащей последовательностью. В ходе нормального процесса восстановления такого DSB с высокой частотой имеет место делеция промежуточной последовательности в результате рекомбинации, которая облегчается DSB и сопутствующим клеточным процессом восстановления.

В некоторых случаях, однако, выбор целевых последовательностей внутри областей гомологии также может приводить к значительно большим делециям, включая слияния генов (в тех случаях, когда делеции находятся в кодирующих областях), что может быть как желательным, так и нежелательным с учетом конкретных обстоятельств.

Примеры, представленные в настоящем документе, дополнительно иллюстрируют выбор различных целевых областей для создания DSB, предназначенных для индукции замен, которые приводят к восстановлению активности титина, а также выбор конкретных целевых последовательностей в указанных областях, которые предназначены для минимизации нецелевых событий по сравнению с целевыми событиями.

Предпочтительные нРНК обладают достаточно высокой целевой активностью для достижения желательных уровней редактирования генома в выбранном локусе и относительно меньшей нецелевой активностью в отношении снижения вероятности изменений в других местах хромосом. Соотношение целевой и нецелевой активности часто называют "специфичностью" нРНК.

Для первоначального скрининга предсказанных нецелевых видов активности существует ряд из-

вестных и общедоступных инструментов биоинформатики, которые могут быть использованы для предсказания наиболее вероятных нецелевых сайтов; и поскольку связывание с целевыми сайтами в системе нуклеаз CRISPR/Cas9 обусловлено спариванием оснований по Уотсону-Крику между комплементарными последовательностями, степень несходства (и, следовательно, сниженная способность к нецелевому связыванию) по существу относится к различиям в первичной последовательности: несоответствиям и петлям, т.е. к основаниям, которые заменены на некомплементарное основание, а также к вставкам или делециям оснований в потенциальном нецелевом сайте в сравнении с целевым сайтом. Примерный инструмент биоинформатики, называемый COSMID (нецелевые сайты CRISPR с несоответствиями, вставками и делециями) (доступный на веб-странице crispr.bme.gatech.edu), компилирует указанные сходства.

Модификации нуклеиновых кислот.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полинуклеотиды, вводимые в клетки, содержат одну или более модификаций, которые могут быть использованы, например, для повышения активности, стабильности или специфичности, изменения доставки, уменьшения ответов врожденной иммунной системы в клетках-хозяевах или для других улучшений, описанных далее и известных в данной области техники.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения модифицированные полинуклеотиды используются в системе CRISPR/Cas и в этом случае направляющие РНК (одноцепочечные направляющие или двухцепочечные направляющие) и/или ДНК или РНК, кодирующая эндонуклеазу Cas, введенная в клетку, может быть модифицирована, как описано и проиллюстрировано ниже. Подходящие модифицированные полинуклеотиды могут быть использованы в системе CRISPR/Cas для редактирования любого одного или более геномных локусов.

Используя систему CRISPR/Cas для неограничивающих иллюстраций таких вариантов применения, модификации направляющих РНК могут быть использованы, чтобы усилить образование или стабильность комплекса редактирования генома CRISPR/Cas, содержащего направляющие РНК, которые могут быть одноцепочечными или двухцепочечными, и эндонуклеазу Cas. Модификации направляющих РНК также могут быть использованы в другом варианте, чтобы усилить инициацию, стабильность или кинетику взаимодействия между комплексом редактирования генома и целевой последовательностью в геноме, которые могут быть использованы, например, для усиления целевой активности. Модификации направляющих РНК также могут быть использованы в другом варианте для повышения специфичности, например, относительных скоростей редактирования генома в целевом сайте по сравнению с эффектами в других (нецелевых) сайтах.

Модификации также могут быть использованы в другом варианте для повышения стабильности направляющей РНК, например, путем повышения ее устойчивости к деградации рибонуклеазами (РНКазами), присутствующими в клетке, увеличивая тем самым период полувыведения в клетке. Модификации, увеличивающие период полувыведения направляющей РНК, могут быть особенно полезны в вариантах реализации, в которых эндонуклеазу Cas вводят в клетку, подлежащую редактированию с помощью РНК, которая должна быть транслирована, чтобы получить эндонуклеазу, поскольку увеличение периода полувыведения направляющих РНК, введенных в то же время как и РНК, кодирующая эндонуклеазу, может быть использовано для увеличения времени совместного существования в клетке направляющих РНК и РНК, кодирующих эндонуклеазу Cas.

Модификации также могут быть использованы в другом варианте для уменьшения вероятности или степени, с которой РНК, вводимые в клетки, вызывают ответы врожденной иммунной системы. Такие ответы, которые были хорошо охарактеризованы в случае РНК-интерференции (РНК-и), включая малые интерферирующие РНК (миРНК), как описано ниже и в данной области техники, как правило, связаны с уменьшением периода полувыведения РНК и/или выявлением цитокинов или других факторов, связанных с иммунными ответами.

Один или более типов модификаций также могут быть сделаны в РНК, кодирующих эндонуклеазу, которые вводят в клетку, включая, но не ограничиваясь указанными, модификации, которые повышают стабильность РНК (например, путем увеличения их устойчивости к разрушению РНКазами, присутствующими в клетке), модификации, которые усиливают трансляцию полученного продукта (т.е. эндонуклеазы), и/или модификации, которые уменьшают вероятность или степень, с которой РНК, введенные в клетки, вызывают ответы врожденной иммунной системы.

Аналогичным образом можно использовать комбинации модификаций, таких как указанные выше и другие. В случае CRISPR/Cas, например, один или более типов модификаций могут быть введены в направляющие РНК (включая те, которые приведены в качестве примера выше), и/или один или более типов модификаций могут быть введены в РНК, кодирующие эндонуклеазу Cas (включая те, которые приведены в качестве примера выше).

В качестве иллюстрации направляющие РНК, используемые в системе CRISPR/Cas, или другие меньшие РНК, могут быть легко синтезированы с помощью химических способов, что позволяет легко включать ряд модификаций, известных в данной области техники. В то время как спектр процедур химического синтеза постоянно расширяется, очистка указанных РНК с помощью таких процедур как высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ, которая позволяет избежать использования гелей,

таких как ПААГ), как правило, становится более сложной, поскольку длины полинуклеотидов значительно увеличиваются более ста нуклеотидов или приблизительно в этом диапазоне. Один из подходов, используемых для получения химически модифицированной РНК большой длины, заключается в получении двух или более молекул, которые лигируют вместе. Гораздо более длинные РНК, такие как РНК, кодирующие эндонуклеазу Cas9, легче получить ферментативными способами. Несмотря на то что для использования в РНК, полученных ферментативными способами, обычно доступно меньше типов модификаций, все еще существуют модификации, которые могут быть использованы, например, для повышения стабильности, уменьшения вероятности или степени ответа врожденной иммунной системы и/или усиления других признаков, описанных ниже и в данной области техники; и новые типы модификаций регулярно разрабатываются.

В качестве иллюстрации различных типов модификаций, особенно тех, которые часто используются с меньшими химически синтезированными РНК, модификации могут содержать один или более нуклеотидов, модифицированных в 2'-положении сахара. Такие модификации обычно встраивают в олигонуклеотиды, и было показано, что указанные олигонуклеотиды имеют более высокую T_m (т.е. более высокую аффинность связывания с мишенью), чем 2'-дезоксидиолонуклеотиды, в отношении конкретной мишени. Аналогичные модификации также могут быть сделаны в других положениях на олигонуклеотиде, в частности 3'-положении сахара на 3'-концевом нуклеотиде и 5'-положении 5'-концевого нуклеотида. Олигонуклеотиды также могут содержать миметики сахара, такие как циклобутил, вместо пентофуранозильной группы.

Было показано, что ряд модификаций нуклеотидов и нуклеозидов делают олигонуклеотид, в который они включены, более устойчивым к расщеплению нуклеазами по сравнению с нативным олигонуклеотидом; указанные модифицированные олигонуклеотиды сохраняются интактными в течение более длительного периода времени, чем немодифицированные олигонуклеотиды. Конкретные примеры модифицированных олигонуклеотидов включают те, которые содержат модифицированные остовы, например фосфотиоаты, фосфотриэфиры, метилфосфонаты, короткоцепочечные алкильные или циклоалкильные межсахарные связи или короткоцепочечные гетероатомные или гетероциклические межсахарные связи.

Модифицированные олигонуклеотидные остовы, которые не содержат атом фосфора, имеют остовы, в которых межнуклеозидные связи образованы короткоцепочечными алкильными или циклоалкильными фрагментами, смешанными гетероатомными и алкильными или циклоалкильными фрагментами или одним или более короткоцепочечными гетероатомными или гетероциклическими фрагментами. Указанные остовы включают те, которые содержат морфолиновые связи (частично образованные из сахарной части нуклеозида); силоксановые остовы; сульфидные, сульфоксидные и сульфоновые остовы; формацетильные и тиоформацетильные остовы; метиленформацетильные и тиоформацетильные остовы; алкенсодержащие остовы; сульфаматные остовы; метиленимино и метиленгидразиновые остовы; сульфонатные и сульфонамидные остовы; амидные остовы; и другие, содержащие смешанные компоненты N, O, S и CH_2 .

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения сахар и межнуклеозидная связь, т.е. остов, нуклеотидных звеньев, заменены новыми группами. Нуклеотидные звенья поддерживают для гибридизации с соответствующим целевым соединением нуклеиновой кислоты. Одно такое олигомерное соединение, олигонуклеотидный миметик, который, как было показано, обладает превосходной способностью к гибридизации, называется пептидная нуклеиновая кислота (ПНК). В соединениях ПНК сахарный остов олигонуклеотида заменен амидсодержащим остовом, например, аминоэтилглициновым остовом. Нуклеиновые основания сохранены и связаны, непосредственно или косвенно, с атомами азота азида амидной части остова.

Направляющие РНК также могут содержать, дополнительно или альтернативно, модификации или замены нуклеинового основания (часто называемого в данной области техники просто "основание"). В настоящей заявке термин "немодифицированные" или "природные" нуклеиновые основания включает аденин (A), гуанин (G), тимин (T), цитозин (C) и урацил (U). Модифицированные нуклеиновые основания включают нуклеиновые основания, которые редко или кратковременно обнаруживаются в природных нуклеиновых кислотах, например, гипоксантин, 6-метиладенин, 5-Ме-пиримидины, в частности, 5-метилцитозин (также называемый 5-метил-2'-дезоксцитозин и часто называемый 5-Ме-C), 5-гидроксиметилцитозин (НМС), гликозил-НМС и гентобиозил-НМС, а также синтетические нуклеиновые основания, например, 2-аминоаденин, 2-метиламиноаденин, 2-имидазолилалкиладенин, 2-аминоалкиламиноаденин или другие гетерозамещенные алкиладенины, 2-тиоурацил, 2-тиотимин, 5-бромурацил, 5-гидроксиметилурацил, 8-азагуанин, 7-дезазагуанин, N6-(6-аминогексил)аденин и 2,6-диаминопурин. Kornberg, A., *DNA Replication*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, p. 75-77 (1980); Gebeyehu et al., *Nucl. Acids. Res.*, 15:4513 (1997). Также может быть включено "универсальное" основание, известное в данной области техники, например инозин. Было показано, что замены 5-Ме-C повышают стабильность дуплекса нуклеиновой кислоты на 0,6-1,2°C (Sanghvi, Y.S., Crooke, S.T., Lebleu, B., eds., *Antisense Research and Applications*, CRC Press, Boca Raton, 1993, p. 276-278) и представляют собой варианты замен оснований.

Соответственно термин "модифицированный" относится к неприродному сахару, фосфату или ос-

нованию, которое включено в направляющую РНК, эндонуклеазу или как направляющую РНК, так и эндонуклеазу. Все положения в данном олигонуклеотиде не обязательно должны быть равномерно модифицированы, и фактически в один олигонуклеотид или даже в один нуклеозид в пределах олигонуклеотида может быть включено более одной из вышеупомянутых модификаций.

Более длинные полинуклеотиды, которые менее поддаются химическому синтезу и которые обычно получают путем ферментативного синтеза, также могут быть модифицированы различными способами. Подходящие модификации могут включать, например, включение определенных нуклеотидных аналогов, включение определенных последовательностей или других фрагментов на 5'-конце или 3'-конце молекул и другие модификации. В качестве иллюстрации мРНК, кодирующая Cas9, содержит приблизительно 4 тыс. п.о. и может быть синтезирована путем транскрипции в условиях *in vitro*. Модификации мРНК могут быть применены, например, для увеличения ее трансляции или стабильности (например, увеличения устойчивости к деградации в клетке) или уменьшения способности РНК вызывать ответ врожденной иммунной системы, который часто наблюдается в клетках после введения экзогенных РНК, особенно более длинных РНК, таких как РНК, кодирующие Cas9.

Многочисленные подходящие модификации были описаны в данной области техники, такие как полиА-хвосты, 5'-кэп аналоги (например, аналог кэп-структуры с правильной ориентацией (ARCA) или m7G(5')ppp(5')G (mCAP)), модифицированные 5'-концевые или 3'-концевые нетранслируемые области (НТО), использование модифицированных оснований (таких как псевдо-УТФ, 2-тио-УТФ, 5-метилцитидин-5'-трифосфат (5-метил-ЦТФ) или N₆-метил-АТФ), или обработка фосфатазой для удаления 5'-концевых фосфатов. Упомянутые и другие модификации известны в данной области техники, и новые модификации РНК регулярно разрабатываются.

Существует множество коммерческих поставщиков модифицированных РНК, включая, например, TriLink Biotech, AxoLabs, Bio-Synthesis Inc., Dharmascon и многие другие. Как описано TriLink, например, 5-метил-ЦТФ может быть использован для придания желательных характеристик, таких как повышенная устойчивость к действию нуклеаз, усиленная трансляция или сниженное взаимодействие рецепторов врожденной иммунной системы с РНК, транскрибируемой в условиях *in vitro*. Было показано, что 5-метилцитидин-5'-трифосфат (5-метил-ЦТФ), N₆-метил-АТФ, а также псевдо-УТФ и 2-тио-УТФ уменьшают стимуляцию врожденной иммунной системы в культуре и в условиях *in vivo*, однако усиливают трансляцию, как показано в публикациях Kormann et al. и Warren et al., упомянутых ниже.

Было показано, что химически модифицированная мРНК, доставленная в условиях *in vivo*, может быть использована для достижения улучшенного терапевтического действия; см., например, Kormann et al., *Nature Biotechnology*, 29, 154-157 (2011). Подходящие модификации могут быть использованы, например, для повышения стабильности молекулы РНК и/или снижения ее иммуногенности. С помощью химических модификаций, таких как псевдо-У, N₆-метил-А, 2-тио-У и 5-метил-Ц, было обнаружено, что замена одной четверти остатков уридина и цитидина на 2-тио-У и 5-метил-Ц, соответственно, приводила к значительному уменьшению распознавания мРНК, опосредованного Toll-подобными рецепторами (TLR), у мышей. Благодаря снижению активации врожденной иммунной системы указанные модификации могут быть использованы для эффективного повышения стабильности и долговечности мРНК в условиях *in vivo*; см., например, Kormann et al., см. выше.

Следовательно, в данной области техники было разработано множество различных модификаций, которые применяли для повышения стабильности РНК, уменьшения ответов врожденной иммунной системы и/или достижения других преимуществ, которые могут быть благоприятными в связи с введением полинуклеотидов в клетки человека, как описано в настоящем документе; см., например, обзоры Whitehead K.A. et al., *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 2:77-96 (2011); Gaglione & Messere, *Mini Rev. Med. Chem.*, 10(7):578-95 (2010); Chernolovskaya et al., *Curr Opin. Mol. Then*, 12(2):158-67 (2010); Deleavey et al., *Curr. Protoc. Nucleic. Acid. Chem. Chapter.*, 16:Unit 16.3 (2009); Behlke, *Oligonucleotides*, 18(4):305-19 (2008); Fucini et al., *Nucleic. Acid. Ther.*, 22(3):205-210 (2012); Bremsen et al., *Front Genet*, 3:154 (2012).

Как отмечалось выше, существует ряд коммерческих поставщиков модифицированных РНК, многие из которых специализируются на модификациях, предназначенных для повышения эффективности миРНК. Предложены различные подходы, основанные на различных результатах, представленных в литературе. Например, Dharmascon отмечает, что замену немостикового кислорода серой (фосфотиоат, PS) широко использовали для улучшения устойчивости миРНК к нуклеазам, согласно сообщению Kole, *Nature Reviews Drug Discovery*, 11:125-140 (2012). Сообщалось, что модификации 2'-положения рибозы улучшают устойчивость межнуклеотидной фосфатной связи к нуклеазам при одновременном повышении стабильности дуплекса (Tm), что также обеспечивает защиту от активации иммунной системы. Комбинация умеренных фосфотиоатных модификаций остова с небольшими, хорошо переносимыми 2'-заменами (2'-О-метил, 2'-фтор, 2'-гидро) обеспечивала высокостабильные миРНК для применения в условиях *in vivo*, согласно сообщению Soutschek et al., *Nature*, 432:173-178 (2004); и 2'-О-метильные модификации, как сообщалось, эффективно улучшают стабильность, согласно сообщению Volkov, *Oligonucleotides*, 19:191-202 (2009). В отношении уменьшения индукции ответов врожденной иммунной системы сообщалось, что модификация определенных последовательностей с использованием 2'-О-метил,

2'-фтор, 2'-гидро снижает взаимодействие TLR7/TLR8 при одновременном сохранении подавляющей активности; см., например, Judge et al., *Mol. Ther.*, 13:494-505 (2006); и Sekaite et al., *J. Mol. Biol.*, 365:90-108 (2007). Также было показано, что дополнительные модификации, такие как 2-тиоурацил, псевдоурацил, 5-метилцитозин, 5-метилурацил и N₆-метиладенозин, сводят к минимуму иммунные эффекты, опосредованные TLR3, TLR7 и TLR8; см., например, Kariko, K. et al., *Immunity* 23:165-175 (2005).

Как известно в данной области техники, и коммерчески доступно, ряд конъюгатов можно использовать с полинуклеотидами, такими как РНК, для применения согласно настоящему изобретению, что может усилить их доставку и/или поглощение клетками, включая, например, холестерин, токоферол и фолиевую кислоту, липиды, пептиды, полимеры, линкеры и аптамеры; см., например, обзор Winkler, *Ther. Deliv.*, 4:791-809 (2013) и ссылки, процитированные в нем.

Оптимизация кодонов.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полинуклеотид, кодирующий сайт-направленный полипептид, оптимизирован по кодомам в соответствии со стандартными способами в данной области техники для экспрессии в клетке, содержащей ДНК-мишень, представляющую интерес. Например, если желательная нуклеиновая кислота-мишень находится в клетке человека, то для получения полипептида Cas9 предусмотрен оптимизированный по кодомам полинуклеотид, кодирующий Cas9.

Комплексы нуклеиновой кислоты, нацеленной на геном, и сайт-направленного полипептида.

Нуклеиновая кислота, нацеленная на геном, взаимодействует с сайт-направленным полипептидом (например, нуклеазой, направляемой нуклеиновой кислотой, такой как Cas9), образуя тем самым комплекс. Нуклеиновая кислота, нацеленная на геном, направляет сайт-направленный полипептид к нуклеиновой кислоте-мишени.

Компоненты системы, кодирующей нуклеиновые кислоты.

Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к нуклеиновой кислоте, содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую нуклеиновую кислоту, нацеленную на геном, сайт-направленный полипептид согласно настоящему изобретению и/или любую нуклеиновую кислоту или белковые молекулы, необходимые для осуществления вариантов реализации способов согласно настоящему изобретению.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения нуклеиновая кислота, кодирующая нуклеиновую кислоту, нацеленную на геном, согласно настоящему изобретению, сайт-направленный полипептид согласно настоящему изобретению и/или любую нуклеиновую кислоту или белковые молекулы, необходимые для осуществления вариантов реализации способов согласно настоящему изобретению, включает вектор (например, рекомбинантный вектор экспрессии).

Термин "вектор" относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной транспортировать другую нуклеиновую кислоту, с которой она соединена. Одним типом вектора является "плаزمид", которая относится к кольцевой двухцепочечной петле ДНК, в которую могут быть лигированы дополнительные сегменты нуклеиновой кислоты. Другим типом вектора является вирусный вектор, в котором дополнительные сегменты нуклеиновой кислоты могут быть лигированы в вирусный геном. Некоторые векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую они введены (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальную точку начала репликации, и эписомальные векторы млекопитающих). Другие векторы (например, неэписомальные векторы млекопитающих) интегрируются в геном клетки-хозяина при введении в клетку-хозяина и, следовательно, реплицируются вместе с геномом хозяина.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения векторы способны направлять экспрессию нуклеиновых кислот, с которыми они функционально соединены. Такие векторы называются в настоящем документе "рекомбинантные векторы экспрессии" или более просто "векторы экспрессии", которые выполняют эквивалентные функции.

Термин "функционально соединенный" означает, что нуклеотидная последовательность, представляющая интерес, соединена с регуляторной последовательностью (последовательностями) таким способом, который обеспечивает экспрессию нуклеотидной последовательности. Термин "регуляторная последовательность" предназначен для включения, например, промоторов, энхансеров и других элементов, контролирующих экспрессию (например, сигналов полиаденилирования). Подходящие регуляторные последовательности хорошо известны в данной области техники и описаны, например, в Goeddel; *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Регуляторные последовательности включают те, которые направляют конститутивную экспрессию нуклеотидной последовательности во многих типах клеток-хозяев, и те, которые направляют экспрессию нуклеотидной последовательности только в определенных клетках-хозяевах (например, тканеспецифичные регуляторные последовательности). Специалисты в данной области техники поймут, что дизайн вектора экспрессии может зависеть от таких факторов как выбор клетки-мишени, желательный уровень экспрессии и т.п.

Векторы экспрессии согласно настоящему изобретению включают, но не ограничиваются указанными, вирусные векторы на основе вируса осповакцины, полиовируса, аденовируса, аденоассоциированного вируса, SV40, вируса простого герпеса, вируса иммунодефицита человека, ретровируса (например, вируса лейкоза мышей, вируса некроза селезенки и векторы, полученные из ретровирусов, таких как вирус саркомы Рауса, вирус саркомы Харви, вирус птичьего лейкоза, лентивирус, вирус иммунодефицита

человека, вирус миелопролиферативной саркомы и вирус опухоли молочной железы) и другие рекомбинантные векторы. Другие векторы, предназначенные для эукариотических клеток-мишеней, включают, но не ограничиваются указанными, векторы pXT1, pSG5, pSVK3, pBPV, pMSG и pSVLSV40 (Pharmacia). Другие векторы могут быть использованы, если они совместимы с клеткой-хозяином.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения вектор содержит один или более элементов, контролирующих транскрипцию и/или трансляцию. В зависимости от используемой системы хозяин/вектор в векторе экспрессии может быть использован любой из ряда подходящих элементов, контролирующих транскрипцию и трансляцию, включая конститутивные и индуцируемые промотеры, элементы энхансеров транскрипции, терминаторы транскрипции и т.д. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения вектор представляет собой самоинактивирующийся вектор, который инактивирует вирусные последовательности или компоненты аппарата CRISPR, или другие элементы.

Неограничивающие примеры подходящих эукариотических промоторов (например, промоторов, функциональных в эукариотической клетке) включают те, которые были получены из раннего-промежуточного промотора цитомегаловируса (ЦМВ), промотора тимидинкиназы вируса простого герпеса (ВПГ), промотора ранних и поздних генов SV40, длинных терминальных повторов (LTR) ретровируса, промотора фактора удлинения человека 1 (EF1), гибридной конструкции, содержащей энхансер цитомегаловируса (ЦМВ), гибридный с промотором бета-актина цыплят (CAG), промотора вируса стволовых клеток мыши (MSCV), промотора локуса фосфоглицераткиназы-1 (PGK) и мышинного металлотронеина-I.

Для экспрессии малых РНК, включая направляющие РНК, используемых совместно с эндонуклеазой Cas, предпочтительными могут быть различные промотеры, такие как промотеры РНК-полимеразы III, включая, например, U6 и H1. Описания и параметры для более частого использования таких промоторов известны в данной области техники, и дополнительная информация и подходы регулярно описываются; см., например, Ma, H. et al., *Molecular Therapy - Nucleic Acids* 3, e161 (2014), DOI: 10.1038/mtna.2014.12.

Вектор экспрессии также может содержать сайт связывания рибосомы для инициации трансляции и терминатор транскрипции. Вектор экспрессии также может содержать соответствующие последовательности для амплификации экспрессии. Вектор экспрессии также может содержать нуклеотидные последовательности, кодирующие ненативные метки (например, гистициновую метку, гемагглютининовую метку, зеленый флуоресцентный белок и т.д.), которые гибридованы с сайт-направленным полипептидом, обеспечивая тем самым гибридный белок.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения промотор представляет собой индуцируемый промотор (например, промотор белка теплового шока, регулируемый тетрациклином промотор, регулируемый стероидом промотор, регулируемый металлом промотор, регулируемый рецептором эстрогена промотор и т.д.). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения промотор представляет собой конститутивный промотор (например, промотор ЦМВ, промотор UBC). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения промотор представляет собой пространственно ограниченный и/или временно ограниченный промотор (например, тканеспецифичный промотор, промотор, специфичный для клеток определенного типа, и т.д.).

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения нуклеиновая кислота, кодирующая нуклеиновую кислоту, нацеленную на геном, согласно настоящему изобретению и/или сайт-направленный полипептид упакованы внутрь или на поверхности носителей для доставки в клетки. Носители для доставки согласно настоящему изобретению включают, но не ограничиваются указанными, наносферы, липосомы, квантовые точки, наночастицы, частицы полиэтиленгликоля, гидрогели и мицеллы. Как описано в данной области техники, для усиления предпочтительного взаимодействия указанных носителей с желательными типами клеток или местами можно использовать множество нацеливающих фрагментов.

Введение комплексов, полипептидов и нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению в клетки может происходить путем вирусной или бактериофаговой инфекции, трансфекции, конъюгации, слияния протопластов, липофекции, электропорации, нуклеофекции, осаждения с фосфатом кальция, опосредованной полиэтиленгликолем (PEI) трансфекции, опосредованной DEAE-декстраном трансфекции, опосредованной липосомами трансфекции, технологии бомбардировки частицами, прямой микроинъекции, опосредованной наночастицами доставки нуклеиновой кислоты и т.п.

Доставка.

Полинуклеотиды направляющих РНК (РНК или ДНК) и/или полинуклеотид(ы) эндонуклеазы (РНК или ДНК) могут быть доставлены с помощью вирусных или невирусных носителей для доставки, известных в данной области техники. В другом варианте полипептид(ы) эндонуклеазы может быть доставлен с помощью невирусных носителей, известных в данной области техники, таких как электропорация или липидные наночастицы. В других альтернативных вариантах реализации ДНК-эндонуклеаза может быть доставлена в виде одного или более полипептидов по отдельности или в виде предварительного комплекса с одной или более направляющими РНК или одной или более crРНК вместе с tracrРНК.

Полинуклеотиды могут быть доставлены с помощью невирусных средств для доставки, включая, но

не ограничиваясь указанными, наночастицы, липосомы, рибонуклеопротеины, положительно заряженные пептиды, небольшие РНК-конъюгаты, химеры аптамер-РНК и комплексы РНК-гибридный белок. Некоторые иллюстративные невирусные средства доставки описаны в работе Peer and Lieberman, Gene Therapy, 18:1127-1133 (2011) (в которой основное внимание уделяется невирусным средствам доставки миРНК, которые также можно применять для доставки других полинуклеотидов).

Полинуклеотиды, такие как направляющая РНК, онРНК и мРНК, кодирующая эндонуклеазу, могут быть доставлены в клетку или пациенту с помощью липидной наночастицы (LNP).

LNP относится к любой частице, имеющей диаметр менее 1000, 500, 250, 200, 150, 100, 75, 50 или 25 нм. В другом варианте наночастица может иметь размер от 1 до 1000, 1-500, 1-250, 25-200, 25-100, 35-75 или 25-60 нм.

LNP могут быть получены из катионных, анионных или нейтральных липидов. Нейтральные липиды, такие как фузогенный фосфолипид DOPE или холестерин, который является компонентом мембраны, могут быть включены в LNP в качестве "вспомогательных липидов" для усиления трансфекционной активности и стабильности наночастиц. Ограничения катионных липидов включают низкую эффективность вследствие плохой стабильности и быстрого клиренса, а также индукцию воспалительных или противовоспалительных ответов.

LNP также могут состоять из гидрофобных липидов, гидрофильных липидов или как гидрофобных, так и гидрофильных липидов.

Любой липид или комбинация липидов, которые известны в данной области техники, могут быть использованы для получения LNP. Примеры липидов, используемых для получения LNP, включают DOTMA, DOSPA, DOTAP, DMRIE, DC-холестерин, DOTAP-холестерин, GAP-DMORIE-DPyPE и GL67A-DOPE-DMPE-полиэтиленгликоль (ПЭГ). Примеры катионных липидов включают 98N12-5, C12-200, DLin-KC2-DMA (KC2), DLin-MC3-DMA (MC3), XTC, MD1 и 7C1. Примеры нейтральных липидов включают DPSC, DPPC, POPC, DOPE и SM. Примеры ПЭГ-модифицированных липидов включают PEG-DMG, PEG-CerC14 и PEG-CerC20.

Липиды можно комбинировать в любом количестве молярных соотношений, чтобы получить LNP. Помимо этого, полинуклеотид (полинуклеотиды) можно комбинировать с липидом (липидами) в широком диапазоне молярных соотношений, чтобы получить LNP.

Как указано выше, сайт-направленный полипептид и нуклеиновая кислота, нацеленная на геном, могут быть введены в клетку или пациенту по отдельности. С другой стороны, сайт-направленный полипептид можно предварительно комбинировать с одной или более направляющими РНК или одной или более сгРНК вместе с траcРНК. Затем предварительно комбинированный материал может быть введен в клетку или пациенту. Указанный предварительно комбинированный материал известен как частица рибонуклеопротеина (RNP).

РНК способна специфично взаимодействовать с РНК или ДНК. Несмотря на то что это свойство используется во многих биологических процессах, оно также сопряжено с риском беспорядочных взаимодействий в клеточной среде, богатой нуклеиновыми кислотами. Одним из решений данной проблемы является образование частиц рибонуклеопротеина (RNP), в которых РНК предварительно комбинирована с эндонуклеазой. Другим преимуществом RNP является защита РНК от деградации. Эндонуклеаза в RNP может быть модифицированной или немодифицированной. Аналогичным образом нРНК, сгРНК, траcРНК или онРНК могут быть модифицированными или немодифицированными. Многочисленные модификации известны в данной области техники и могут быть использованы.

Эндонуклеазу и онРНК обычно комбинируют в молярном соотношении 1:1. В другом варианте эндонуклеазу, сгРНК и траcРНК обычно комбинируют в молярном соотношении 1:1:1. Однако для получения RNP может быть использован широкий диапазон молярных соотношений.

Для доставки может быть использован рекомбинантный аденоассоциированный вирус (AAV). Методики получения частиц рAAV, в которых геном AAV, который должен быть упакован, включающий полинуклеотид, который должен быть доставлен, гены гер и сар и вспомогательные вирусные функциональные элементы, предназначенные для введения в клетку, являются стандартными в данной области техники. Для получения гAAV необходимо присутствие в одной клетке (обозначенной в настоящем документе как упаковывающая клетка) следующих компонентов: генома гAAV, генов гер и сар AAV, отделенных от (т.е. не входящих в состав генома) генома гAAV, и функциональных элементов вспомогательного вируса. Гены гер и сар AAV могут быть из любого серотипа AAV, для которого может быть получен рекомбинантный вирус, и могут быть из другого серотипа AAV, отличного от ITR генома гAAV, включая, помимо всего прочего, серотипы AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAV-8, AAV-9, AAV-10, AAV-11, AAV-12, AAV-13 и AAV rh.74. Получение псевдотипированного гAAV описано, например, в публикации международной заявки на патент WO 01/83692. См. табл. 1.

Таблица 1

Серотип AAV	Номер доступа в Genbank
AAV-1	NC_002077.1

AAV-2	NC_001401.2
AAV-3	NC_001729.1
AAV-3B	AF028705.1
AAV-4	NC_001829.1
AAV-5	NC_006152.1
AAV-6	AF028704.1
AAV-7	NC_006260.1
AAV-8	NC_006261.1
AAV-9	AX753250.1
AAV-10	AY631965.1
AAV-11	AY631966.1
AAV-12	DQ813647.1
AAV-13	EU285562.1

Способ получения упаковывающей клетки включает создание линии клеток, которые стабильно экспрессируют все из компонентов, необходимых для получения частиц AAV. Например, плазмиду (или несколько плазмид), содержащую геном гAAV, лишенный генов гер и сар AAV, гены гер и сар AAV, отделенные от генома гAAV, и селективный маркер, такой как ген устойчивости к неомицину, интегрируют в геном клетки. Геномы AAV были введены в бактериальные плазмиды с помощью таких процедур как присоединение оснований GC (Samulski et al., 1982, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79:2077-2081), добавление синтетических линкеров, содержащих сайты расщепления рестрикционной эндонуклеазой (Laughlin et al., 1983, Gene, 23:65-73), или с помощью прямого лигирования тупых концов (Senapathy & Carter, 1984, J. Biol. Chem., 259:4661-4666). Линию упаковывающих клеток затем инфицируют вспомогательным вирусом, таким как аденовирус. Преимущества указанного способа заключаются в том, что клетки могут быть отобраны и подходят для крупномасштабного получения гAAV. Другие примеры подходящих способов основаны на применении аденовируса или бакуловируса, а не плазмиды, для введения геномов гAAV и/или генов гер и сар в упаковывающие клетки.

Общие принципы получения гAAV рассмотрены, например, в Carter, 1992, Current Opinions in Biotechnology, 1533-539; и Muzyczka, 1992, Curr. Topics in Microbial. and Immunol., 158:97-129). Различные подходы описаны в Ratschin et al., Mol. Cell. Biol., 4:2072 (1984); Hermonat et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 81:6466 (1984); Tratschin et al., Mol. Cell. Biol., 5:3251 (1985); McLaughlin et al., J. Virol., 62:1963 (1988); и Lebkowski et al., 1988, Mol. Cell. Biol., 7:349 (1988); Samulski et al. (1989, J. Virol., 63:3822-3828); патенте США № 5173414; WO 95/13365 и соответствующем патенте США № 5655876; WO 95/13392; WO 96/17947; PCT/US98/18600; WO 97/09441 (PCT/US96/14423); WO 97/08298 (PCT/US96/13872); WO 97/21825 (PCT/US96/20777); WO 97/06243 (PCT/FR96/01064); WO 99/11764; Perrin et al. (1995), Vaccine, 13:1244-1250; Paul et al. (1993), Human Gene Therapy, 4:609-615; Clark et al. (1996), Gene Therapy 3:1124-1132; патенте США № 5786211; патенте США № 5871882; и патенте США № 6258595.

Серотипы AAV-векторов могут быть сопоставлены с типами клеток-мишеней. Например, следующие примерные типы клеток могут быть трансдуцированы указанными серотипами AAV, помимо прочих. См. табл. 2.

Таблица 2

Тип ткани/клетки	Серотип
Печень	AAV8, AAV9
Скелетная мышца	AAV1, AAV7, AAV6, AAV8, AAV9
Центральная нервная система	AAV5, AAV1, AAV4
Пигментный эпителий сетчатки	AAV5, AAV4
Фоторецепторные клетки	AAV5
Легкое	AAV9
Сердце	AAV8, rh74
Поджелудочная железа	AAV8
Почка	AAV2

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения каждую из мРНК Cas9, онРНК, нацеленной на один или два локуса в гене титина, и донорной ДНК по отдельности заключают в липидные наночастицы или все вместе заключают в одну липидную наночастицу.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения Cas9 мРНК заключают в липидную наночастицу, в то время как онРНК и донорная ДНК будут доставлены в AAV-векторе.

Генетически модифицированные клетки.

Термин "генетически модифицированная клетка" относится к клетке, которая содержит по меньшей мере одну генетическую модификацию, введенную посредством редактирования генома (например, с использованием системы CRISPR/Cas). Согласно некоторым вариантам реализации в условиях *ex vivo*, описанным в настоящем документе, генетически модифицированная клетка представляет собой генетически модифицированную клетку-предшественника. Согласно некоторым вариантам реализации в условиях *in vivo*, описанным в настоящем документе, генетически модифицированная клетка представляет собой генетически модифицированную клетку сердца или скелетной мышцы. В область настоящего изобретения включена генетически модифицированная клетка, содержащая экзогенную нуклеиновую кислоту, нацеленную на геном, и/или экзогенную нуклеиновую кислоту, кодирующую нуклеиновую кислоту, нацеленную на геном.

Термин "контрольная обработанная популяция" описывает популяцию клеток, которые были обработаны с использованием идентичных сред, вирусной индукции, последовательностей нуклеиновых кислот, температуры, конfluентности, размера колбы, рН и т.д., за исключением добавления компонентов для редактирования генома. Любой способ, известный в данной области техники, может быть использован для измерения восстановления экспрессии или активности гена титина или белка титина, например, вестерн-блоттинг белка титина или количественная оценка мРНК титина.

Термин "выделенная клетка" относится к клетке, которая была удалена из организма, в котором она была первоначально обнаружена, или к потомкам такой клетки. Необязательно клетку культивировали в условиях *in vitro*, например, в определенных условиях или в присутствии других клеток. Необязательно клетку позднее вводят во второй организм или повторно вводят в организм, из которого она (или клетка, потомком которой она является) была выделена.

Термин "выделенная популяция" по отношению к выделенной популяции клеток относится к популяции клеток, которые были удалены и отделены от смешанной или гетерогенной популяции клеток. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения выделенная популяция представляет собой по существу чистую популяцию клеток по сравнению с гетерогенной популяцией, из которой клетки были выделены или обогащены. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения выделенная популяция представляет собой выделенную популяцию клеток-предшественников человека, например, по существу чистую популяцию клеток-предшественников человека, по сравнению с гетерогенной популяцией клеток, содержащей клетки-предшественники человека и клетки, из которых были получены клетки-предшественники человека.

Термин "существенно усиленный" в отношении конкретной популяции клеток относится к популяции клеток, в которых появление определенного типа клетки увеличивается по сравнению с ранее существовавшими или эталонными уровнями по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 3 раза, по меньшей мере в 4 раза, по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 6 раз, по меньшей мере в 7 раз, по меньшей мере в 8 раз, по меньшей мере в 9 раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 20 раз, по меньшей мере в 50 раз, по меньшей мере в 100 раз, по меньшей мере в 400 раз, по меньшей мере в 1000 раз, по меньшей мере в 5000 раз, по меньшей мере в 20000 раз, по меньшей мере в 100000 раз или более в зависимости, например, от желательных уровней таких клеток для облегчения кардиомиопатии или дру-

гой титинопатии.

Термин "существенно обогащенный" по отношению к определенной популяции клеток относится к популяции клеток, которая составляет по меньшей мере приблизительно 10%, приблизительно 20%, приблизительно 30%, приблизительно 40%, приблизительно 50%, приблизительно 60%, приблизительно 70% или более по отношению к клеткам, составляющим общую популяцию клеток.

Термины "существенно обогащенный" или "по существу чистый" по отношению к определенной популяции клеток относятся к популяции клеток, которая имеет по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере приблизительно 90% или по меньшей мере приблизительно 95% степень чистоты, по сравнению с клетками, составляющими общую популяцию клеток. Т.е. термины "по существу чистый" или "по существу очищенный" по отношению к популяции клеток-предшественников относятся к популяции клеток, которые содержат менее приблизительно 20%, приблизительно 15%, приблизительно 10%, приблизительно 9%, приблизительно 8%, приблизительно 7%, приблизительно 6%, приблизительно 5%, приблизительно 4%, приблизительно 3%, приблизительно 2%, приблизительно 1% или менее 1% клеток, которые не являются клетками-предшественниками, как определено терминами в настоящем документе.

Имплантация клеток пациентам.

Другой этап способа в условиях *ex vivo* согласно настоящему изобретению включает имплантацию гепатоцитов пациентам. Этап имплантации может быть выполнен с использованием любого способа имплантации, известного в данной области техники. Например, генетически модифицированные клетки могут быть инъецированы непосредственно в печень пациента или введены пациенту иным образом.

Другой этап способов в условиях *ex vivo* согласно настоящему изобретению включает введение пациентам *eCSC* или первичных кардиомиоцитов. Этап имплантации может быть выполнен с использованием любого способа имплантации, известного в данной области техники. Например, генетически модифицированные клетки могут быть инъецированы непосредственно в сердце пациента или введены пациенту иным образом.

Фармацевтически приемлемые носители.

Способы введения клеток-предшественников субъекту в условиях *ex vivo* согласно настоящему изобретению включают использование терапевтических композиций, содержащих клетки-предшественники.

Терапевтические композиции содержат физиологически переносимый носитель совместно с композицией клеток, растворенной или диспергированной в носителе в качестве активного ингредиента, и необязательно по меньшей мере один дополнительный биологически активный агент, описанный в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения терапевтическая композиция по существу не является иммуногенной при введении млекопитающему или пациенту-человеку в терапевтических целях, если это не является желательным.

В целом клетки-предшественники, описанные в настоящем документе, вводят в виде суспензии с фармацевтически приемлемым носителем. Специалист в данной области техники поймет, что фармацевтически приемлемый носитель должен быть использован в клеточной композиции, не будет включать буферы, соединения, криоконсервирующие агенты, консерванты или другие агенты в количествах, которые существенно нарушают жизнеспособность клеток, которые должны быть доставлены субъекту. Состав, содержащий клетки, может включать, например, осмотические буферы, которые позволяют поддерживать целостность клеточной мембраны, и необязательно питательные вещества для поддержания жизнеспособности клеток или усиления приживления при введении. Подходящие составы и суспензии известны специалистам в данной области техники и/или могут быть адаптированы для использования с клетками-предшественниками, как описано в настоящем документе, с использованием стандартных экспериментов.

Композиция клеток также может быть эмульгирована или представлена в виде липосомной композиции, при условии, что процедура эмульгирования не оказывает отрицательного влияния на жизнеспособность клеток. Клетки и любой другой активный ингредиент могут быть смешаны со вспомогательными веществами, которые являются фармацевтически приемлемыми и совместимыми с активным ингредиентом, и в количествах, подходящих для использования в терапевтических способах, описанных в настоящем документе.

Дополнительные агенты, включенные в клеточную композицию, могут включать фармацевтически приемлемые соли компонентов указанной композиции. Фармацевтически приемлемые соли включают кислотно-аддитивные соли (образованные со свободными аминогруппами полипептида), которые образованы с неорганическими кислотами, такими как, например, хлористоводородная кислота или фосфорная кислота, или такими органическими кислотами как уксусная, винная, миндальная и подобные. Соли, образованные со свободными карбоксильными группами, также могут быть получены из неорганических оснований, таких как, например, гидроксиды натрия, калия, аммония, кальция или трехвалентного железа, и таких органических оснований как изопропиламин, триметиламин, 2-этиламиноэтанол, гистидин, прокаин и т.п.

Физиологически переносимые носители хорошо известны в данной области техники. Примеры

жидких носителей включают стерильные водные растворы, которые не содержат никаких материалов в дополнение к активным ингредиентам и воде, или содержат буфер, такой как фосфат натрия при физиологическом значении pH, физиологический раствор или и то, и другое, например, забуференный фосфатом физиологический раствор. Помимо этого, водные носители могут содержать более одной буферной соли, а также соли, такие как хлориды натрия и калия, декстрозу, полиэтиленгликоль и другие растворенные вещества. Жидкие композиции также могут содержать жидкие фазы в дополнение к воде и за исключением воды. Примеры подходящих дополнительных жидких фаз включают глицерин, растительные масла, такие как хлопковое масло, и водно-масляные эмульсии. Количество активного соединения, используемого в композициях клеток, которое является эффективным в лечении конкретного расстройства или состояния, будет зависеть от характера расстройства или состояния и может быть определено с помощью стандартных клинических методик.

Введение и эффективность.

Термины "введение", "внесение" и "трансплантация" используются взаимозаменяемо применительно к помещению клеток, например, клеток-предшественников, субъекту с помощью способа или пути, который приводит к по меньшей мере частичной локализации введенных клеток в желательном сайте, таком как сайт повреждения или восстановления, так, что достигается желательный эффект(ы). Клетки, например, клетки-предшественники или их дифференцированное потомство могут быть введены любым подходящим путем, который приводит к доставке в желательное место у субъекта, где по меньшей мере часть имплантированных клеток или компонентов клеток остается жизнеспособной. Период жизнеспособности клеток после введения субъекту может быть коротким, от нескольких часов, например, двадцать четыре часа, до нескольких дней, до нескольких лет или даже на протяжении жизни пациента, т.е. долгосрочное приживание. Например, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, описанным в настоящем документе, эффективное количество миогенных клеток-предшественников вводят посредством системного пути введения, такого как внутрибрюшинный или внутривенный путь.

В настоящей заявке термины "индивидуальный", "субъект", "хозяин" и "пациент" используются взаимозаменяемо и относятся к любому субъекту, который нуждается в диагностике, лечении или терапии. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения субъект является млекопитающим. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения субъект является человеком.

При профилактическом введении способы лечения, описанные в настоящем документе, применяют у субъекта до появления симптомов кардиомиопатии или другой титинопатии. Соответственно профилактическое введение служит для предотвращения кардиомиопатии или другой титинопатии.

При терапевтическом введении способы, описанные в настоящем документе, применяют у субъекта при (или после) возникновении симптома кардиомиопатии или другой титинопатии.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения термин "эффективное количество" относится к количеству композиции, которую необходимо ввести для предотвращения или облегчения по меньшей мере одного симптома кардиомиопатии или другой титинопатии, и относится к достаточному количеству композиции, чтобы обеспечить желательный эффект, например, для лечения субъекта, имеющего кардиомиопатию или другую титинопатию. Следовательно, термин "терапевтически эффективное количество" относится к количеству композиции, которое является достаточным для стимулирования конкретного эффекта при введении типичному субъекту, такому как тот, который имеет или подвергается риску кардиомиопатии или другой титинопатии. Эффективное количество также будет включать количество, достаточное для того чтобы предотвратить или задержать развитие симптома заболевания, изменить течение симптома указанного заболевания (например, но не ограничиваясь этим, замедлить прогрессирование симптома заболевания), или обратить симптом заболевания. Следует понимать, что для любого конкретного случая подходящее "эффективное количество" может быть определено специалистом в данной области техники с использованием стандартных экспериментов.

Умеренное и постепенное увеличение уровней функционального белка титина, экспрессированного в клетках пациентов с кардиомиопатией или другой титинопатией, может быть благоприятным для облегчения одного или более симптомов заболевания, для увеличения долговременной выживаемости и/или для снижения побочных эффектов, связанных с другими способами лечения. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения эффективное лечение субъекта приводит к выработке по меньшей мере приблизительно 3, 5 или 7% функционального белка титина по отношению к общему количеству белка титина у субъекта, получившего лечение. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения функциональный белок титина будет составлять по меньшей мере приблизительно 10% от общего количества белка титина. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения функциональный белок титина будет составлять по меньшей мере от 20 до 30% от общего количества белка титина. Аналогичным образом предоставление одинаковых относительно ограниченных субпопуляций клеток, имеющих значительно повышенные уровни функционального белка титина, может быть благоприятным у разных пациентов, поскольку в некоторых ситуациях нормализованные клетки будут иметь селективное преимущество по сравнению с пораженными клетками. Однако даже невысокие уровни функционального белка титина могут быть благоприятными для улучшения одного

или более аспектов кардиомиопатии или другой титинопатии у пациентов. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения приблизительно 10%, приблизительно 20%, приблизительно 30%, приблизительно 40%, приблизительно 50%, приблизительно 60%, приблизительно 70%, приблизительно 80% или более модифицированных клеток у пациентов вырабатывают повышенные уровни функционального белка титина.

Термин "введение" относится к доставке композиции субъекту с помощью способа или пути, который приводит к по меньшей мере частичной локализации композиции клеток в желательном сайте. Композицию клеток можно вводить любым подходящим способом, который приводит к эффективному лечению у субъекта, т.е. введение приводит к доставке в желательное место у субъекта, где по меньшей мере часть доставленной композиции, т.е. по меньшей мере 1×10^4 клеток, доставляется в желательный сайт в течение определенного периода времени. Способы введения включают инъекцию, инфузию, инстилляцию или проглатывание. "Инъекция" включает, но не ограничивается указанными, внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интракавальную, внутрижелудочковую, интракапсулярную, внутриорбитальную, внутрисердечную, внутрикожную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, подкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, интрацереброспинальную и внутрисуставную инъекцию и инфузию. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения путь введения представляет собой внутривенный путь. Предпочтительным для доставки клеток обычно является введение путем инъекции или инфузии.

Согласно одному варианту реализации введение является системным. Выражения "системное введение", "введенный системно", "периферическое введение" и "введенный периферически" относятся к введению, отличному от непосредственного введения в целевой сайт, ткань или орган, так, что введение осуществляют в систему кровообращения субъекта.

Наборы.

Согласно настоящему изобретению предложен набор для осуществления способов согласно настоящему изобретению. Набор может содержать одну или более нуклеиновых кислот, нацеленных на геном, полинуклеотид, кодирующий нуклеиновую кислоту, нацеленную на геном, сайт-направленный полипептид, полинуклеотид, кодирующий сайт-направленный полипептид, и/или любую нуклеиновую кислоту или белковые молекулы, которые необходимы для осуществления вариантов реализации способов согласно настоящему изобретению или их комбинации.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения набор содержит

- (1) вектор, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую нуклеиновую кислоту, нацеленную на геном;
- (2) вектор, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую сайт-направленный полипептид, или сайт-направленный полипептид; и
- (3) реагент для восстановления и/или разбавления вектора(ов) и/или полипептида.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения набор содержит

(1) вектор, содержащий

- (i) нуклеотидную последовательность, кодирующую нуклеиновую кислоту, нацеленную на геном, и
- (ii) нуклеотидную последовательность, кодирующую сайт-направленный полипептид; и
- (2) реагент для восстановления и/или разбавления вектора.

Согласно некоторым вариантам реализации любого из указанных выше наборов, набор содержит одноцепочечную направляющую нуклеиновую кислоту, нацеленную на геном. Согласно некоторым вариантам реализации любого из указанных выше наборов, набор содержит двухцепочечную нуклеиновую кислоту, нацеленную на геном. Согласно некоторым вариантам реализации любого из указанных выше наборов, набор содержит две или более двухцепочечных направляющих или одноцепочечных направляющих нуклеиновых кислот. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения указанные наборы содержат вектор, который кодирует нуклеиновую кислоту, нацеленную на нуклеиновую кислоту.

Согласно некоторым вариантам реализации любого из указанных выше наборов набор может дополнительно содержать полинуклеотид, который должен быть вставлен для реализации желательной генетической модификации.

Компоненты набора могут быть в отдельных контейнерах или комбинированы в один контейнер.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения набор, описанный выше, дополнительно содержит один или более дополнительных реагентов, причем указанные дополнительные реагенты выбраны из буфера, буфера для введения полипептида или полинуклеотида в клетку, промыточного буфера, контрольного реагента, контрольного вектора, контрольного полинуклеотида РНК, реагента для получения *in vitro* полипептида из ДНК, адаптеров для секвенирования и тому подобного. Буфер может представлять собой стабилизационный буфер, буфер для восстановления, буфер для разбавления или т.п. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения набор также может содержать один или более компонентов, которые могут быть использованы для облегчения или усиления связывания с мишенью или расщепления ДНК эндонуклеазой или улучшения специфичности нацеливания.

В дополнение к вышеупомянутым компонентам набор может дополнительно содержать инструкцию по использованию компонентов набора для осуществления способов. Инструкции для осуществления способов обычно записаны на подходящем носителе для записи. Например, инструкции могут быть напечатаны на подложке, такой как бумага или пластик, и т.д. Инструкции могут присутствовать в наборах в виде вкладыша в упаковку, в маркировке контейнера набора или его компонентов (т.е. связаны с упаковкой или субупаковкой) и т.д. Инструкции могут быть предоставлены в виде электронного файла для хранения данных, присутствующего на подходящем носителе для чтения на компьютере, например CD-ROM, дискете, флеш-накопителе и т.д. В некоторых случаях фактические инструкции отсутствуют в наборе, но могут быть предоставлены средства для получения инструкций из удаленного источника (например, через Интернет). Примером такого варианта реализации является набор, который включает веб-адрес, где могут быть просмотрены инструкции и/или с которого могут быть загружены инструкции. Как и в случае с инструкциями, указанные способы получения инструкций могут быть записаны на подходящую подложку.

Состав направляющей РНК.

Направляющие РНК согласно настоящему изобретению представляют в виде состава с фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами, такими как носители, растворители, стабилизаторы, адъюванты, разбавители и т.д., в зависимости от конкретного способа введения и лекарственной формы. Композиции направляющих РНК обычно представлены в виде составов для достижения физиологически совместимого рН, и значение рН варьируется от приблизительно 3 до приблизительно рН 11, от приблизительно рН 3 до приблизительно рН 7, в зависимости от состава и способа введения. В других вариантах реализации рН доводят до диапазона от приблизительно рН 5,0 до приблизительно рН 8. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения композиции содержат терапевтически эффективное количество по меньшей мере одного соединения, описанного в настоящем документе, вместе с одним или более фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами. Необязательно композиции содержат комбинацию соединений, описанных в настоящем документе, или могут содержать второй активный ингредиент, который можно применять для лечения или предотвращения размножения бактерий (например, но не ограничиваясь указанными, антибактериальные или антимикробные агенты), или могут содержать комбинации реагентов согласно настоящему изобретению.

Подходящие вспомогательные вещества включают, например, молекулы-носители, которые включают большие, медленно метаболизируемые макромолекулы, такие как белки, полисахариды, полимолочные кислоты, полигликолевые кислоты, полимерные аминокислоты, сополимеры аминокислот и частицы неактивных вирусов. Другие примерные вспомогательные вещества включают антиоксиданты (например, но не ограничиваясь этим, аскорбиновую кислоту), хелатирующие агенты (например, но не ограничиваясь этим, ЭДТА), углеводы (например, но не ограничиваясь указанными, декстрин, гидроксиалкилцеллюлозу и гидроксиалкилметилцеллюлозу), стеариновую кислоту, жидкости (например, но не ограничиваясь указанными, масла, воду, физиологический раствор, глицерин и этанол), смачивающие или эмульгирующие агенты, вещества, забуферивающие рН, и т.п.

Другие возможные терапевтические подходы.

Предпочтительным является использование эндонуклеаз CRISPR, таких как Cas9, в способах, описанных в настоящем документе. Однако принципы, описанные в настоящем документе, такие как терапевтические сайты-мишени, могут быть применены к другим формам эндонуклеаз, таким как ZFN, TALEN, HE или MegaTAL.

Нуклеазы, содержащие цинковые пальцы.

Нуклеазы, содержащие цинковые пальцы (ZFN), представляют собой модульные белки, состоящие из модифицированного ДНК-связывающего домена цинкового пальца, соединенного с каталитическим доменом эндонуклеазы FokI типа II. Поскольку FokI функционирует только как димер, пара ZFN должна быть модифицирована для связывания с последовательностями "полусайтов" когнатных мишеней на противоположных цепях ДНК и с точным расстоянием между ними, чтобы обеспечить возможность образования каталитически активного димера FokI. При димеризации домена FokI, который сам по существу не обладает специфичностью в отношении последовательности, двухцепочечный разрыв ДНК возникает между полусайтами ZFN в качестве начального этапа редактирования генома.

ДНК-связывающий домен каждой ZFN, как правило, состоит из 3-6 цинковых пальцев распространенной структуры Cys2-His2, причем каждый палец главным образом распознает триплет нуклеотидов на одной цепи последовательности ДНК-мишени. Несмотря на то что кросс-нитевое взаимодействие с четвертым нуклеотидом также может быть важным. Изменение аминокислот пальца в положениях, которые осуществляют ключевые контакты с ДНК, изменяет специфичность последовательности данного пальца. Следовательно, белок цинкового пальца с четырьмя пальцами будет селективно распознавать последовательность-мишень, содержащую 12 п.о., причем последовательность-мишень представляет собой комбинацию предпочтительных триплетов для каждого пальца, хотя соседние пальцы могут в разной степени влиять на триплетное предпочтение. Важный аспект ZFN заключается в том, что они могут быть легко повторно нацелены практически на любой геномный локус путем простого изменения отдельных пальцев, хотя для осуществления такого перенацеливания необходим большой опыт. В боль-

шинстве вариантов применения ZFN используют белки 4-6 пальцев, которые распознают 12-18 п.о. соответственно. Следовательно, пара ZFN, как правило, будет распознавать комбинированную последовательность-мишень из 24-36 п.о., не включая спейсер из 5-7 п.о. между полусайтами. Последовательность-мишень указанной длины, вероятно, будет уникальной в геноме человека, это позволяет предположить, что повторяющиеся последовательности или гомологи генов исключены в процессе проектирования. Тем не менее, взаимодействия белок ZFN-ДНК не являются абсолютными по своей специфичности, поэтому возникают нецелевые связи и события расщепления, либо в виде гетеродимера между двумя ZFN, либо в виде гомодимера одной или другой из ZFN. Последняя возможность была эффективно устранена путем конструирования интерфейса димеризации домена FokI, чтобы создать варианты "плюс" и "минус", также известные как облигатные гетеродимерные варианты, которые могут димеризоваться только друг с другом, а не с самими собой. Усиление обязательной гетеродимеризации предотвращает образование гомодимера. Это значительно повысило специфичность ZFN, а также любой другой нуклеазы, в которой используются указанные варианты FokI.

В данной области техники были описаны различные системы на основе ZFN, регулярно сообщаются их модификации, и в многочисленных ссылках описаны правила и параметры, которые используют для того чтобы руководить дизайном ZFN; см., например, Segal et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 96(6):2758-63 (1999); Dreier B. et al., J. Mol. Biol., 303(4):489-502 (2000); Liu Q. et al., J. Biol. Chem., 277(6):3850-6 (2002); Dreier et al., J. Biol. Chem., 280(42):35588-97 (2005); и Dreier et al., J. Biol. Chem., 276(31):29466-78 (2001).

Эффекторные нуклеазы, сходные с активатором транскрипции (TALEN).

TALEN представляют другой формат модульных нуклеаз, в котором, как и в случае ZFN, модифицированный ДНК-связывающий домен соединяется с нуклеазным доменом FokI, и пара TALEN работает в тандеме для достижения целевого расщепления ДНК. Основное отличие от ZFN заключается в характере ДНК-связывающего домена и связанных с ним свойств распознавания последовательности ДНК-мишени. ДНК-связывающий домен TALEN происходит от белков TALE, которые были первоначально описаны в бактериальном патогене растений *Xanthomonas* sp. TALE состоят из тандемных массивов, содержащих повторы 33-35 аминокислот, причем каждый повтор распознает одно основание в последовательности ДНК-мишени, которая обычно содержит до 20 п.о., что дает общую длину последовательности-мишени до 40 п.о. Нуклеотидная специфичность каждого повтора определяется парой переменных аминокислотных остатков (RVD), которая содержит только две аминокислоты в положениях 12 и 13. Гуаниновые, адениновые, цитозиновые и тиминные основания преимущественно распознаются четырьмя RVD: Asn-Asn, Asn-Ile, His-Asp и Asn-Gly соответственно. Это представляет собой гораздо более простой код распознавания, чем для цинковых пальцев, и, следовательно, является преимуществом для дизайна нуклеаз, по сравнению с цинковыми пальцами. Тем не менее, как и в случае ZFN, специфичность взаимодействий белок-ДНК для TALEN не является абсолютной, и использование облигатных гетеродимерных вариантов домена FokI для уменьшения нецелевой активности обеспечило преимущества для TALEN.

Были созданы дополнительные варианты домена FokI, каталитическая функция которых дезактивирована. Если одна половина TALEN или пары ZFN содержит неактивный домен FokI, то в сайте-мишени будет происходить только одноцепочечное расщепление (надрез) ДНК, а не DSB. Результат сопоставим с использованием мутированных вариантов "никазы" CRISPR/Cas9, в которых один из доменов расщепления Cas9 дезактивирован. Надрезы ДНК могут быть использованы для управления редактированием генома с помощью HDR, но с меньшей эффективностью, чем с помощью DSB. Главным преимуществом является то, что нецелевые надрезы быстро и точно восстанавливаются, в отличие от DSB, которые подвержены неправильному восстановлению посредством NHEJ.

В данной области техники описано множество систем на основе TALEN, и их модификации регулярно сообщаются; см., например, Boch, Science, 326(5959):1509-12 (2009); Mak et al., Science, 335(6069):716-9 (2012); и Moscou et al., Science, 326(5959):1501 (2009). Использование TALEN на основе платформы "Golden Gate" описано несколькими группами; см., например, Cermak et al., Nucleic Acids Res., 39(12):e82 (2011); Li et al., Nucleic Acids Res., 39(14):6315-25(2011); Weber et al., PLoS One, 6(2):e16765 (2011); Wang et al., J. Genet. Genomics., 41(6):339-47, Epub, 2014 May 17 (2014); и Cermak T. et al., Methods Mol. Biol., 7239:133-59 (2015).

Самонастраивающиеся эндонуклеазы.

Самонастраивающиеся эндонуклеазы (HE) представляют собой специфичные в отношении последовательности эндонуклеазы, которые имеют длинные последовательности распознавания (14-44 пары оснований) и расщепляют ДНК с высокой специфичностью, часто в сайтах, уникальных в геноме. Существует по меньшей мере шесть известных семейств HE, классифицированных по их структуре, включая LAGLIDADG, GIY-YIG, His-Cis-бокс, H-N-H, PD-(D/E)xK и Vsr-подобную HE, которые получены из широкого диапазона хозяев, включая эукариот, простейших, бактерии, архей, цианобактерии и фаги. Как и в случае ZFN и TALEN, HE могут быть использованы для создания DSB в локусе-мишени в качестве начального этапа редактирования генома. Помимо этого, некоторые природные и модифицированные HE разрезают только одну цепь ДНК, функционируя тем самым как сайт-специфичные никазы. Большая последовательность-мишень HE и специфичность, которую они обеспечивают, позволяют рассматривать

их как перспективных кандидатов для создания сайт-специфичных DSB.

В данной области техники описаны различные системы на основе HE, и их модификации регулярно сообщаются; см., например, обзоры Steentoft et al., *Glycobiology*, 24(8):663-80 (2014); Belfort, Bonocora, *Methods. Mol. Biol.*, 1123:1-26 (2014); Hafez and Hausner, *Genome*, 55(8):553-69 (2012); и ссылки, процитированные в них.

MegaTAL/Tev-mTALEN/MegaTev.

В качестве другого примера гибридных нуклеаз в платформе MegaTAL и платформе Tev-mTALEN используется гибрид ДНК-связывающего домена TALE с каталитически активной HE, что позволяет использовать преимущества как корректируемого связывания ДНК, так и специфичности TALE, а также специфичности в отношении расщепляемой последовательности, характерной для HE; см., например, Boissel et al., *NAR*, 42:2591-2601 (2014); Kleinstiver et al., *G3*, 4:1155-65 (2014); и Boissel, Scharenberg, *Methods. Mol. Biol.*, 1239:171-96(2015).

В другом варианте структура MegaTev представляет собой гибрид мегануклеазы (Mega) и нуклеазного домена, полученного из самонаводящейся эндонуклеазы I-TevI (Tev), относящейся к семейству GIY-YIG. Два активных сайта расположены на расстоянии ~30 п.о. друг от друга на субстрате ДНК и позволяют получить два DSB с несовместимыми липкими концами; см., например, Wolfs et al., *NAR*, 42, 8816-29 (2014). Предполагается, что другие комбинации существующих подходов, основанных на использовании нуклеаз, будут развиваться и могут быть использованы для достижения описанных в настоящем документе нацеленных модификаций генома.

Нуклеазы dCas9-FokI и другие.

Комбинирование структурных и функциональных свойств нуклеазных платформ, описанных выше, обеспечивает дополнительный подход к редактированию генома, который может потенциально преодолеть некоторые из исходных недостатков. Например, в системе редактирования генома CRISPR, как правило, для создания DSB используется одна эндонуклеаза Cas9. Специфичность нацеливания определяется 20-нуклеотидной последовательностью в направляющей РНК, которая подвергается спариванию оснований по Уотсону-Крику с ДНК-мишенью (плюс 2 дополнительных основания в прилегающей последовательности NAG или NGG PAM в случае Cas9 из *S. aureus*). Такая последовательность является достаточно длинной, чтобы быть уникальной в геноме человека, однако специфичность взаимодействия РНК/ДНК не является абсолютной, при этом иногда допускается значительное несоответствие, особенно в 5'-концевой половине последовательности-мишени, что эффективно уменьшает количество оснований, которые определяют специфичность. Одним из решений указанной проблемы была полная дезактивация каталитической функции Cas9, при одновременном сохранении только функции связывания ДНК с РНК, и вместо этого осуществляли гибридизацию домена FokI с дезактивированной Cas9; см., например, Tsai et al., *Nature Biotech.*, 32:569-76 (2014); и Guilinger et al., *Nature Biotech.*, 32:577-82 (2014). Поскольку домен FokI должен димеризоваться для того чтобы стать каталитически активным, две направляющие РНК необходимы для закрепления двух гибридов Cas9-FokI в непосредственной близости, чтобы образовать димер и расщепить ДНК. Это существенно удваивает количество оснований в комбинированных сайтах-мишенях, увеличивая тем самым строгость нацеливания на основе CRISPR-систем.

В качестве другого примера, гибридизация ДНК-связывающего домена TALE с каталитически активной HE, такой как I-TevI, позволяет использовать преимущества корректируемого связывания ДНК и специфичности TALE, а также специфичность в отношении расщепляемой последовательности, характерную для I-TevI, при этом ожидается, что нецелевое расщепление может быть дополнительно снижено.

Другие определения.

Термин "содержащий" или "содержит" используется по отношению к композициям, способам и их соответствующему компоненту(ам), которые являются существенными для настоящего изобретения, указанный термин подразумевает включение неуказанных элементов, независимо от их значимости.

Термин "состоящий по существу из" относится к тем элементам, которые необходимы для конкретного варианта реализации. Упомянутый термин допускает наличие дополнительных элементов, которые не оказывают существенного влияния на основную и новую или функциональную характеристику (характеристики) указанного варианта реализации настоящего изобретения.

Термин "состоящий из" относится к композициям, способам и их соответствующим компонентам, описанным в настоящем документе, которые исключают любой элемент, не указанный в данном описании варианта реализации.

Формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если в контексте явно не указано иное.

Некоторым численным значениям, представленным в настоящем документе, предшествует термин "приблизительно". Термин "приблизительно" используется для обеспечения буквенной поддержки численного значения, которому предшествует термин "приблизительно", а также численного значения, которое является приблизительным численным значением, т.е. аппроксимационное не перечисленное численное значение может быть числом, которое, применительно к контексту, в котором оно представлено, является существенным эквивалентом конкретно перечисленного численного значения.

В том случае, если в настоящем документе представлен диапазон численных значений, предполага-

ется, что каждое промежуточное значение между нижним и верхним пределом диапазона, значения, которые представляют собой верхние и нижние пределы диапазона, и все указанные значения, которые находятся в пределах диапазона, включены в область настоящего изобретения. Все возможные поддиапазоны в нижнем и верхнем пределах диапазона также включены в область настоящего изобретения.

Примеры

Настоящее изобретение будет полностью понятно с помощью ссылки на следующие примеры, которые обеспечивают иллюстративные неограничивающие варианты реализации настоящего изобретения.

Примеры описывают применение системы CRISPR в качестве иллюстративной методики редактирования генома, чтобы восстановить мутации в гене титина, что приводит к постоянной коррекции мутаций в геномном локусе, или экспрессии в гетерологичном локусе, что восстанавливает активность титина. Восстановление мутаций путем редактирования генома представляет собой новую терапевтическую стратегию для возможного облегчения кардиомиопатий или других титинопатий, описанных и проиллюстрированных в настоящем документе.

Пример 1.

Модель восстановления усекающей мутации гена титина путем редактирования генома с помощью CRISPR/Cas9 в условиях *in vitro* была разработана на основе мутаций, выявленных в патенте, в котором в качестве модели была использована центронукулярная миопатия, а также дилатационная кардиомиопатия (Seuhan-Birosy, *Neurology*, 81(14): 1205-1214 (2013)). Фибробласты пациента имели мутацию G>C в экзона титина 219 (мутация с.32854G>C), расположенную в сайте сплайсинга, что приводит к усечению С-конца титина и потере сайта связывания калпаина 3 и домена титинкиназы. Другая усекающая мутация была идентифицирована в интроне 242 (мутация с.37112G>A).

Стратегия восстановления 1.

В качестве первой примерной стратегии восстановления мутация титина с.32854G>C являлась мишенью для восстановления с использованием Cas9 *S. aureus* и одной из четырех различных нРНК для вставки донорной матрицы дикого типа, которая корректировала мутацию.

Области гена титина человека вблизи мутации экзона 219 сканировали для выявления сайтов расщепления. Поскольку для редактирования генома использовали эндонуклеазы Cas9 *S. aureus*, каждую область сканировали для выявления мотива, прилегающего к протоспейсеру (PAM), из *S. aureus*, содержащего последовательность NNGRRT. Ряд спейсеров, содержащих 21 п.о., нацеленных на ДНК титина, смежную с PAM, разрабатывали для включения в онРНК. На фиг. 2 представлены выбранные PAM и спейсерная последовательность, содержащая 21 п.о. (каждой нРНК), которая комплементарна выбранной целевой последовательности ДНК титина. Номер положения, приведенный на фиг. 2, соответствует 3'-концу направляющей последовательности, которая является комплементарной геномной последовательности титина. Оценку специфичности определяли с использованием программного обеспечения, доступного на DeskGen.com. Чем выше оценка специфичности, тем более специфичной является нРНК в отношении гена титина согласно прогнозам.

Чтобы экспрессировать каждую онРНК и Cas9 *S. aureus*, использовали плазмиду № 61591 (Addgene, Кембридж, Массачусетс, США) (pX601-AAV-CMV::NLS-SaCas9-NLS-3xHA-bGFP;U6::BsaI-sgRNA) (Ran et al., см. выше). Плазида кодирует одновекторную систему AAV-Cas9, содержащую Cas9 из *Staphylococcus aureus* (SaCas9) и ее онРНК. ДНК, кодирующую одну из спейсерных последовательностей, содержащую 21 п.о., вводили в соответствующее место в плазмиде так, что спейсерная последовательность экспрессировалась как 5'-конец онРНК. На фиг. 3 представлена структура и последовательность нРНК, при этом одна из специфичных спейсерных последовательностей заменяет 5'-концевые нуклеотиды, показанные как "N", и остальные нуклеотиды являются идентичными среди нРНК.

Фибробласты пациентов совместно трансфицировали путем электропорации плазмидой Sa-Cas9/нРНК и донорной матрицей дикого типа для восстановления мутации с.32854G>A. Фибробласты обрабатывали трипсином и осаждали в течение 5 мин при 1500 g. Затем клетки промывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ) и центрифугировали. Затем клетки ресуспендировали в 1-2 мл среды RPMI (без сыворотки или антибиотиков) и подсчитывали. Для электропорации клетки (200 мкл - 5×10^5 клеток) помещали в кювету размером 0,2 см с 10 мкг плазмиды (не более 15 мкл, предпочтительно в воде) и ДНК-матрицы и подвергали электропорации при 250 В, 500 мкФ. Вносили 800-900 мкл среды для культивирования (содержащей по меньшей мере 20% фетальной бычьей сыворотки), и клетки высевали в 6- или 12-луночный планшет.

Среды	Объем	Кол-во клеток	Кювета	Условия	ДНК
RPMI	200 мкл	5×10^5	0,2 см	250 В, 500 мкФ	10 мкг
RPMI	500 мкл	1×10^6	0,4 см	250 В, 500 мкФ	10-20 мкг

Донорная матрица (фиг. 4) представляла собой одноцепочечный олигонуклеотид, содержащий 100 нуклеотидов (нт.), который содержал гомологичные плечи и перекрывал 21-нуклеотидную последовательность-мишень, но содержал мутированную последовательность PAM, чтобы уменьшить вероятность

разрезания донорной матрицы под действием Cas9.

Чтобы продемонстрировать коррекцию гена в фибробластах пациента, обработанные клетки проверяли для выявления активности, направленной на модификацию гена, с помощью количественного исследования T7E1 через 48 часов после трансфекции. Продукты ПЦР разделяли на 0,7% агарозном геле, окрашенном этидиумбромидом. Полученные результаты представлены на фиг. 5, где процент вставок/делеций представляет собой сумму всех NHEJ-опосредованных вставок/делеций для всех образцов. Количественное исследование T7E1 продемонстрировало 3-10% эффективность в фибробластах пациента.

Стратегия восстановления 2.

В качестве второй примерной стратегии восстановления мутация титина с.32854G>C являлась мишенью для восстановления с использованием Cas9 *S. aureus* и пары нРНК, чтобы удалить (или "пропустить") экзон 219, содержащий мутацию, чтобы восстановить рамку считывания титина дикого типа.

Области двух интронов (интрона 218 и интрона 219), фланкирующие экзон 219, сканировали для выявления сайтов расщепления. Как и в предыдущем примере, поскольку для редактирования генома использовали эндонуклеазу Cas9 из *S. aureus*, каждую область сканировали для выявления РАМ *S. aureus*, содержащего последовательность NNGRRT. Спейсерную последовательность, содержащую 21 п.о., конструировали так, чтобы нацелить ее на последовательность ДНК, смежную с РАМ в каждом интроне.

Каждую из спейсерных последовательностей, содержащих 21 п.о., встраивали в онРНК (например, как описано для стратегии 1). На фиг. 6 представлены выбранные РАМ и спейсерная последовательность, содержащая 21 п.о. (каждой нРНК), которая комплементарна выбранной целевой последовательности ДНК интрона. Спейсерные последовательности, содержащие 21 п.о., которые могут быть альтернативно использованы в одном или обоих элементах пары онРНК для удаления экзона 219, представлены на фиг. 7.

Затем две онРНК, одна из которых нацелена на интрон 218 и другая нацелена на интрон 219, использовали вместе с Cas9 *S. aureus* для удаления экзона 219 титина в клетке субъекта.

Стратегия восстановления 3.

В качестве третьей примерной стратегии восстановления мутация титина с.37112G>А являлась мишенью для восстановления с использованием Cas9 *S. aureus* и одной из трех различных нРНК, чтобы вставить донорную матрицу дикого типа, которая корректировала мутацию.

Области интрона 242 сканировали для выявления сайтов расщепления. Как и в предыдущем примере, поскольку для редактирования генома использовали эндонуклеазу Cas9 из *S. aureus*, каждую область сканировали для выявления РАМ *S. aureus*, содержащего последовательность NNGRRT. Ряд спейсерных последовательностей, содержащих 21 п.о., нацеленных на ДНК титина, смежную с РАМ, разрабатывали для включения в онРНК. На фиг. 8 представлены выбранные РАМ и спейсерная последовательность, содержащая 21 п.о. (каждой нРНК), которая комплементарна выбранной целевой последовательности ДНК титина.

Каждую из спейсерных последовательностей, содержащих 21 п.о. затем включали в онРНК (например, как описано для стратегии 1).

Одну из онРНК, нацеленную на интрон 24, вместе с Cas9 *S. aureus* и донорной матрицей дикого типа использовали для восстановления мутации в интроне 242 в клетке субъекта.

Стратегия восстановления 4.

В качестве четвертой примерной стратегии восстановления мутация с.4362insAT в экзоне титина 326 являлась мишенью для восстановления с использованием *S. aureus* Cas9 и пары нРНК, чтобы удалить (или "пропустить") экзон 326, содержащий мутацию, для восстановления рамки считывания титина дикого типа.

Области двух интронов (интрон 325-327), фланкирующие экзон 326, сканировали для выявления сайтов расщепления. Как и в предыдущем примере, поскольку для редактирования генома использовали эндонуклеазу Cas9 из *S. aureus*, каждую область сканировали для выявления РАМ *S. aureus*, содержащего последовательность NNGRRT. Спейсерную последовательность, содержащую 21 п.о. конструировали так, чтобы нацелить на последовательность ДНК, смежную с РАМ в каждом интроне.

На фиг. 9 представлены два набора выбранных РАМ (один набор для каждого интрона) и 21-нуклеотидная спейсерная последовательность (каждой нРНК), которая комплементарна выбранной целевой последовательности ДНК интрона. Затем каждую пару спейсерных последовательностей, содержащих 21 п.о. (по одной из каждого набора на пару), включали в онРНК (например, как описано для стратегии 1).

Две онРНК, одна из которых нацелена на интрон 325 и другая нацелена на интрон 327, затем использовали вместе с Cas9 *S. aureus*, чтобы удалить экзон титина 326 в клетках субъекта.

Пример 2.

Кассеты SaCas9/нРНК из плазмид, полученных в экспериментах, описанных в примере 1, будут упакованы в gAAV.rh74. Полученные gAAV в общем случае называются gAAV.rh74.Cas9TTN в примере 4 ниже.

Модифицированный подход перекрестной упаковки, ранее описанный в Rodino-Klapac et al., J. Transl. Med., 5:45 (2007), использовали для получения вектора gAAV. Способ тройной трансфекции с

осаждением $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ в клетках HEK293 позволяет упаковывать ITR AAV2 в другой серотип капсида AAV (Rabinowitz et al., *J. Virol.*, 76(2):791-801 (2002); и Grieger et al., *Nat. Protoc.*, 1(3):1412-1428 (2006)). Полученные плазмиды включали

- (i) pAAV.Cas9.TTN;
- (ii) rep2-caprh.74 модифицированные вспомогательные плазмиды AAV, кодирующие сар изолята rh.74, сходного с серотипом 8; и
- (iii) вспомогательную плазмиду аденовируса типа 5 (pAdhelper), экспрессирующую гены аденовируса E2A, E4 ORF6 и PНК VA I/II.

Векторы очищали и титр инкапсулированного векторного генома (vg) определяли (используя систему детектирования Prism 7500 Taqman (PE Applied Biosystems, Карлсбад, Калифорния, США)), как описано ранее (Clark et al., *Hum. Gene. Ther.*, 10(6):1031-1039 (1999)).

Пример 3.

В модели на мышах, содержащей мутации титина, rAAV.rh74.Cas9TTN доставляли с использованием внутрикоронарного подхода, и повышение дозы использовали для установления надлежащей дозы для достижения экспрессии в кардиомиоцитах.

Модель включает индукцию ишемии миокарда в сердце мышей с помощью модифицированного варианта лигирования коронарной артерии (Gao et al., *Methods in Molecular Therapy*, 2013, 1037: 299-311; Gao et al., *Circ Res.*, 107(12):1445-1453). Данный новый подход улучшил выживаемость, уменьшил время восстановления и снизил частоту сердечной аритмии, по сравнению со стандартными способами проникновения в грудную клетку (торакотомией или стернотомией). Доставка AAV.rh74.CMV.eGFP с помощью внутрикоронарного подхода в модели приводит к экспрессии eGFP только в сердце с высокой эффективностью трансдукции.

Модель 1: модель DCM, нацеленная на экзон 326.

Платформу CRISPR MIT (crispr.mit.edu) использовали для разработки усеченных онПНК (5'-NNGRRT-3') (Doench et al., *Nature Biotechnology*, 34(2):184-91 (2016)), нацеленных на геномную последовательность вокруг экзона 326 человека, чтобы вставить 2 пары оснований (с.43628insAT) для введения определенной мутации DCM человека. Указанная мутация была первоначально идентифицирована в двух крупных родственных когортах в Великобритании, однако она была идентифицирована приблизительно в 15% популяции TTN DCM (Gramlich et al., *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 47(3):352-358 (2009); Zhou et al., *BioMed Research International*, 2075:163564 (2015); Gramlich et al., *EMBO Molecular Medicine*, 7(5):562-576 (2015); Peled et al., *International Journal of Cardiology*, 171(1):24-30 (2014); Gerull et al., *Nature Genetics*, 30(2):201-204 (2002)). Помимо этого, в литературе описан потенциальный внутренний промотор на стыке экзонов 239 и 240 в TTN, который разграничивает более патогенные мутации у пациентов с TTN (Zou et al., *eLife*, 4:e09406 (2015)). Пациенты с мутациями, которые расположены дистальнее внутреннего промотора, имеют более тяжелые случаи DCM. В этой связи была разработана доступная модель на мышах для исследования терапевтических вмешательств.

Последовательности онПНК сопоставляли с геномом человека, чтобы проверить исключение однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) (Tsai et al., *Nature Biotechnology*, 33(2):187-197 (2015)). мПНК Cas9, полученную из *Staphylococcus aureus*, очищали и ресуспендировали в буфере для инъекций EmbryoMax (Temecula). онПНК получали с помощью транскрипции в условиях *in vitro*, как было опубликовано ранее (Mashiko et al., *Scientific Reports*, 3:3355, 2013); Horii et al., *Scientific Reports*, 4:4513 (2014)). В общих чертах, после очистки продуктов ПЦР матрицу использовали для транскрипции в условиях *in vitro* с использованием набора для транскрипции T7 (Life Technologies). Самок мышей BL6 в возрасте приблизительно 6 недель подвергали суперовуляции с помощью PMS (сыворотки беременной кобылы) и ХГЧ (хорионического гонадотропина человека) (Horii et al., см. выше). Затем их скрещивали с самцами мышей BL6, и зиготы выделяли из ампул маточных труб суперовулированных мышей. онПНК и мПНК saCas9 вводили в пронуклеус с помощью микроскопа с микроманипуляторами. Приблизительно 20-30 зигот повторно имплантировали одной псевдобеременной мышью сразу после инъекции.

Все процедуры, выполняемые на животных, соответствуют требованиям IACUC (AR08-00017, IBS00000202). Дальнейшее размножение с перекрестными одноплетниками использовали для определения вставки 2 пар оснований AT в экзон 326 в место с.43628 TTN и успешной передачи вставленной мутации посредством зародышевой линии.

Другая модель на мышах описана в литературе и отличается тем, что она была получена с использованием нацеленного вектора, содержащего мутацию TTN человека с.43628insAT, за которой расположена кассета резистентности к неомицину с сигналом полиаденилирования (Gramlich et al., 2009, см. выше). Мутацию вводили в ES-клетки мыши путем гомологичной рекомбинации. В модели на мышах Gramlich гомозиготное потомство страдало эмбриональной летальностью вообще без кардиального образования. У гетерозиготного потомства развилась дилатационная кардиомиопатия и была нарушена сердечная функция при индукции стресса.

Модель 2: модель скелетной миопатии, нацеленная на экзон 219.

Помимо этого, модель миопатии скелетных мышц, связанной с TTN, разрабатывали для включения опубликованной мутации, которая влияет на скелетную мышцу и проявляется как центронукулярная

миопатия (с.32854G>C) (Ceyhan-Birsoy et al., *Neurology*, 57(14):1205-14 (2013)). Результаты, полученные в клинической популяции, включают увеличенные центральные ядра, усечение белка, потерю связывания с калпаином-3, саркомерную дезорганизацию, увеличенное количество соединительной ткани и области, лишенные митохондрий. Клинические проявления у этого пациента включают генерализованную мышечную слабость, слабость дыхания и возможное вовлечение сердца. Мутация расположена в консервативном сайте сплайсинга и вызывает дефекты сплайсинга и выработку усеченного белка титина (Ceyhan-Birsoy et al., *supra*, Foye, *Narrative Inquiry in Bioethics*, 5(3):206-208 (2015)). В литературе отсутствуют описания аналогичной модели на мышах. Модель миопатии скелетных мышц, связанная с TTN, описанная в настоящем документе, может быть использована для определения степени тяжести заболевания, связанного с различными типами мутаций и положениями мутаций в TTN, а также для того чтобы обеспечить терапевтический подход. Для создания модели на мышах редактирование генома с помощью Cas9 использовали для введения мутации пары нуклеотидов и усечения белка TTN и установления фенотипа и функционального дефицита в скелетной и сердечной тканях.

Платформу CRISPR MIT использовали для создания усеченных онПНК (5'-NNGRRT-3') с использованием последовательности человека в экзоне 219. Последовательности онПНК сопоставляли с геномом человека, чтобы проверить исключение sNP (Tsai et al., см. выше). мПНК Cas9, полученную из *Staphylococcus aureus*, очищали и ресуспендировали в буфере для инъекций EmbryoMax (Temecula). онПНК получали с помощью транскрипции в условиях *in vitro*, как было опубликовано ранее (Machiko et al., см. выше, Horii et al., см. выше). В общих чертах, после очистки продуктов ПЦР, матрицу использовали для транскрипции в условиях *in vitro* с использованием набора для транскрипции T7 (Life Technologies). Самок мышей BL6 в возрасте приблизительно 6 недель подвергали суперовуляции с помощью PMS (сыворотки беременной кобылы) и ХГЧ (хорионического гонадотропина человека) (Horii et al., см. выше). Затем самок скрещивали с самцами мышей BL6, и зиготы выделяли из ампул маточных труб суперовулированных мышей. онПНК и мПНК saCas9 вводили в пронуклеус с помощью микроскопа с микроманипуляторами. Приблизительно 20-30 зигот повторно имплантировали одной псевдобеременной мышью сразу после инъекции.

Все процедуры, выполняемые на животных, соответствуют требованиям IACUC (AR08-00017, IBS00000202). Дальнейшее размножение с перекрестными одноплетниками использовали для определения введения с.32854G>C в экзон 219 и успешной передачи вставленной мутации посредством зародышевой линии.

Доставка AAV.rh74.Cas9TTN.

Мышей с одной или более мутациями гена титина (которые могут быть введены путем редактирования генома с помощью CRISPR/Cas9, как описано для моделей 1 и 2) анестезировали с помощью 2,5% изофлурана в кислороде при скорости потока 2 л/мин. Небольшой разрез кожи на левой груди делали для обнажения грудных мышц. Большие и малые мышцы грудной клетки иссекали, чтобы обнажить дополнительное межреберное пространство. Кровоостанавливающие зажимы типа "москит" проталкивали через четвертое межреберье, чтобы проникнуть в межреберную мышцу, плевральную мембрану и перикард. Держа щипцы открытыми, сердце экстернализировали для просмотра верхушки. Используя иглу 30G, AAVrh.74.SaCas9/TTN вводили в просвет левого желудочка. После доставки иглу удаляли, сердце помещали обратно в грудную клетку, и затем вручную удаляли воздух и закрывали кожу одним швом. Было показано, что пути внутрикороной доставки превосходят другие способы доставки (например, внутривенные, внутрибрюшинные), исходя из однородности распределения клеток, регенерации миоцитов и количества жизнеспособной ткани в ишемической области миокарда (Li, *Basic Research in Cardiology*, 2011, 106(5):849-864). В предыдущих исследованиях процедура была безопасной с очень низкой смертностью (Gao et al., см. выше).

Конечная точка исследования составляла 3 месяца, и измерения конечных результатов включали количественную оценку экспрессии титина и биораспределение/количественную оценку копий вирусного генома во всех скелетных и сердечных мышцах. Если исходные когорты, получавшие дозы исследуемого препарата, не имели 50% увеличения количества полноразмерного титина, то продолжали повышать дозы. Наконец, нецелевые анализы выполняли с помощью количественных исследований на основе ПНР для выявления геномных транслокаций и нецелевой активности с учетом NNGRRT-специфичного мотива, прилегающего к протоспейсеру (PAM), который направляет SaCas9. Для того чтобы оценить функцию сердца в условиях *in vivo* систолическую и диастолическую функцию оценивали с использованием эхокардиографа с импульсно-волновой доплеровской визуализацией и тканевой доплеровской визуализацией. Эхокардиографы использовали для определения нескольких показателей сердечной функции, включая фракцию выброса, фракцию укорочения, конечный диастолический объем и конечный систолический объем. Кроме того, измеряли толщину стенок. После наблюдения в течение жизни мышей умерщвляли и вскрывали через 12 недель, чтобы оценить экспрессию титина в миокарде. Результаты иммунофлуоресцентных исследований титина (частей Z-диска и C-конца) и сердечного тропонина T продемонстрировали саркомерную организацию после лечения. Электронную микроскопию миофибрилл использовали для определения надлежащего выравнивания после лечения.

Примечания относительно иллюстративных вариантов реализации и процитированных документов.

Несмотря на то что настоящее изобретение содержит конкретные варианты реализации и примеры, специалисты в данной области техники поймут, что могут быть осуществлены изменения и модификации. Соответственно в область настоящего изобретения должны быть включены только те ограничения, которые указаны в формуле настоящего изобретения.

Все документы, процитированные в настоящей заявке, полностью включены посредством ссылки, при этом особое внимание уделено изобретению, на которое они направлены.

Перечень последовательностей

- <110> Исследовательский фонд в Национальном детском госпитале
- <120> СРЕДСТВА И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ МИОПАТИЙ, СВЯЗАННЫХ С ТИТИНОМ, И ДРУГИХ ТИТИНОПАТИЙ
- <130> 28335/50216PCT
- <150> US-62/255,887
- <151> 2016-11-16
- <160> 78
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 21
- <212> ДНК
- <213> Искусственная последовательность
- <220>
- <223> Спейсерная последовательность
- <400> 1
ggaggaggtg ggggtcttgg t 21
- <210> 2
- <211> 6
- <212> ДНК
- <213> Искусственная последовательность
- <220>
- <223> Синтетический полинуклеотид
- <400> 2
ttgagt 6
- <210> 3
- <211> 25
- <212> ДНК
- <213> Искусственная последовательность
- <220>
- <223> Синтетический олигонуклеотид
- <400> 3
caccggagga ggtgggggtc ttggt 25
- <210> 4
- <211> 25
- <212> ДНК
- <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический олигонуклеотид

<400> 4
 aaacassaag aсссссасст сстсс 25

<210> 5
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Спейсерная последовательность

<400> 5
 ggtggagсаg gtggaggagg t 21

<210> 6
 <211> 6
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический полинуклеотид

<400> 6
 ggggggt 6

<210> 7
 <211> 25
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический олигонуклеотид

<400> 7
 сaccggtgga gсаggtggaг gaggt 25

<210> 8
 <211> 25
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический олигонуклеотид

<400> 8
 aaacacстсс тссасстgct ссасс 25

<210> 9
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Спейсерная последовательность

<400> 9 tggcattttt tacctttaag t	21
<210> 10 <211> 6 <212> ДНК <213> Искусственная последовательность	
<220> <223> Синтетический полинуклеотид	
<400> 10 tggaat	6
<210> 11 <211> 25 <212> ДНК <213> Искусственная последовательность	
<220> <223> Синтетический олигонуклеотид	
<400> 11 cacctggcat tttttacctt taagt	25
<210> 12 <211> 25 <212> ДНК <213> Искусственная последовательность	
<220> <223> Синтетический олигонуклеотид	
<400> 12 accgtaaaaa atggaattc асааа	25
<210> 13 <211> 21 <212> ДНК <213> Искусственная последовательность	
<220> <223> Спейсерная последовательность	
<400> 13 ttttcagggtt caggttcttg а	21
<210> 14 <211> 6 <212> ДНК <213> Искусственная последовательность	
<220> <223> Синтетический полинуклеотид	
<400> 14 ааgagt	6

<210> 15
 <211> 25
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Синтетический олигонуклеотид

 <400> 15
 caccttttca ggttcagggt cttga 25

<210> 16
 <211> 25
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Синтетический олигонуклеотид

 <400> 16
 aaaagtcca gtccaagaac tcaaa 25

<210> 17
 <211> 148
 <212> РНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Синтетический олигонуклеотид

 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 <223> n представляет собой а, с, г или у

 <400> 17
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nguuiuaqua cusciguauu uuagguaua gguagacгаа 60
 aauiguasiu auaccuaaaa uucagaauc uacuaaaaca aggcaaaaug ccguuuuuu 120
 cuscuaacu uguuggcgag auuuuuuu 148

<210> 18
 <211> 900
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

 <400> 18
 ctttacatat accaaataca acaacatgta tacatcatac agacaagggt aaacatacat 60
 ttcataагаа асаacattta cactcggagt агаатссаа aggtacattg аacatgacaa 120
 agagagtaca gttgacaccg аacagaccta cгааасаааc асаасаата accacggaaa 180
 cgacataaag agtagtagaa acatttccca actataaaaa тасаааатаc ааgacacaaa 240
 atacaaccta tgaccataat gcatggaatt tttcatttga аacatgaagt atatatatat 300

atatatatat atatatatat atatatatat attaaagata atttatatga tgtatagggtg 360
 tacgattgta tatgtatatg attgtggaga ctttatgaga aagttcttgg acttggactt 420
 ttccaataac tcttcggttt tgagtttggg tctgggggtg gaggagggtg acgagggtgga 480
 ttccttctac acttcctctt ttataagggt gaatttccat tttttacggt gaaggtttca 540
 aaataatcgg acgaagtttg aagatagggtc ggtagacttt actacgaacg ttctttacat 600
 actgaaaatc ttcacacatg aaagtctgta ctaacatgac actctaactg atctcgacag 660
 agaagacgac ggggtacca ggaaccaacg aacagtagcg tacggacgac gacgttttca 720
 gtctttcatg taactatcgc agtaggcct atagacttac gtccgtgaca ggttaattga 780
 aagaaaacac ctccccctc tttctcaaaa gactaaagtt tcggactaac gatatgtata 840
 gtaacgctag aatacgaatt ccttacatat tctttaggaa cgttctataa aaattataac 900

<210> 19
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Спейсерная последовательность

<400> 19
 agtatatgta tatgtagca t 21

<210> 20
 <211> 6
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический полинуклеотид

<400> 20
 gtggat 6

<210> 21
 <211> 25
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический олигонуклеотид

<400> 21
 caccagtata tgtatatggt agcat 25

<210> 22
 <211> 25
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>		
<223>	Синтетический олигонуклеотид	
<400>	22	
	tcatatacat atacaatcgt acaaa	25
<210>	23	
<211>	21	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Спейсерная последовательность	
<400>	23	
	tgcaagcatc atttcagatg g	21
<210>	24	
<211>	6	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Синтетический полинуклеотид	
<400>	24	
	ctggat	6
<210>	25	
<211>	25	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Синтетический олигонуклеотид	
<400>	25	
	cacstgcaag catcatttca gatgg	25
<210>	26	
<211>	25	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Синтетический олигонуклеотид	
<400>	26	
	acgttcgtag taaagtctac ccaaa	25
<210>	27	
<211>	21	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Спейсерная последовательность	

<400> 27		
agaagattta agtccactgg a		21
<210> 28		
<211> 21		
<212> ДНК		
<213> Искусственная последовательность		
<220>		
<223> Спейсерная последовательность		
<400> 28		
gataaagaag atttaagtcc a		21
<210> 29		
<211> 21		
<212> ДНК		
<213> Искусственная последовательность		
<220>		
<223> Спейсерная последовательность		
<400> 29		
atgagggtca catttасаас a		21
<210> 30		
<211> 21		
<212> ДНК		
<213> Искусственная последовательность		
<220>		
<223> Спейсерная последовательность		
<400> 30		
tgatagcgtc atccgggata t		21
<210> 31		
<211> 21		
<212> ДНК		
<213> Искусственная последовательность		
<220>		
<223> Спейсерная последовательность		
<400> 31		
gtасаagtta catggaаасс t		21
<210> 32		
<211> 21		
<212> ДНК		
<213> Искусственная последовательность		
<220>		
<223> Спейсерная последовательность		
<400> 32		
ttttatgttc tgtgttttat g		21

<210> 33
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Спейсерная последовательность

 <400> 33
 tgtccaatta actttctttt g 21

<210> 34
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Спейсерная последовательность

 <400> 34
 ttcttttgtg gagtggggag a 21

<210> 35
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Спейсерная последовательность

 <400> 35
 aagtacattg atagcgtcat c 21

<210> 36
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Спейсерная последовательность

 <400> 36
 tcttctgctg ccccatggtt c 21

<210> 37
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Спейсерная последовательность

 <400> 37
 atcattgcga tcttatgctt a 21

<210> 38
 <211> 21

<212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Спейсерная последовательность

 <400> 38
 gtattttctca tcatctttgt a 21

 <210> 39
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Спейсерная последовательность

 <400> 39
 cagtgcstgc attcagatat c 21

 <210> 40
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Спейсерная последовательность

 <400> 40
 stcatgtcaa ctgtggcttg t 21

 <210> 41
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Спейсерная последовательность

 <400> 41
 аaccatatac atttсаагаg а 21

 <210> 42
 <211> 6
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Синтетический полинуклеотид

 <400> 42
 ttgaat 6

 <210> 43
 <211> 6
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>			
<223>	Синтетический	полинуклеотид	
<400>	43		
ctggat			6
<210>	44		
<211>	6		
<212>	ДНК		
<213>	Искусственная	последовательность	
<220>			
<223>	Синтетический	полинуклеотид	
<400>	44		
aagaat			6
<210>	45		
<211>	6		
<212>	ДНК		
<213>	Искусственная	последовательность	
<220>			
<223>	Синтетический	полинуклеотид	
<400>	45		
ctgaat			6
<210>	46		
<211>	6		
<212>	ДНК		
<213>	Искусственная	последовательность	
<220>			
<223>	Синтетический	полинуклеотид	
<400>	46		
aagaat			6
<210>	47		
<211>	6		
<212>	ДНК		
<213>	Искусственная	последовательность	
<220>			
<223>	Синтетический	полинуклеотид	
<400>	47		
ttggat			6
<210>	48		
<211>	6		
<212>	ДНК		
<213>	Искусственная	последовательность	
<220>			
<223>	Синтетический	полинуклеотид	

<400> 48 tggagt		6
<210> 49 <211> 6 <212> ДНК <213> Искусственная последовательность		
<220> <223> Синтетический полинуклеотид		
<400> 49 aagagt		6
<210> 50 <211> 6 <212> ДНК <213> Искусственная последовательность		
<220> <223> Синтетический полинуклеотид		
<400> 50 cgggat		6
<210> 51 <211> 6 <212> ДНК <213> Искусственная последовательность		
<220> <223> Синтетический полинуклеотид		
<400> 51 ctgggt		6
<210> 52 <211> 6 <212> ДНК <213> Искусственная последовательность		
<220> <223> Синтетический полинуклеотид		
<400> 52 aggaat		6
<210> 53 <211> 6 <212> ДНК <213> Искусственная последовательность		
<220> <223> Синтетический полинуклеотид		
<400> 53 aaggt		6

<210>	54	
<211>	6	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Синтетический полинуклеотид	
<400>	54	
	ccggat	6
<210>	55	
<211>	6	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Синтетический полинуклеотид	
<400>	55	
	ctggat	6
<210>	56	
<211>	6	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Синтетический полинуклеотид	
<400>	56	
	aagaat	6
<210>	57	
<211>	21	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Спейсерная последовательность	
<400>	57	
	ggagctgtaa gagaatgtca t	21
<210>	58	
<211>	6	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Синтетический полинуклеотид	
<400>	58	
	сagaat	6
<210>	59	
<211>	21	

<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Спейсерная последовательность	
<400>	59	
	attccacatg aggagctgta a	21
<210>	60	
<211>	6	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Синтетический полинуклеотид	
<400>	60	
	gagaat	6
<210>	61	
<211>	21	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Спейсерная последовательность	
<400>	61	
	attctcttac agctcctcat g	21
<210>	62	
<211>	6	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Синтетический полинуклеотид	
<400>	62	
	tggaat	6
<210>	63	
<211>	900	
<212>	ДНК	
<213>	Homo sapiens	
<400>	63	
	ccatagtgct tcacgtgttc tatctttgaa ttctgctaataa ttctcaaaga ttgtgctaag	60
	tgccttaaataa aagacaatgt ttctttgccca ctgggtgtctg aagtttcctt tgacattatc	120
	tttcaagtct ggtgcagtgc aatgaagat ttttcctcca gctattattc aaaagaactg	180
	agatggctcc ctagtatata tactgtacac acacacatgc aactagttg aacatataga	240
	atgccacata attttatgta aactaaagag atatctaaaa agcaaagcat catacctgat	300
	gggcagcttc aagtgatttc aaagtcagtt gtagtctatt aagatggaaa atccctaaaa	360

aagagtcact ttttcttaat gtatactatg gtaatgtcag agtaaatttc cagaaacctc 420
 attttgaatt ctgatgacat tctcttacag ctctcatgt ggaattctta agaccactca 480
 ccgaccttca agttagagaa aaagaaatgg ctcgatttga gtgtgaactt tcccagagaaa 540
 atgctaaggt ctgtgactgt atacctgtca tcttgtactg tcaaataact ttatatttac 600
 ttttggctca gccaaaatgg aaaaaaaaaa gttagtcaca acttctctgg tcaccacttt 660
 acttttaaag ataattgtag tataaaatgt attcttgact ttaattgctc tcttttttagt 720
 attattaatt tactattact tgaaaaacac tggactcaca atcaggagat ttagatatta 780
 gtttgaacca tatgaaagtg ctgttttctt agatcagaaa gtcaaatac agcaattata 840
 tttctttcaa ctaagtacct cctgttgcta ttaactacca ttggcaagtt tcttcaagtc 900

<210> 64
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Спейсерная последовательность

<400> 64
 ttagataaaa tattggcact c 21

<210> 65
 <211> 6
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический полинуклеотид

<400> 65
 tggaat 6

<210> 66
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Спейсерная последовательность

<400> 66
 tatatattca gagtttggct t 21

<210> 67
 <211> 6
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический полинуклеотид

<400> 67 ttgggt	6
<210> 68 <211> 21 <212> ДНК <213> Искусственная последовательность	
<220> <223> Спейсерная последовательность	
<400> 68 aaattaccсса aaagссааас t	21
<210> 69 <211> 6 <212> ДНК <213> Искусственная последовательность	
<220> <223> Синтетический полинуклеотид	
<400> 69 ctgaat	6
<210> 70 <211> 21 <212> ДНК <213> Искусственная последовательность	
<220> <223> Спейсерная последовательность	
<400> 70 aaagасасаа aagtatatat t	21
<210> 71 <211> 6 <212> ДНК <213> Искусственная последовательность	
<220> <223> Синтетический полинуклеотид	
<400> 71 саgagt	6
<210> 72 <211> 21 <212> ДНК <213> Искусственная последовательность	
<220> <223> Спейсерная последовательность	
<400> 72 agсаааатта асgtggatat g	21

<210>	73	
<211>	6	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Синтетический полинуклеотид	
<400>	73	
	tagaat	6
<210>	74	
<211>	21	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Спейсерная последовательность	
<400>	74	
	acatatccac gttaattttg c	21
<210>	75	
<211>	6	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Синтетический полинуклеотид	
<400>	75	
	tagaat	6
<210>	76	
<211>	21	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Спейсерная последовательность	
<400>	76	
	cgttaatttt gctagaatag t	21
<210>	77	
<211>	6	
<212>	ДНК	
<213>	Искусственная последовательность	
<220>		
<223>	Синтетический полинуклеотид	
<400>	77	
	gtgagt	6
<210>	78	

<211> 25
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетический полинуклеотид

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(21)
 <223> n представляет собой a, c, g или t

<400> 78
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn ngrrt

25

3

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ увеличения экспрессии функционального белка титина в клетке, содержащей мутацию в гене титина человека, причем мутация находится в экзоне 219, в экзоне 326, с.32854G>C мутация в экзоне 219 или с.37112G>A мутация в интроне 242, включающий введение в клетку, содержащую мутацию в гене титина человека,

(a) эндонуклеазы Cas9 или ее гомолога, оптимизированного по кодомам варианта или модифицированного варианта, которая осуществляет разрыв в пределах гена титина, или нуклеиновой кислоты, которая кодирует эндонуклеазу Cas9 или ее гомолог, оптимизированный по кодомам вариант или модифицированный вариант, которая осуществляет разрыв в пределах гена титина; и

(b) (i) когда мутация находится в экзоне 219, нуклеиновой кислоты, кодирующей направляющую рибонуклеиновую кислоту (нРНК), которая комплементарна целевой последовательности, которая содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 19, 23 или 27-41;

(ii) когда мутация находится в экзоне 326, нуклеиновой кислоты, кодирующей нРНК, которая комплементарна целевой последовательности, которая содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 64, 66, 68, 70, 72, 74 или 76;

(iii) когда мутация представляет собой мутацию с.32854G>C в экзоне 219, нуклеиновой кислоты, кодирующей нРНК, которая комплементарна целевой последовательности, которая содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1, 5, 9 или 13, и нуклеиновой кислоты, содержащей область донорной матрицы, содержащей SEQ ID NO: 18; или

(iv) когда мутация представляет собой мутацию с.37112G>A в интроне 242, нуклеиновой кислоты, кодирующей нРНК, которая комплементарна целевой последовательности, которая содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 57, 59 или 61, и нуклеиновой кислоты, содержащей область донорной матрицы, содержащей SEQ ID NO: 63,

что приводит к восстановлению гена титина человека, что, в свою очередь, приводит к увеличенной экспрессии функционального белка титина в клетке.

2. Применение эндонуклеазы Cas9 или ее гомолога, оптимизированного по кодомам варианта или модифицированного варианта, которая осуществляет разрыв в пределах гена титина, или нуклеиновой кислоты, которая кодирует эндонуклеазу Cas9 или ее гомолога, оптимизированного по кодомам варианта или модифицированного варианта, которая осуществляет разрыв в пределах гена титина и нуклеиновой кислоты, кодирующей направляющую рибонуклеиновую кислоту (нРНК), для производства лекарственного средства для редактирования гена титина в клетке, выделенной от субъекта, содержащей мутацию в гене титина человека, включающее

применение лекарственного средства, содержащего эндонуклеазу Cas9 или ее гомолог, оптимизированный по кодомам вариант или модифицированный вариант, которая осуществляет разрыв в пределах гена титина, или нуклеиновую кислоту, которая кодирует эндонуклеазу Cas9 или ее гомолог, оптимизированный по кодомам вариант или модифицированный вариант, которая осуществляет разрыв в пределах гена титина и нуклеиновой кислоты, кодирующей нРНК, для редактирования гена титина и увеличения экспрессии функционального белка титина клеткой, при этом мутация находится в экзоне 219, в экзоне 326, мутация с.32854G>C в экзоне 219 или мутация с.37112G>A в интроне 242; и

(i) когда мутация находится в экзоне 219, нуклеиновой кислоты, кодирующей нРНК, которая комплементарна целевой последовательности, которая содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 19, 23 или 27-41;

(ii) когда мутация находится в экзоне 326, нуклеиновой кислоты, кодирующей нРНК, которая комплементарна целевой последовательности, которая содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 64, 66, 68, 70, 72, 74 или 76;

(iii) когда мутация представляет собой мутацию с.32854G>C в экзоне 219, нуклеиновой кислоты, кодирующей нРНК, которая комплементарна целевой последовательности, которая содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1, 5, 9 или 13, и нуклеиновой кислоты, содержащей область донорной матрицы, содержащей SEQ ID NO: 18; или

(iv) когда мутация представляет собой мутацию с.37112G>A в интроне 242, нуклеиновой кислоты, кодирующей нРНК, которая комплементарна целевой последовательности, которая содержит последовательность, указанную в SEQ ID NO: 57, 59 или 61, и нуклеиновой кислоты, содержащей область донорной матрицы, содержащей SEQ ID NO: 63.

3. Способ по п.1, отличающийся тем, что нРНК представляют собой одноцепочечную молекулу нРНК (онРНК).

4. Способ по п.1, отличающийся тем, что нРНК представляют собой модифицированную нРНК или модифицированную одноцепочечную молекулу нРНК (онРНК).

5. Способ по п.1, где нуклеиновая кислота

(a) представляет собой ДНК или РНК; и/или

(b) содержит модифицированный полинуклеотид или модифицированную РНК.

6. Способ по п.1, где клетка представляет собой кардиомиоцит или сердечную стволовую клетку.

7. Способ по п.1, где субъект страдает титинопатией или кардиомиопатией, связанной с титином.

8. Способ по п.1, где одна или несколько ДНК-эндонуклеаз предварительно образуют комплекс с одной или несколькими нРНК или онРНК.

9. Способ по п.1, где

(a) эндонуклеаза Cas9 или ее гомолог, оптимизированный по кодонам вариант или модифицированный вариант, которая осуществляет разрыв в пределах гена титина, или нуклеиновая кислота, которая кодирует эндонуклеазу Cas9 или ее гомолог, оптимизированный по кодонам вариант или модифицированный вариант, которая осуществляет разрыв в пределах гена титина;

(b) нуклеиновая кислота, кодирующая нРНК; и/или

(c) нуклеиновая кислота, содержащая донорную матрицу, каждая отдельно заключена в липидную наночастицу.

10. Способ по п.1, где

(a) эндонуклеаза Cas9 или ее гомолог, оптимизированный по кодонам вариант или модифицированный вариант, которая осуществляет разрыв в пределах гена титина, или нуклеиновая кислота, которая кодирует эндонуклеазу Cas9 или ее гомолог, оптимизированный по кодонам вариант или модифицированный вариант, которая осуществляет разрыв в пределах гена титина;

(b) нуклеиновая кислота, кодирующая нРНК; и/или

(c) нуклеиновая кислота, содержащая донорную матрицу, заключены вместе в липидную наночастицу.

11. Способ по п.1, где любая одна или более из

(a) нуклеиновой кислоты, которая кодирует эндонуклеазу Cas9 или ее гомолог, оптимизированный по кодонам вариант или модифицированный вариант, которая осуществляет разрыв в пределах гена титина;

(b) нуклеиновой кислоты, кодирующей нРНК; и/или

(c) нуклеиновой кислоты, содержащей донорную матрицу, представлены в векторе.

12. Способ по п.1, где любые две или более из

(a) нуклеиновой кислоты, которая кодирует эндонуклеазу Cas9 или ее гомолог, оптимизированный по кодонам вариант или модифицированный вариант, которая осуществляет разрыв в пределах гена титина;

(b) нуклеиновой кислоты, кодирующей нРНК; и/или

(c) нуклеиновой кислоты, содержащей донорную матрицу, представлены в одном векторе.

13. Способ по п.11 или 12, где вектор представляет собой аденоассоциированный вирус (AAV).

14. Способ по п.1, где нуклеиновая кислота, которая кодирует эндонуклеазу Cas9 или ее гомолог, оптимизированный по кодонам вариант или модифицированный вариант, которая осуществляет разрыв в пределах гена титина, заключена в липидную наночастицу, а нуклеиновая кислота, кодирующая нРНК, и/или нуклеиновая кислота, содержащая донорную матрицу, представлены в векторе.

15. Способ по п.1, где ген титина расположен на хромосоме 2q31 (Консорциум референсного генома - GRCh38/hg38).

16. Применение по п.2, где лекарственное средство предназначено для лечения субъекта с кардиомиопатией, связанной с титином, или другой титинопатией.

17. Нуклеиновая кислота, кодирующая или содержащая направляющую рибонуклеиновую кислоту (нРНК), включающую спейсерную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1, 5, 9, 13, 19, 23, 27-41, 57, 59, 61, 64, 66, 68, 70, 72, 74 или 76.

18. Нуклеиновая кислота по п.17, отличающаяся тем, что нРНК представляют собой одноцепочечную молекулу нРНК (онРНК).

19. Нуклеиновая кислота по п.17, отличающаяся тем, что нРНК представляют собой модифицированную нРНК или модифицированную одноцепочечную молекулу нРНК (онРНК).

20. Применение по п.2, отличающееся тем, что нРНК представляют собой одноцепочечную молекулу нРНК (онРНК).

21. Применение по п.2, отличающееся тем, что нРНК представляют собой модифицированную нРНК или модифицированную одноцепочечную молекулу нРНК (онРНК).

22. Применение по п.2, где нуклеиновая кислота

(a) представляет собой ДНК или РНК; и/или

(b) содержит модифицированный полинуклеотид или модифицированную РНК.

23. Применение по п.2, где клетка представляет собой кардиомиоцит или сердечную стволовую клетку.

24. Применение по п.2, где субъект страдает титинопатией или кардиомиопатией, связанной с титином.

25. Применение по п.2, где одна или несколько ДНК-эндонуклеаз предварительно образуют комплекс с одной или несколькими нРНК или онРНК.

26. Применение по п.2, где

(a) эндонуклеаза Cas9 или ее гомолог, оптимизированный по кодонам вариант или модифицированный вариант, которая осуществляет разрыв в пределах гена титина, или нуклеиновая кислота, которая кодирует эндонуклеазу Cas9 или ее гомолог, оптимизированный по кодонам вариант или модифицированный вариант, которая осуществляет разрыв в пределах гена титина;

(b) нуклеиновая кислота, кодирующая нРНК; и/или

(c) нуклеиновая кислота, содержащая донорную матрицу, каждая отдельно заключена в липидную наночастицу.

27. Применение по п.2, где

(a) эндонуклеаза Cas9 или ее гомолог, оптимизированный по кодонам вариант или модифицированный вариант, которая осуществляет разрыв в пределах гена титина, или нуклеиновая кислота, которая кодирует эндонуклеазу Cas9 или ее гомолог, оптимизированный по кодонам вариант или модифицированный вариант, которая осуществляет разрыв в пределах гена титина;

(b) нуклеиновая кислота, кодирующая нРНК; и/или

(c) нуклеиновая кислота, содержащая донорную матрицу, заключены вместе в липидную наночастицу.

28. Применение по п.2, где любая одна или более из

(a) нуклеиновой кислоты, которая кодирует эндонуклеазу Cas9 или ее гомолог, оптимизированный по кодонам вариант или модифицированный вариант, которая осуществляет разрыв в пределах гена титина;

(b) нуклеиновой кислоты, кодирующей нРНК; и/или

(c) нуклеиновой кислоты, содержащей донорную матрицу, представлены в векторе.

29. Применение по п.2, где любые две или более из

(a) нуклеиновой кислоты, которая кодирует эндонуклеазу Cas9 или ее гомолог, оптимизированный по кодонам вариант или модифицированный вариант, которая осуществляет разрыв в пределах гена титина;

(b) нуклеиновой кислоты, кодирующей нРНК; и/или

(c) нуклеиновой кислоты, содержащей донорную матрицу, представлены в одном векторе.

30. Применение по п.28 или 29, где вектор представляет собой аденоассоциированный вирус (AAV).

31. Применение по п.2, где нуклеиновая кислота, которая кодирует эндонуклеазу Cas9 или ее гомолог, оптимизированный по кодонам вариант или модифицированный вариант, которая осуществляет разрыв в пределах гена титина, заключена в липидную наночастицу, а нуклеиновая кислота, кодирующая нРНК, и/или нуклеиновая кислота, содержащая донорную матрицу, представлены в векторе.

32. Применение по п.2, где ген титина расположен на хромосоме 2q31 (Консорциум референсного генома - GRCh38/hg38).

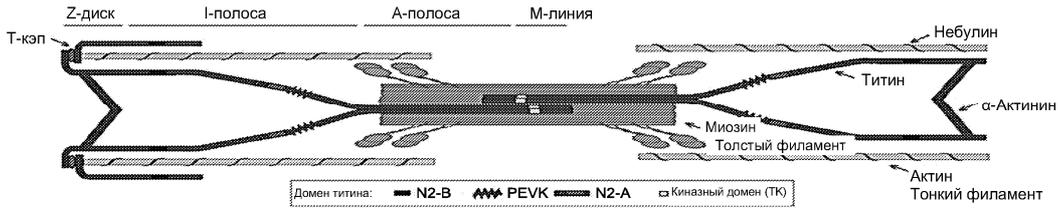
33. Липидная наночастица, содержащая нуклеиновую кислоту по пп.17, 18 или 19.

34. Липидная наночастица по п.33, дополнительно содержащая нуклеиновую кислоту, которая кодирует эндонуклеазу Cas9.

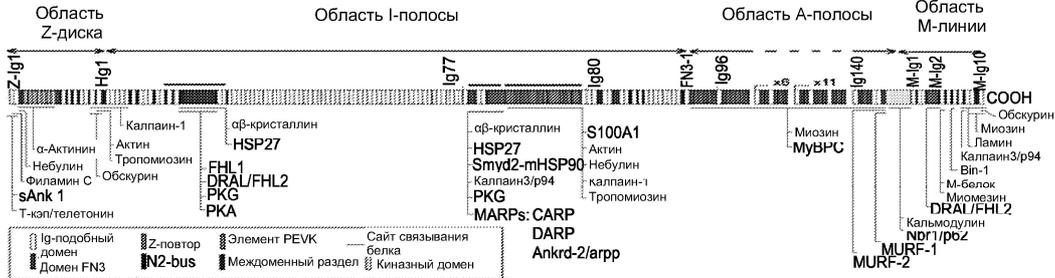
35. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по пп.17, 18 или 19.

36. Вектор по п.35, где вектор представляет собой аденоассоциированный вирус (AAV).

37. Вектор по п.36, дополнительно содержащий нуклеиновую кислоту, которая кодирует эндонуклеазу Cas9.



Фиг. 1А



Фиг. 1В

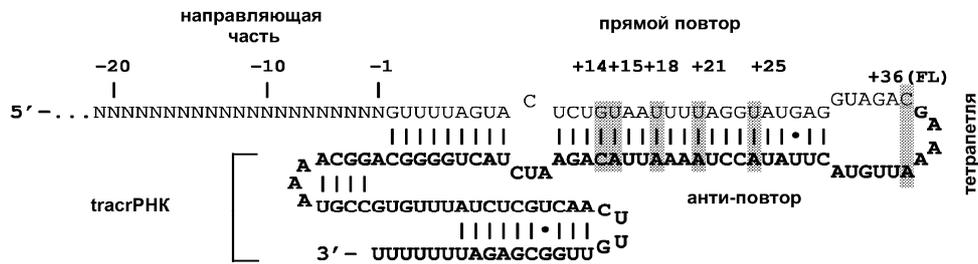
Стратегия восстановления 1: Восстановление мутации титина с.32854G>C с использованием донорной матрицы

Специфичн. для человека SaCas9					
Положение	Цель	Спейсерная последовательность	PAM	Оценка специфичн.	Заказанные олигонуклеотиды
Направляющ. молекула 1: chr2 +178,645,987*	-1	GGAGGAGGTGGGGTCTTGGT (SEQ ID NO: 1)	TTGAGT (SEQ ID NO: 2)	55	CACCGGAGGAGGTGGGGTCTTGGT (SEQ ID NO: 3)
					AAACACCAAGACCCCACTCTCC (SEQ ID NO: 4)
Направляющ. молекула 2: chr2 +178,645,975	-1	GGTGGAGCAGTGGAGGAGGT (SEQ ID NO: 5)	GGGGGT (SEQ ID NO: 6)	25	CACCGGTGGAGCAGTGGAGGAGGT (SEQ ID NO: 7)
					AAACACTCTCCACTGCTCCACC (SEQ ID NO: 8)
Направляющ. молекула 3: chr2 +178,645,924	-1	TGGCATTTTTACSTTAAAGT (SEQ ID NO: 9)	TGGAAT (SEQ ID NO: 10)	14	CACCTGGCATTTTTACSTTAAAGT (SEQ ID NO: 11)
					ACCGTAAAAAATGGAATTCAAAA (SEQ ID NO: 12)
Направляющ. молекула 4: chr2 +178,646,032*	-1	TTTCAGGTTCAAGTCTTGA (SEQ ID NO: 13)	AAGAGT (SEQ ID NO: 14)	36	CACCTTTCAGGTTCAAGTCTTGA (SEQ ID NO: 15)
					AAAAGTCCAAGTCCAAGAАСТСААА (SEQ ID NO: 16)
Обратн. направл.					

*Наиболее эффективные направляющие последовательности; подчеркнутая буква спейсерной последовательности соответствует расположению двухцепочечного разрыва, сделанного в последовательности-мишени

Заказанные олигонуклеотиды соответствуют последовательностям праймеров, использованных для клонирования спейсерной последовательности в плазмиду Cas9 (px601, каталожный номер плазмиды в Addgene №61591)

Фиг. 2



SEQ ID NO: 17

Фиг. 3

Стратегия восстановления 3: вырезание и восстановление мутации титина с.37112G>A

Положение	Цепь	Спейсерная последовательность	PAM	Оценка специфичности
Chr 2: 178622784	-1	GGAGCTGTAAGAGAAATGTCAT (SEQ ID NO: 57)	CAGAAT (SEQ ID NO: 58)	41.758739
Chr 2: 178622773	-1	ATTCCACATGAGGAGCTGIAA (SEQ ID NO: 59)	GAGAAT (SEQ ID NO: 60)	44.4639886
Chr 2: 178622779	1	ATTCTTTACAGCTCCTCATG (SEQ ID NO: 61)	TGGAAT (SEQ ID NO: 62)	42.8443275

Подчеркнутая буква спейсерной последовательности соответствует расположению двухцепочечного разрыва, сделанного в последовательности-мишени

Донорная матрица:

ccatagtgcttcacgtgttctcttgaattctgtaattctcaagattgtgctgaagtgcttaaaagacaagtgttcttgccactgtgtctgaagtcttcttgacattatcttcaagctggtgcagtgcaaa
tgaagatcttctccagctatttcaaaagaactgagatggctccctagatataactgtacacacacacactagtggaacatagaaatgccacataatttatgtaactaaagagatctcaaaa
gcaaacatcactcctgagggcagctcaagtgattcaagtcagttgtagctcttaagatggaataatccctaaaaaagagtcacttttctaatgtatactatgtaagtcagagataattccagaaacct
catttgaattctgatgacattctctaca**GCTCCTCATGTGGAATTTAAAGACCACTACCACCTCAAGTTAGAGAAAAAGAAATGGCTCGATTTGAGTGTGAACCTT**
CCCGAGAAAATGCTAAGgtctgtgactgtatacctgtcatctgtctgcaaaactttatatttctttgtctagcctcaaatggaaaaaaagtagtcacaactctctgtccacccttactttt
aaagataattgtagataaaaatgattctgacttaattgtctctcttttagtattataattactactgaaaaaacactggactcaaacaggagatttagatattgtaaacatagaagtgctgtttc
ttagatcagaagaatcaaatatcgaattatcttctcaactaagtcctctgtctataactaccattggcaagttcttcaagtc
SEQ ID NO: 63

*нижний регистр обозначает последовательности интронов, верхний регистр обозначает последовательность экзона, подчеркнутая и выделенная жирным шрифтом буква обозначает точное восстановление мутации

Фиг. 8

Стратегия восстановления 4: пропуск экзона 326 - восстановление вставки 2 п.о. в экзон 326 (с.4362insAT, p.Ser14450fsX4), что приводит к сдвигу рамки считывания с преждевременным стоп-кодоном в А-полосе, усечению более половины А-полосы и всей М-полосы (что является причиной ~20% известных мутаций TTN, вызывающих DCM)

Набор 1

Положение	Цепь	Спейсерная последовательность	PAM	Оценка специфичности
Chr 2: 178576493	-1	TTAGATAAAATATTGGCACTC (SEQ ID NO: 64)	TGGAAT (SEQ ID NO: 65)	43.073943
Chr 2: 178576463	-1	TATATATTCAGAGTTGGCTT (SEQ ID NO: 66)	TTGGGT (SEQ ID NO: 67)	38.9577076
Chr 2: 178576474	1	AAATTACCCAAAAGCCAAACT (SEQ ID NO: 68)	CTGAAT (SEQ ID NO: 69)	40.3960258
Chr 2: 178576450	-1	AAAGACACAAAAGTATATATT (SEQ ID NO: 70)	CAGAGT (SEQ ID NO: 71)	28.3422717

Набор 2

Положение	Цепь	Спейсерная последовательность	PAM	Оценка специфичности
Chr 2: 178559283	-1	AGCAAAATTAACGTGGATATG (SEQ ID NO: 72)	TAGAAT (SEQ ID NO: 73)	36.7538162
Chr 2: 178559284	1	ACATATCCACGTTAATTTIGC (SEQ ID NO: 74)	TAGAAT (SEQ ID NO: 75)	45.3645981
Chr 2: 178559275	1	CGTTAATTTTGCTAGAATAGT (SEQ ID NO: 76)	GTGAGT (SEQ ID NO: 77)	39.5941154

Подчеркнутая буква спейсерной последовательности соответствует расположению двухцепочечного разрыва, сделанного в последовательности-мишени

Фиг. 9



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2