

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201992358** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.03.24

(51) Int. Cl. *C12N 15/63* (2006.01)
A01K 67/027 (2006.01)
C12Q 1/68 (2018.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.04.03

(54) ТКАНЕСЕЛЕКТИВНАЯ ЭКСПРЕССИЯ ТРАНСГЕНА

(31) 62/480,998

(32) 2017.04.03

(33) US

(86) PCT/US2018/025940

(87) WO 2018/187363 2018.10.11

(71) Заявитель:
ИНКОУДИД ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.
(US)

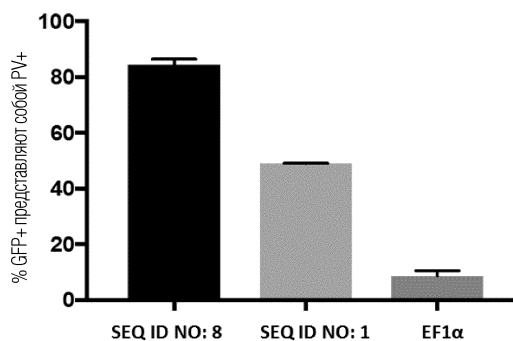
(72) Изобретатель:

Тальятелла Стефани, Янг Эндрю,
Чэн Сцзу-Ин, Рамамурти Картик,
Оберкофлер Дэвид (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) В описании предоставлены композиции и способы для селективной экспрессии трансгена. Композиции и способы для селективной экспрессии трансгена содержат один или более регуляторных элементов человека, которые, когда функционально связаны с трансгеном, могут облегчать селективную экспрессию трансгена (например, селективную экспрессию в определенном типе клеток) в целевой клетке по сравнению по меньшей мере с одной или более нецелевыми клетками.



A1

201992358

201992358

A1

ТКАНЕСЕЛЕКТИВНАЯ ЭКСПРЕССИЯ ТРАНСГЕНА**ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА**

[1] По данной заявке испрашивают преимущество предварительной заявки США № 62/480,998, поданной 3 апреля 2017 года, которая включена в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[2] Данная заявка содержит список последовательностей, который подан в электронном виде в формате ASCII и включен, таким образом, посредством ссылки в полном объеме. Указанная ASCII копия, созданная 27 сентября 2019 года под названием Списки последовательностей.txt и 78 342 Б размером.

ПРЕДПОСЫЛКИ РАСКРЫТИЯ

[3] Генная терапия давно известна благодаря ее огромному потенциалу в отношении того, как мы подходим к заболеваниям человека и лечим их. Вместо того, чтобы полагаться на лекарственные средства или хирургические вмешательства, пациентов, в частности, тех, которые подвержены генетическим факторам, можно лечить путем непосредственного направленного воздействия на первопричину. Кроме того, посредством направленного воздействия на генетическую первопричину, генная терапия обладает потенциалом эффективно излечивать пациентов или обеспечивать длительное лечение в течение более долгого периода времени. Кроме того, несмотря на это, клинические применения генной терапии все еще требуют усовершенствования в нескольких аспектах. Одна область, представляющая интерес, представляет собой эффекты вне мишени. Привлекательный подход, направленный на эффекты вне мишени, состоит в том, чтобы направлять экспрессию гена при генной терапии на определенные тип(ы) клеток или ткань(и), представляющие интерес, или целевые тип(ы) клеток или ткань(и). По существу, имеет место необходимость идентифицировать элементы и способы их использования для того, чтобы направлять генную терапию или экспрессию гена в ткань или тип клеток, представляющие интерес.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ РАСКРЫТИЯ

[4] Существует значительная потребность в том, чтобы направлять генную терапию и экспрессию гена/трансгена при ней в желаемые ткань и/или тип клеток *in vivo*, что может снижать эффекты вне мишени, увеличивать терапевтический эффект в целевых ткани и/или типе клеток и увеличивать безопасность и переносимость пациента путем снижения эффективной дозы, необходимой для достижения эффекта.

[5] В настоящем описании предоставлены композиции и способы для селективной экспрессии трансгена в целевых ткани или типе клеток относительно одной или более не целевых тканей или типов клеток. Композиции и способы селективной экспрессии трансгена включают один или более регуляторных элементов (RE), которые, когда функционально связаны с трансгеном (например, субъединица ионного канала или

регулятор нейромедиатора или связывающий синтаксин белок), могут способствовать или вести к селективной или преимущественной экспрессии трансгена в целевых ткани или типе клеток (например, парвальбумин (PV) нейронов) по сравнению с одним или более не целевыми типами клеток (например, не PV клетки). В некоторых случаях, RE представляют собой не встречаемые в природе последовательности. В некоторых случаях RE представляют собой полученные у человека регуляторные элементы. В некоторых случаях, RE содержит последовательность от не являющихся человеком биологических видов, таких как обезьяна или собака или кролик или мышь. В некоторых случаях, композиции, описанные в настоящем описании, доставляют в клетку *in vivo*, *ex vivo* или *in vitro* с использованием вирусного вектора и/или вирусных частиц, например, аденоассоциированного вируса (AAV) или лентивируса. В некоторых случаях композиции, описанные в настоящем описании, доставляют в клетки в качестве генной терапии. Также в настоящем описании предусмотрены способы и композиции для лечения неврологического состояния или нарушения, ассоциированного с генетическим дефектом в CNS. В некоторых случаях, релевантный тип клеток или ткань, пораженные генетическим дефектом представляют собой PV клетки. В некоторых случаях, неврологическое состояние или заболевание представляет собой синдром Драве, болезнь Альцгеймера, эпилепсию и/или пароксизмы. В некоторых случаях, неврологическое состояние или заболевание представляет собой психиатрическое нарушение (например, шизофрению, обсессивно-компульсивное расстройство, зависимость, депрессию, беспокойство, психоз); нарушение аутического спектра (например, синдром ломкой X-хромосомы, синдром Ретта); эпилепсию (например, хроническую травматическую энцефалопатию, генерализованную эпилепсию с фебрильными пароксизмами плюс (GEFS+), эпилептическую энцефалопатию, эпилепсию височной доли, фокальную эпилепсию, туберозный склероз); или нейродегенерацию (например, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона). В некоторых случаях, неврологическое состояние или заболевание представляет собой любое связанное с пароксизмами и/или эпилепсией состояние или заболевание, в которое вовлечены PV нейроны.

[6] В одном из аспектов настоящее раскрытие предусматривает кассету нуклеиновой кислоты, содержащую один или более регуляторных элементов, функционально связанных с трансгеном, что ведет к селективной экспрессии в любом целевом типе клеток, например, PV нейронах в CNS, относительно одного или более не целевых типов клеток, или не PV клеток в CNS. В некоторых случаях, каждый регуляторный элемент содержит (i) последовательность SEQ ID NO: 1–32, (ii) функциональный фрагмент или их сочетание или (iii) последовательность с по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей с (i) или (ii). В некоторых случаях, идентичность последовательностей определяют с использованием BLAST. В некоторых

случаях, по меньшей мере один из регуляторных элементов получают у человека. В некоторых случаях, по меньшей мере один из регуляторных элементов получают у не относящегося к человеку млекопитающего. В некоторых случаях, регуляторные элементы являются не встречаемыми в природе. В некоторых случаях, регуляторные элементы ведут к селективной экспрессии трансгена в PV нейронах, то есть более чем к экспрессии того же трансгена, когда он функционально связан с неселективным регуляторным элементом, как измеряют посредством анализа совместной локализации. В некоторых случаях, неселективный регуляторный элемент представляет собой конститутивный промотор. В некоторых случаях, неселективный регуляторный элемент представляет собой любое из CAG, EF1 α , SV40, CMV, UBC, PGK и CBA. В некоторых случаях регуляторные элементы ведут к селективной экспрессии трансгена в PV нейронах на уровне, который по меньшей мере в 1,5 раза выше, по меньшей мере в 2 раза выше, по меньшей мере в 3 раза выше, по меньшей мере в 4 раза выше, по меньшей мере в 5 раз выше, по меньшей мере в 6 раз выше, по меньшей мере в 7 раз выше, по меньшей мере в 8 раз выше, по меньшей мере в 9 раз выше, по меньшей мере в 10 раз выше, по меньшей мере в 15 раз выше или по меньшей мере в 20 раз выше по сравнению с селективной экспрессией трансгена в PV нейронах, когда он функционально связан с неселективным регуляторным элементом, как измеряют с помощью анализа совместной локализации. В некоторых случаях, регуляторные элементы ведут к селективной экспрессии в PV нейронах, которая по меньшей мере на 2%, по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, 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%, или по меньшей мере на 95% выше экспрессии в PV нейронах, когда трансген функционально связывают с неселективным регуляторным элементом. В некоторых случаях, регуляторные элементы ведут к селективной экспрессии в PV нейронах, которая приблизительно 1,5 раза, 2 раза, 2,5 раза, 3 раза, 3,5 раза, 4 раза, 4,5 раза, 5 раз, 5,5 раза, 6 раз, 6,5 раза, 7 раз, 7,5 раза, 8 раз, 8,5 раза, 9 раз, 9,5 раза, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 25 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз или 100 раз выше, чем ожидают для естественного распределения PV нейронов в CNS. В некоторых случаях анализ совместной локализации представляет собой иммуногистохимический анализ. В некоторых случаях, иммуногистохимический анализ содержит антитело против PV. В некоторых случаях, анализ совместной локализации осуществляют как показано в примере 5 далее. В некоторых случаях, трансген кодирует субъединицу ионного канала, регулятор нейромедиатора, ДНК связывающий домен, редактирующий гены белок или его вариант или функциональный фрагмент. В некоторых случаях субъединица ионного канала представляет собой α -субъединицу или β -субъединицу натриевого ионного канала или субъединицу калиевого ионного канала. В некоторых случаях, трансген содержит любое из (i) SEQ ID NO: 37–43;

(ii) ее функционального фрагмента; или (iii) последовательности, обладающей по меньшей мере 80% идентичностью последовательностей с (i) или (ii). В некоторых случаях, идентичность последовательностей определяют с использованием BLAST. В некоторых случаях, трансген содержит (i) SCN1A, SNC2A, SNC8A, SCN1B, SCN2B, KV3.1 или KV3.3; (ii) его функциональный фрагмент; или (iii) последовательность, обладающую по меньшей мере 80% идентичностью последовательностей с (i) или (ii). В некоторых случаях, трансген представляет собой регулятор нейромедиатора, который содержит (i) STXBP1, (ii) его функциональный фрагмент или (iii) последовательность, обладающую по меньшей мере 80% идентичностью последовательностей с (i) или (ii). В некоторых случаях трансген содержит ДНК-связывающий белок, который модулирует экспрессию эндогенного гена. В некоторых случаях, эндогенный ген представляет собой SCN1A, SNC2A, SNC8A, SCN1B, SCN2B, KV3.1, KV3.2, KV3.3 или STXBP1. В некоторых случаях, трансген содержит ДНК-связывающий белок, который содержит ДНК-связывающий домен ДНК-связывающего белка или ДНК-расщепляющего белка (например, нуклеазы, рестрикционного фермента, рекомбиназы и т. д.), в котором ДНК-расщепляющий домен или нуклеазный домен дезактивирован, например, Cas с дезактивированной нуклеазной активностью (dCas), дезактивированная подобная активатору транскрипции эффекторная нуклеаза или белок с цинковыми пальцами с дезактивированной нуклеазной активностью. В некоторых случаях, трансген содержит ДНК-связывающий домен, связанный с транскрипционным модулирующим доменом (например, домен транскрипционного активатора или репрессора). В некоторых случаях, редактирующий гены белок представляет собой белок Cas. В некоторых случаях регуляторные элементы совместно составляют меньше чем 2,5 т. о., меньше чем 2 т. о., меньше чем 1,5 т. о., меньше чем 1 т. о. или меньше чем 500 п. о. в размере. В некоторых случаях, не PV клетки содержат один или более типов не PV клеток в CNS. В некоторых случаях, не PV клетки содержат один или более из возбуждающих нейронов, дофаминергических нейронов, астроцитов, микроглии и моторных нейронов. В некоторых случаях кассета нуклеиновой кислоты представляет собой линейную конструкцию. В некоторых случаях кассета нуклеиновой кислоты представляет собой вектор. В некоторых случаях вектор представляет собой плазмиду. В некоторых случаях вектор представляет собой вирусный вектор. В некоторых случаях вирусный вектор представляет собой вектор аденоассоциированного вируса (AAV). В некоторых случаях, AAV вектор представляет собой AAV1, AAV8, AAV9, scAAV1, scAAV8 или scAAV9. В некоторых случаях, вирусный вектор представляет собой лентивирусный вектор.

[7] В одном из аспектов, регуляторные элементы любой из кассет нуклеиновой кислоты, раскрытых в настоящем описании, содержат меньше чем 600 п. о. непрерывной последовательности из 10 т. о. от сайта инициации транскрипции GAD2, GAD1, SYN1, NKX2.1, DLX1, DLX5/6, SST, PV и/или VIP.

[8] В одном из аспектов, способ лечения неврологического нарушения или состояния у нуждающегося в этом субъекта включает доставку терапевтически

эффективного количества любой кассеты нуклеиновой кислоты, раскрытой в настоящем описании. В некоторых случаях, неврологическое нарушение или состояние представляет собой психиатрическое нарушение (например, шизофрению, обсессивно-компульсивное расстройство, зависимость, депрессию, беспокойство, психоз); нарушение аутического спектра (например, синдром ломкой X-хромосомы, синдром Ретта); эпилепсию (например, хроническую травматическую энцефалопатию, генерализованную эпилепсию с фебрильными пароксизмами плюс (GEFS+), эпилептическую энцефалопатию, эпилепсию височной доли, фокальную эпилепсию, туберозный склероз); или нейродегенерацию (например, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона). В некоторых случаях, неврологическое нарушение или состояние представляет собой синдром Драве или болезнь Альцгеймера. В некоторых случаях, неврологическое состояние или заболевание представляет собой любое связанное с пароксизмами и/или эпилепсией состояние или заболевание, в которое вовлечены PV нейроны.

[9] В одном из аспектов способ увеличения селективной экспрессии трансгена в PV нейронах в CNS включает приведение клетки в контакт с кассетой нуклеиновой кислоты, раскрытой в настоящем описании.

[10] В некоторых аспектах, настоящее раскрытие предусматривает способ направления экспрессии любого трансгена в PV нейроны в CNS, способ включает функциональное связывание одного или более селективных регуляторных элементов PV нейронов с трансгеном. В некоторых случаях, каждый из регуляторных элементов содержит (i) последовательность SEQ ID NO: 1–32, (ii) функциональный фрагмент или их сочетание или (iii) последовательность с по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей с (i) или (ii). В некоторых случаях идентичность последовательностей определяют с использованием BLAST. В некоторых случаях регуляторные элементы ведут к селективной экспрессии трансгена в PV нейронах, которая больше, чем экспрессия того же трансгена, когда он функционально связан с неселективным регуляторным элементом, как измеряют с помощью анализа совместной локализации. В некоторых случаях иммуногистохимический анализ содержит антитело против PV (например, как описано далее в примере 5). В некоторых случаях, неселективный регуляторный элемент представляет собой конститутивный промотор. В некоторых случаях, неселективный регуляторный элемент представляет собой любое из CAG, EF1 α , SV40, CMV, UBC, PGK и CBA. В некоторых случаях, регуляторные элементы ведут к селективной экспрессии трансгена в PV нейронах на уровне, который по меньшей мере в 1,5 раза выше, по меньшей мере в 2 раза выше, по меньшей мере в 3 раза выше, по меньшей мере в 4 раза выше, по меньшей мере в 5 раз выше, по меньшей мере в 6 раз выше, по меньшей мере в 7 раз выше, по меньшей мере в 8 раз выше, по меньшей мере в 9 раз выше, по меньшей мере в 10 раз выше, по меньшей мере в 15 раз выше или по

меньшей мере в 20 раз выше по сравнению с неселективным регуляторным элементом, когда он функционально связан с трансгеном, как измеряют с помощью анализа совместной локализации. В некоторых случаях, регуляторные элементы ведут к селективной экспрессии в PV нейронах, которая по меньшей мере на 2%, по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, 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% или по меньшей мере на 95% выше, чем экспрессия в PV нейронах, когда трансген функционально связывают с неселективным регуляторным элементом. В некоторых случаях, регуляторные элементы ведут к селективной экспрессии в PV нейронах, которая приблизительно в 1,5 раза, 2 раза, 2,5 раза, 3 раза, 3,5 раза, 4 раза, 4,5 раза, 5 раз, 5,5 раза, 6 раз, 6,5 раза, 7 раз, 7,5 раза, 8 раз, 8,5 раза, 9 раз, 9,5 раза, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 25 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз или 100 раз выше, чем ожидают для естественного распределения PV нейронов в CNS. В некоторых случаях, трансген представляет собой любой один из SCN1A, SNC2A, SNC8A, SCN1B, SCN2B, KV3.1, KV3.3, STXBP1, ДНК-связывающего белка, редактирующего гены белка или его функционального фрагмента. В некоторых случаях, регуляторные элементы и трансген находятся в AAV. В некоторых случаях, AAV представляет собой AAV1, AAV8, AAV9, scAAV1, scAAV8 или scAAV9.

[11] В другом аспекте настоящее раскрытие предусматривает способ лечения неврологического состояния или нарушения у нуждающегося в этом субъекта, способ включает приведение клетки в контакт с кассетой нуклеиновой кислоты, содержащей: один или более регуляторных элементов, функционально связанных с трансгеном, которые ведут к селективной экспрессии трансгена в PV нейронах относительно одной или более не PV клеток в CNS. В некоторых случаях каждый из регуляторных элементов содержит (i) последовательность SEQ ID NO: 1–32, (ii) функциональный фрагмент или их сочетание или (iii) последовательность с по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей с (i) или (ii). В некоторых случаях, идентичность последовательностей определяют с использованием BLAST. В некоторых случаях, трансген представляет собой субъединицу потенциалзависимого ионного канала или ее вариант или функциональный фрагмент. В некоторых случаях, субъединица представляет собой β -субъединицу натриевого ионного канала. В некоторых случаях, субъединица представляет собой α -субъединицу натриевого ионного канала. В некоторых случаях, субъединица относится к калиевому ионному каналу. В некоторых случаях, трансген представляет собой любое из (i) SCN1A, SCN1B, SCN2B, KV3.1 или KV3.3; (ii) его функционального фрагмента; или (iii) последовательности, обладающей по меньшей мере

80% идентичностью последовательностей с (i) или (ii). В некоторых случаях, трансген представляет собой ДНК-связывающий белок. В некоторых случаях, ДНК-связывающий белок модулирует эндогенный ген. В некоторых случаях, эндогенный ген представляет собой SCN1A, SNC2A, SNC8A, SCN1B, SCN2B, KV3.1, KV3.3 или STXBP1. В некоторых случаях, трансген представляет собой ДНК-связывающий белок, который содержит ДНК-связывающий домен ДНК-связывающего белка или ДНК-расщепляющего белка (например, нуклеазы, рестрикционного фермента, рекомбиназы и т. д.), где ДНК-расщепляющий домен или нуклеазный домен дезактивирован, например, Cas с дезактивированной нуклеазной активностью (dCas), дезактивированная подобная активатору транскрипции эффекторная нуклеаза или белок с цинковыми пальцами с дезактивированной нуклеазной активностью. В некоторых случаях, трансген содержит ДНК-связывающий домен, связанный с транскрипционным модулирующим доменом (например, домен транскрипционного активатора или репрессора). В некоторых случаях, трансген представляет собой редактирующий гены белок. В некоторых случаях, редактирующий гены белок представляет собой белок Cas, например, Cas9. В некоторых случаях, неврологическое состояние или нарушение ассоциировано с гаплонедостаточностью или мутацией в любом из SCN1A, SNC2A, SNC8A, SCN1B, SCN2B, KV3.1, KV3.3 или STXBP1. В некоторых случаях, неврологическое состояние или нарушение представляет собой эпилепсию, нейродегенерацию, таупатию или нейрональную гиповозбудимость. В некоторых случаях, неврологическое состояние или нарушение представляет собой синдром Драве. В некоторых случаях, неврологическое состояние или нарушение представляет собой болезнь Альцгеймера. В некоторых случаях, неврологическое состояние или заболевание представляет собой психиатрическое нарушение (например, шизофрению, обсессивно-компульсивное расстройство, зависимость, депрессию, беспокойство, психоз); нарушение аутического спектра (например, синдром ломкой X-хромосомы, синдром Ретта); эпилепсию (например, хроническую травматическую энцефалопатию, генерализованную эпилепсию с фебрильными пароксизмами плюс (GEFS+), эпилептическую энцефалопатию, эпилепсию височной доли, фокальную эпилепсию, туберозный склероз); или нейродегенерацию (например, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона). В некоторых случаях, неврологическое состояние или заболевание представляет собой любое связанное с пароксизмами и/или эпилепсией состояние или заболевание, в которое вовлечены PV нейроны. В некоторых случаях, регуляторные элементы по этому раскрытию ведут к селективной экспрессии трансгена в PV нейронах, которая больше, чем экспрессия того же трансгена, когда он функционально связан с неселективным регуляторным элементом, как измеряют с помощью анализа совместной локализации. В некоторых случаях, неселективный регуляторный элемент представляет собой конститутивный промотор. В некоторых случаях, неселективный регуляторный элемент представляет собой любое из CAG, EF1 α , SV40, CMV, UBC, PGK и CBA. В некоторых случаях, регуляторные элементы ведут к селективной экспрессии в PV нейронах на уровне, который по меньшей мере в 1,5

раза выше, по меньшей мере в 2 раза выше, по меньшей мере в 3 раза выше, по меньшей мере в 4 раза выше, по меньшей мере в 5 раз выше, по меньшей мере в 6 раз выше, по меньшей мере в 7 раз выше, по меньшей мере в 8 раз выше, по меньшей мере в 9 раз выше, по меньшей мере в 10 раз выше, по меньшей мере в 15 раз выше или по меньшей мере в 20 раз выше по сравнению с неселективным регуляторным элементом, когда он функционально связан с трансгеном, как измеряют с помощью анализа совместной локализации. В некоторых случаях, регуляторные элементы ведут к селективной экспрессии в PV нейронах, которая по меньшей мере на 2%, по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, 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% или по меньшей мере на 95% выше, чем экспрессия в PV нейронах, когда трансген функционально связывают с неселективным регуляторным элементом. В некоторых случаях, регуляторные элементы ведут к селективной экспрессии в PV нейронах, которая приблизительно в 1,5 раза, 2 раза, 2,5 раза, 3 раза, 3,5 раза, 4 раза, 4,5 раза, 5 раз, 5,5 раза, 6 раз, 6,5 раза, 7 раз, 7,5 раза, 8 раз, 8,5 раза, 9 раз, 9,5 раза, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 25 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз или 100 раз выше, чем ожидают для естественного распределения PV нейронов в CNS. В некоторых случаях, кассета нуклеиновой кислоты находится в AAV. В некоторых случаях, AAV представляет собой AAV1, AAV8, AAV9, scAAV1, scAAV8 или scAAV9.

[12] В одном из аспектов, настоящее раскрытие предусматривает способ лечения синдрома Драве, который включает приведение в контакт клетки с AAV, содержащим трансген, где трансген представляет собой любое из (i) SCN1A, SNC2A, SNC8A, SCN1B, SCN2B или ДНК-связывающего белка, (ii) его функционального фрагмента или (iii) последовательности, обладающей по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичность последовательностей с (i) или (ii). В некоторых случаях, идентичность последовательностей измеряют с использованием BLAST. В некоторых случаях, ДНК-связывающий белок модулирует эндогенный ген. В некоторых случаях, ДНК-связывающий белок представляет собой транскрипционный модулятор. В некоторых случаях трансген представляет собой ДНК-связывающий белок, который содержит ДНК-связывающий домен ДНК-связывающего белка или ДНК-расщепляющего белка (например, нуклеазы, рестрикционного фермента, рекомбиназы и т. д.), где ДНК-расщепляющий домен или нуклеазный домен дезактивирован, например, Cas с дезактивированной нуклеазной активностью (dCas), дезактивированная подобная активатору транскрипции эффекторная нуклеаза или белок с цинковыми пальцами с дезактивированной нуклеазной активностью. В некоторых

случаях, ДНК–связывающий домен связывают с транскрипционным модулирующим доменом (например, доменом транскрипционного активатора или репрессора). В некоторых случаях трансген содержит редактирующий гены белок, например, белок Cas, Cas9. В некоторых случаях, эндогенный ген представляет собой SCN1A, SNC2A, SNC8A, SCN1B или SCN2B. В некоторых случаях, AAV дополнительно содержит один или более селективных регуляторных элементов PV нейронов, или один или более регуляторных элементов, раскрытых в настоящем описании, функционально связаны с трансгеном. В некоторых случаях, каждый из регуляторных элементов независимо содержит (i) последовательность SEQ ID NO: 1–32, (ii) функциональный фрагмент или их сочетание или (iii) последовательность с по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей с (i) или (ii).

[13] В другом аспекте настоящее раскрытие предусматривает способ лечения болезни Альцгеймера, который включает приведение в контакт клетки с AAV, содержащим трансген, где трансген представляет собой любое из (i) SCN1A, SNC2A, SNC8A, SCN1B, SCN2B, KV3.1, KV3.3, STXBP1 или ДНК–связывающего белка; (ii) его функционального фрагмента; или (iii) последовательности, обладающей по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей с (i) или (ii). В некоторых случаях, идентичность последовательностей измеряют с использованием BLAST. В некоторых случаях, ДНК–связывающий белок модулирует эндогенный ген. В некоторых случаях, эндогенный ген представляет собой SCN1A, SNC2A, SNC8A, SCN1B, SCN2B, KV3.1, KV3.3 или STXBP1. В некоторых случаях, трансген представляет собой ДНК–связывающий белок, содержащий транскрипционный модулятор. В некоторых случаях, трансген представляет собой ДНК–связывающий белок, который содержит ДНК–связывающий домен ДНК–связывающего белка или ДНК–расщепляющего белка (например, нуклеазы, рестрикционного фермента, рекомбиназы и т. д.), где ДНК–расщепляющий домен или нуклеазный домен дезактивирован, например, Cas с дезактивированной нуклеазной активностью (dCas), дезактивированная подобная активатору транскрипции эффекторная нуклеаза или белок с цинковыми пальцами с дезактивированной нуклеазной активностью. В некоторых случаях, ДНК–связывающий домен связывают с транскрипционным модулирующим доменом (например, доменом транскрипционного активатора или репрессора). В некоторых случаях, трансген содержит редактирующий гены белок, например, белок Cas, Cas9. В некоторых случаях, AAV дополнительно содержит один или более селективных регуляторных элементов PV нейронов, или один или более регуляторных элементов, раскрытых в настоящем

описании, функционально связаны с трансгеном. В некоторых случаях, каждый из регуляторных элементов независимо содержит каждый из регуляторных элементов независимо содержит (i) последовательность SEQ ID NO: 1–32, (ii) функциональный фрагмент или их сочетание или (iii) последовательность с по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей с (i) или (ii).

ВКЛЮЧЕНИЕ ПО ССЫЛКЕ

[14] Все публикации, патенты и патентные заявки, упомянутые в этом описании, включены в настоящее описание посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая индивидуальная публикация, патент или патентная заявка была конкретно и индивидуально указана для включения по ссылке.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

[15] Новые признаки изобретения изложены конкретно в приложенной формуле изобретения. Более полное понимание признаков и преимуществ настоящего изобретения можно получить, обратившись к следующему подробному описанию, в котором изложены иллюстративные варианты осуществления, в которых используют принципы изобретения, и сопроводительным рисункам, среди которых:

[16] Фиг. 1 иллюстрирует частоту пароксизмов (пароксизмы за интервал 12 ч) у SCN1A гетерозиготных мышей после лечения рекомбинантным вектором AAVDJ, содержащим SCN1B или eGFP, функционально связанный с регуляторным элементом, содержащим последовательность SEQ ID NO: 32. График иллюстрирует средние значения в каждые сутки регистрации с величинами ошибки, представляющими стандартную ошибку среднего.

[17] Фиг. 2 иллюстрирует высокую гамма-мощность (50–100 Гц) у различных мышей: контроль дикого типа (WT), трансгенные мыши APP/PS1 без лечения (APP/PS1) или трансгенные мыши APP/PS1, которых лечили с использованием rAAV, содержащего SCN1B, функционально связанный с регуляторным элементом, содержащим последовательность SEQ ID NO: 32 (APP/PS1+SCN1B).

[18] Фиг. 3А иллюстрирует иммунофлуоресцентный анализ совместной локализации клеток CNS от детенышей после неонатальных системных инъекций AAV9, содержащего трансген eGFP, функционально связанный с регуляторным элементом, содержащим последовательность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 8. AAV9, содержащий трансген eGFP, функционально связанный с CAG, использовали в качестве контроля. Изображения в нижнем ряду иллюстрируют клетки eGFP+. Изображения в среднем ряду иллюстрируют PV+ клетки, которые окрашивали антителом против PV. Изображения в верхнем ряду (слитые) иллюстрируют наложение PV+, eGFP+ флуоресценции (с репрезентативными eGFP+ и PV+ клетками, которые показаны как белые или светло-серые клетки, показанные стрелками) и DAPI+.

[19] Фиг. 3В иллюстрирует количественное определение в иммунофлуоресцентных исследованиях совместной локализации, проиллюстрированных на фиг. 3А, где селективную экспрессию в PV клетках выражают как процентную долю eGFP⁺ клеток, которые также являются PV⁺ в сравнении с CAG контролем, как измеряют посредством иммунофлуоресцентного анализа совместной локализации.

[20] Фиг. 4А иллюстрирует иммунофлуоресцентный анализ совместной локализации клеток CNS от взрослых мышей после системных инъекций AAV9, содержащего трансген eGFP, функционально связанный с регуляторным элементом, содержащим последовательность SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 8. AAV9, содержащий трансген eGFP, функционально связанный с EF1 α , использовали в качестве контроля. Изображения в нижнем ряду иллюстрируют eGFP⁺ клетки. Изображения в среднем ряду иллюстрируют PV⁺ клетки, которые окрашивали антителом против PV. Изображения в верхнем ряду (слитые) иллюстрируют наложение PV⁺ eGFP⁺ флуоресценции (с репрезентативными eGFP⁺ и PV⁺ клетками, или белыми или светло-серыми клетками, показанными стрелками) и DAPI⁺.

[21] Фиг. 4В иллюстрирует количественное определение в иммунофлуоресцентных исследованиях совместной локализации, проиллюстрированных на фиг. 4А, в которых селективную экспрессию в PV клетках выражают как процентную долю eGFP⁺ клеток, которые также были PV⁺ в сравнении с EF1 α контролем, как измеряют посредством иммунофлуоресцентного анализа совместной локализации.

[22] Фиг. 5А–5F иллюстрируют иммунофлуоресцентный анализ совместной локализации клеток CNS от взрослых мышей после непосредственных CNS-инъекций AAVDJ, содержащего трансген eGFP, функционально связанный с регуляторным элементом, содержащим последовательность SEQ ID NO: 2–22. Изображения в нижнем ряду иллюстрируют eGFP⁺ клетки. Изображения в среднем ряду иллюстрируют PV клетки, которые окрашивали антителом против PV. Изображения в верхнем ряду (слитые) иллюстрируют наложение PV⁺, eGFP⁺ флуоресценции (с репрезентативными eGFP⁺ и PV⁺ клетками, или белыми или светло-серыми клетками, показанными стрелками) и DAPI⁺. Фиг. 5А иллюстрирует иммунофлуоресцентный анализ совместной локализации, выполняемый с использованием AAVDJ, содержащего одну из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 5, функционально связанную с eGFP. Фиг. 5В иллюстрирует иммунофлуоресцентный анализ совместной локализации, выполняемый с использованием AAVDJ, содержащего одну из SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 9, функционально связанную с eGFP. Фиг. 5С иллюстрирует иммунофлуоресцентный анализ совместной локализации, выполняемый с использованием AAVDJ, содержащего одну из SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 и SEQ ID NO: 13, функционально связанную с eGFP. Фиг. 5D иллюстрирует иммунофлуоресцентный анализ совместной локализации, выполняемый с использованием AAVDJ, содержащего одну из SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 и SEQ ID NO: 17, функционально связанную с eGFP. Фиг. 5Е иллюстрирует иммунофлуоресцентный анализ совместной локализации,

выполняемый с использованием AAVDJ, содержащим одну из SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 и SEQ ID NO: 21, функционально связанную с eGFP. Фиг. 5F иллюстрирует иммунофлуоресцентный анализ совместной локализации, выполняемый с использованием AAVDJ, содержащего SEQ ID NO: 22 или SEQ ID NO: 34, функционально связанную с eGFP, где SEQ ID NO: 34 представляет собой ранее охарактеризованный неселективный регуляторный элемент, и ее использовали в качестве контроля для сравнения.

[23] Фиг. 6 иллюстрирует количественное определение в иммунофлуоресцентных исследованиях совместной локализации, проиллюстрированных на фиг. 5A–5F, где селективную экспрессию в PV клетках выражают как процентную долю eGFP⁺ клеток, которые также были PV⁺ в сравнении с SEQ ID NO: 34, как измеряют посредством иммунофлуоресцентного анализа совместной локализации.

[24] Фиг. 7 иллюстрирует схематический пример экспрессирующей кассеты, содержащей RE по этому раскрытию, например, энхансер, промотор и элементы стабильности. RE можно располагать выше и/или ниже по направлению считывания от трансгена в экспрессирующей кассете, которая может представлять собой плазмиду, вектор или вирусный вектор.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ РАСКРЫТИЯ

[25] Настоящее раскрытие предусматривает композиции и способы использования таких композиций в генной терапии для того, чтобы лечить заболевание или состояние, ассоциированное с центральной нервной системой (CNS), например, синдром Драве, болезнь Альцгеймера, эпилепсию и/или пароксизмы.

[26] Генная терапия может заменять, модифицировать, удалять или добавлять ген или конкретную последовательность нуклеиновой кислоты, такую как экспрессирующая кассета, чтобы вызывать терапевтический эффект в клетке. В некоторых случаях, генную терапию используют для того, чтобы доставлять экспрессирующую кассету в клетку, которая вызывает терапевтический эффект или ведет к нему. В некоторых случаях, вирус, такой как AAV, который содержит вирусный вектор, который содержит экспрессирующую кассету, можно использовать для того, чтобы доставлять трансген в клетку. Экспрессирующая кассета может содержать трансген, который обеспечивает терапевтический эффект, когда его экспрессируют в клетке.

[27] Одна проблема в генной терапии состоит в обеспечении того, что трансген экспрессируют в подходящем типе клеток, представляющем интерес, или целевом типе клеток, чтобы вызывать или направлять экспрессию гена. Традиционные способы направленной генной терапии часто основаны на способах доставки и/или носителях (например, изменении используемых вирусов или капсидных последовательностей вирусов). В дополнение к направлению или селективной экспрессии экспрессирующей кассеты в целевом типе клеток относительно одного или более не целевых типов клеток, другая проблема в этой области представляет собой увеличение экспрессии гена, в частности, когда ген является большим, в целевых типе клеток или ткани, чтобы

проявлять терапевтический эффект.

[28] Настоящее раскрытие предусматривает множество регуляторных элементов, которые представляют собой некодирующие нуклеотидные последовательности, которые могут быть функционально связаны с любым трансгеном, чтобы увеличивать или усовершенствовать избирательность экспрессии трансгена в CNS, например, в PV нейронах. Увеличивая избирательность экспрессии гена с использованием одного или более регуляторных элементов, раскрытых в настоящем описании, можно усовершенствовать эффект генной терапии, снижать эффективную дозу, необходимую для получения терапевтического эффекта, минимизировать нежелательные эффекты или эффект вне мишени и/или увеличивать безопасность и/или переносимость пациента.

[29] В одном из аспектов, один или более регуляторных элементов могут быть функционально связаны с любым трансгеном в экспрессирующей кассете для того, чтобы модулировать экспрессию гена в клетке, например, направлять экспрессию трансгена в целевые тип клеток или ткань (например, PV клетки) относительно одного или более не целевых типов клеток или тканей (например, клетки CNS не PV типа). В некоторых случаях, направление экспрессии трансгена в целевые тип клеток или ткань включает увеличенную экспрессию гена в целевом типе клеток или ткани. Один или более регуляторных элементов, функционально связанных с трансгеном, могут представлять собой часть экспрессирующей кассеты, которая может представлять собой линейную или кольцевую конструкцию, плазмиду, вектор, вирусный вектор, например, вектор аденоассоциированного вируса (AAV). Такую экспрессирующую кассету можно адаптировать для генной терапии или доставки субъекту (например, человеку, пациенту или млекопитающему). В некоторых случаях, функциональное связывание одного или более регуляторных элементов с геном ведет к направленной экспрессии гена в целевых ткани или типе клеток в CNS, таких как парвальбуминовый (PV) нейрон. В некоторых случаях, один или более регуляторных элементов (например, SEQ ID NO: 1–32 или функциональный фрагмент или их сочетание, или последовательности, обладающие по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей с ними) увеличивают избирательность экспрессии гена в целевых ткани или типе клеток в CNS, таких как PV нейроны. В некоторых случаях, генная терапия содержит один или более регуляторных элементов, раскрытых в настоящем описании, где регуляторные элементы функционально связаны с трансгеном и управляют селективной экспрессией трансгена в PV нейронах.

[30] В некоторых случаях, селективную экспрессию гена в PV нейронах используют для того, чтобы лечить заболевание или состояние, ассоциированное с гаплонедостаточностью и/или генетическим дефектом в эндогенном гене, где генетический дефект может представлять собой мутацию в гене или дисрегуляцию гена. Такой генетический дефект может вести к сниженному уровню продукта гена и/или продукту гена с ослабленной функцией и/или активностью. В некоторых случаях, экспрессирующая кассета содержит ген, субъединицу, ее вариант или функциональный

фрагмент, где экспрессию гена из экспрессирующей кассеты используют для того, чтобы лечить заболевание или состояние, ассоциированное с генетическим дефектом, ослабленной функцией и/или активностью и/или дисрегуляцией эндогенного гена. В некоторых случаях, заболевание или состояние представляет собой синдром Драве, болезнь Альцгеймера, эпилепсию, нейродегенерацию, таупатию, нейрональную гиповозбудимость и/или пароксизмы.

[31] В некоторых случаях трансген представляет собой ионный канал или регулятор нейромедиатора, ДНК–связывающий белок или субъединицу, ее вариант или функциональный фрагмент. В некоторых случаях, трансген представляет собой α –субъединицу натриевого ионного канала, β –субъединицу натриевого ионного канала или ее вариант или функциональный фрагмент. В некоторых случаях, трансген представляет собой калиевый ионный канал или его субъединицу. В некоторых случаях, трансген представляет собой SCN1A, SNC2A, SNC8A, SCN1B, SCN2B, KV3.1, KV3.2, KV3.3, STXBP1, ДНК–связывающий белок (например, ДНК–связывающий белок, который модулирует экспрессию эндогенного гена) или его вариант или функциональный фрагмент. В некоторых случаях, трансген содержит последовательность, обладающую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей с любым одним из SCN1A, SNC2A, SNC8A, SCN1B, SCN2B, KV3.1, KV3.2, KV3.3, STXBP1, ДНК–связывающего белка или его варианта или функционального фрагмента. В некоторых случаях, трансген представляет собой ДНК–связывающий белок, который модулирует экспрессию эндогенного гена, такого как любой один из SCN1A, SNC2A, SNC8A, SCN1B, SCN2B, KV3.1, KV3.2, KV3.3 и STXBP1.

[32] Как используют в настоящем описании, формы единственного числа предназначены также включать множественные формы, пока контекст явно не указывает на иное. Кроме того, в той мере, в какой термины «включающий», «включает», «имеющий», «имеет», «с» или их варианты используют в любом подробном описании и/или формуле изобретения, такие термины предназначены в качестве включающих наподобие термина «содержащий».

[33] Термин «приблизительно» или «около» обозначает в пределах приемлемого диапазона ошибки конкретное значение, как определяет специалист в данной области, что зависит отчасти от того, как значение измеряют или определяют, т. е. от ограничений измерительной системы. Например, «приблизительно» может обозначать в пределах одного или больше чем одного стандартного отклонения, в соответствии с практикой в данной области. Альтернативно, «приблизительно» может обозначать диапазон вплоть до 20%, вплоть до 15%, вплоть до 10%, вплоть до 5% или вплоть до 1%) от заданного значения.

[34] Термины «определение», «измерение», «оценка», «анализ» и их грамматические эквиваленты можно использовать взаимозаменяемо в настоящем

описании, чтобы отослать к любой форме измерения, и они включают определение того, присутствует ли элемент или нет (например, обнаружение). Эти термины могут включать количественное и/или качественное определение. Оценка может быть относительной или абсолютной.

[35] Термин «экспрессия» относится к процессу, посредством которого последовательность нуклеиновой кислоты или полинуклеотид транскрибируют с ДНК матрицы (например, в мРНК или другой РНК транскрипт), и/или процессу, посредством которого транскрибированную мРНК впоследствии транслируют в пептиды, полипептиды или белки. Транскрипты и кодируемые полипептиды в совокупности можно обозначать как «продукт гена». Если полинуклеотид получают из геномной ДНК, экспрессия может включать сплайсинг мРНК в эукариотической клетке.

[36] Как используют в настоящем описании, «функционально связанный», «функциональная связь», «функционально связан» или их грамматические эквиваленты относятся к близкому положению генетических элементов, например, промотора, энхансера, последовательности полиаденилирования и т. д., где элементы находятся в связи, позволяющей им работать ожидаемым образом. Например, регуляторный элемент, который может содержать промоторные и/или энхансерные последовательности, функционально связывают с кодирующей областью, если регуляторный элемент помогает инициировать транскрипцию кодирующей последовательности. Могут иметь место промежуточные остатки между регуляторным элементом и кодирующей областью при условии, что эта функциональная связь сохранена.

[37] «Вектор», как используют в настоящем описании, относится к макромолекуле или ассоциации макромолекул, которая содержит или образует ассоциацию с полинуклеотидом и которую можно использовать для того, чтобы опосредовать доставку полинуклеотида в клетку. Примеры векторов включают плазмиды, вирусные векторы, липосомы и другие носители доставки генов. Вектор обычно содержит генетические элементы, например, регуляторные элементы, функционально связанные с геном, чтобы содействовать экспрессии гена в мишени. Комбинацию регуляторных элементов и ген или гены, с которыми они функционально связаны для экспрессии, обозначают как «экспрессирующая кассета».

[38] Термин «AAV» представляет собой сокращение для аденоассоциированного вируса, и его можно использовать, чтобы отослать к самому вирусу или его производному. Термин охватывает все серотипы, подтипы, а также как встречаемые в природе, так и рекомбинантные формы, за исключением того, где требуется иное. Сокращение «rAAV» относится к рекомбинантному аденоассоциированному вирусу, также обозначаемому как рекомбинантный AAV вектор (или «rAAV вектор»). Термин «AAV» включает AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, rh10 и их гибриды, AAV птицы, AAV коровы, AAV собаки, AAV лошади, AAV примата, AAV не примата и AAV овцы. Геномные последовательности различных серотипов AAV, а также последовательности нативных

концевых повторов (TR), Rep белки и капсидные субъединицы известны в данной области. Такие последовательности можно найти в литературе или в публичных базах данных, таких как GenBank. «гAAV вектор», как используют в настоящем описании, относится к AAV вектору, содержащему полинуклеотидную последовательность, происходящую не из AAV (т. е., полинуклеотид, гетерологичный AAV), обычно последовательность, представляющую интерес, для генетической трансформации клетки. В целом, гетерологичный полинуклеотид фланкируют по меньшей мере одним и обычно двумя последовательностями инвертированных концевых повторов AAV (ITR). Термин гAAV вектор охватывает как частицы гAAV вектора, так и плазмиды гAAV вектора. гAAV вектор может быть одноцепочечным (ssAAV) или самокомплементарным (scAAV). «AAV вирус» или «AAV вирусная частица» или «частица гAAV вектора» относится к вирусной частице, состоящей из по меньшей мере одного белка капсида AAV и инкапсидированного полинуклеотидного гAAV вектора. Если частица содержит гетерологичный полинуклеотид (т. е. полинуклеотид, отличный от генома AAV дикого типа, такой как трансген, подлежащий доставке в клетку млекопитающего), его обычно обозначают как «частица гAAV вектора» или просто «гAAV вектор». Таким образом, получение гAAV частицы обязательно включает получение гAAV вектора, поскольку такой вектор содержится в гAAV частице.

[39] Как используют в настоящем описании, термины «лечить», «лечение», «терапия» и т. п. относятся к достижению желаемого фармакологического и/или физиологического эффекта, включая в качестве неограничивающих примеров облегчение, задержку или замедление прогрессирования, снижение эффектов или симптомов, предотвращение начала, ингибирование, улучшение начала заболевания или нарушения, достижение полезного или желаемого результата в отношении заболевания, нарушения или медицинского состояния, такого как терапевтический эффект и/или профилактическая польза. «Лечение», как используют в настоящем описании, охватывает любое лечение заболевания у млекопитающего, в частности, у человека, и включает: (а) предотвращение возникновения заболевания у субъекта, который может быть предрасположен к заболеванию или иметь риск возникновения заболевания, не у которого еще не диагностировано его наличие; (b) ингибирование заболевания, т. е., задержка его развития; и (с) облегчение заболевания, т. е. инициация регресса заболевания. Терапевтический эффект включает эрадикацию или улучшение основного нарушения, подлежащего лечению. Также терапевтического эффекта достигают при эрадикации или улучшении одного или более физиологических симптомов, ассоциированных с основным нарушением так, что усердствование наблюдают у субъекта, безотносительно того, что субъект все еще может страдать основным нарушением. В некоторых случаях, для профилактической пользы, композиции вводят субъекту с риском развития конкретного заболевания или субъекту, сообщающему об одном или более физиологических симптомах заболевания, даже несмотря на то, что диагноз этого заболевания может быть не поставлен. Способы по настоящему раскрытию можно использовать у любого

млекопитающего. В некоторых случаях, лечение может вести к снижению или прекращению симптомов (например, снижение частоты или длительности пароксизмов). Профилактический эффект включает задержку или устранение проявления заболевания или состояния, задержку или устранение начала симптомов заболевания или состояния, замедление, остановку или обращение прогрессирования заболевания или состояния или любое их сочетание.

[40] Термин «эффективное количество» или «терапевтически эффективное количество» относится к такому количеству композиции, описанной в настоящем описании, которого достаточно для того, чтобы осуществлять предполагаемое применение, включая в качестве неограничивающих примеров лечение заболевания, как определено далее. Терапевтически эффективное количество может варьировать в зависимости от предполагаемого применения лечения (*in vivo*) или субъекта и патологического состояния, подлежащего лечению, например, массы и возраста субъекта, тяжести патологического состояния, способа введения и т. п., которые может легко определять специалист в данной области. Термин также применим к дозе, которая вызывает конкретный ответ в целевой клетке. Конкретная доза варьирует в зависимости от конкретной выбранной композиции, схемы дозирования, которой следует придерживаться, ее введения в комбинации с другими соединениями, времени введения, ткани, в которую ее вводят, и физической системы доставки, в которой ее переносят.

[41] «Фрагмент» нуклеотидной или пептидной последовательности предназначен для обозначения последовательности, которая меньше той, которую считают «полноразмерной» последовательностью.

[42] «Вариант» молекулы относится к аллельным вариациям таких последовательностей, то есть последовательность, по существу схожая по структуре и биологической активности с целой молекулой или с ее фрагментом.

[43] Термин «функциональный фрагмент» предназначен включать «фрагменты», «варианты», «аналоги» или «химические производные» молекулы.

[44] «Функциональный фрагмент» последовательности ДНК или белка обладает по меньшей мере биологически активным фрагментом последовательности, что относится к фрагменту, который сохраняет биологическую активность (функциональную или структурную), которая по существу схожа с биологической активностью полноразмерной последовательностью ДНК или белка. Биологическая активность последовательности ДНК может представлять собой ее способность влиять на экспрессию таким образом, который приписывают полноразмерной последовательности. Например, функциональный фрагмент регуляторного элемента сохраняет способность влиять на транскрипцию, как полноразмерный RE.

[45] Термины «субъект» и «индивидуум» используют взаимозаменяемо в настоящем описании, чтобы отослать к позвоночному, предпочтительно млекопитающему, более предпочтительно к человеку. «Субъект» относится к животному, такому как млекопитающее, например, человек. Способы, описанные в настоящем

описании, можно использовать в терапевтических средствах для человека, ветеринарных применениях и/или доклинических исследованиях заболевания или состояния на животных моделях. В определенном случае субъектом является млекопитающее, и в некоторых случаях субъектом является человек.

[46] Термин «*in vivo*» относится к событию, которое имеет место в организме субъекта.

[47] Термин «*in vitro*» относится к событию, которое имеет место вне организма субъекта. Например, анализ *in vitro* охватывает любой анализ, выполняемый вне субъекта. Анализы *in vitro* охватывают анализы на основе клеток, в которых используют живые или погибшие клетки. Анализы *in vitro* также охватывают бесклеточный анализ, в котором не используют интактные клетки.

[48] Сравнение последовательностей, например, с целью оценки отличительных черт, мутаций или где одно или более положений тестовой последовательности выпадают относительно одного или более конкретных положений эталонной последовательности, можно осуществлять с помощью любого подходящего алгоритма выравнивания, включая в качестве неограничивающих примеров алгоритм Needleman–Wunsch (см., например, программу выравнивания EMBOSS Needle, доступную по адресу www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/, необязательно с настройками по умолчанию), алгоритм BLAST (см., например, инструмент выравнивания BLAST, доступный по адресу blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi, необязательно с настройками по умолчанию) и алгоритм Smith–Waterman (см., например, программу выравнивания EMBOSS Water, доступную по адресу www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_water/, необязательно с настройками по умолчанию). Оптимальное выравнивание можно оценивать с использованием любых подходящих параметров выбранного алгоритма, включая параметры по умолчанию.

[49] В целом, «идентичность последовательностей» или «гомология последовательностей», которые можно использовать взаимозаменяемо, относится к точному соответствию нуклеотид–к–нуклеотиду или аминокислота–к–аминокислоте в двух полинуклеотидных или полипептидных последовательностях, соответственно. Обычно, приемы для определения идентичности последовательностей включают определение нуклеотидной последовательности полинуклеотида и/или определение аминокислотной последовательности, кодируемой им, и сравнение этих последовательностей со второй нуклеотидной или аминокислотной последовательностью. Две или больше последовательности (полинуклеотидных или аминокислотных) можно сравнивать посредством определения их «процента идентичности», также обозначаемого как «процент гомологии». Процент идентичности с эталонной последовательностью (например, последовательностями нуклеиновых кислот или аминокислот), которая может представлять собой последовательность в более длинной молекуле (например, полинуклеотиде или полипептиде), можно вычислять в качестве числа точных совпадений между двумя оптимально выровненными последовательностями, деленного на длину эталонной последовательности и умноженного на 100. Процент идентичности также

можно определять, например, посредством сравнения информации о последовательности с использованием передовой компьютерной программы BLAST, включая версию 2.2.9, доступную в National Institutes of Health. Программа BLAST основана на способе выравнивания Karlin and Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2264–2268 (1990) и как рассмотрено в Altschul, et al., *J. Mol. Biol.* 215:403–410 (1990); Karlin and Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873–5877 (1993); и Altschul et al., *Nucleic Acids Res.* 25:3389–3402 (1997). В кратком изложении, программа BLAST определяет идентичность как число идентичных выровненных символов (т. е. нуклеотидов или аминокислот), деленное на общее число символов в более короткой из двух последовательностей. Программу можно использовать для того, чтобы определять процент идентичности по всей длине последовательностей, подлежащих сравнению. Параметры по умолчанию предусмотрены для того, чтобы оптимизировать поиск с использованием коротких запросных последовательностей, например, с использованием программы blastp. Программа также допускает использование фильтра SEG для маскирования сегментов запросных последовательностей, как определяют с помощью программы SEG из Wootton and Federhen, *Computers and Chemistry* 17: 149–163 (1993). Диапазоны желаемых степеней идентичности последовательностей составляют приблизительно от 80% до 100% и целые значения между ними. Обычно, проценты идентичности между обнаруженной последовательностью и заявленной последовательностью составляют по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%. В целом, точное совпадение указывает на 100% идентичность на протяжении длины эталонной последовательности. В некоторых случаях упоминание о проценте идентичности последовательностей относится к идентичности последовательностей, как измеряют с использованием BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). В других случаях можно использовать ClustalW для множественного выравнивания последовательностей.

[50] Если не указано иное, все термины, используемые в настоящем описании, имеют то же значение, в каком их будет применять специалист в данной области и в практическом осуществлении настоящего изобретения, общепринятых способах молекулярной биологии, микробиологии и технологии рекомбинантных ДНК, которые входят в объем знаний специалистов в данной области.

Регуляторные элементы

[51] Регуляторные элементы представляют собой последовательности нуклеиновой кислоты или генетические элементы, которые способны влиять (например, увеличивать или снижать) экспрессию гена и/или вызывать селективную экспрессию гена (например, репортерного гена, такого как eGFP, трансген или терапевтический ген) в конкретной ткани или типе клеток, представляющих интерес. В некоторых случаях, регуляторный элемент может представлять собой трансген, интрон, промотор, энхансер, UTR, инсультатор, репрессор, последовательность инвертированного концевого повтора (ITR), последовательность длинного концевого повтора (LTR), элемент стабильности, элемент

посттрансляционного ответа или последовательность polyA или их сочетание. В некоторых случаях, регуляторный элемент представляет собой промотор или энхансер или их сочетание. В некоторых случаях, регуляторный элемент получают из последовательности человека.

[52] В некоторых случаях, тип клеток, представляющий интерес, представляет собой PV нейроны. Регуляторные элементы могут функционировать на уровне ДНК и/или РНК. Регуляторные элементы могут функционировать для того, чтобы модулировать избирательность экспрессии гена в типе клеток, представляющем интерес. Регуляторные элементы могут функционировать для того, чтобы модулировать экспрессию гена в транскрипционной фазе, посттранскрипционной фазе или в трансляционной фазе экспрессии гена. Регуляторные элементы включают, но не ограничиваясь этим, последовательности промотора, энхансера, репрессора, сайленсера и инсулятора. На уровне РНК, регуляция может происходить на уровне трансляции (например, элементы стабильности, которые стабилизируют мРНК для трансляции), расщепления РНК, сплайсинга РНК и/или терминации транскрипции. В некоторых случаях, регуляторные элементы могут рекрутировать транскрипционные факторы в кодирующую область, что увеличивает избирательность экспрессии гена в типе клеток, представляющем интерес. В некоторых случаях, регуляторные элементы могут увеличивать скорость, с которой образуются транскрипты РНК, увеличивать стабильность образуемой РНК и/или увеличивать скорость синтеза белка с транскриптов РНК. В некоторых случаях регуляторные элементы могут предотвращать разрушение РНК и/или увеличивать ее стабильность для того, чтобы содействовать синтезу белка. В некоторых случаях регуляторные элементы подавляют процессы транскрипции и/или трансляции в типах клеток вне мишени. В некоторых случаях, типы клеток вне мишени включают, но не ограничиваясь этим, возбуждающие нейроны, клетки CNS не PV типа и не нейрональные типы клеток CNS.

[53] Различные анализы, включая в качестве неограничивающих примеров, гиперчувствительность к ДНКазе, ATAC-Seq и ChIP-Seq, можно использовать для того, чтобы идентифицировать предполагаемые некодирующие регуляторные элементы (RE). Ферментативная реакция в каждом из этих анализов предпочтительно направленно воздействует на хроматин в открытом/доступном состояниях, состоянии, которое предположительно предсказывает регуляторные элементы. Для обнаружения селективных регуляторных элементов клеток определенного типа можно анализировать последовательность открытого хроматина для целевого типа клеток, представляющего интерес (например, парвальбуминовые нейроны), и сравнивать ее с последовательностями открытого хроматина для не целевых типов клеток (например, возбуждающие нейроны). Можно применять дополнительные фильтры для того, чтобы дополнительно уточнять выбор мишени, включая близость к селективному гену определенного типа клеток, консервативность вида и/или мотивы последовательностей, такие как сайты связывания факторов транскрипции. Последовательности ДНК, которые уникально

идентифицированы в целевом типе клеток, можно синтезировать и клонировать в экспрессирующий вектор. Избирательность регуляторного элемента можно определять с использованием иммуногистохимических способов для того, чтобы количественно определять совместную локализацию с известными селективными белками определенного типа клеток.

[54] Например, один способ выделения селективного регуляторного элемента клеток определенного типа включает выделение ядер из ткани головного мозга или типа клеток, представляющего интерес, у животной модели, чего можно достичь с использованием способа аффинной очистки, которым выделяют ткань или тип клеток, представляющий интерес, (например, с использованием бус, покрытых антителом против PV, для выделения PV нейронов), используя высокопропускное естественное праймирование и синтез ДНК для того, чтобы генерировать совокупность последовательностей из областей открытого хроматина в ядрах, секвенирование совокупности последовательностей для того, чтобы идентифицировать предполагаемые последовательности, которые управляют экспрессией гена в ткани или типе клеток, представляющих интерес, и верификацию селективной экспрессии в репортерной системе в клеточной линии *in vitro* и/или в животной модели.

[55] Другой способ идентификации кандидатных регуляторных элементов, которые селективны в ткани или типе клеток, представляющих интерес, включает использование мыши с нокином R26–CAG–LSL–Sun1–sfGFP–My для сбора ткани или типа клеток, представляющих интерес, выделения GFP+/Myc+ ядер из неокортекса мыши этого штамма с использованием аффинной очистки, например, с использованием антител против GFP или против Myc и покрытых белком G магнитных бус для выделения ядер из неокортекса. Ядерную РНК из очищенных ядер или целые неокортикальные ядра можно превращать в кДНК и амплифицировать с использованием Nugen Ovation RNA–seq System V2 (Nugen 7102), после чего следует секвенирование с использованием Illumina HiSeq 2500. Геномную ДНК из очищенных ядер можно фрагментировать и использовать для получения библиотек MethylC–seq, которые можно секвенировать с использованием Illumina HiSeq 2000. Для того чтобы создавать библиотеку ATAC–seq, ядра, связанные с бусами, подвергают транспозиции с использованием транспозазы Tn5 (Illumina FC–121–1030). После 9–12 циклов ПЦР амплификации, библиотеки секвенируют с использованием Illumina HiSeq 2500. Для того чтобы создавать библиотеку ChIP–seq, ядра возбуждающих нейронов можно расщеплять на моноклеосомы с использованием микрококковой нуклеазы, после чего следует солевое экстрагирование хроматина и нативный ChIP и конструирование библиотеки, которую можно секвенировать на Illumina HiSeq 2500. После секвенирования этих библиотек, последовательности картируют для того, чтобы идентифицировать корреляцию, например, в конкретном типе клеток в гипометилировании в CG–богатых областей, модификациях гистонов, сайтах связывания транскрипционных факторов и паттернах, ассоциированных с высоко экспрессированными транскрипционными факторами. Пересекающиеся признаки и

корреляции из нескольких анализов и/или библиотек, описанных выше, предоставляют доказательства для идентификации кандидатных последовательностей в таких геномных областях в качестве потенциальных регуляторных элементов, ассоциированных с селективной экспрессией и/или высокой экспрессией в клетках, выделенных из неокортекса. Например, геномная область, отличающаяся значимым пересечением гипометилирования, обнаруживаемого в библиотеке MethylC-seq, ChIP анализ, и обогащения мотивами, связывающими факторы транскрипции, в одной и той же области, дает сходящиеся данные, которые указывают на то, что геномная область содержит последовательность предполагаемого регуляторного элемента, селективного к выделенной ткани или типу клеток. В качестве другого примера, чтобы идентифицировать кандидатные селективные регуляторные элементы PV нейронов, можно выделять PV нейроны и очищать ядра из выделенных PV клеток с тем, чтобы геномные последовательности, которые идентифицируют как активные во множестве анализов секвенирования, описанных выше, имели высокую вероятность представлять собой селективные регуляторные элементы PV клеток, например, геномная область, которую идентифицируют как активную в анализе ATAC-seq (соответствует областям открытого хроматина), активную при секвенировании РНК (указывает на активную экспрессию гена и паттерны слабого метилирования ДНК в области) и активную в анализе MethylC-seq (в котором создают метиломные карты с разрешением в одно основание для типа клеток, представляющего интерес).

[56] Когда кандидатные геномные области идентифицируют как избирательно активные в типе клеток, представляющем интерес, последовательности в этой области можно генерировать с использованием способов ПЦР и тестировать в дополнительных анализах *in vitro* и/или *in vivo* для того, чтобы валидировать избирательность последовательностей к ткани или типу клеток. Такие валидационные анализы включают иммуногистохимический анализ совместной локализации, в котором антитело или любой поддающийся обнаружению маркер используют для того, чтобы метить тип клеток, представляющий интерес, а второй поддающийся обнаружению маркер, например, флуоресцентный трансген, функционально связывают с предполагаемыми регуляторными элементами. Экспрессирующие кассеты, содержащие такие элементы доставляют в клетки *in vitro* и/или *in vivo*. Селективную экспрессию, движимую одним или более предполагаемыми регуляторными элементами, можно валидировать посредством измерения перекрытия между типом клеток, представляющим интерес (как измеряют с помощью поддающегося обнаружению сигнала или флуоресценции его меченного маркера, например, антитела против PV), и вторым поддающимся обнаружению маркером, соответствующим экспрессии трансгена (например, eGFP или RFP), функционально связанного с регуляторными элементами. Перекрытие в сигналах обоих поддающихся обнаружению маркеров указывает на избирательность определенного типа клеток в меченном типе клеток, если количество наблюдаемого перекрытия выше, чем перекрытие, наблюдаемое, когда регуляторные элементы заменяют на контроль, такой как

CAG, EF1 α , конститутивный промотор (например, SV40, CMV, UBC, PGK и CBA), неселективный регуляторный элемент или предварительно охарактеризованный неселективный регуляторный элемент. Различные штаммы мышей, адаптированные для экспрессии поддающегося обнаружению маркера в типе клеток, представляющем интерес, делают возможной валидацию избирательности к определенному типу клеток регуляторного элемента *in vivo*. Например, можно использовать множество линий мышей, которые экспрессируют Cre в конкретном типе клеток, поскольку селективная экспрессия Cre в определенном типе клеток может вызывать Cre-индуцированную экспрессию флуоресцентного белка, такого как RFP, в типе клеток, представляющих интерес. Мечение такого типа клеток, представляющего интерес, *in vivo* позволяет определять уровень селективной экспрессии в определенном типе клеток, которая ассоциирована с предполагаемым регуляторным элементом, функционально связанным с флуоресцентным или репортерным трансгеном у одной и той же мыши. Подобно анализу совместной локализации, перекрытие сигналов от обоих маркеров, которое превышает перекрытие, обнаруживаемое для CAG, EF1 α , конститутивного промотора (например, SV40, CMV, UBC, PGK и CBA) или неселективного регуляторного элемента, указывает у тестируемых регуляторных элементов на избирательность к определенному типу клеток. В некоторых случаях, используемый штамм мышей представляет собой мышь B6 PV-Cre (Jackson Laboratory), которая представляет собой мышь с нокином B6 PV-Cre, которая экспрессирует рекомбиназу Cre в экспрессирующих парвальбумин нейронах (например, вставочные нейроны в головном мозге и проприоцептивные афферентные рецепторные нейроны в дорсальных корешковых ганглиях), без нарушения эндогенной экспрессии Pvalb.

[57] При валидации избирательности к определенному типу клеток у регуляторного элемента для конкретного типа клеток, последовательности таких регуляторных элементов можно менять с использованием различных способов мутагенеза, например, способов подверженной ошибкам ПЦР, чтобы усовершенствовать их избирательность. В некоторых случаях, можно комбинировать два или больше регуляторных элементов, имеющих клеточную избирательность. В некоторых случаях, комбинированные регуляторные элементы проявляют увеличенную избирательность к определенному типу клеток при управлении экспрессией гена в типе клеток, представляющем интерес. В некоторых случаях, такие регуляторные элементы усекают на одно или более оснований за раз для того, чтобы определять минимальное количество последовательности, которая сохраняет свою избирательность к определенному типу клеток. Меньшие регуляторные элементы, которые сохраняют избирательность к определенному типу клеток, полезны для создания генной терапии, содержащей большой трансген, или где клонирующая емкость вектора или плазмиды ограничена в отношении размера трансгена, который желают доставлять с использованием генной терапии.

[58] Настоящее раскрытие предусматривает множество нуклеотидных последовательностей, которые представляют собой регуляторные элементы. В некоторых

случаях, любой один или более регуляторных элементов, раскрытых в настоящем описании, ведут к увеличенной избирательности экспрессии гена в парвальбуминовой клетке. В некоторых случаях, регуляторные элементы, раскрытые в настоящем описании, являются селективными к PV клеткам. В некоторых случаях, селективные регуляторные элементы PV клеток ассоциированы с селективной экспрессией гена в PV клетках, больше чем экспрессия в клетках CNS не PV типа. В некоторых случаях, селективные регуляторные элементы PV клеток как ассоциировано со сниженной экспрессией гена в клетках CNS не PV типа.

[59] Неограничивающие примеры регуляторных элементов включают SEQ ID NO: 1–32, как предоставлено в таблице 1 далее.

Таблица 1: список последовательностей нуклеиновой кислоты, раскрытых в настоящем описании.

SEQ ID NO:	Последовательность нуклеиновой кислоты	Источник/геномное местоположение
1	GGAGGAAGCCATCAACTAACTACAATGACTGTAAGAT ACAAAATTGGGAATGGTAACATATTTTGAAGTTCTGTTG ACATAAAGAATCATGATATTAATGCCCATGGAAATGAA AGGGCGATCAACACTATGGTTTGAAAAGGGGGAAATTG TAGAGCACAGATGTGTTCGTGTGGCAGTGTGCTGTCTCT AGCAATACTCAGAGAAGAGAGAGAACAATGAAATTCTG ATTGGCCCCAGTGTGAGCCCAGATGAGGTTTCAGCTGCCA ACTTTCTCTTTCACATCTTATGAAAGTCATTTAAGCACAA CTAACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGAGACAGAGTCTT GCTCTGTTGCCCAGGACAGAGTGCAGTAGTGAATCAATC TCGGCTCACTGCAGCCTCCACCTCCTAGGCTCAAACGGT CCTCCTGCATCAGCCTCCCAAGTAGCTGGAATTACAGGA GTGGCCCAACCATGCCAGCTAATTTTTGTATTTTAAATAG ATACGGGGGTTTCACCATATCACCCAGGCTGGTCTCGAA CTCCTGGCCTCAAGTGATCCACCTGCCTCGGCCTCCCAA AGTGCTGGGATTATAGGCGTCAGCCACTATGCCCAACCC GACCAACCTTTTTTAAATAAATATTTAAAAAATTGGTA TTTCACATATATACTAGT	Человек; hg19: chr2: 171621900– 171622580
2	AGTTTGGACAAGAAGTATAGTTCTAGCTTTCTCTGGGTC TCCACCTTGCAGAGAATGCAGCTTTCATTATCTCATGAG CCAAACTCTCATCATCTCTTTCCATATATCTGTCTGGTGCT CTTCCATGAGTACTCTAACACACACAGAAGGAGCACTTA CACAGGCTGTTGTTTTTCTCTTATTATCATAGCTGTTGTT CAGACATGTGCATTCTGTTCTTGTGCTTCAATGCTAAA GGAGTCTCAGGATATGAGAACTGTACCAGCCGAGGCAT CAGGAAACATGGGTGGAAATTCCCACAGTACTATTTGTT CACTGTGTGACCTTGGGCCAGTCACATCCCTTTCTCTGAG GCTTCGATTCCCAAGCTATAAAAGAAGCATCTCTTAAC CTTTTTTTAGGTCATGAGTCAGGCCCAGCACACTCTCAG GGAGACTCATGAGAGTACAGATCATTTCCCATAGAAAA ACCATAGTTTTATATCCAGAGGCTTTTCTGTAAG	Мышь; mm10:chr2:36 053858– 36054359
3	GGTTCAGTTCAGAGGCAGAGCATTTGGGGTTCCAGTC	Мышь;

SEQ ID NO:	Последовательность нуклеиновой кислоты	Источник/ геномное местоположе ние
	AGGAGCTTTCCTCTCTCCGCTCCTTAGTTCCTCTCTTTA AAAAAAAAATGGGTGATAGTATAGAAAGGAAGCTCTGGG CTCGGGGACCAGGGCCCTGGGATCCCCGCTCCCAGCCAC TCGCTCCTGACCCTTCCAGGGACAAGCTCCCCCCCCACCC CGTCCTTTCCAGGCTGCCACTAGAAGAGATGGGGACGC GTGGTCAGCCGCTTCTGTGCGCCCCCAGGGAACGGTCTC ACGCTGGAGGGGGCAGTGCCCTCGGAACAGGACAGTCA GCCCCAAGCCAGCCAAGCGCGCGCGGACGTCCTTCACCG CAGAGCAATTGCAGGTACCCCGGGCAAGCCCCGAAGCG TGTGGGCGGGGCTTCGGAGTGGGCGTGGTTGTTTCGGGAC TTGTGACTCCGCCCCTTGTGCGGGGACCCGCGTGAGGCC GCTCCAAGGATGAAGCTGCCTGGGGCGTGGCCTCGGAC CCTGAGCCTCTGATTGGGCGGAGGTCTCAGGGCCCTTCT GCGCCCCACAGGTTATGCAGGCGCAGTTCGCGCAGGAC AACAAACCCGGACGCGCAGACGCTGCAGAAGCTGGCGGA CATGACGGGCCTCAGTCGCAGGGTCATCCAGGTGGGGC TCCGGGGTCTCGGCCTTCAGGTCTAGGGTGAACCTTAGG GAAGCGCTGAAGCTCGTAGTGGTACGGATGGTCGCGCG TGCACGTGGCCGCCCTCTCCAGTGTGGCCTAAGGACCC CAGTCGGCACGGGTTGACCCTTTTCCTTGATTACTGAGA GTGCAGAGGCTGT	chr2:36091144 –36091966
4	TGGTGGGAAGACATGTCCAGGGAAGAAATGGCCTCCAG AGGCCTGAGGTGGGGAAATGCTGGAGGTGGAGAGAGGA ACAACTGACTGAAAATGAGCTTCCACTGTGGCTTAGTAG CCTATACCAAGTCTAGAGTATAGGGTAGGAGAAGATTA GGAAAGCGATGGGTCTGAGAATGATGTGGCCTGTTGAC TTTTGTAAACCCAAAGCACCTTGGACTAAACCCATGAA CAGTGTGGTGCCACCAAAGACTATAATGAGCTCAGGGA ACAGAATTCTGTGTGCATGGTGATTTTTTTTTTTTTTCT GCTAACTGCAGTCTGGGTGATGCATTGACAAACCAATCC TGGAAAGTAAGAGGCAAGGGCAGCTGGGACGGTGAGA GGAGCCTGATGGGAACCAAGGCCAAGCAGGGCAGCAGAG GCGATGAAGAGGATGTGGTGCATCCAGAGACTCACTTC ATTAGCTGGAGGCACTGCTGGATAGGGTCTGAAGGTTCT GGTATCTGAGTTGGCGGGCTGGGTGAGTGGTGGCTCTGC TTCCTGAACAGTGTGTGCAAGAGGAAACAGGGTTAAGG GCTAGGACAGTCACAGGTGAGTCAGCCTCACAAGAGCA ACCTTCCCCTAGTGCAGA	Мышь; chr2:36095396 –36096028
5	GGAGGTCTCCTTTTGCCCCGGTCCAACAAGAGAATGCA AGGCTGTATCTCAATTTCTTGAGCCTCTCTGTATTATAG AAGAAAAGTAGGGAAGCCATACGCCCTTCTGAGCTTC AGTGTCTCTCTGTCTCTGCAAATGAGGCTGGGGAGGCTG GGGGCGGGCGTGAAAGAGGCCCCGCGCCAAGCCGACCCC CACCTCTGCCCCCTCCCCAGGTCAACAACCTCATCTGGC ACGTGCGGTGCCTCGAGTGCTCCGTGTGTGCGACATCGC TGAGGCAGCAGAATAGCTGCTACATCAAGAACAAGGAG ATCTACTGCAAGATGGACTACTTCAGGTAGGCAGCGGCC ATCCCGCCAGCAAGCGCTGGAGCATGAACGCCTTGACAC	Мышь; mm10:chr2:36 102524– 36103193

SEQ ID NO:	Последовательность нуклеиновой кислоты	Источник/ геномное местоположе ние
	ACGCGTGCCTAGGCCACTTGTGTGGCCTGTGCTCTCCAA TTCCTGAGCCCTGCTGTTTCAGAGTGCACAACGCGGCTCA GCGCACTGGCCCCGGCCCTCCTACTCAGCACGTCTTACAC AGAAGGGAGCGCCAGTCTCAGCCTGAGTTCTGGCGGGG GATCTGCCTCGGGTTCCTCCGATCTGACAGGCGCTGGCC ACGGGTCTGGTTCCATCTCTGGTCTTTTCTGGCCCCGAGC ACCAGTGTGTTCTGTTGAGCTCTGATGTCCGAGGCTCTG GCCCCGATCA	
6	CTCTGGCTACCTCTTATCTTGGGCATTACGACAATTTCT AATTGCAGGTAGTTTGTGTGTGTGCGCGTGTTTTTTTTCC CCCTCAGAGGCTTGGATTGCAAAGGAACTAAGCGATTA CTTCAAGAGCCACGGGTAAAGTGCAGGGAGAGGGGGAG AGAGAGGGGAAAAAAACCCAATCCAAATTCAAATTGCTT CATAGAGAGACACCGCTTTTGTGGGGAAGGGCTTTAAA TGCCCCACTACAAAGTTAGGACTCATTGTTTCAGCGCCGGT TTATATAACAGGCGAGGGGAGGCGCTGGGCTCTGACAG CTCCGAGCCAGTTCAGCAGCCGCGCTCGCCTGCATTCCC TCCCCCTCCCCCAGGTGATGGCCCAGCCAGGGTCCGGCT GCAAAGCGACCACCCGCTGTCTCGAAGGGACCGCTCCG CCTGCCATGGTGAGTCCTTTTCGGTCTGCTTTTCGGCCCCG AGTCCCCCAACAGCACAGGCCAGGGCTTCTGGCTCAGC CTTCCGGCTACCAACCTCTACCCCTGCGCTGGAAAAGT CCGATAGGAGCCGCTCTCGTTGAGCCTTGGTTTTTCTG GCCTGGAATGTGAGCTTTGGCTGCTTCCTGCACCCAGGA TGCGCTGTGTTAAAAGTTGGGGGCGCTCCCTTCTTCTCC AATAGGTCCTTTCATTCTTGTACTCCAGCCTAGGGCGCG ACATCCCTGGCACATTTTCGGTGTTCAGTCGGTGCGCGAGG AAACCAGATTCAACTCTGAGTACTCGGCTAAGCGCTTCG CTGTTCTCTCTCCCATTTTCAGGCTCAGTCAGACGCAGA GGCCTTGGCAGGCGCTCTGGACAAGGACGAAGGTAGAG CCTCCCCATGTACGCCCAGCACACCGTCTGTCTGCTCGC CGCCCTCTGCTGCCTCTTCCGTGCCGTCTGCCGGCAAGA ATATCTGCTCCAGTTGCGGTCTGGAGATCCTGGACCGGT ATCTGCTCAAGGTGAGTCAGGGTAGGTGTGCCTGCTTGC CCACGGGTGTGGTTTGCAGCCCCAAGAGCTGT	Мышь; mm10:chr2:36 103286– 36104328
7	CAAGACTTTTAAAAGTTTAGATAAATAAACAACATTTG ACGGCTTTCCATCACATCTAGACTATAATCCAAAGATCT ATATGGTCCCAAACGACTTACACTTAACCTACCGTCTCCC ATATGGCTTCTTCCCCCATCAGTCATTGTCCTCAGCCATA GTGGCCTCCCTGTTCCCTTGGGTACAAGGGAACAACCTCC CTGAGAGGTTCCATTAGCTGCTGTTGCCTGAGATGCTCT TGAGCCCACACCATCTGCTCATTCTCTCCTCACGTGTCA GTGATTAAGAGGCTGTCCTTGGCCTCCCGTCAAAATTAC ATCCCTGCCGCTTTCCACTTCTTGCCTTCTTATTTTCTAA ATAGAACTAACTCACCCTACCCAACATTCTATATAATT GGATATCTGTCTCTGTTTAAATATAATGTTGACTTCAA GAAAGAACGTTGTCACTGCCCTGTCACCAGACTTTTAAA CAGTGCCTATCGTGTGGCACATGCTCAGTGAAATTG	Мышь; mm10:chr2:36 114311– 36114817

SEQ ID NO:	Последовательность нуклеиновой кислоты	Источник/ геномное местоположе ние
8	TCAACAGGGGGACACTTGGGAAAGAAGGATGGGGACAG AGCCGAGAGGACTGTTACACATTAGAGAAACATCAGTG ACTGTGCCAGCTTTGGGGTAGACTGCACAAAAGCCCTGA GGCAGCACAGGCAGGATCCAGTCTGCTGGTCCCAGGAA GCTAACCGTCTCAGACAGAGCACAAAGCACCGAGACAT GTGCCACAAGGCTTGTGTAGAGAGGTCAGAGGACAGCG TACAGGTCCCAGAGATCAAACCTCAACCTCACCAGGCTTG GCAGCAAGCCTTTACCAACCCACCCCCACCCCACCCACC CTGCACGCGCCCCCTCTCCCCTCCCCATGGTCTCCCATGG CTATCTCACTTGGCCCTAAAATGTTTAAGGATGACACTG GCTGCTGAGTGGAAATGAGACAGCAGAAGTCAACAGTA GATTTTAGGAAAGCCAGAGAAAAAGGCTTGTGCTGTTTT TAGAAAGCCAAGGGACAAGCTAAGATAGGGCCCAAGTA AT	Мышь; mm10:chr15:7 8179109– 78179610
9	AAATAGAACTGTGAGATAGGGGGAGAGGGGGCAGGAA GGACAAGAGACCCCTGTCTCATTGTGATCCCCACCTGTC TGCTCTGTGGGAGGGTACCCATGAGGGCCAGCCCACAG CCCTTAGGTGGACATTGTCTGGTCTGTCTCACTGTCCCT CCCAGCAGCCCCAGAGGCCAGGAGACAGGGGTCTCAGT CCTCACTGAGAGATGTGTAAACTGAGGCCCAGTGAATGT TGAGGGCCAGGGCATGCCCTTGGTGGGATGTGACCTGG GTCTCCTTCGCACGGGCTTCCTCCCCGAAGCCGAGCTGA GCATTTGGAGTTTGAAATGTTTCCGTAAGCAATCTG CTCCTCTATTCCCGGGCGGACTTCCGATAGCTCCGGCCT TATGCTGCACTAGATAAGATGGAGCAGGGAGAGGACAC GGCACTACTTATGTAACCGGCCTCTTGAAAAATGGAGCA GCGGTCAGGGCGGAACAAGACGTCCTCTCTCTACGCATC CCTCTCCTTTCCCTGCTAAGGCTGCAGCTGGAGTCAGAG GCAGGGCTGTTCCAATCTGTCTTTGATCAGTAACGCAGC CAGCCTCCAGCCTCCGTCAGCCTCCTCATGGCTGAGACC CGGCCTCAGTTTCCCCCACTTACATCCCGAGGATCAGAG CCTGTGAGGATGAAATGGGATAAGGTAGCTGGAACCGT CTGGCAGAGAGCGAGTCCTCAGGACTGTTGATGCCTGTG GCTGCCTGGCTTGACCCCAAGTGACCCCGCCTCCTCATC CTGCAGCAGGAGAA	Мышь; mm10:chr15:7 8195347– 78196134
10	TCTATAGAATGTGTCCCCAGCCTTGTTTTCCCACTTGAT ACGCAAGGAATGCATACCACAGAGAGGGATGAGGGTAG CATCCAGCCTGCTTCCTGTGTGTCGGGGCGCTACAGCCA CATCTCCCCAGTCCATCTCAGACCGTCACAGAGCTTCGC CGAATGTATAGCTTTGTTCTCTGTGCAGACAGGGAGACA GAGCCTTGGGAAGCATAGGTGCTTGCTTCTTTGCCCACT GAGTCTTAGCTGGACTTGACACCCACATGCCTCACAGCC GGGCGCACTTGCAATTTGTACCCAGGCCCAGTGATGATG GCTCTGCTTGCTTTGTGCTTTGTGCCAACTACAGCTCCAG CACCTGTGCCCTGGGTTTTCACTCCTTTAGTTGAACACGT AGTTACTGGGGTTGTAGGGATGGAGCCTTTCTGCTTCCT TCTGGCAAAGTCCTTAGCGGCCTGCTGCGGGGGTGGGG GGTGTTTCAGGGGAGTGGTGATGAAGTATGACAG	Мышь; mm10:chr15:7 8196305– 78196806

SEQ ID NO:	Последовательность нуклеиновой кислоты	Источник/ геномное местоположе ние
11	TCTCCAGTTGGAGAAACAGATGCTGTAAC TGGGGCCAC AGTATAAAGAGAGAGCCAGACATTGAACTGTCAACACAG AAGCCTGGCACACTGGAAGTGGCAGTCCAGCTGGGAAC AAGGGGTAGAGGCTGAGGCCACTAAGTCAACTGAGGCA GGAGACATAGGAGCTAAAGCAGCTGAAGGGTGCAGGAC AGCTGGGGGGTCTGAAGTGGGCCTCATGCCAGAGCTA TGAAGTCAGGGGCTGTAGCCTAGGAGCCTTGGAAAGCCA GCTGGCAAGCTGTGGCCCAAAGACGCTGACTCACCAGG AGGGGGCAGCTGGAGCCAGGCACTCCTAAGGTTTCCAG GAAGGGCAGCCTTCCAGGGGCTCAGCTAGGGGAGACAGT GTTGACAGCAAGTTGTCAGGCAACTTGAGCTACTGGGCA GCTGGGAAGCTGTCCCTTGGTCCCCAGTATCATCATCAC CCCAGACGCTGCCACCTGCCTCAGGTCCCACACAGTGA TCCTCCCATCTTTAACACAACACATGACCAGAGAGA	Мышь; mm10:chr15:7 8205234– 78205766
12	GTCACCCCTCCCCCAAACAACCCCTTCTTCTCTGGTTCTGA GAAATTACAGGCATGAAAGATATAAATCGGGATGCTTG ACTTGGGAATATAAATCACTAAAGCTTGGGGGCAGGGG TGGGCGACCTTTGTGACCGTCCTTGTGCGTGCCAGTAAA TCCTGTGGTCCAGGGGAGAAAGAAAAGGCTGTGTGGCTT CTGCTCACAAAGCTGCAGAAACCATTTCTTTAAGCCCAAA AGCACTTCCAGAGAGAGCAGAGCATCCCCAGGCTGCTG GCTCAGCAAGTTCACTGTGCTCAATCTCAGGAAGTGAGG ATAAGAGCAGTGCCTGGAGAGTGCCTGGTGCTGAGCTG AGGGTTTCTGAACACATTAAAGCGGGGAGCATGGACCG GGCCTCAGGAGGGGTGTTGAACATCCCTAGGCAGAGGA GTCTAGCTTCCCTGGGAAAAGATATCAGGTAAAGCACACA CATGTCCTCTGGAATAAGATAATCTTTCTGATCACACAC TATACACACACAAAAGCCTGCTC	Мышь; mm10:chr15:7 8224841– 78225364
13	GCCCTCTAGGCCACCTGACCAGGTCCCCTCAGTCCCCC CTTCCCACACTCCCACACTCAGCCCCCTCCCCCCCCCCC GACCCCTGCAGGATTATCCTGTCTGTGTTCTGACTCAG CCTGGGAGCCACCTGGGCAGCAGGGGCCAAGGGTGTCC TAGAAGGGACCTGGAGTCCACGCTGGGCCAAGCCTGCC CTTTCTCCCTCTGTCTTCCGTCCCTGCTTGCGGTTCTGCT GAATGTGGTTATTTCTCTGGCTCCTTTTACAGAGAATGCT GCTGCTAATTTTATGTGGAGCTCTGAGGCAGTGTAATTG GAAGCCAGACACCCTGTCAGCAGTGGGCTCCCGTCCTGA GCTGCCATGCTTCCCTGCTCTCCTCCCGTCCCGGCTCCTCA TTTCATGCAGCCACCTGTCCCAGGGAGAGAGGAGTCACC CAGGCCCCCTCAGTCCGCCCCCTTAAATAAGAAAGCCTCCG TTGCTCGGCACACATAACCAAGCAGCCGCTGGTGCAATCT	Мышь; mm10:chr15:7 8241348– 78241856
14	GTGTTCTTCCCTTCCCTTTTGGACCCCGAGACAAGCCA ATAAAATACTCGGCAGGGTGGCTTCTCTCCTTTTTTTGCC AGTAATAAACAGACTCAGAGCAAGTTAAGGGTCTGGTC CAAGGTCATGGCTGGGATCAGTGACAGAGCCCAGAAGA GAACCTGAGACTTCTTGCTGAGCCAAGCTGGAGAGGAC AGAAAGGAATGCGTCTACTCCATGCATGACCCTCTGCCA GCTTTGCTCCTTCCTAAGGGACCATGAACGATATGTGCA	Мышь; mm10:chr9:10 7340928– 107341325

SEQ ID NO:	Последовательность нуклеиновой кислоты	Источник/ геномное местоположе ние
	CACCGCTCATACGTATGTGCACACCTGCAAGAGGAGGC ATCCCATGTACACCTATGAGACGCACAGAGAAACATAT ATGTAGCCATAGGCTAGAAATTCTTTCTCTTTCTAGGTCT GCCCCCTCTGCA	
15	GGACCACTCAGTGTACACGGAATGTAGAATTGAGTCTGC CATTGGTCTTCCCTCAAAGTCTTGGAGGCTTGGGACTGA TATTGGGAGCATCTGGGCAGAGAAGGCCACAAAGACAG GGTGGTTTTTCTACACTGGGACATACTCGTGAGCATGCA CAGAGGCGTGTCCCCAACTTCCCTGTCACCCCTGTCTC TGCCGGCTAGAGGGGATGCGGGGGTGGACATATGCTGC TATTGGGCAGATATCACATGTTAAGAGGTGGGGGGGGG CTCAAGAGGCGGAGGGCTAGGAGCATCCCATGGGGAGA GGTTCTGGTTTTCTTGCTGCCTCTAGCTGCTATAAATACG TTAGCACTTGAGCAACTGGAAAGCTCTGAGTAATTTAGG ATGCACAAAGCTGTAATTTAACTCCAGCATCTCAGTGTG CGAGAGCATTAAGATGTAATTAAGATGTTTACACAAA GAGATTGGAGTCTGTGACACTTGGGGTGCAAAACCCCA GGAAGGGACACAATGGGTGAGGTGAGGATCTGTGGGAG GCCTGGGGACAGTCACTTGGATCCCAGCTATGAGATGGC AGGCCACCCAGCTGTTTCTCCTTGGAATGTTTTGGCCT GGGGGTGGGGGTGGGGCATCACACTTTGATATGGAGA TGGGGCAACAAAGCCTGCAATATCTGGGGGTGGAGAGG TCAAGTGGATGGAGTCTTTTGAGATCATGTCAGGAAGAG GGCTCGATCCCCCAAATCATGGTGACATATGGTGTCTC GGGGTTCACAGGAGCTATGTCTAAAATACAAAAGTAAA	Мышь; mm10:chr9:10 7349227– 107350036
16	TCTGCAGAAGCCTGCCATTCCACCATTAAACCTGTGAC TCCAGGCCTTAAGCCTGTTGAAGGTCGAGTCCCAGAAGG GTCATATGTGCAACTGCCTAGGGAGAGTTCCCACTCGCA GGGCCAAGAGGAGTCCCCCGGTCTGAGGTGTGGGGGCG GGGACGTGCACTGGGCGCTGGGACCACGGCTGGGGCTC AGGACTCGC	Мышь; mm10:chr9:10 7399438– 107399639
17	TGCTCAGTTTCTTCGCCTAGAAAGCCGGGTCTAAGGGT ACATGCCCTGATTCTTTTCTGGGGTGTCTCGAATTTTAAA CAACACATACTGTTCTGGGCTGATGACAAGAGGAAGTA CTGGTCGGTGGCTGATGGACATCCACCATGGTGGCAACT GGAGGGAGGGGGAACGGACGTTGAAACCCTGCCCTCCT GGAATCTGTGCGCATGCACGCACGTTGACAATGCTTGGCA CTGGGGACAGGCTGGGATGGATGGAGCGGAGCGTGAGG AGGAGTGGGCATGCAGGCCCGAGTGTCTGTTTTGCTGAT TGCTCCTTTTGCTTTCAAGGAGATTAACTATTTTATGTC CATGCCTACTGCTGGTGAGACGCTGGAGGAAGCCTTTCC ATCGTTGAGATTTTCTGGAAGCTGCCAAGTGTGGTCTTC AGCTCAATTCTGGGAGCCTCCCAGAGTGGGAGGGAGGA ACATTTCCATCTGGGGGCTTCGGGGACAGGCTAAGATCT TCCCTGGGGTCCTTGCTGCGCTGGCCTCCTCAAACCACG CTGCCTCGGCCTGCATAAAGCAGTAATCTGATGTGCCCG ATGTTTGTAACGCTGTGTTTAAAAAAGTAATTTATTTTC TAATTATTCCTTGTCTTGCTAACCATGCATTGCCAAAGT	Мышь; mm10:chr9:10 7443292– 107444228

SEQ ID NO:	Последовательность нуклеиновой кислоты	Источник/ геномное местоположе ние
	GTCGCTATTTAAAATATTTATCTCTCCACGCCGCAGGAG CAGCTCTGGAGCGTGGAGGGGGAAGAAATAAAAGTCCG CGTGCCAGTCGCAGGCATATTACTTTGACTCGTCCTGGT GGCTTTGACGTCTCCCTGTAAATACATTTATTTTTCATTA GGACGTTTCTGAGCTTGTGGCCCCCGGAGAGCGGAGTG ATTACGCTGTTTATCTGCAAGCGATGCAATAGAGGGGTA CTCGCAGAATGACTTCCGCCAGAGCATCCTGCGCCTGT CT	
18	TAAAATACCTTATTTTTTTTCCAGTCTCTAAACTGCTAATC TCCCAGGCTAAGGGATTCTGGGACAAAGGCAAGGCCTG GAAGTGGAATCTGTAAAATTAGCTTCAGCGGTATTAGT GTTTGCAGTTGAAGATTGAAAAACTGCTTTCCAGGGCC TGATTGGAGGCTCCACTCTCCTCCAGGAAGAGGCAAGG ACTCTGGGCTGGCACTGAGGACAAATCCTGGGAGGCTG CTATGGGGCCTGGGAGCCAGGCTGCCTTGTGCTAGAGGC CTAGAGAGTGTCTGTGTCCCAAGTCCCAAGCTACCCCA GCAGCTAACAGCTTTTCCAGTTCTCAGGCACAGCAGGTG CCAAGATCACGCTCTGGAGTCCAGCTGGGCCCCCTTCCTC TTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAGACCTCCTGGACACTGT TCCTCTCCCCCCCCCGTGACCCCCCCCCCTCAGTTCTCAA ACACGTGAGGGTTGGGGGAGGGTTCCACAGCCAGAGAG AGGGGCCAGCTCTGGTGCCTGTGGGTACGCCCCGCCGTA TGGCCCATCAGGCCTCTTGTGTGCTTGATTGCCTCTGATT GGCTGCAGCTGAATTCAGCAAAAGCTATTATTTGCCCTT GATGAGCCAATCAGATGGCCTCATTGGCCATTGAGAGCA GGCACCGGAACCTGAGGGTGGGGTGGGGGGTGGGGGAT GGAGATGGGACTCAGTGAGGGGGTGGGAAGCTCTAAAA CAGATGCAGGACCTGAGCCTGTCTGTGTCCACCACGACC TTCACACAGGTCACACCCCTTCCCCTGACTTGTACCCC CAAACCAGGGCTTGTTGCCCCAACCCACCTCACAATTCC CTCACTCTGTAACACCTTTCCATATACCTCTGCATGTCTA AACCCAAGACTTGCTCTATGAAATC	Мышь; mm10:chr9:10 7444825– 107445746
19	AGACCCTGCTTAGCACAGCTCTTAGCGGGTCCTTTAGGG GGTCTCCCAGCGGGCCCAGTGGGAATGAGATAAGGAAG GACACAGCTGTCCATTCTCCCGTGCCTGCTAAGGAGGAA ATGGGGCCGCCTTACATAATTGGGGCAATTTGTTCCACT CTTGTCTCCTGGTATCATGGCTATCACCCCTCCTTGCT CAGGGAGTCCTTGATTGAGCGAGAAGCTCAGGCCTCCCT CTCTCCCTCCTGCTGGGGGTTGCTGAACAGAGGGTGTAG GAGCCATAGGCTCTGTCACTGCTGAGATCTGCCAGATGT CTAGGCCAGGAGAAAATGGAAAGGGCTAAGTCACAGCA TATGTGGCCACTCAGGCCTATAGCCCCAAATCTGCCTGG TAACCCATTATGTCCCCAGAGAATTTGCATGGGCGGACA CCCTCATGCCGGGTCTCAGTAAGGGAAGGGGTGGGAGG CAAAAATATCCCTCCCCACCCTGAATCTCCACCCCTCC CCCCAGAACTGACACTTGGCCTTGTCTAAGGATGGGTT TTCCCAAAATCCTTCTGAAAAAACAGAATTTCAAGAGT CACTCCCTCCGGGTCTCAGCCTAGAACATATGCAGTATC	Мышь; mm10:chr9:10 7452080– 107452718

SEQ ID NO:	Последовательность нуклеиновой кислоты	Источник/ геномное местоположение
	CCCTGACGTCCATAGGG	
20	AAACTGGCACAGTAATGGCGGGCTGACAGACAAGGGAG TCTGTAGCACCCGCTGCCTCCGCCCACCCCTTCTCCGAG CAATTAAAAGGTGTTTATGTGGGGCTGGCAGTGGCTTCT GCCTCCCTTCCATTACGAACATTAAGAGATCTTGACCCT TCCACTTTCCCCGCTCTTGAAAGGAGCTGCAGACACGTG GAGCCAATTAGGCGCACGCGTGGGCGCCAAGGGCCTGA GCAGCTTTTTCTCCCTGATTGCGGCGTTTACAGCTGATTA TTCTCCCCCTCACCCAAACAGTGCTGCTTCCCTGGCAAGGT GCCACCCAGAGGAGCCGGCTGGGGGCCCCCTGGGGACAG GGGAGGACTGGATTAGTAAATGGGCATCTATCGAATGG CTTTCATATGTGTGGCTGGAAGGGAGAAGGGTAGGGCC AGGAATGGTGGCAGCAAGGGCCCAGGTAGCAATGAGGG TTCTTCTAACCCACCATTAGGGATAGCGATCAGAAAAG GGCCCTCGAGGAGGTGACCTAAATGTGTGTAGAAGCTG ACGGCCACTACACACACACACACACACACACACACA TACACAAGCATCCTTGTCTTGGAGTCGGTCAGCATGAG CAAGAGAAAGATGTTCCCAGTGGCCATGAGAGTGGAGC CCTCCTCCCTACTTACATCCAGGTTGGATGGCCAGGAGA TCCTGAGATCCTTCAAGACTCC	Мышь; mm10:chr9:10 7470414– 107471129
21	AAGCCACATCCTGGGTGGAAATATATGGCTTCAATTCCC ACTCTTCCGGATGACCTCTGTGGGGAGCCCTGGCTTCAC CTTGGTCCAGCTTCATCCCTTAGCCTCGCTGCCAGGAAG GCAGTGAGGTCAGAGGCTGGTGCTGGCGTG	Мышь; mm10:chr9:10 7484887– 107485033
22	CCTACCTGGTGCCCGCCAACATCTGGGGGCCATCCTGGC CAGCGCCAGCGTGGTGGTGAAGGCACTGTGCGCCGTGG TACTGTTTCTCTACCTGCTTTCCTTCGCTGTGGACACGGG CTGCCTGGCCGTCACCCAGGCTACCTTTTCCCACCCAA CTTCTGGATCTGGACCCTGGCCACCCACGGGCTCATGGA ACAGCACGTGTGGGACGTGGCCATTAGCCTGGCCACAG TGGTTGTGGCCGGGCGATTACTGGAGCCCCCTCTGGGGAG CCTTGGAGCTGCTCATCTTCTTCTC	Мышь; mm10:chr9:10 7534490– 107534786
23	AAACGGACGGGCCTCCGCTGAACCAAGTGAGGCCCCAGA CGTGCGCATAAATAACCCCTGCGTGCTGCACCACCTGGG GAGAGGGGGAGGACCACGGTAAAT	Человек; hg19: chr2:17167206 3–171672163
24	GGAGCGAGCGCATAGCAAAAGGGACGCGGGGTCCTTTT CTCTGCCGGTGGCACTGGGTAGCTGTGGCCAGGTGTGGT ACTTTGATGGGGCCCAGGGCTGGA	Человек; hg19: chr2:17167269 7–171672797
25	GCTCAAGGAAGCGTCGCAGGGTCACAGATCTGGGGGAA CCCCGGGGAAAAGCACTGAGGCAAAACCGCCGCTCGTC TCCTACAATATATGGGAGGGGGAGG	Человек; hg19: chr2:17167291 8–171673018
26	TTGAGTACGTTCTGGATTACTCATAAGACCTTTTTTTTTT CCTTCCGGGCGCAAAACCGTGAGCTGGATTATAATCGC CCTATAAAGCTCCAGAGGCGGTCAGGCACCTGCAGAGG AGCCCCGCGCTCCGCGGACTAGCTGCCCCCGCGAGCAA	Человек; hg19: chr2:17167315 0–171673696

SEQ ID NO:	Последовательность нуклеиновой кислоты	Источник/ геномное местоположе ние
	CGGCCTCGTGATTTCCCCGCCGATCCGGTCCCCGCCTCC CCTCTGCCCCCGCCTACCCCGGAGCCGTGCAGCCGCC TCTCCGAATCTCTCTCTTCTCCTGGCGCTCGCGTGCGAGA GGGAAGTAGCGAGAACGAGGAAGCAGCTGGAGGTGAC GCCGGGCAGATTACGCCTGTCAGGGCCGAGCCGAGCGG ATCGCTGGGCGCTGTGCAGAGGAAAGGCGGGAGTGCCC GGCTCGCTGTGCGCAGAGCCGAGGTGGGTAAGCTAGCGA CCACCTGGACTTCCCAGCGCCCAACCGTGGCTTTTCAGC CAGGTCCTCTCCTCCC GCGGCTTCTCAACCAACCCCATC CCAGCGCCGGCCACCCAACCTCCCGAAATGAGTGCTTCC TGCCC	
27	CAGCAGCCGAAGGCGCTACTAGGAACGGTAACCTGTTA CTTTTCCAGGGGCCGTAGTCGACCCGCTGCCCCGAGTTGC TGTGCGACTGCGCGCGCGGGGCTA	Человек; hg19: chr2:17167390 0–171674000
28	GAGTGCAAGGTGACTGTGGTTCTTCTCTGGCCAAGTCCG AGGGAGAACGTAAAGATATGGGCCTTTTTCCCCCTCTCA CCTTGTCTCACCAAAGTCCCTAGTCCCCGGAGCAGTTAG CCTCTTTCTTTCCAGGGAATTAGCCAGACACAACAACGG GAACCAGACACCGAACCAGACATGCCCGCCCCGTGCGC CCTCCCC	Человек; hg19: chr2:17167440 0–171674600
29	GCTCGCTGCCTTTCCTCCCTCTTGTCTCTCCAGAGCCGGA TCTTCAAGGGGAGCCTCCGTGCCCCCGGCTGCTCAGTCC CTCCGGTGTGCAGGACCCCGGAAGTCCTCCCCGCACAGC TCTCGCTTCTCTTTGCAGCCTGTTTCTGCGCCGGACCACT CGAGGACTCTGGACAGTAGAGGCCCGGGACGACCGAG CTG	Человек; hg19: chr2:17167490 3–171675101
30	AAACGGACGGGCCTCCGCTGAACCAGTGAGGCCCCAGA CGTGCGCATAAATAACCCCTGCGTGCTGCACCACCTGGG GAGAGGGGGAGGACCACGGTAAATGGAGCGAGCGCAT AGCAAAAGGGACGCGGGGTCTTTTCTCTGCCGGTGGCA CTGGGTAGCTGTGGCCAGGTGTGGTACTTTGATGGGGCC CAGGGCTGGAGCTCAAGGAAGCGTCGCAGGGTCAAGAG TCTGGGGGAACCCCGGGGAAAAGCACTGAGGCAAAACC GCCGCTCGTCTCCTACAATATATGGGAGGGGGAGGTTGA GTACGTTCTGGATTACTCATAAGACCTTTTTTTTTTTCCTT CCGGGCGCAAAACCGTGAGCTGGATTTATAATCGCCCTA TAAAGCTCCAGAGGCGGTGAGGCACCTGCAGAGGAGCC CCGCCGCTCCGCCGACTAGCTGCCCCCGCGAGCAACGGC CTCGTGATTTCCCCGCCGATCCGGTCCCCGCCTCCCCACT CTGCCCCCGCCTACCCCGGAGCCGTGCAGCCGCCTCTCC GAATCTCTCTCTTCTCCTGGCGCTCGCGTGCGAGAGGGA ACTAGCGAGAACGAGGAAGCAGCTGGAGGTGACGCCGG GCAGATTACGCCTGTCAGGGCCGAGCCGAGCGGATCGC TGGGCGCTGTGCAGAGGAAAGGCGGGAGTGCCCGGCTC GCTGTGCGCAGAGCCGAGGTGGGTAAGCTAGCGACCACC TGGACTTCCCAGCGCCCAACCGTGGCTTTTCAGCCAGGT CCTCTCCTCCCGCGGCTTCTCAACCAACCCCATCCAGC	Человек

SEQ ID NO:	Последовательность нуклеиновой кислоты	Источник/ геномное местоположе ние
	GCCGGCCACCCAACCTCCCGAAATGAGTGCTTCCTGCCC CAGCAGCCGAAGGCGCTACTAGGAACGGTAACCTGTTA CTTTTCCAGGGGCCGTAGTCGACCCGCTGCCCCGAGTTGC TGTGCGACTGCGCGCGCGGGGCTAGAGTGCAAGGTGAC TGTGGTTCTTCTCTGGCCAAGTCCGAGGGAGAACGTAAA GATATGGGCCTTTTTCCCCCTCTCACCTTGTCTCACCAAA GTCCCTAGTCCCCGGAGCAGTTAGCCTCTTTCTTTCCAG GGAATTAGCCAGACACAACAACGGGAACCAGACACCGA ACCAGACATGCCCCGCCCCGTGCGCCCTCCCCGCTCGCTG CCTTTCCTCCCTCTTGTCTCTCCAGAGCCGGATCTTCAAG GGGAGCCTCCGTGCCCCCGGCTGCTCAGTCCCTCCGGTG TGCAGGACCCCGGAAGTCCTCCCCGCACAGCTCTCGCTT CTCTTTGCAGCCTGTTTCTGCGCCGGACCAGTCGAGGAC TCTGGACAGTAGAGGGCCCCGGGACGACCGAGCTG	
31	GGAGGAAGCCATCAACTAACTACAATGACTGTAAGAT ACAAAATTGGGAATGGTAACATATTTTGAAGTTCTGTTG ACATAAAGAATCATGATATTAATGCCCATGGAAATGAA AGGGCGATCAACACTATGGTTTGAAAAGGGGGAAATTG TAGAGCACAGATGTGTTTCGTGTGGCAGTGTGCTGTCTCT AGCAATACTCAGAGAAGAGAGAGAACAATGAAATTCTG ATTGGCCCCAGTGTGAGCCCAGATGAGGTTCACTGCCA ACTTCTCTTTCACATCTTATGAAAGTCATTTAAGCACAA CTAACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGAGACAGAGTCTT GCTCTGTTGCCCAGGACAGAGTGCAGTAGTGACTCAATC TCGGCTCACTGCAGCCTCCACCTCCTAGGCTCAAACGGT CCTCCTGCATCAGCCTCCCAAGTAGCTGGAATTACAGGA GTGGCCCCACCATGCCCAGCTAATTTTTTGTATTTTAAATAG ATACGGGGGTTTCACCATATCACCCAGGCTGGTCTCGAA CTCCTGGCCTCAAGTGATCCACCTGCCTCGGCCTCCCAA AGTGCTGGGATTATAGGCGTCAGCCACTATGCCCAACCC GACCAACCTTTTTTAAAATAAATATTTAAAAAATTGGTA TTTCACATATATACTAGTATTTACATTTATCCACACAAA ACGGACGGGCCTCCGCTGAACCAGTGAGGCCCCAGACG TGCGCATAAATAACCCCTGCGTGCTGCACCACCTGGGGA GAGGGGGAGGACCACGGTAAATGGAGCGAGCGCATAGC AAAAGGGACGCGGGGTCTTTTCTCTGCCGGTGGCACTG GGTAGCTGTGGCCAGGTGTGGTACTTTGATGGGGCCCAG GGCTGGAGCTCAAGGAAGCGTCGCAGGGTCACAGATCT GGGGGAACCCCGGGGAAAAGCACTGAGGCAAAACCGCC GCTCGTCTCCTACAATATATGGGAGGGGGAGGTTGAGTA CGTTCTGGATTACTCATAAGACCTTTTTTTTTTTCCTTCCG GGCGCAAAACCGTGAGCTGGATTATAATCGCCCTATAA AGCTCCAGAGGCGGTCAGGCACCTGCAGAGGAGCCCCG CCGCTCCGCCGACTAGCTGCCCCCGCGAGCAACGGCCTC GTGATTTCCCCGCCGATCCGGTCCCCGCCTCCCCACTCT GCCCCCGCCTACCCCGGAGCCGTGCAGCCGCCTCTCCGA ATCTCTCTCTTCTCCTGGCGCTCGCGTGCGAGAGGGAAC TAGCGAGAACGAGGAAGCAGCTGGAGGTGACGCCGGGC	Человек

SEQ ID NO:	Последовательность нуклеиновой кислоты	Источник/ геномное местоположе ние
	AGATTACGCCTGTCAGGGCCGAGCCGAGCGGATCGCTG GGCGCTGTGCAGAGGAAAGGCGGGAGTGCCCGGCTCGC TGTCGCAGAGCCGAGGTGGGTAAGCTAGCGACCACCTG GACTTCCCAGCGCCCAACCGTGGCTTTTCAGCCAGGTCC TCTCCTCCCGCGGCTTCTCAACCAACCCCATCCCAGCGC CGGCCACCCAACCTCCCGAAATGAGTGCTTCCTGCCCA GCAGCCGAAGGCGCTACTAGGAACGGTAACCTGTTACTT TTCCAGGGGCGGTAGTCGACCCGCTGCCCGAGTTGCTGT GCGACTGCGCGCGCGGGGCTAGAGTGCAAGGTGACTGT GGTTCTTCTCTGGCCAAGTCCGAGGGGAGAACGTAAAGAT ATGGGCCTTTTTCCCCCTCTCACCTTGTCTCACCAAAGTC CCTAGTCCCCGGAGCAGTTAGCCTCTTTCTTTCCAGGGA ATTAGCCAGACACAACAACGGGAACCAGACACCGAACCC AGACATGCCCGCCCCGCTGCGCCCTCCCCGCTCGCTGCCT TTCCTCCCTCTTGTCTCTCCAGAGCCGGATCTTCAAGGG GAGCCTCCGTGCCCCCGGCTGCTCAGTCCCTCCGGTGTG CAGGACCCCGGAAGTCCTCCCCGCACAGCTCTCGCTTCT CTTTGCAGCCTGTTTCTGCGCCGGACCAGTCGAGGACTC TGGACAGTAGAGGCCCGGGACGACCGAGCTG	
32	TCAACAGGGGGACACTTGGGAAAGAAGGATGGGGACAG AGCCGAGAGGACTGTTACACATTAGAGAAACATCAGTG ACTGTGCCAGCTTTGGGGTAGACTGCACAAAAGCCCTGA GGCAGCACAGGCAGGATCCAGTCTGCTGGTCCCAGGAA GCTAACCGTCTCAGACAGAGCACAAAGCACCGAGACAT GTGCCACAAGGCTTGTGTAGAGAGGTCAGAGGACAGCG TACAGGTCCCAGAGATCAAACCTCAACCTCACCAGGCTTG GCAGCAAGCCTTTACCAACCCACCCCCACCCCACCCACC CTGCACGCGCCCCCTCTCCCCTCCCCATGGTCTCCCATGG CTATCTCACTTGGCCCTAAAATGTTTAAGGATGACACTG GCTGCTGAGTGGAATGAGACAGCAGAAGTCAACAGTA GATTTTAGGAAAGCCAGAGAAAAAGGCTTGTGCTGTTTT TAGAAAGCCAAGGGACAAGCTAAGATAGGGCCCAAGTA ATGCTAGTATTTACATTTATCCACACAAAACGGACGGGC CTCCGCTGAACCAGTGAGGCCCCAGACGTGCGCATAAA TAACCCCTGCGTGCTGCACCACCTGGGGAGAGGGGGAG GACCACGGTAAATGGAGCGAGCGCATAGCAAAAGGGAC GCGGGGTCTTTTCTCTGCCGGTGGCACTGGGTAGCTGT GGCCAGGTGTGGTACTTTGATGGGGCCAGGGCTGGAG CTCAAGGAAGCGTCGCAGGGTCACAGATCTGGGGGAAC CCCGGGGAAAAGCACTGAGGCAAAACCGCCGCTCGTCT CCTACAATATATGGGAGGGGGAGGTTGAGTACGTTCTG GATTACTCATAAGACCTTTTTTTTTTCTTCCGGGCGCAA AACCGTGAGCTGGATTTATAATCGCCCTATAAAGCTCCA GAGGCGGTGAGGCACCTGCAGAGGAGCCCCGCCGCTCC GCCGACTAGCTGCCCCCGCGAGCAACGGCCTCGTGATTT CCCCGCCGATCCGGTCCCCGCCTCCCCACTCTGCCCCCG CCTACCCCGGAGCCGTGCAGCCGCCTCTCCGAATCTCTC TCTTCTCCTGGCGCTCGCGTGCGAGAGGGAACTAGCGAG	Человек и мышь

SEQ ID NO:	Последовательность нуклеиновой кислоты	Источник/ геномное местоположе ние
	AACGAGGAAGCAGCTGGAGGTGACGCCGGGCAGATTAC GCCTGTCAGGGCCGAGCCGAGCGGATCGCTGGGCGCTG TGCAGAGGAAAGGCGGGAGTGCCCGGCTCGCTGTGCA GAGCCGAGGTGGGTAAAGCTAGCGACCACCTGGACTTCC CAGCGCCCAACCGTGGCTTTTCAGCCAGGTCCTCTCCTC CCGCGGCTTCTCAACCAACCCCATCCCAGCGCCGGCCAC CCAACCTCCCGAAATGAGTGCTTCCTGCCCCAGCAGCCG AAGGCGCTACTAGGAACGGTAACCTGTACTTTCCAGG GGCCGTAGTCGACCCGCTGCCCGAGTTGCTGTGCGACTG CGCGCGCGGGGCTAGAGTGCAAGGTGACTGTGGTTCTTC TCTGGCCAAGTCCGAGGGAGAACGTAAAGATATGGGCC TTTTTCCCCCTCTCACCTTGTCTCACCAAAGTCCCTAGTC CCCGGAGCAGTTAGCCTCTTTCTTTCCAGGGAATTAGCC AGACACAACAACGGGAACCAGACACCGAACCAGACATG CCCGCCCCGTGCGCCCTCCCCGCTCGCTGCCTTTCCTCCC TCTTGTCTCTCCAGAGCCGGATCTTCAAGGGGAGCCTCC GTGCCCCCGGCTGCTCAGTCCCTCCGGTGTGCAGGACCC CGGAAGTCCTCCCCGCACAGCTCTCGCTTCTCTTTGCAG CCTGTTTCTGCGCCGGACCAGTCGAGGACTCTGGACAGT AGAGGCCCCCGGGACGACCGAGCTG	
33	ATTTACATTTATCCACACA	Человек
34	TGCCGCTGGACTCTCTTCCAAGGAACTAGGAGAACCAA GATCCGTTTTTCTGCCAAGGGCTGCCCCCCCCACGCCCC CAACCCCCTCACCCCGATCCCCACAGAAAGAAATCTTGA GGTAGCTGGAGCTTCTTCTGTGGGTGTGACAGGACTGCC ATTCTCCTCTGTAGTCTGCAGAAGCCTGCCATTCCACCA TTTAAACCTGTGACTCCAGGCCTTAAGCCTGTTGAAGGT CGAGTCCCAGAAGGGTCATATGTGCAACTGCCTAGGGA GAGTTCCCACTCGCAGGGCCAAGAGGAGTCCCCCGGTCT GAGGTGTGGGGGCGGGGACGTGCACTGGGCGCTGGGAC CACGGCTGGGGCTCAGGACTCGCGAGCTTGGATTCGGAT CGGTTTGC GCGAGCCAGTAGGGCAGGCTCCGGGGTGAA CGGGGACGAGGGGCGCGCGGGCACAGGCGGGCGCGTG ACCGCGGCGGGGGCGCGCGGAGGCGGGCCGGCCAAGG AGAGGGAGGGAGGGAATGAGGGAGGGAGCGACAGGGG AGGGCGGCGCCGGCAGGTTGGCGGCGGGCCGCTATTTGA GCGCAGGTCCCGGGCCAGGCGCTCAAAGCGCTTGGAGC CAGCGCGGCGGGGAGATCGCTGCGCGCAGCCCGCAGAG GCGCTGCGGCCAGTGCAGCCCCGGAGGCCCCGCGCGGA GAAGGAGGTGGAGAAGAGGCGGGCTTTCCGCCCCGCCGC CCGCGCCCCCCCCACCTCCATCCCGCCGCGCCGTCCCCC CTCCCTCCCCGCGGGCGCCGCATCTTGAATGGAAC	Мышь; chr9:10739926 8–107400067
35	GAGTAATTCATACAAAAGGACTCGCCCCTGCCTTGGGGA ATCCCAGGGACCGTCGTTAAACTCCCCTAACGTAGAAC CCAGAGATCGCTGCGTTCCCGCCCCCTACCCGCCCCGCT CTCGTCATCACTGAGGTGGAGAAGAGCATGCGTGAGGC TCCGGTGCCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCAC AGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTGCGCAATTGAA	

SEQ ID NO:	Последовательность нуклеиновой кислоты	Источник/ геномное местоположение
	CCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAA AGTGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTCCCGAGGGT GGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAA CGTTCCTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGT AAGTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTAC GGGTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACGCC CCTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGG TTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCGCTTAA GGAGCCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCTT GGGCGCTGGGGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTT CGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTT AAAATTTTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCA AGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGG TATTTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCG TGCGTCCCAGCGCACATGTTTCGGCGAGGCGGGGCCTGC GAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAA GCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCCG TGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCCGGTCG GCACCAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGG CCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCGCT CGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAA AGGGCCTTTCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCC ACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTC TCGAGCTTTTGGAGTACGTGCTCTTAGGTTGGGGGGAG GGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTG GAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTC TCCTTGGAATTTGCCCTTTTGGAGTTTGATCTTGGTTCA TTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTCTTCC ATTCAGGTGTCGTGA	

[60] В одном из аспектов, регуляторные элементы, раскрытые в настоящем описании, селективны к определенному типу клеток. В некоторых случаях, регуляторные элементы, раскрытые в настоящем описании, селективны к PV нейронам. В некоторых случаях, регуляторные элементы, раскрытые в настоящем описании, селективны к PV нейронам в CNS. В некоторых случаях, селективные регуляторные элементы PV клеток или любые регуляторные элементы, раскрытые в настоящем описании, могут вести к селективной экспрессии гена в PV нейронах относительно по меньшей мере одного, двух, трех, четырех, пяти или больше клеток CNS не PV типа.

[61] В некоторых случаях, любой один или более регуляторных элементов, раскрытых в настоящем описании, функционально связывают с трансгеном в экспрессирующей кассете, чтобы достигать селективной экспрессии в целевом типе клеток, например, PV нейроне. В некоторых случаях регуляторный элемент по любому из вариантов осуществления в настоящем описании содержит или состоит из любого одного из (i) SEQ ID NO: 1–33; (ii) варианта, функционального фрагмента или их сочетание; или (iii) последовательности, обладающей по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по

меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательностей с любым одним из (i) или (ii). В некоторых случаях, регуляторный элемент содержит любую одну из SEQ ID NO: 1–32. В некоторых случаях, идентичность последовательностей измеряют с помощью BLAST.

[62] В некоторых случаях, две или больше, три или больше, четыре или больше, пять или больше, шесть или больше, семь или больше, восемь или больше, девять или больше или десять или больше из SEQ ID NO: 1–32, или функциональный фрагмент или их сочетание, или последовательности, обладающие по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей с ними, комбинируют для того, чтобы формировать более крупный регуляторный элемент, или функционально связывают с геном в экспрессирующей кассете. В некоторых случаях, две или больше, три или больше, четыре или больше, пять или больше, шесть или больше, семь или больше, восемь или больше, девять или больше или десять или больше SEQ ID NO: 1–32, или функциональный фрагмент или их сочетание, или последовательности, обладающие по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей с ними, комбинируют с использованием линкерной последовательности из 1–50 нуклеотидов. В некоторых случаях, две или больше, три или больше, четыре или больше, пять или больше, шесть или больше, семь или больше, восемь или больше, девять или больше или десять или больше из SEQ ID NO: 1–32, или функциональный фрагмент или их сочетание, или последовательности, обладающие по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей с ними, комбинируют без линкерной последовательности. В некоторых случаях, последовательность SEQ ID NO: 33 используют в качестве линкера между любыми двумя регуляторными элементами. В некоторых случаях, линкерная последовательность между любыми двумя регуляторными элементами содержит SEQ ID NO: 33 или последовательность, обладающую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью последовательностей с SEQ ID NO: 33. В некоторых случаях, идентичность последовательностей измеряют с помощью BLAST.

[63] В некоторых случаях, когда два или больше регуляторных элементов комбинируют или используют в экспрессирующей кассете, регуляторные элементы не обязательно должны быть смежными или сцепленными в экспрессирующей кассете. Например, один регуляторный элемент можно располагать выше по направлению считывания от транскрипта, тогда как второй регуляторный элемент и/или дополнительные регуляторные элементы можно располагать ниже по направлению считывания от

трансгена. В некоторых случаях, один или более регуляторных элементов можно располагать выше по направлению считывания от трансгена. В некоторых случаях, один или более регуляторных элементов можно располагать ниже по направлению считывания от трансгена.

[64] В некоторых случаях, любую одну или более из SEQ ID NO: 1–22, или функциональный фрагмент или их сочетание, или последовательности, обладающие по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей с ними, можно комбинировать с любой одной или более из SEQ ID NO: 23–30, или функциональным фрагментом или их сочетание, или последовательностями, обладающими по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей с ними, чтобы формировать более крупный регуляторный элемент. Например, регуляторный элемент содержит SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 30. Регуляторный элемент содержит SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 30. регуляторный элемент содержит SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 23–29. Регуляторный элемент содержит SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 23–29. В некоторых случаях, регуляторный элемент содержит SEQ ID NO: 30 или любую одну или более из SEQ ID NO: 23–29, или функциональный фрагмент или их сочетание, или последовательности, обладающие по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей с ними.

[65] В некоторых случаях, один или более регуляторных элементов по настоящему раскрытию ведут к селективной экспрессии гена в PV клетке. В некоторых случаях, регуляторные элементы, которые проявляют селективную активность или функцию в целевом типе клеток, также проявляют минимальную активность или функцию в одном или более типах клеток вне мишени, например, клетках CNS не PV типа, не тормозных нейронах или возбуждающих нейронах, не PV клетках.

[66] В некоторых случаях, один или более регуляторных элементов, функционально связанных с геном, модулируют экспрессию гена в клетке, включая в качестве неограничивающих примеров селективную экспрессию в целевом типе клеток относительно не целевых типов клеток. Селективная экспрессия в целевой клетке или типе клеток также можно обозначать как клеточная селективная экспрессия или селективная экспрессия в определенном типе клеток.

[67] Селективная экспрессия обычно относится к экспрессии в высокой фракции клеток типа клеток, представляющего интерес (или целевого типа клеток), по сравнению с другими клетками (или не целевым типом клеток). Селективную экспрессию также можно рассматривать как преимущественную экспрессию в целевой клетке или целевом типе клеток относительно одной или более не целевых клеток или типов клеток. В некоторых случаях селективную экспрессию одного или более регуляторных элементов по этому раскрытию сравнивают с CAG, EF1 α , конститутивным промотором (например, SV40, CMV, UBC, PGK и CBA) или неселективным регуляторным элементом, который

дополнительно управляет экспрессией в любой клетке или типе клеток без избирательности. В некоторых случаях, селективную экспрессию одного или более регуляторных элементов по этому раскрытию сравнивают с CAG, EF1 α , конститутивным промотором (например, SV40, CMV, UBC, PGK и CBA), неселективным регуляторным элементом или экспрессирующей кассетой без регуляторных элементов.

[68] Не целевые типы клеток могут включать отличающееся подмножество, подтип или тип клеток по сравнению с целевой клеткой или целевым типом клеток или всем не целевыми типами клеток. В некоторых случаях, один или более регуляторных элементов, функционально связанных с геном, ведут к селективной экспрессии в целевом типе клеток относительно по меньшей мере одного типа не целевых клеток, или по меньшей мере двух, по меньшей мере трех, по меньшей мере четырех, по меньшей мере пяти или больше чем пяти типов не целевых клеток. В некоторых случаях, не целевые типы клеток относятся ко всем другим типам клеток, не включая целевой тип клеток. В некоторых случаях, все не целевые типы клеток представляют собой другие типы клеток в релевантной ткани или органе, не включая целевой тип клеток, например, все не целевые типы клеток в CNS, все не целевые типы клеток в гиппокампе. В некоторых случаях, не целевая клетка или не целевой тип клеток охватывает подмножество или подтип клеток, которые не являются целевой клеткой. Например, клетки CNS не PV типа могут включать ГАМК-эргические клетки, которые экспрессируют кальретицин и/или соматостатин вместо парвальбумина, или все ГАМК-эргические клетки, которые не экспрессируют парвальбумин. В некоторых случаях, типы клеток различают по наличию отличающихся клеточного маркера, морфологии, фенотипа, генотипа, функции и/или любого другого средства для классификации типов клеток.

[69] Избирательность экспрессии, движимой регуляторным элементом в клетке или типе клеток, представляющих интерес, можно измерять многими путями. Избирательность экспрессии гена в целевом типе клеток относительно не целевых типов клеток можно измерять посредством сравнения числа целевых клеток, которые экспрессируют поддающийся обнаружению уровень транскрипта с гена, который функционально связывают с одним или более регуляторными элементами, с общим числом клеток, которые экспрессируют ген. Такое измерение, обнаружение и количественное определение можно осуществлять *in vivo* или *in vitro*.

[70] В некоторых случаях избирательность к PV нейронам можно определять с использованием анализа совместной локализации. В некоторых случаях, анализ совместной локализации основан на иммуногистохимии. В некоторых случаях, поддающийся обнаружению репортерный ген используют в качестве трансгена для того, чтобы сделать возможным обнаружение и/или измерение экспрессии гена в клетке. В некоторых случаях поддающийся обнаружению маркер, например, флуоресцентный маркер или антитело, который специфически метит целевую клетку, используют для того, чтобы обнаруживать и/или измерять целевые клетки. В некоторых случаях, в анализе совместной локализации используют визуализацию, например, флуоресцентную

визуализацию, чтобы определять перекрытие между различными флуоресцентными метками, например, перекрытие между флуоресцентным сигналом, отражающим целевую клетку, и другим флуоресцентным сигналом, отражающим экспрессию гена. В некоторых случаях, флуоресцентные метки, используемые для анализа совместной локализации, включают красный флуоресцентный белок (RFP), такой как репортерный ген tdTomato, и зеленый флуоресцентный репортерный белок, такой как eGFP.

[71] В некоторых случаях, ген, функционально связанный с одним или более регуляторными элементами, представляет собой флуоресцентный белок, например, eGFP или RFP, где экспрессия трансгена обеспечивает поддающийся обнаружению сигнал. В некоторых случаях, ткань окрашивают по eGFP или флуоресценцию eGFP обнаруживают непосредственно с использованием флуоресцентного микроскопа. Второй флуоресцентный маркер или репортерный ген, имеющий отличающуюся флуоресценцию или поддающийся обнаружению сигнал, можно использовать для того, чтобы обозначать целевые клетки, например, антитело, которое идентифицирует целевые клетки. Например, антитело против PV, которое специфически взаимодействует с PV нейронами, можно использовать для того, чтобы получать поддающийся обнаружению сигнал, который отличим от флуоресценции, используемой для того, чтобы измерять экспрессию гена, такой как красная флуоресценция или красный краситель. Таким образом, в примере, в котором eGFP представляет собой трансген, функционально связанный с одним или более регуляторными элементами, которые управляют селективной экспрессией в PV нейронах, и в котором PV нейроны метят антителом против PV, избирательность экспрессии гена в PV клетках измеряют как процентную долю eGFP⁺ клеток, которые также являются PV⁺. В таком анализе PV⁺ клетки, которые также представляют собой eGFP⁺, обозначают посредством перекрытия обоих флуоресцентных сигналов, т. е. перекрытия красной и зеленой флуоресценции. Такое измерение, анализ и/или обнаружение можно осуществлять посредством визуальной проверки или с помощью компьютера.

[72] В некоторых случаях также можно измерять долю типа клеток, представляющего интерес (или целевого тип клеток), которые экспрессируют трансген, по сравнению с долей не целевых типов клеток (или других клеток), которые экспрессируют трансген для того, чтобы оценивать избирательность одного или более регуляторных элементов, функционально связанных с трансгеном. Аналогичным образом, избирательность экспрессии также можно измерять посредством сравнения числа целевых клеток, которые экспрессируют трансген, функционально связанный с одним или более регуляторными элементами, с общим числом всех клеток, которые экспрессируют трансген. В обоих подходах чем выше число целевых клеток, которые экспрессируют трансген, тем более селективными являются регуляторные элементы для целевых клеток. В некоторых случаях целевые клетки представляют собой PV нейроны.

[73] В некоторых случаях, один или более регуляторных элементов, раскрытых в настоящем описании, ведут к увеличенной избирательности экспрессии гена в PV нейроне. В некоторых случаях один или более регуляторных элементов, раскрытых в

настоящем описании, ведут к увеличенной избирательности экспрессии гена в PV нейронах по сравнению с клетками CNS не PV типа. В некоторых случаях, один или более регуляторных элементов, раскрытых в настоящем описании, ведут к увеличенной избирательности экспрессии гена в PV нейронах по сравнению с не PV ГАМК-эргическими клетками, где не PV ГАМК-эргические клетки могут представлять собой любую одну или более ГАМК-эргических клеток, которые экспрессируют кальретицин (CR), соматостатин (SOM), холецистокинин (CCK), нейропептид Y (NPY), вазоинтестинальный полипептид (VIP), холинацетилтрансферазу (ChAT) или их сочетание. В некоторых случаях, один или более регуляторных элементов, раскрытых в настоящем описании, ведут к увеличенной избирательности экспрессии гена в PV нейронах по сравнению с по меньшей мере одним, по меньшей мере двумя, по меньшей мере тремя, по меньшей мере четырьмя, по меньшей мере пятью или больше чем пятью не PV ГАМК-эргическими подтипами. В некоторых случаях, один или более регуляторных элементов, раскрытых в настоящем описании, ведут к увеличенной избирательности экспрессии гена в PV нейронах по сравнению со всеми другими не PV ГАМК-эргическими клетками или всеми другими ГАМК-эргическими клетками, которые не экспрессируют PV, или всеми другими клетками CNS, которые не экспрессируют PV, или всеми другими нейронами, которые не экспрессируют PV. В некоторых случаях, один или более регуляторных элементов, раскрытых в настоящем описании, ведут к увеличенной избирательности экспрессии гена в PV нейронах по сравнению со всеми не PV клетками в CNS или всеми не PV нейронами.

[74] В некоторых случаях один или более регуляторных элементов, функционально связанных с трансгеном, ведут к селективной экспрессии трансгена в PV клетках, где процентная доля PV клеток, экспрессирующих трансген, составляет процентную долю выше экспрессии гена в PV клетках, в которых трансген функционально связывают с CAG, EF1 α , конститутивным промотором (например, SV40, CMV, UBC, PGK и CBA) или неселективным регуляторным элементом, таким как SEQ ID NO: 34, или его функциональным фрагментом, или последовательностью, обладающей по меньшей мере 80% идентичностью последовательностей с ним. В некоторых случаях, один или более регуляторных элементов ведут к селективной экспрессии в PV нейронах на уровне, который по меньшей мере в 1,5 раза выше, по меньшей мере 2 раза выше, по меньшей мере в 3 раза выше, по меньшей мере в 4 раза выше, по меньшей мере в 5 раз выше, по меньшей мере в 6 раз выше, по меньшей мере в 7 раз выше, по меньшей мере в 8 раз выше, по меньшей мере в 9 раз выше, по меньшей мере в 10 раз выше, по меньшей мере в 15 раз выше, по меньшей мере в 20 раз выше, по меньшей мере в 25 раз выше или по меньшей мере в 50 раз выше по сравнению с экспрессией гена, функционально связанного с CAG, EF1 α , конститутивным промотором (например, SV40, CMV, UBC, PGK и CBA) или неселективным регуляторным элементом, таким как SEQ ID NO: 34, или его функциональным фрагментом, или последовательностью, обладающей по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей

мере 99% идентичностью последовательностей с ним.

[75] В некоторых аспектах, регуляторный элемент получают у человека или он содержит последовательность, которую получают у человека. В некоторых случаях, регуляторный элемент получают у мыши или он содержит последовательность, которую получают у мыши. В некоторых случаях, регуляторный элемент содержит не встречаемую в природе последовательность. В некоторых случаях, регуляторный элемент является не встречаемым в природе. В некоторых случаях, один или более получаемых у человека регуляторных элементов комбинируют с другим регуляторным элементом для того, чтобы создавать не встречаемый в природе регуляторный элемент. В некоторых случаях, получаемый у человека регуляторный элемент объединяют с получаемым у мыши регуляторным элементом.

[76] Термин «получаемый у человека», как используют в настоящем описании, относится к последовательностям, которые встречают в геноме человека (или сборке генома человека) или последовательностях, гомологичных ему. Гомологичная последовательность может представлять собой последовательность, которая имеет область с по меньшей мере 80% идентичностью последовательностей (например, как измеряют с помощью BLAST) по сравнению с областью генома человека. Например, последовательность, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% гомологична последовательности человека, полагают полученной у человека. В некоторых случаях, регуляторный элемент содержит получаемую у человека последовательность и не получаемую у человека последовательность так, что полный регуляторный элемент имеет низкую идентичность последовательностей с геномом человека, тогда как часть регуляторного элемента имеет 100% идентичность последовательностей (или локальную идентичность последовательностей) с последовательностью в геноме человека.

[77] В некоторых случаях, полученный у человека регуляторный элемент представляет собой последовательность, которая на 100% идентична последовательности человека. В некоторых случаях, последовательность селективного регуляторного элемента клеток определенного типа на 100% получена у человека.

[78] В других случаях по меньшей мере 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% или 99% последовательности регуляторного элемента получено у человека. Например, регуляторный элемент может иметь 50% его последовательности, полученной у человека, и остальные 50%, полученные не у человека (например, полученные у мыши или полностью синтетические). В качестве дополнительного примера, регуляторный элемент, который рассматривают как на 50% полученный у человека и который содержит 300 п. о., может иметь общую идентичность последовательностей 45% с последовательностью в геноме человека, тогда как пары

оснований 1–150 в RE могут иметь 90% идентичность (локальная идентичность последовательностей) с областью аналогичного размера в геноме человека.

[79] В некоторых случаях, последовательность, которая гомологична полученной у человека регуляторной последовательности, по меньшей мере на 90% идентична последовательности человека. В некоторых случаях, регуляторный элемент в настоящем описании содержит последовательность, которая обладает по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью с любой одной из SEQ ID NO: 1, 23–31 и 33. В некоторых случаях, идентичность последовательностей измеряют с помощью BLAST. Когда регуляторный элемент содержит последовательность, которая гомологична (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% идентичность последовательностей) с любой одной или более из SEQ ID NO: 23–29, или функциональным фрагментом или их сочетанием, такой регуляторный элемент ведет к более высокой экспрессии функционально связанного трансгена (когда промотор также присутствует в экспрессирующем векторе или кассете), по сравнению со схожим вектором без регуляторного элемента. Такую более высокую экспрессию трансгена можно наблюдать, например, в клетках HEK293T или CHO.

[80] В некоторых случаях один или более регуляторных элементов содержат любую одну или более из SEQ ID NO: 23–29, комбинируемых или используемых в комбинации с любой одной или более из SEQ ID NO: 1–22, с линкерной последовательностью, такой как SEQ ID NO: 33, или без нее. В некоторых случаях, любые два регуляторных элемента по этому раскрытию связывают вместе с использованием полинуклеотидного линкера, содержащего 1–50 нуклеотидов, такого как SEQ ID NO: 33 или ее вариант. В некоторых случаях, линкерная последовательность представляет собой получаемую у человека последовательность. В некоторых случаях, линкерная последовательность является получаемой у мыши или не встречаемой в природе. В некоторых случаях два регуляторных элемента соединяют без линкера или без любой промежуточной последовательности. В некоторых случаях линкер содержит 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, 26, 27, 28, 29 или 30 нуклеотидов. В некоторых случаях, линкерная последовательность представляет собой результат участка рестрикционного фермента, лигирования, ПЦР и/или клонирования.

[81] В некоторых случаях, получаемый у человека регуляторный элемент объединяют с получаемым у мыши регуляторным элементом, таким как SEQ ID NO: 32, которая представляет собой комбинацию SEQ ID NO: 8 (получаемая у мыши последовательность) и SEQ ID NO: 23–29 (получаемые у человека последовательности). В некоторых случаях, селективные регуляторные элементы клеток определенного типа комбинируют непосредственно без дополнительной линкерной последовательности. В других случаях, селективные регуляторные элементы клеток определенного типа

комбинируют с одной или более короткими линкерными последовательностями, которые могут быть преднамеренными или представлять собой артефакты клонирования. В некоторых случаях линкерная последовательность содержит 1–50 оснований. Например, SEQ ID NO: 31 содержит последовательность SEQ ID NO: 1 и 23–29 вместе с дополнительными 19 п. о. геномной последовательности (SEQ ID NO: 33) непосредственно после последовательности SEQ ID NO: 1. SEQ ID NO: 32 также содержит эти 19 п. о., но без последовательности SEQ ID NO: 1. В других примерах комбинированные селективные регуляторные элементы клеток определенного типа могут включать короткие последовательности, обычно меньше чем 50 п. о., меньше чем 20 п. о., меньше чем 15 п. о. или меньше чем 10 п. о., из клонирующей плазмиды или участка распознавания рестрикционного фермента.

[82] В некоторых случаях регуляторные элементы могут происходить из некодирующих последовательностей ДНК. В некоторых случаях, регуляторные элементы, получаемые из некодирующей ДНК, ассоциированы с генами, такими как последовательности выше по направлению считывания, интроны, 3'– и 5'–нетранслируемые области (UTR) и/или области ниже по направлению считывания. В других случаях регуляторные элементы, получаемые из некодирующих последовательностей ДНК, не ассоциированы с геном. В некоторых случаях, регуляторные элементы происходят из кодирующих последовательностей. В некоторых случаях, геномная область, из которой регуляторный элемент получают, отличается от геномной области, из которой получают функционально связанный трансген. В некоторых случаях, RE получают из отдаленной геномной области или местоположения относительно геномной области или местоположения, из которого получают трансген (такой как встречаемая в природе или эндогенная версия трансгена).

[83] В одном из аспектов, регуляторный элемент представляет собой любую не кодирующую последовательность, которая модулирует экспрессию гена, например, избирательность экспрессии в целевой клетке. В некоторых случаях, целевая клетка представляет собой PV нейрон. В некоторых случаях, регуляторный элемент получают из геномной последовательности выше по направлению считывания от участка инициации транскрипции, 5' UTR последовательности, экзонной последовательности, интронной последовательности или 3' UTR последовательности. В некоторых случаях, получаемый у человека регуляторный элемент содержит интронную получаемую у человека последовательность. В некоторых случаях, регуляторный элемент содержит энхансер, и его присутствие в экспрессирующей кассете вместе с промотором увеличивает экспрессию функционально связанного трансгена в целевом типе клеток (например, PV нейронах) по сравнению с экспрессией того же трансгена с помощью промотора без энхансера. В некоторых случаях, энхансер увеличивает экспрессию функционально связанного трансгена через транскрипционный механизм, посттранскрипционный механизм или то и другое. В некоторых случаях, регуляторный элемент содержит энхансерную последовательность, промоторную последовательность или комбинацию

энхансерной и промоторной последовательностей. В некоторых случаях, регуляторный элемент содержит одно или более из получаемой у человека энхансерной последовательности, получаемой у человека промоторной последовательности, получаемой у человека интронной последовательности и/или их сочетания.

[84] В некоторых случаях регуляторный элемент содержит одно или более из SEQ ID NO: 1–32, или фрагмента или их сочетания, или последовательностей, обладающих по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей с ними. В некоторых случаях, регуляторный элемент содержит одно или более из SEQ ID NO: 1–22, или фрагмента или их сочетания, или последовательностей, обладающих по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей с ними. В некоторых случаях, регуляторный элемент содержит одно или более из SEQ ID NO: 23–29, или фрагмента или их сочетания, или последовательностей, обладающих по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей с ними. В некоторых случаях, регуляторный элемент содержит одно или более из SEQ ID NO: 30–32, или фрагмента или их сочетания, или последовательностей, обладающих по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей с ними. В некоторых случаях, регуляторный элемент содержит последовательность SEQ ID NO: 30–32, или фрагмент или их сочетание, или последовательности, обладающие по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей с ними.

[85] В некоторых случаях, регуляторный элемент получают из не относящихся к человеку ДНК последовательностей или как человеческих, так и не относящихся к человеку геномных последовательностей. В некоторых случаях, селективные регуляторные элементы клеток определенного типа, или их части, гомологичны геномной последовательности млекопитающего. В некоторых случаях, регуляторные элементы обладают по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью с геномной последовательностью млекопитающего. В некоторых случаях, регуляторный элемент получают из геномной последовательности мыши. В некоторых случаях, регуляторный элемент, или его фрагменты, обладает по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше чем 99% идентичностью с геномной последовательностью мыши или не относящейся к человеку геномной последовательностью млекопитающего. В некоторых случаях, идентичность последовательностей измеряют с помощью BLAST. В некоторых случаях, регуляторные

элементы могут содержать любую из SEQ ID NO: 1–33, или фрагмент или их сочетание, или последовательности, обладающие по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей с ними.

[86] В некоторых случаях, селективные регуляторные элементы клеток определенного типа являются короткими. В некоторых случаях, размер регуляторных элементов совместим с клонирующей емкостью вектора, например, вирусного вектора или gAAV, так что комбинированный размер трансгена и одного или более регуляторных элементов не превышает клонирующей емкости вектора. В некоторых случаях, селективные регуляторные элементы клеток определенного типа имеют длину приблизительно до 2050 п. о., 2000 п. о., 1900 п. о., 1800 п. о., 1700 п. о., 1600 п. о., 1500 п. о., 1400 п. о., 1300 п. о., 1200 п. о., 1100 п. о., 1000 п. о., 900 п. о., 800 п. о., 700 п. о., 600 п. о., 500 п. о., 400 п. о., 300 п. о., 200 п. о. или 100 п. о. В некоторых случаях селективные регуляторные элементы клеток определенного типа имеют общую длину не более чем приблизительно 20 п. о., 30 п. о., 40 п. о., 50 п. о., 60 п. о., 70 п. о., 80 п. о., 90 п. о., 100 п. о., 200 п. о., 300 п. о., 400 п. о., 500 п. о., 600 п. о., 700 п. о., 800 п. о., 900 п. о., 1000 п. о., 1010 п. о., 1020 п. о., 1030 п. о., 1040 п. о., 1050 п. о., 1060 п. о., 1070 п. о., 1080 п. о., 1090 п. о., 1100 п. о., 1200 п. о., 1300 п. о., 1500 п. о., 1600 п. о., 1700 п. о., 1800 п. о., 1900 п. о. или 2000 п. о. В некоторых случаях, селективные регуляторные элементы клеток определенного типа имеют длину приблизительно 100–1100 п. о., 100–1000 п. о., 100–900 п. о., 200–900 п. о., 200–800 п. о., 300–600 п. о., 400–800 п. о., 500–600 п. о. или 600–900 п. о. В некоторых случаях, регуляторный элемент составляет приблизительно 400–600 п. о., 400–600 п. о., 400–700 п. о., 400–800 п. о., 400–900 п. о., 400–1000 п. о. или 400–1500 п. о. В некоторых случаях, регуляторный элемент составляет приблизительно 500–600 п. о., 500–700 п. о., 500–800 п. о., 500–900 п. о., 500–1000 п. о. или 500–1500 п. о. В некоторых случаях, два или больше регуляторных элементов комбинируют для того, чтобы формировать более крупный селективный регуляторный элемент клеток определенного типа в 1300–2500 п. о., 1300–2060 п. о., приблизительно 1350 п. о., приблизительно 2050 п. о. или приблизительно 1880 п. о.

[87] В некоторых случаях, можно комбинировать два или больше селективных регуляторных элементов клеток определенного типа. Например, можно комбинировать два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или больше селективных регуляторных элементов клеток определенного типа. Например, SEQ ID NO: 30 содержит последовательности из семи регуляторных элементов, т. е. SEQ ID NO: 23–29, все они получены из геномной последовательности человека. В некоторых случаях, селективные регуляторные элементы клеток определенного типа относятся к селективным регуляторным элементам PV нейронов.

[88] В некоторых случаях, селективный регуляторный элемент клеток определенного типа повторяют два или больше раз для создания комбинированного регуляторного элемента, который также является селективным к определенному типу

клеток или имеет усиленное селективное свойство в отношении определенного типа клеток. В некоторых случаях, комбинируют два или больше регуляторных элементов с различной избирательностью к определенному типу клеток. В некоторых случаях, селективный регуляторный элемент клеток определенного типа объединяют с неселективным регуляторным элементом, например, неселективным энхансерным элементом, который управляет высокой экспрессией гена. Например, промоторный регуляторный элемент с высокой избирательностью для целевой клетки можно комбинировать с регуляторным элементом с высокой эффективностью экспрессии. В некоторых случаях, селективные регуляторные элементы одного или более типов клеток комбинируют с одним или более высокоэффективными регуляторными элементами. Например, любое одно или более из SEQ ID NO: 1–32, или фрагмента или их сочетания, или последовательностей, обладающих по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% идентичность последовательностей с ними, можно комбинировать с конститутивным промотором, таким как промотор GAD2, промотор синапсина человека, промотор minCMV, TATA-бокс, коровий супер-промотор или промотор EF1 α или их сочетание.

[89] В некоторых аспектах, настоящее раскрытие предусматривает список регуляторных элементов, которые можно добавлять в любую генную терапию, чтобы достигать селективной экспрессии гена в целевом типе клеток, таком как PV нейрон, относительно одного или более не целевых типов клеток, таких как не PV клетки CNS, включая в качестве неограничивающих примеров возбуждающие клетки и/или не PV ГАМК-эргические клетки.

[90] В некоторых случаях, селективные регуляторные элементы клеток определенного типа можно комбинировать с другими регуляторными элементами, такими как промотор высокой экспрессии или последовательность, которая увеличивает стабильность мРНК. В некоторых случаях, один или более селективных регуляторных элементов клеток определенного типа комбинируют с человеческой, не относящейся к человеку или не млекопитающей последовательностью, например, промотором hSyn1, промотором CBA, промотором CMV, промотором EF1 α , сигналом polyA (например, сигналом polyA SV40), или посттранскрипционный регуляторный элемент, такой как посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE).

[91] В некоторых случаях, комбинированные регуляторные элементы могут происходить от различных биологических видов. Комбинированные регуляторные элементы могут происходить из различных геномных областей в пределах биологического вида. В некоторых случаях, регуляторные элементы получают из отдаленных геномных последовательностей, например, комбинируют последовательности, которые обычно или в природе не ассоциированы друг с другом или с типом клеток, представляющим интерес. В некоторых случаях, индивидуальные регуляторные элементы, используемые для получения комбинированного регуляторного элемента, могут происходить из различных хромосом человека.

[92] В одном из аспектов, регуляторный элемент по раскрытию содержит функциональный фрагмент из любой из SEQ ID NO: 1–32, или их сочетания, или последовательностей, обладающих по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей с ними. Такой функциональный фрагмент может увеличивать экспрессию трансгена в экспрессирующей кассете или векторе по сравнению со схожей экспрессирующей кассетой или вектором без регуляторного элемента. Такой функциональный фрагмент может выполнять функцию энхансера для увеличения селективной экспрессии в определенном типе клеток, когда фрагмент функционально связывают с трансгеном, по сравнению со схожим вектором или кассетой без функционального фрагмента. Фрагмент предпочтительно составляет более чем 30, 40, 50 или 60 п. о. в длину.

[93] В некоторых случаях, селективный регуляторный элемент PV клеток или любой регуляторный элемент по этому раскрытию содержит любое из SEQ ID NO: 1–32, (ii) последовательность нуклеиновой кислоты, обладающую по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентичностью последовательностей с любой одной из SEQ ID NO: 1–32, (iii) функционального фрагмента любой последовательности (i) или (ii), или (iv) комбинации любой последовательности (i), (ii) и/или (iii). В некоторых случаях, идентичность последовательностей измеряют с помощью BLAST. В некоторых случаях, два или больше из SEQ ID NO: 1–29, или функционального фрагмента или их сочетания, или последовательностей, обладающих по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей с ними, используют в качестве регуляторного элемента для увеличения экспрессии трансгена избирательно в PV клетках по сравнению с не PV клетками CNS, или в любом целевом типе клеток по сравнению с не целевым типом клеток. В некоторых случаях, функциональный фрагмент представляет собой тот, который ведет к селективной экспрессии в целевом типе клеток относительно одного или более не целевых типов клеток.

[94] В некоторых случаях, две или больше копий регуляторного элемента можно использовать для усиления селективной экспрессии в целевой клетке, например, две или больше копий любого одного из SEQ ID NO: 1–29, или фрагмента или их сочетания, или последовательностей, обладающих по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей с ними.

[95] В других случаях, одно или более из SEQ ID NO: 1–32, или фрагмента или их сочетания, или последовательностей, обладающих по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей с ними, функционально связывают с другим регуляторным элементом, таким как промотор или энхансер, чтобы дополнительно

увеличивать селективную экспрессию в целевой клетке. В некоторых случаях, можно усиливать любую генную терапию посредством добавления одного или более регуляторных элементов, как раскрыто в настоящем описании, чтобы усовершенствовать или увеличивать экспрессию из генной терапии в целевой клетке по сравнению с не целевыми клетками. В некоторых случаях, целевая клетка представляет собой PV нейроны или ГАМК–эргические клетки, которые экспрессируют парвальбумин.

[96] В некоторых аспектах один или более регуляторных элементов (например, любое одно или более из SEQ ID NO: 1–32, или фрагмента или их сочетания, или последовательностей, обладающих по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей с ними), раскрытых в настоящем описании, демонстрируют избирательность к определенному типу клеток для целевого типа клеток относительно по меньшей мере одного, по меньшей мере двух, по меньшей мере трех, по меньшей мере четырех, по меньшей мере пяти или больше чем пяти не целевых типов клеток. В некоторых случаях, регуляторный элемент управляет селективной экспрессией или преимущественной экспрессией в целевом подтипе клеток относительно по меньшей мере одного, по меньшей мере двух, по меньшей мере трех, по меньшей мере четырех, по меньшей мере пяти или больше чем пяти не целевых подтипов или всех других известных подтипов клеток. Например, ГАМК–эргические клетки содержат различные подтипы, включая PV клетки. В некоторых случаях, целевой тип клеток представляет собой PV клетку. В некоторых случаях, один или более регуляторных элементов селективны к PV клеткам относительно по меньшей мере одного, по меньшей мере двух, по меньшей мере трех, по меньшей мере четырех, по меньшей мере пяти или больше чем пяти не целевых типов клеток. В некоторых случаях, один или более регуляторных элементов селективны к PV клеткам относительно всех других известных типов клеток CNS.

[97] В некоторых случаях, любое одно или более из SEQ ID NO: 1–32, или фрагмента или их сочетания, или последовательностей, обладающих по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей с ними, можно комбинировать с любым одним или более из SEQ ID NO: 1–32, или фрагмента или их сочетания, или последовательностей, обладающих по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей с ними. В некоторых случаях, такие комбинированные регуляторные элементы с использованием с использованием линкера из 1–50 нуклеотидов. В некоторых случаях, такие комбинированные регуляторные элементы не сцеплены.

[98] В некоторых случаях, один или более регуляторных элементов, раскрытых в настоящем описании, когда функционально связаны с любым трансгеном (например, репортерный трансген или терапевтический трансген), управляют селективной экспрессией или преимущественной экспрессией в по меньшей мере одном целевом типе клеток на уровне, который статистически значимо выше чем экспрессия под управлением

CAG, EF1 α , конститутивного промотора (например, SV40, CMV, UBC, PGK и CBA) или неселективного регуляторного элемента (например, SEQ ID NO: 34, или ее фрагмент, или последовательность, обладающая по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей с ней), когда функционально связан с тем же трансгеном, или с помощью той же конструкции без регуляторных элементов. В некоторых случаях, статистически значимо более высокий обозначает, что регуляторные элементы управляют селективной экспрессией в целевом типе клеток на уровне, который по меньшей мере в 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10, 10,5, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100 раз превышает уровень экспрессии с помощью CAG, EF1 α , конститутивного промотора (например, SV40, CMV, UBC, PGK и CBA) или неселективного регуляторного элемента, когда он функционально связан с тем же трансгеном или с помощью той же конструкции без регуляторных элементов. В некоторых случаях, такую селективную экспрессию в определенном типе клеток анализируют с использованием анализа совместной локализации, как раскрыто в настоящем описании. В некоторых случаях, целевой тип клеток представляет собой парвальбуминовую клетку. В некоторых случаях, такой анализ совместной локализации проводят с использованием антитела против PV. В некоторых случаях, такой анализ совместной локализации проводят с использованием мыши PV-Cre, как раскрыто в настоящем описании. В некоторых случаях, неселективный регуляторный элемент представляет собой SEQ ID NO: 34, или ее фрагмент, или последовательность, обладающую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей с ней.

Экспрессирующие кассеты

[99] Термины «экспрессирующая кассета» и «кассета нуклеиновой кислоты» используют взаимозаменяемо, чтобы отослать к полинуклеотидной молекуле или последовательности нуклеиновой кислоты. В некоторых случаях, экспрессирующая кассета содержит один или более регуляторных элементов, раскрытых в настоящем описании, функционально связанных с трансгеном. В некоторых случаях, экспрессирующая кассета содержит один или более регуляторных элементов. В некоторых случаях, экспрессирующая кассета содержит один или более селективных регуляторных элементов определенного типа клеток, раскрытых в настоящем описании. В некоторых случаях, экспрессирующая кассета содержит один или более селективных регуляторных элементов PV клеток, раскрытых в настоящем описании. В некоторых случаях, экспрессирующая кассета дополнительно содержит промотор. В некоторых случаях, экспрессирующая кассета содержит одну или более последовательностей SEQ ID NO: 1–32 и/или любое их сочетание. В некоторых случаях, экспрессирующая кассета содержит одно или более из SEQ ID NO: 1–32, (ii) последовательности нуклеиновой кислоты, обладающей по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичностью

последовательностей с любой одной из SEQ ID NO: 1–32, (iii) функционального фрагмента любой последовательности (i) или (ii), или (iv) комбинации любой последовательности (i), (ii) и/или (iii). В некоторых случаях, идентичность последовательностей измеряют с помощью BLAST. В некоторых случаях, регуляторный элемент располагают выше по направлению считывания от трансгена в экспрессирующей кассете. В некоторых случаях, регуляторный элемент располагают ниже по направлению считывания от трансгена в экспрессирующей кассете. В некоторых случаях, экспрессирующая кассета дополнительно содержит промотор, например, промотор hSyn1, промотор CBA, промотор CMV, промотор EF1 α , сигнал polyA (например, сигнал polyA SV40) или посттранскрипционный регуляторный элемент, такой как посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков (WPRE).

[100] В некоторых аспектах, один или более регуляторных элементов, описанных в настоящем описании, функционально связывают с трансгеном в экспрессирующей кассете. В некоторых случаях генная терапия содержит экспрессирующую кассету, содержащую трансген, функционально связанный с одним или более, двумя или больше, тремя или больше, четырьмя или больше или пятью или больше регуляторными элементами по настоящему раскрытию, чтобы достигать селективной экспрессии трансгена в целевых ткани или тип клеток, таких как PV нейроны. В некоторых случаях, экспрессирующая кассета содержит один или более селективных регуляторных элементов PV клеток или один или более регуляторных элементов, раскрытых в настоящем описании, функционально связанных с трансгеном, например, репортерным геном, eGFP, SCN1A, SNC2A, SNC8A, SCN1B, SCN2B, KV3.1, KV3.2, KV3.3, STXBP1, ДНК-связывающим белком или его вариантом или фрагментом или последовательностями, обладающими по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей с ними.

[101] В некоторых случаях, экспрессирующую кассету адаптируют для доставки через генную терапию. В некоторых случаях, экспрессирующая кассета представляет собой линейную или кольцевую конструкцию. В некоторых случаях, экспрессирующая кассета представляет собой часть плазмиды, вектора, вирусного вектора или gAAV.

[102] В некоторых случаях, генную терапию вводят непосредственно в CNS субъекта, нуждающегося в этом, или систематически через инъекцию и/или инфузию. В некоторых случаях, у такого субъекта диагностировано заболевание или состояние, ассоциированное с гаплонедостаточностью или генетической мутацией, такой как гаплонедостаточность или мутация в любом одно из следующих генов: SCN1A, SNC2A, SNC8A, SCN1B, SCN2B, KV3.1, KV3.2, KV3.3 или STXBP1. В некоторых случаях, субъект имеет риск или имеет синдром Драве, болезнь Альцгеймера, эпилепсию, нейродегенерацию, таупатию, нейрональную гиповозбудимость и/или пароксизмы. В некоторых случаях, такую генную терапию доставляют с использованием вируса или вирусного вектора, такого как gAAV. В некоторых случаях используют серотип AAV с

тропизмом к клеткам CNS и/или способностью пересекать гематоэнцефалический барьер, такой как AAV9 или его вариант.

[103] В некоторых случаях, один или более регуляторных элементов (например, одно или более из SEQ ID NO: 1–32, или фрагмента или их сочетания, или последовательностей, обладающих по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей с ними), функционально связанных с трансгеном в экспрессирующей кассете, ведут к селективной экспрессии гена в PV клетках по сравнению с не PV клетками CNS или по сравнению с управляющим элементом, таким как CAG, EF1 α , конститутивный промотор (например, SV40, CMV, UBC, PGK и CBA) или неселективный регуляторный элемент (например, SEQ ID NO: 34 или его функциональный фрагмент или последовательность, обладающая по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей с ней). В некоторых случаях, регуляторные элементы ведут к тому, что по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80% или по меньшей мере 90% всех клеток, экспрессирующих трансген, представляют собой PV нейроны. В некоторых случаях, регуляторные элементы ведут к селективной экспрессии гена в PV нейронах, которая приблизительно в 1,5 раза, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 7,5 раза, 8 раз, 9 раз или 10 раз выше, чем ожидают для естественного распределения PV нейронов в CNS. В некоторых случаях, регуляторный элемент управляет селективной экспрессией в PV клетках, где процентная доля PV клеток, экспрессирующих трансген, представляет собой процентную долю, которая по меньшей мере в 1,5 раза выше, по меньшей мере в 2 раза выше, по меньшей мере в 3 раза выше, по меньшей мере в 4 раза выше, по меньшей мере в 5 раз выше, по меньшей мере в 6 раз выше, по меньшей мере в 7 раз выше, по меньшей мере в 8 раз выше, по меньшей мере в 9 раз выше или по меньшей мере в 10 раз выше, чем ожидаемое распределение PV клеток в CNS, или по меньшей мере на 1–5%, 5%–10%, 10–15%, 15–20%, 20–25%, 25–30%, 30–35%, 35–40%, 40–45%, 45–50%, 50–55%, 55–60%, 65–70%, 70–75%, 75–80%, 80–85%, 85–90% или 90–95% выше, чем экспрессия в PV клетках, когда трансген функционально связывают с CAG, EF1 α , конститутивным промотором (например, SV40, CMV, UBC, PGK и CBA) или неселективным регуляторным элементом, имеющим последовательность SEQ ID NO: 34, или ее функциональным фрагментом, или последовательностью, обладающей по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей с ней, и как измеряют в иммуногистохимическом анализе совместной локализации. В некоторых случаях, регуляторный элемент в экспрессирующей кассете, или использование такого регуляторного элемента в экспрессирующей кассете, ведет к селективной экспрессии гена в PV клетках, или PV клетках в CNS, или PV нейронах, где приблизительно 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% клеток,

экспрессирующих трансген, являются PV–положительными.

[104] В некоторых случаях, экспрессирующая кассета или генная терапия содержит один или более, два или больше, три или больше, четыре или больше, пять или больше, шесть или больше, семь или больше, восемь или больше, девять или больше или десять или больше регуляторных элементов, как описано в таблице 1, например, SEQ ID NO: 1–32, или функциональный фрагмент или их сочетание, или последовательности, обладающие по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей с ней.

[105] В некоторых случаях, один или более селективных регуляторных элементов PV клеток или один или более регуляторных элементов, раскрытых в настоящем описании, функционально связывают с любым трансгеном в экспрессирующей кассете. В некоторых случаях, экспрессирующая кассета представляет собой генную терапию. В некоторых случаях, экспрессирующая кассета представляет собой часть вектора или плазмиды, например, вирусного вектора или rAAV вектора. В некоторых случаях, экспрессирующая кассета представляет собой часть AAV1, AAV8, AAV9 или AAVDJ или их вариант или гибрид. В некоторых случаях, экспрессирующая кассета содержит один или более селективных регуляторных элементов PV клеток или один или более регуляторных элементов, раскрытых в настоящем описании, функционально связанных с трансгеном, где трансген представляет собой SCN1A, SNC2A, SNC8A, SCN1B, SCN2B, KV3.1, KAV3.2, KV3.3, STXBP1, ДНК–связывающий белок (например, транскрипционный модулятор эндогенного гена) или его вариант или функциональный фрагмент, или последовательность, обладающую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей с ним. В некоторых случаях, такие регуляторные элементы увеличивают селективную экспрессию трансгена в PV нейронах по сравнению с клетками CNS не PV типа. В некоторых случаях, такие регуляторные элементы увеличивают экспрессию трансгена избирательно в целевом типе клеток, таком как PV нейрон. В некоторых случаях, целевой тип клеток представляет собой PV клетку.

[106] Приемы, рассматриваемые в настоящем описании для генной терапии соматических клеток, включают доставку через вирусный вектор (например, ретровирусные, аденовирусные, AAV, хелпер–зависимые аденовирусные системы, гибридные аденовирусные системы, простой герпес, поксвирус, лентивирус и вирус Эпштейна–Барр) и не вирусные системы, такие как физические системы (депротеинизированная ДНК, ДНК бомбардировка, электропорация, гидродинамика, ультразвук и магнитофекция) и химические системы (катионные липиды, различные катионные полимеры и липидные полимеры).

[107] Клонированная емкость векторов или вирусных экспрессирующих векторов является конкретной трудностью при экспрессии больших трансгенов. Например, AAV векторы обычно имеют паковую емкость $\approx 4,8$ т. о., лентивирусы обычно имеют емкость ≈ 8 т. о., аденовирусы обычно имеют емкость $\approx 7,5$ т. о. и альфавирусы обычно

имеют емкость $\square 7,5$ т. о. Некоторые вирусы имеют более значительные пакующие емкости, например, вирус герпеса может иметь емкость >30 т. о. и вирус осповакцины емкость $\square 25$ т. о. Преимущества использования AAV для генной терапии включают низкую патогенность, очень низкую частоту встраивания в геном хозяина и способность инфицировать делящиеся и не делящиеся клетки.

[108] Чтобы разрешить эти ограничения размеров у определенных вирусных векторов или усовершенствовать экспрессию с вирусных векторов, настоящее раскрытие предусматривает использование регуляторных элементов, которые короче, чем 2,5 т. о., 2 т. о., 1,5 т. о., 1 т. о., 900 п. о., 800 п. о., 700 п. о., 600 п. о., 500 п. о., 400 п. о., 300 п. о., 200 п. о., 150 п. о. или 110 п. о., но по меньшей мере 10 п. о., 50 п. о. или 100 п. о. в длину. В некоторых случаях, размер комбинированного регуляторного элемента составляет приблизительно 2500 п. о., 2000 п. о., 1500 п. о., 1400 п. о., 1300 п. о., 1200 п. о., 1100 п. о. или 1000 п. о. В некоторых случаях, каждый комбинированный регуляторный элемент имеет общую длину приблизительно 100 п. о., 200 п. о., 300 п. о., 400 п. о., 500 п. о., 600 п. о., 700 п. о., 800 п. о., 900 п. о., 1000 п. о., 1100 п. о., 1200 п. о., 1300 п. о., 1400 п. о., 1500 п. о., 1600 п. о., 1700 п. о., 1800 п. о., 1900 п. о., 2000 п. о., 2100 п. о., 2200 п. о., 2300 п. о., 2400 п. о. или 2500 п. о. В некоторых случаях, размер комбинированного RE имеет общую длину приблизительно 200–3000 п. о., 200–2500 п. о., 200–2100 п. о., 500–2500 п. о., 1000–2500 п. о., 1500–2500 п. о., 1500–2000 п. о. или 2000–2500 п. о.

[109] В некоторых случаях, регуляторный элемент по раскрытию предпочтительно представляет собой (i) тот, который избирательно управляет экспрессией в типе клеток, представляющем интерес, таком как PV клетки; (ii) включает получаемую у человека последовательность и (iii) составляет меньше чем 2,5 т. о., 2 т. о., 1,5 т. о., или 1 т. о.

[110] Также в настоящем описании предусмотрены экспрессирующие кассеты, которые могут представлять собой кольцевую или линейную молекулу нуклеиновой кислоты. В некоторых случаях, экспрессирующую кассету доставляют в клетки (например, множество различных клеток или типов клеток, включая целевые клетки или типы клеток и/или не целевые типы клеток) в векторе (например, экспрессирующем векторе). Вектор может представлять собой интегрирующий или неинтегрирующий вектор, относящийся к способности вектора интегрировать экспрессирующую кассету и/или трансген в геном клетки. Интегрирующий вектор или не интегрирующий вектор можно использовать для того, чтобы доставлять экспрессирующую кассету, содержащую трансген, функционально связанный с регуляторным элементом. Примеры векторов включают, но не ограничиваясь этим, (a) не вирусные векторы, такие как векторы нуклеиновой кислоты, в том числе линейные олигонуклеотиды и кольцевые плазмиды; искусственные хромосомы, такие как искусственные хромосомы человека (HAC), искусственные хромосомы дрожжей (YAC) и бактериальные искусственные хромосомы (BAC или PAC); эписомальные векторы; транспозоны (например, PiggyBac); и (b) вирусные векторы, такие как ретровирусные векторы, лентивирусные векторы, аденовирусные векторы и AAV векторы. Вирусы имеют несколько преимуществ для

доставки нуклеиновых кислот, включая высокую инфекционность и/или тропизм к определенным целевым клеткам или тканям. В некоторых случаях, вирус используют для того, чтобы доставлять молекулу нуклеиновой кислоты или экспрессирующую кассету, содержащую один или более регуляторных элементов, как раскрыто в настоящем описании, функционально связанных с трансгеном.

[111] Предпочтительные характеристики вирусных генно-терапевтических векторов или векторов доставки генов включают способность к воспроизводимости и стабильному размножению и очистке до высоких титров; опосредовать направленную доставку (например, чтобы доставлять трансген, в частности, в ткань или орган, представляющие интерес, без обширной диссеминации вектора в другом месте или доставки вне мишени); и опосредовать доставку гена и/или экспрессию трансгена, не вызывая вредных побочных эффектов или эффектов вне мишени. Для того чтобы избежать потенциальных вредных побочных эффектов, направленной экспрессии или селективной экспрессии в определенных тканях/типах клеток можно достичь, помещая трансген под управление селективного регуляторного элемента для определенного типа клеток, например, одного или более из SEQ ID NO: 1–32, или функционального фрагмента или их сочетание, или последовательностей, обладающих по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей с ними, энхансера, промотора, элемента стабильности, UTR или их сочетание. Например, вирусные частицы, содержащие вирусный вектор, можно разрабатывать для того, чтобы инфицировать многие различные типы клеток, но экспрессию трансгена усиливают и/или оптимизируют в типе клеток, представляющем интерес, (например, PV нейроны), и экспрессию трансгена снижают и/или минимизируют в других не целевых типах клеток (например, не PV клетках CNS). Дифференциальную экспрессию трансгена в различных типах клеток можно контролировать, конструировать или манипулировать ею с использованием различных факторов транскрипции или регуляторных элементов, которые селективны к одному или более типам клеток. В некоторых случаях, один или более регуляторных элементов, таких как промотор или энхансер, или их сочетание, функционально связывают с трансгеном для того, чтобы управлять селективной экспрессией трансгена в определенной ткани или клетках. В некоторых случаях, один или более регуляторных элементов, используемых в генной терапии или векторе, управляют экспрессией гена селективным образом в определенном типе клеток, т. е., обеспечивают селективную экспрессию гена в целевой клетке, типе клеток или ткани, и/или не управляют экспрессией гена в одной или более (например, по меньшей мере одной, двух, трех или четырех) клетках или типах клеток вне мишени. В некоторых случаях, один или более регуляторных элементов, функционально связанных с трансгеном, усиливают селективную экспрессию трансгена в целевых клетке, типе клеток или ткани, тогда как один или более регуляторных элементов подавляют экспрессию трансгена в клетках, типе клеток или ткани вне мишени или обеспечивают значительно более низкую, *de minimis*, или статистически более низкую экспрессию гена в

одной или более клетках, типах клеток или ткани вне мишени.

[112] Несколько серотипов AAV, непатогенного парвовируса, сконструировано для целей доставки генов, некоторые из которых доподлинно имеют тропизм к определенным тканям или типам клеток. Можно конструировать вирусы, используемые для различных генно-терапевтических применений, обладающие недостаточностью репликации или низкой токсичностью и низкой патогенностью у субъекта или хозяина. Такие вирусные векторы можно получать, удаляя все или некоторые из кодирующих областей из вирусного генома и оставляя интактными те последовательности (например, последовательности инвертированных концевых повторов), которые необходимы для функций, таких как упаковка генома вектора в вирусный капсид или встраивание нуклеиновой кислоты вектора (например, ДНК) в хроматин хозяина. Экспрессирующую кассету, содержащую трансген, например, можно клонировать в вирусный каркас, такой как модифицированный или сконструированный вирусный каркас, не содержащий вирусные гены, и использовать в сочетании с дополнительными векторами (например, пакующими векторами), которые могут, например, при совместной трансфекции, продуцировать частицы рекомбинантного вирусного вектора. В некоторых случаях, серотип AAV, который может пересекать гематоэнцефалический барьер или инфицировать клетки CNS, является предпочтительным. В некоторых случаях, AAV9 или его вариант используют для того, чтобы доставлять экспрессирующую кассету по этому раскрытию, которая содержит один или более PV-селективных регуляторных элементов, функционально связанных с трансгеном.

[113] Одно преимущество доставки экспрессирующих кассет по этому раскрытию с использованием генной терапии, например, rAAV, как раскрыто в настоящем описании, состоит в том, что такая терапия может обеспечивать более направленные и продолжительные терапевтические эффекты с течением времени. Дополнительно, можно конструировать вирусную генную терапию, которая обладает тропизмом к типу клеток или ткани, представляющим интерес, относительно не целевых типов клеток или тканей. Например, вирусную генную терапию можно конструировать для того, чтобы инфицировать и доставлять полезную нагрузку или терапевтическое средство, например, транскрипционный модулятор или трансген, в одну или более областей, тканей или типов клеток в CNS (например, PV клетки), при этом имея минимальные эффекты, оказываемые на ткани или типы клеток вне мишени (например, ткань или типы клеток не CNS, не PV клетки CNS). В некоторых случаях, вирусную генную терапию можно конструировать для того, чтобы доставлять трансген через гематоэнцефалический барьер и/или направлять в конкретную область или ткань в CNS (например, гиппокамп) или тип клеток в CNS, например, PV клетки.

[114] В некоторых случаях, AAV вектор или AAV вирусная частица или вирион, используемые для того, чтобы доставлять один или более регуляторных элементов и трансген в клетку, тип клеток или ткань, *in vivo* или *in vitro*, предпочтительно имеет дефицит репликации. В некоторых случаях, AAV вирус конструируют или генетически

модифицируют с тем, чтобы он мог реплицироваться и создавать вирионы только в присутствии хелперных факторов.

[115] В некоторых случаях, экспрессирующую кассету разрабатывают для доставки с помощью AAV или рекомбинантного AAV (rAAV). В некоторых случаях, экспрессирующую кассету доставляют с использованием лентивируса или лентивирусного вектора. В некоторых случаях, более крупные трансгены, т. е. гены, которые превышают клонирующую емкость AAV, предпочтительно доставляют с использованием лентивируса или лентивирусного вектора.

[116] AAV, используемый в композициях и способах описанных в настоящем описании, может представлять собой любой серотип (например, AAV1, AAV2, AAV5, AAV8, AAV9 и AAVDJ), включая гибридные или химерные серотипы AAV. В некоторых случаях, AAV используют для того, чтобы доставлять и/или экспрессировать трансген, функционально связанный с одним или более регуляторными элементами, которые селективны к PV нейронам по сравнению с не PV клетками CNS. В некоторых случаях, используют AAV, который имеет высокий тропизм к клеткам CNS и/или пересекает гематоэнцефалический барьер. В некоторых случаях, AAV1, AAV8, AAV9 и/или AAVDJ используют для того, чтобы доставлять для того, чтобы доставлять экспрессирующую кассету, описанную в настоящем описании.

[117] В некоторых случаях, экспрессирующая кассета содержит один или более селективных регуляторных элементов PV клеток или один или более регуляторных элементов, раскрытых в настоящем описании, функционально связанных с трансгеном, который доподлинно недостаточно экспрессирован *in vivo*, например, при заболевании или состоянии, ассоциированном с гаплонедостаточностью в гене. В некоторых случаях, трансген представляет собой потенциалзависимый ионный канал (например, натриевый ионный канал или калиевый ионный канал), регулятор нейромедиатора или субъединицу или ее функциональный фрагмент. В некоторых аспектах, трансген представляет собой ДНК–связывающий белок, ионный канал, регулятор нейромедиатора или субъединицу ионного канала или регулятора нейромедиатора. В некоторых случаях, трансген представляет собой ДНК–связывающий белок, который содержит один или более цинковых пальцев. В некоторых случаях, ДНК–связывающий белок содержит домен Cas9, белка семейства Cas, Cas9 с инактивированной нуклеазной активностью (или dCas9), белок семейства dCas, или подобный активатору транскрипции эффектор (TALE). В некоторых случаях, трансген представляет собой ДНК–связывающий белок, который содержит ДНК–связывающий домен ДНК–связывающего белка или ДНК–расщепляющего белка (например, нуклеазы, рестрикционного фермента, рекомбиназы и т. д.), где ДНК–расщепляющий домен или нуклеазный домен дезактивирован, например, Cas с дезактивированной нуклеазной активностью (dCas), дезактивированная подобная активатору транскрипции эффекторная нуклеаза или белок с цинковыми пальцами с дезактивированной нуклеазной активностью. В некоторых случаях, ДНК–связывающий домен связывают с транскрипционным модулирующим доменом (например, доменом

транскрипционного активатора или репрессора). В некоторых случаях, трансген содержит редактирующий гены белок, например, белок Cas, Cas9.

[118] В некоторых аспектах, трансген представляет собой потенциалзависимый ионный канал или его субъединицу, такую как SCN1A, SNC2A, SNC8A, SCN1B, SCN2B, KV3.1, KV3.2 или KV3.3, или ее функциональный фрагмент или вариант. В некоторых случаях, трансген представляет собой α -субъединицу натриевого ионного канала. В некоторых случаях, трансген представляет собой β -субъединицу натриевого ионного канала. В некоторых аспектах, регулятор нейромедиатора представляет собой STXBP1 или его функциональный фрагмент или вариант.

[119] В некоторых аспектах, экспрессирующую кассету доставляют в виде вирусного вектора, такого как AAV. В некоторых аспектах, AAV представляет собой AAV1, AAV8, AAV9, AAV-DJ, scAAV1, scAAV8 или scAAV9. В некоторых аспектах, генную терапию, содержащую экспрессирующую кассету по этому раскрытию, вводят нуждающемуся в этом субъекту (например, пациенту-человеку, млекопитающему, трансгенному животному или в животную модель). В некоторых случаях, субъект, нуждающийся в этом, имеет симптомы, имеет диагноз или имеет риск развития болезни Альцгеймера, синдрома Драве, эпилепсии, нейродегенерации, таупатии, нейрональной гиповозбудимости и/или пароксизмов. В некоторых случаях, субъект, нуждающийся в этом, имеет недостаточную экспрессию гена или мутацию в любом одном или более из SCN1A, SNC2A, SNC8A, SCN1B, SCN2B, KV3.1, KV3.2, KV3.3 и STXBP1.

[120] В некоторых случаях, генную терапию, такую как rAAV9, используют для того, чтобы доставлять экспрессирующую кассету, содержащую один или более селективных регуляторных элементов PV клеток или один или более регуляторных элементов, раскрытых в настоящем описании, функционально связанных с трансгеном, где трансген представляет собой SCN1A, SNC2A, SNC8A, SCN1B, SCN2B, KV3.1, KV3.2, KV3.3, STXBP1, ДНК-связывающий белок или его функциональный фрагмент или последовательность, обладающую по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентичностью последовательностей с любым одним из SCN1A, SNC2A, SNC8A, SCN1B, SCN2B, KV3.1, KV3.2, KV3.3, STXBP1, ДНК-связывающего белка или его функционального фрагмента. В некоторых случаях, трансген содержит последовательность, обладающую по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательностей с любой одной из SEQ ID NO: 37–43 или ее функциональным фрагментом, как предусмотрено в таблице 2 далее.

[121] В некоторых случаях, трансген представляет собой любое из SEQ ID NO: 36–43, или ее функционального фрагмента, или последовательностей, обладающих по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей с ними. В некоторых случаях, один или более регуляторных элементов, раскрытых в настоящем описании,

функционально связывают с любой одной из SEQ ID NO: 36–43 в экспрессирующей кассете, или ее функциональном фрагменте, или последовательностях, обладающих по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей с ней.

Таблица 2: список аминокислотных последовательностей, раскрытых в настоящем описании.

SEQ ID NO:	Ген	Аминокислотная последовательность
36	eGFP	MVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLT KFICTTGKLPVPWPTLVTTLTYGVCFSRYPDHMKQHDFFKSAMP EGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDG NILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLA DHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDH MVLL
37	SCN1B	MGTLALVVGAAALVSSAWGGCVEVDSDEAVYGMTFKILCISCK RRSETTAETFTWTFRQKGTEEFVKILPOЖNEVLQLEEDERFEGR VWNGSRGTKDLQDLSIFITNVTYNHSGDYECHVYRLLFFDNYEH NTSVVKKIHLEVVDKANRDMASIVSEIMMYVLIVLTIWLVAEMV YCYKKIAAATEAAQENASEYLAITSESKENCTGVQVAE
38	SCN2B	MHRDAWLPRPAFSLTGLSLFFSLVPPGRSMEVTVPATLNVL NGSD ARLPCTFNSCYTVNHKQFSLNWTYQECNNCSEEMFLQFRMKIINL KLERFQDRVEFSGNPSKYDVSVM LRNVQPEDEGIYNCYIMNPPDR HRGHGKIHLQVLMEEPPERDSTVAVIVGASVGGFLAVVILVLMVV KCVRRKKEQKLSTDDLKTEEEGKTDGEGNPDDGAK
39	SCN1A	MEQTVLVPPGPDSFNFFTRESLAAIERIAEEKAKNP KPDKKDDDE NGPKPNSDLEAGKNLPFIYGDIPPEMVSEPLEDLPYYINKKTFIVL NKGKAI FRFSATSALYILTPFNPLRKIAIKILVHSLFSMLIMCTILTNC VFMTMSNPPDWTKNVEYTFTGIYTFESLIKIIARGFCLEDFTFLRDP WNWLDFTVITFAYVTEFVDLGNVSALRTFRVLRAKLTISVIPGLKT IVGALIQSVKKLS DVMILTVFCLSVFALIGLQLFMGNLRN KCIQWP PTNASLEEH SIEKNITVNYNGTLINETVFEFDWKS YIQDSRYHYFLE GFLDALLCGNSSDAGQCPEGYMCVKAGRNP NYGYTSFDTFSWAF LSLFR LMTQDFWENLYQLTLRAAGKTYMIFVFLVIFLGSFYLINLIL AVVAMAYEEQNQATLEEAEQKEAEFQQMIEQLKKQQEAAQQA TATASEHSREPSAAGRLSDSSSEASKLSSSAKERRNRRKKRKQKE QSGGEEKDEDEFQKSESEDSIRRKGRFRFSIEGNRLTYEKRYSSPHQS LLSIRGSLFSPRRNSRTSLFSFRGRAKDV GSEND FADDEHSTFEDNE SRRDSL FVPRRHGERRNSNLSQTSRSSRMLAVFPANGKMHSTVDC NGVVS LVGGPSVPTSPVGQLLPEVIIDKPATDDNGTTTETEMRKRR SSSFHVSMDFLEDPSQRQRAMSIA SILTNTVEELEE SRQKCPPCWY KFSNIFLIWDCSPYWLKV KHVVN LVMDPFVDLAITICIVLNTLFM AMEHYPM TDHFNNVLT VGNLVFTGIFTAEMFLKIIAMDPYYYFQE GWNIFDGFIVTSLVELGLANVEGLSVLRSFRLLRVFKLAKSWPTL NMLIKIIGNSVGALGNLTLVLAII VFIFAVVGMQLFGKSYKDCVCKI ASDCQLPRWHMNDFFHSFLIVFRVLCGEWIETMWDCMEVAGQA MCLTVFMMVMVIGNLVVLNLFALLSSFSADNLAATDDDNEMN NLQIAVDRMHKGVAYVKRKIYEFIQQS FIRQKILDEIKPLDDLNN KKDSCMSNHTAEIGKDL DYLKDVNGTTSGIGTGSSVEKYIIDESDY

SEQ ID NO:	Ген	Аминокислотная последовательность
		MSFINNPSLTVTVPIAVGESDFENLNTEDFSSSEDLEESKEKLNNESS SSSEGSTVDIGAPVEEQPVVEPEETLEPEACFTEGCVQRFKCCQINV EEGRGKQWWNLRRTCFRIVEHNWFETFIVFMILLSSGALAFEDIYI DQRKTIKTMLEYADKVFTYIFILEMLLKWVAYGYQTYFTNAWCW LDFLIVDVSLVSLTANALGYSELGAIKSLRTLRLRPLRLSRFEG MRVVVNALLGAIPSIMNVLLVCLIFWLIFSIMGVNLFAGKFYHCIN TTTGDRFDIEDVNNHTDCLKLIERNETARWKNVKVNFNDNVGFGY LSLLQVATFKGWMDIMYAAVDSRNVELQPKYEEESLYMYLYFVIFI IFGSFFTLNLFIVIIDNFNQKKKFGGQDIFMTEEQKKYYNAMKK LGSKKPQKPIPRPGNKFQGMVDFVTRQVFDISIMILICLNMVTMM VETDDQSEYVTILSRINLVFIVLFTGECVLKLISLRHYFTIGWNIF DFVVVILSIVGMFLAELIEKYFVSPTLFRVIRLARIGRILRLIKGAKGI RTLLFALMMSLPALFNIGLLLFLVMFIYAIFGMSNFAYVKREVGID DMFNFETFGNSMICLFQITTSAGWDGLLAPILNSKPPDCDPNKVNP GSSVKGDCGNPSVGIFFFVSYIIISFLVVVNMYIAVILENFSVATEES AEPLSEDDFEMFYEVWEKFDPDATQFMEFEKLSQFAAALEPPLNL PQPNKLQLIAMDLPMVSGDRIHCLDILFAFTKRVLGESGEMDALRI QMEERFMASNPISKVSYQPITTTLKRKQEEVSAVIIQRAYRRHLLKR TVKQASFTYNKNKIKGGANLLIKEDMIIDRINENSITEKTDLTMTSA ACPPSYDRVTKPIVEKHEQEGKDEKAKGK
40	STXBP 1	MAPIGLKAVVGEKIMHDVIKKVKKKGEWKVLVVDQLSMRMLSS CCKMTDIMTEGITIVEDINKRREPLPSLEAVYLITPSEKSVHSLISDF KDPPTAKYRAAHVFFTDSCPDALFNELVKSRAAKVIKTLTEINIAF LPYESQVYSLDSADSFQSFYSPHKAQMKNPILERLAEQIATLCATL KEYPAVRYRGEYKDNALLAQLIQDKLDAYKADDPTMGEGPDKA RSQLLILDRGFDPPSPVLHELTFQAMSYDLLPIENDVYKYETSGIGE ARVKEVLLDEDDDLWIALRHKHIAEVSQEVTRSLKDFSSSKRMNT GEKTTMRDLSQMLKKMPQYQKELSKYSTHLHLAEDCMKHYYQGT VDKLCRVEQDLAMGTDAEGEKIKDPMRAIVPILLDANVSTYDKIRI ILLYIFLKNGITEENLNKLIQHAQIPPEDSEITNMAHLGVPIVTDSTL RRRSKPERKERISEQTYQLSRWTPIIKDIMEDTIEDKLDTKHYPYIST RSSASFSTTAVSARYGHWKKNKAPGEYRSGPRLIIFILGGVSLNEM RCAYEVTQANGKWEVLIGSTHILTPTKFLMDLRHPDFRESSRVSE DQAPTME
41	KV3.1	MGQGDESERIVINVGGTRHQTYRSTLRTLPGTRLAWLAEPDAHSH FDYDPRADEFFFFDRHPGVFAHILNYYRTGKLHCPADVCGPLYEEE LAFWGIDETDVEPCCWMTYRQHRDAEEALDSFGGAPLDNSADDA DADGPGDSGDGEDELEMTKRLALS DSPDGRPGGFWRWQPRIWA LFEDPYSSRYARYVAFASLFFILVSITTFCLETHERFNPIVNKTEIEN VRNGTQVRYRYREAETEAFLTYIEGVCVWVWTFEFLMRVIFCPNKV EFIKNSLNIIDFVAILPFYLEVGLSGLSSKAAKDVGLGFLRVVRVFRIL RIFKLTRHFVGLRVLGHTLRASTNEFLLLIIFLALGVLI FATMIYYAE RIGAQPNDPSASEHTHFKNIPIGFWWAVVTMTTLGYGDMYPQTW SGMLVGALCALAGVLTIAMPVVIVNNFGMYYSLAMAKQKLPKK KKKHIPRPPQLGSPNYCKSVVNSPHHSTQSDTCPLAQEEILEINRAG RKPLRGMSI
42	KV3.2	MGKIESNERVILNVGGTRHETYRSTLKTLPGTRLALLASSEPGQDC LTAAGDKLQPLPPPLSPPPRPPPLSPVPSGCFEGGAGNCSSHGGNG GNGGSDHPGGGREFFFFDRHPGVFAVVLNYYRTGKLHCPADVCGP

SEQ ID NO:	Ген	Аминокислотная последовательность
		LFEEELAFWGIDETDVEPCCWMTYRQHRDAEEALDIFETPDLLIGG DPGDDDEDLAAKRLGIEDAAGLGPGDGKSGRWRKLQPRMWALFE DPYSSRAARFIAFASLFFILVSITTFCLETHEAFNIVKNKTEPVINGT SPVLQYEIETDPALTYVEGVCVVWFTFEFLVRIVFSPNKLEFIKNLL NIIDFVAILPFYLEVGLSGLSSKAAKDVLGFLRVVRFVRILRIFKLTR HFVGLRVLGHTLRASTNEFLLLIIFLALGVLFATMIYYAERVGAQP NDPSASEHTQFKNIPIGFWWAVVTMTTLGYGDMYPQTSWGMVLV GALCALAGVLTIAMPPVPVIVNNFGMYYSLAMAKQKLPRKRKKHI PPAPLASSPTFCKTELNMACNSTQSDTCLGKENRLLLEHNRSVLSGD DSTGSEPPLSPPERLPIRRSSTRDKNRRGETCFLTTGDYTCASDGG IRKASTLEPMESTAQTKGDRPEAHWNCAHLLNFGCPTGSSSFTL
43	KV3.3	MLSSVCVSSFRGRQGASKQQPAPPPQPPEPPPPPLPPQQQQAQP GPAASPAGPPAPRGPGRRAEPCPLPAAAMGRHGGGGGDSGKI VINVGGVRHETYRSTLRTLPGTRLAGLTEPEAAARFDYDPGADEF FFDRHPGVFA YVLNYYRTGKLHCPADVCGPLFEEELGFWGIDETD VEACCWMTYRQHRDAEEALDSFEAPDPAGAANAANAAGAHG LDDEAGAGGGGLDGAGGELKRLCFQDAGGGAGGPPGGAGGAGG TWWRRWQPRVWALFEDPYSSRAARYVAFASLFFILISITTFCLETH EGFIHISNKTVTQASPIPGAPPENITNVEVETEPFLTYVEGVCVVWF TFEFLMRITFCPDKVEFLKSSLNIIDCVAILPFYLEVGLSGLSSKAAK DVLGFLRVVRFVRILRIFKLTRHFVGLRVLGHTLRASTNEFLLLIIFL ALGVLFATMIYYAERIGADPDDILGSNHTYFKNIPIGFWWAVVTM TTLGYGDMYPKTWSGMLVGALCALAGVLTIAMPPVPVIVNNFGM YYSLAMAKQKLPKKKNKHIPRPPQPGSPNYCKPDPPPPPPPHPHG SGGISPPPPITPPSMGVTVAGAYPAGPHTHPGLLRGGAGGLGIMGL PPLPAPGEPCPLAQEEVIEINRADPRPNGDPAAAALAHEDCPAIDQP AMSPEDKSPITPGSRGRYSRDRACFLLDYAPSPDGSIRKATGAPP LPPQDWRKPGPPSFLPDNLNANAAAWISP

[122] В некоторых случаях, один или более селективных регуляторных элементов PV клеток содержат последовательности SEQ ID NO: 1–32, функциональный фрагмент или их сочетание, или последовательности, обладающие по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательностей с ними. В некоторых случаях, идентичность последовательностей измеряют с помощью BLAST. В некоторых случаях, такую генную терапию используют для того, чтобы лечить эпилепсии, нейродегенерацию, таупатию, нейрональную гиповозбудимость, синдром Драве и/или болезнь Альцгеймера. В некоторых случаях, такую генную терапию используют для того, чтобы лечить эпилепсию и/или пароксизмы, ассоциированные с синдром Драве и/или болезнью Альцгеймера. В некоторых случаях, лечение с использованием генной терапии, описанной в настоящем описании, ведет к сниженной частоте и/или длительности пароксизмов. В некоторых случаях, лечение с использованием генной терапии, описанной в настоящем описании, ведет к увеличенному формированию функциональных натриевых ионных каналов, функциональных калиевых ионных каналов или функционального регулятора нейромедиатора *in vivo*.

[123] В некоторых случаях, серотипы 1, 8 и/или 9 AAV или их гибрид можно использовать с экспрессирующими кассетами, описанными в настоящем описании, чтобы направлять селективную экспрессию в PV клетки. В некоторых случаях, экспрессирующая кассета, разработанная для доставки с помощью AAV, содержит 5' ITR, один или более селективных регуляторных элементов клеток определенного типа, необязательный энхансер, необязательный минимальный промотор, трансген, необязательно один или более интронов, необязательный сигнал polyA и 3' ITR. В некоторых случаях экспрессирующая кассета может содержать 5' ITR, селективные RE двух типов клеток, основной промотор, трансген, один или более посттранскрипционных РНК регуляторных элементов и 3' ITR.

[124] Образцовая AAV экспрессирующая кассета проиллюстрирована на фиг. 7. В некоторых случаях, экспрессирующая кассета содержит 5' AAV ITR, энхансер (например, селективный энхансер PV клеток или один или более комбинированных регуляторных элементов), промотор (например, один или более селективных промоторов или регуляторных элементов PV клеток), трансген (например, SCN1A, SNC2A, SNC8A, SCN1B, SCN2B, KV3.1, KV3.2, KV3.3, STXBP1 или ДНК-связывающий белок), посттранскрипционный регуляторный элемент и 3' AAV ITR. Промотор может представлять собой селективный к PV клеткам или конститутивный промотор. В некоторых случаях, трансген представляет собой репортерный ген, например, кодирующую последовательность для eGFP, RFP или флуоресцентного маркера. В других случаях, трансген представляет собой ДНК-связывающий белок, который модулирует экспрессию гена.

[125] В некоторых случаях, трансген представляет собой терапевтический трансген, например, кодирующую последовательность для SCN1A, SNC2A, SNC8A, SCN1B, SCN2B, KV3.1, KV3.2, KV3.3, STXBP1 или ДНК-связывающего белка, или функционального фрагмента или последовательности, обладающей по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей с ними. Посттранскрипционный регуляторный элемент может представлять собой любую последовательность, которая влияет на экспрессию белка с мРНК или стабильность РНК, например, интрон, внутренний участок связывания рибосомы (IRES) или посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков. В некоторых случаях, посттранскрипционный регуляторный элемент представляет собой комбинацию двух или больше посттранскрипционных регуляторных элементов.

[126] Экспрессирующую кассету можно разрабатывать для доставки с помощью оптимизированного терапевтического ретровирусного вектора, например, лентивирусного вектора. Ретровирусный вектор может представлять собой лентивирусный вектор, содержащий левую (5') LTR; последовательности, которые способствуют упаковке и/или ядерному импорту вируса, по меньшей мере один селективный регуляторный элемент клеток определенного типа, необязательно лентивирусный элемент обратного ответа

(RRE); необязательно промотор или его активную часть; трансген, функционально связанный с одним или более регуляторными элементами; необязательно инсулятор; и правую (3') ретровирусную LTR.

[127] В некоторых случаях, экспрессирующая кассета содержит один или более селективных регуляторных элементов клеток определенного типа, раскрытых в настоящем описании. В некоторых случаях, экспрессирующая кассета содержит два или больше комбинированных регуляторных элементов. В некоторых примерах, экспрессирующая кассета содержит два или больше регуляторных элементов, которые не объединяют, например, промотор выше по направлению считывания от трансгена и энхансер или элемент стабильности, расположенный ниже по направлению считывания от трансгена.

[128] В некоторых случаях, экспрессирующая кассета содержит предполагаемый селективный регуляторный элемент клеток определенного типа, который обладает селективной активностью в типе клеток, представляющем интерес, например, предполагаемый селективный регуляторный элемент PV клеток. Экспрессирующую кассету, содержащую предполагаемый регуляторный элемент, можно упаковывать в вирусный вектор и трансфицировать в животную модель для того, чтобы оценивать активность предполагаемого селективного регуляторного элемента клеток определенного типа. В некоторых случаях, предполагаемый селективный регуляторный элемент определенного типа клеток можно оценивать *in vitro* или *ex vivo* посредством доставки вектора, содержащего предполагаемый селективный регуляторный элемент определенного типа клеток, во множество клеток или типов клеток, которые включают целевые клетку или тип клеток, и последующего сравнения селективной активности в отношении типа клеток у предполагаемого регуляторного элемента с контрольным регуляторным элементом, таким как конститутивный промотор или регуляторный элемент, или ранее известный регуляторный элемент.

[129] В некоторых случаях, селективную экспрессию используют для того, чтобы селективно экспрессировать терапевтический фрагмент или трансген в типе клеток, представляющем интерес (или типе ткани, представляющем интерес), таком как PV нейроны в CNS. В некоторых случаях, вектор, содержащий селективный регуляторный элемент клеток определенного типа, функционально связанный с трансгеном, ведет к увеличенной селективной экспрессии трансгена в типе клеток, представляющем интерес, по сравнению с одним или более (например, по меньшей мере двумя, тремя, четырьмя или пятью) другими клетками, типами клеток, тканями или типами тканей, или ведет к предпочтительной экспрессии трансгена в типе клеток, представляющем интерес, по сравнению с одной или более клетками или типами клеток, например, по меньшей мере одним, двумя, тремя, четырьмя или пятью не целевыми типами клеток.

[130] Любой известный прием можно использовать для того, чтобы доставлять регуляторные элементы и трансген или композиции, содержащие регуляторные элементы и трансген, в клетки, представляющие интерес (или целевые клетку или тип клеток),

чтобы вызывать или индуцировать экспрессию трансгена *in vitro*, *in vivo* или *ex vivo* селективным образом в определенном типе клеток.

[131] Экспрессирующие кассеты, содержащие селективные регуляторные элементы клеток определенного типа по этому раскрытию, дополнительно содержат один или более трансгенов. Трансгены могут представлять собой кодирующие белок гены. В некоторых случаях, экспрессирующая кассета содержит трансген. Трансген может замещать отсутствующий или дефектный ген, или компенсировать недостаточную экспрессию белка внутри клетки. Трансген может быть вовлечен путь передачи сигнала клетки. В некоторых случаях, трансген может кодировать белок дикого типа, его функциональный фрагмент, вариант или мутантный белок, имеющий усиленные терапевтические свойства, например, усиленную активность. В некоторых случаях, трансген может кодировать ДНК–связывающий белок, содержащий один или цинковый палец или домен dCas9, ионный канал, такой как калиевый ионный канал или натриевый ионный канал или его субъединица, нейромедиаторный фактор или регулятор нейромедиатора. В некоторых случаях, трансген может кодировать субъединицу ионного канала, ее вариант или мутант. В некоторых случаях, трансген представляет собой ДНК–связывающий белок, который содержит ДНК–связывающий домен ДНК–связывающего белка или ДНК–расщепляющего белка (например, нуклеазы, рестрикционного фермента, рекомбиназы и т. д.), в котором ДНК–расщепляющий домен или нуклеазный домен дезактивирован, например, Cas с дезактивированной нуклеазной активностью (dCas), дезактивированная подобная активатору транскрипции эффекторная нуклеаза или белок с цинковыми пальцами с дезактивированной нуклеазной активностью. В некоторых случаях, ДНК–связывающий домен связывают с транскрипционным модулирующим доменом (например, доменом транскрипционного активатора или репрессора). В некоторых случаях, трансген содержит редактирующий гены белок, например, белок Cas, Cas9.

[132] Регуляторные элементы, раскрытые в настоящем описании, можно располагать в любом положении в экспрессирующем векторе или кассете. Например, регуляторные элементы можно располагать выше по направлению считывания от энхансера, ниже по направлению считывания от энхансера, но выше по направлению считывания от промотора, в 5' UTR трансгена, в интроне в трансгене, в 3' UTR трансгена, или ниже по направлению считывания от трансгена. В некоторых случаях, один или более регуляторных элементов располагают выше по направлению считывания или ниже по направлению считывания от функционально связанного трансгена.

[133] В некоторых примерах, регуляторный элемент по этому раскрытию ведет к селективной экспрессии функционально связанного трансгена на уровне, который составляет по меньшей мере 0,5, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,5 или 3 МЕ/мл в целевом типе клеток (например, PV клетках), как измеряют посредством ELISA. В некоторых случаях, способность регуляторного элемента увеличивать экспрессию трансгена можно оценивать у мыши, у которой измеряют общее количество экспрессии трансгена во всей мышце и/или общее число типов клеток или типов тканей, имеющих

экспрессию трансгена.

[134] При оценке активности экспрессирующей кассеты или вектора, активность или экспрессию можно представлять как активность или уровень экспрессии на стандартную дозу или нормализовать по дозе экспрессирующей кассеты или вектора, вводимого или доставляемого в клетку, мышь или субъекту. В некоторых случаях, экспрессию или активность трансгена нормализуют по количеству плазмиды или ДНК (например, мкг/кг мышь) или вирусных частиц (например, нормализуют по количеству копий генома/кг на мышь или субъект), используемых для того, чтобы сделать возможным сравнение между различными экспрессирующими векторами или кассетами с регуляторным элементом или без него. Например, при оценке активности регуляторного элемента у мышь, селективную экспрессию или активность в анализируемых PV клетках можно нормализовать по дозе приблизительно 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более чем 10 или 720 мкг экспрессирующего вектора, кассеты или плазмиды на мышь. В некоторых случаях, уровень экспрессии или активность можно нормализовать по 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} , 10^{14} или 10^{15} гк/кг вирусных частиц, содержащих экспрессирующий вектор или кассету, как раскрыто в настоящем описании, на мышь.

[135] В некоторых аспектах, экспрессирующая кассета содержит один или более регуляторных элементов (например, любое одно или более из SEQ ID NO: 1–32, или функционального фрагмента или их сочетание, или последовательностей, обладающих по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей с ними), раскрытых в настоящем описании, функционально связанных с трансгеном, что ведет к селективной экспрессии в определенном типе клеток или преимущественной экспрессии трансгена в целевом типе клеток относительно по меньшей мере одного, по меньшей мере двух, по меньшей мере трех, по меньшей мере четырех, по меньшей мере пяти или больше чем пяти не целевых типов клеток. В некоторых случаях, экспрессирующая кассета содержит один или более регуляторных элементов, функционально связанных с трансгеном, что ведет к селективной экспрессии в определенном типе клеток или преимущественной экспрессии в целевом подтипе клеток относительно по меньшей мере одного, по меньшей мере двух, по меньшей мере трех, по меньшей мере четырех, по меньшей мере пяти или больше чем пяти не целевых подтипов или всех других известных подтипов клеток. В некоторых случаях, трансген представляет собой любое из SCN1A, SNC2A, SNC8A, SCN1B, SCN2B, KV3.1, KV3.3 и STXBP1, или его функционального фрагмента, или последовательностей, обладающих по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей с ними. В некоторых случаях трансген представляет собой ДНК–связывающий белок, который модулирует эндогенный ген (например, эндогенный SCN1A, SNC2A, SNC8A, SCN1B, SCN2B, KV3.1, KV3.2, KV3.3 или STXBP1). В некоторых случаях, трансген представляет собой любое из SEQ ID NO: 36–43, или их функционального фрагмента, или последовательностей, обладающих по меньшей мере

80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей с ним. В некоторых случаях, трансген представляет собой транскрипционный модулятор. В некоторых случаях, трансген представляет собой ДНК-связывающий белок, который содержит ДНК-связывающий домен ДНК-связывающего белка или ДНК-расщепляющего белка (например, нуклеазы, рестрикционного фермента, рекомбиназы и т. д.), в котором ДНК-расщепляющий домен или нуклеазный домен дезактивирован, например, Cas с дезактивированной нуклеазной активностью (dCas), дезактивированная подобная активатору транскрипции эффекторная нуклеаза или белок с цинковыми пальцами с дезактивированной нуклеазной активностью. В некоторых случаях, ДНК-связывающий домен связывают с транскрипционным модулирующим доменом (например, домен транскрипционного активатора или репрессора). В некоторых случаях трансген представляет собой редактирующий гены белок, такой как белок семейства Cas, Cas9, нуклеаза с цинковыми пальцами, нуклеаза с цинковыми пальцами или подобная активатору транскрипции эффекторная нуклеаза. В некоторых случаях, трансген представляет собой репортерный ген или флуоресцентный маркер. В некоторых случаях, экспрессирующая кассета, раскрытая в настоящем описании, находится в вирусном векторе. В некоторых случаях, экспрессирующую кассету, раскрытую в настоящем описании, упаковывают в gAAV, такой как gAAV9 или gAAVDJ. В некоторых случаях, экспрессирующую кассету, раскрытую в настоящем описании, доставляют в клетку в качестве генной терапии. В некоторых случаях, генную терапию, раскрытую в настоящем описании, доставляют субъекту, предпочтительно человеку или млекопитающему. В некоторых случаях, экспрессирующую кассету, раскрытую в настоящем описании, используют для того, чтобы лечить неврологическое состояние или заболевание, такое как эпилепсия, нейродегенеративное заболевание, таупатия, нейрональная гиповозбудимость, синдром Драве или болезнь Альцгеймера.

[136] В некоторых случаях, экспрессирующая кассета (например, генная терапия, вирусный вектор, вектор или плаزمид) содержит любое одно или более из SEQ ID NO: 1–32, или функционального фрагмента или их сочетания, или последовательностей, обладающих по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей с ними, которые функционально связаны с трансгеном. В некоторых случаях, такие комбинированные регуляторные элементы связывают с использованием линкера из 1–50 нуклеотидов. В некоторых случаях, такие комбинированные регуляторные элементы не связывают. В некоторых случаях, два или больше регуляторных элементов располагают выше и/или ниже по направлению считывания от промотора. В некоторых случаях, два или больше регуляторных элементов располагают выше и/или ниже по направлению считывания от трансгена.

[137] В некоторых случаях, экспрессирующая кассета содержит один или более регуляторных элементов, раскрытых в настоящем описании, когда функционально связана с любым трансгеном (например, репортерным трансгеном или терапевтическим

трансгеном), управляет селективной экспрессией или преимущественной экспрессией в по меньшей мере одном целевом типе клеток на уровне, который статистически значимо выше, чем экспрессия под управлением CAG, EF1 α , конститутивного промотора или неселективного регуляторного элемента, когда он функционально связан с тем же трансгеном, или с помощью той же конструкции без регуляторных элементов. В некоторых случаях, статистически значимо более высокий обозначает, что регуляторные элементы управляют селективной экспрессией в целевом типе клеток на уровне, который по меньшей мере в 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10, 10,5, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100 раз выше уровня экспрессии посредством CAG, EF1 α , конститутивного промотора или неселективного регуляторного элемента, когда он функционально связан с тем же трансгеном в целевом типе клеток, или с помощью той же конструкции без регуляторных элементов. В некоторых случаях, такую селективную экспрессию в определенном типе клеток анализируют с использованием анализа совместной локализации, как раскрыто в настоящем описании.

[138] В других аспектах, экспрессирующая кассета, содержащая один или более регуляторных элементов, раскрытых в настоящем описании, функционально связанная с любым трансгеном, раскрытым в настоящем описании, ведет к селективной экспрессии или преимущественной экспрессии трансгена в целевом типе клеток относительно по меньшей мере одного, по меньшей мере двух, по меньшей мере трех, по меньшей мере четырех, по меньшей мере пяти или больше чем пяти не целевых типов клеток или не целевых подтипов.

[139] В некоторых случаях, целевой тип клеток представляет собой PV клетку. В некоторых случаях, не целевые подтипы клеток представляют собой по меньшей мере один, по меньшей мере два, по меньшей мере три или по меньшей мере четыре не PV ГАМК-эргических подтипов, раскрытых в настоящем описании. В некоторых случаях, экспрессирующая кассета, содержащая регуляторный элемент, раскрытый в настоящем описании, селективна к PV клеткам относительно всех не PV ГАМК-эргических клеток или всех не PV клеток CNS. В некоторых случаях, избирательность к определенному типу клеток измеряют в соответствии с анализом совместной локализации, раскрытым в настоящем описании. В некоторых случаях, избирательность к определенному типу клеток измеряют с использованием мыши, которая экспрессирует Cre в целевом типе клеток.

Парвальбуминовые (PV) нейроны

[140] ГАМК-эргические нейроны продуцируют γ -аминомасляную кислоту (GABA), основной тормозной нейромедиатор в CNS. GABA важна для снижения нервной возбудимости по всей нервной системе. GABA действует на тормозные синапсы посредством связывания конкретных трансмембранных рецепторов и вызывая открывание ионных каналов, которые отрицательно меняют поляризацию мембраны. Обычно это ведет к гиперполяризации клетки и увеличивает сигнал, необходимый для того, чтобы

вызывать потенциал действия. Дефекты в ГАМК–эргических нейронах могут вести к дисбалансу между возбуждающими и тормозными сигналами и вовлечены во многие неврологические заболевания, включая синдром Драве, эпилепсию, нейродегенерацию, таупатии и болезнь Альцгеймера. Другие вовлеченные неврологические состояния или заболевания включают психиатрическое нарушение (например, шизофрению, обсессивно–компульсивное расстройство, зависимость, депрессию, беспокойство, психоз); нарушение аутического спектра (например, синдром ломкой X–хромосомы, синдром Ретта); эпилепсию (например, хроническую травматическую энцефалопатию, генерализованную эпилепсию с фебрильными пароксизмами плюс (GEFS+), эпилептическую энцефалопатию, эпилепсию височной доли, фокальную эпилепсию, туберозный склероз); и/или нейродегенерацию (например, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона). В некоторых случаях, неврологическое состояние или заболевание представляет собой любое связанное с пароксизмами и/или эпилепсией состояние или заболевание, в которое вовлечены PV нейроны.

[141] Парвальбумин представляет собой связывающий кальций белок, который экспрессируют приблизительно 40% всех ГАМК–эргических вставочных нейронов в соматосенсорной коре. В CNS, PV клетки обычно считаются ГАМК–эргическими клетками. В различных исследованиях также идентифицированы ГАМК–эргические клетки, которые включают различные подтипы клеток, включая клетки, которые экспрессируют PV, SOM, CR, CCK, NPY, VIP или их сочетание.

[142] PV нейроны, в частности, релевантны для различных неврологических заболеваний или состояний, таких как синдром Драве, болезнь Альцгеймера, эпилепсия, нейродегенерация, таупатии и/или пароксизмы. В некоторых случаях, PV нейрон–ассоциированное неврологическое состояние или заболевание представляет собой психиатрическое нарушение (например, шизофрению, обсессивно–компульсивное расстройство, зависимость, депрессию, беспокойство, психоз); нарушение аутического спектра (например, синдром ломкой X–хромосомы, синдром Ретта); эпилепсию (например, хроническую травматическую энцефалопатию, генерализованную эпилепсию с фебрильными пароксизмами плюс (GEFS+), эпилептическую энцефалопатию, эпилепсию височной доли, фокальную эпилепсию, туберозный склероз); или нейродегенерацию (например, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона). В некоторых случаях, неврологическое состояние или заболевание представляет собой любое связанное с пароксизмами и/или эпилепсией состояние или заболевание, в которое вовлечены PV нейроны. В различных аспектах целевая клетка представляет собой PV клетки в CNS или ГАМК–эргические клетки, которые экспрессируют PV.

[143] В различных аспектах PV–экспрессирующие вставочные нейроны также называют корзинчатыми клетками, которые дополнительно можно подразделять по размеру перикариона (например, большая корзинчатая клетка, малая корзинчатая клетка и гнездовая корзинчатая клетка) и дендритной и аксональной проекции. Физиологически PV–экспрессирующие корзинчатые клетки часто являются быстро разряжающимися (FS),

которые отличаются высокочастотной последовательностью потенциалов действия (AP) при небольшой адаптации. Общепринято, что PV корзинчатые нейроны иннервируют тела и проксимальные дендриты возбуждающих пирамидальных нейронов. Упреждающее торможение, опосредованное через FS PV–экспрессирующие корзинчатые нейроны, можно найти в некоторых корковых сетях, включая таламокорковые, трансламинарные и межрегиональные сети. FS PV корзинчатые нейроны сильно тормозят соседние возбуждающие пирамидальные нейроны. Показано, что PV корзинчатые нейроны и пирамидальные нейроны, которые имеют общие совместные возбуждающие входы, склонны к реципрокному соединению (торможение по принципу обратной связи). Эти соединения могут служить для того, чтобы регулировать точный временной интервал, в котором возбуждающие нейроны могут генерировать импульсы в ответ на возбуждающие стимулы. Кроме того, таламокорковые и внутрикоровые возбуждающие входы на FS PV корзинчатых нейронах подавляют с помощью высокочастотной стимуляции, которая опосредует зависящее от активности упреждающее торможение. PV–экспрессирующие корзинчатые клетки также иннервируют другие вставочные нейроны, в том числе другие корзинчатые клетки, и электрически сопряжены друг с другом через щелевые соединения. Сделано предположение, что эта особенность может помогать генерировать и поддерживать синхронизацию и осцилляцию корковой сети.

[144] В некоторых случаях, один или более регуляторных элементов, раскрытых в настоящем описании, ведут к увеличенной избирательности экспрессии гена в PV нейронах по сравнению с по меньшей мере одним, по меньшей мере двумя, по меньшей мере тремя, по меньшей мере четырьмя или по меньшей мере пятью не PV–экспрессирующими нейронами. В некоторых случаях, не PV клетки включают все не PV ГАМК–эргические клетки. В некоторых случаях, не PV ГАМК–эргические нейроны включают, но не ограничиваясь этим, клетки, экспрессирующие кальретинин (CR), соматостатин (SOM), холецистокинин (CCK), CR+SOM, CR+нейропептид Y (NPY), CR+вазоинтестинальный полипептид (VIP), SOM+NPY, SOM+VIP, VIP+холинацетилтрансферазу (ChAT), CCK+NPY, CR+SOM+NPY и CR+SOM+VIP.

[145] В некоторых случаях, любое из CAG, EF1 α , конститутивного промотора (например, SV40, CMV, UBC, PGK и CBA) или неселективного регуляторного элемента, которое управляет экспрессией гена в неселективным образом в отношении определенного типа клеток можно использовать для сравнения с PV–селективными регуляторными элементами или любыми селективными регуляторными элементами определенного типа клеток, раскрытыми в настоящем описании. В некоторых случаях, регуляторный элемент, который ведет к селективной экспрессии в PV клетках на уровне выше экспрессии гена, функционально связанного с CAG или EF1 α контролем, указывает на избирательность к PV клеткам. В некоторых случаях, регуляторный элемент, раскрытый в настоящем описании, демонстрирует селективную экспрессию гена в PV клетках, которая по меньшей мере на 2%, по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25%, по

меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, 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% или по меньшей мере на 95% выше, чем PV уровень экспрессии с трансгена, который функционально связывают с CAG, EF1 α , конститутивным промотором (например, SV40, CMV, UBC, PGK и CBA) или неселективным регуляторным элементом (например, SEQ ID NO: 34 или ее функциональный фрагмент или последовательность, обладающая по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей с ней), и как измеряют в анализе совместной локализации. В некоторых случаях, регуляторный элемент, раскрытый в настоящем описании, демонстрирует селективную экспрессию гена в PV клетках, которая по меньшей мере в 1,5 раза выше, по меньшей мере в 2 раза выше, по меньшей мере в 3 раза выше, по меньшей мере в 4 раза выше, по меньшей мере в 5 раз выше, по меньшей мере в 6 раз выше, по меньшей мере в 7 раз выше, по меньшей мере в 8 раз выше, по меньшей мере в 9 раз выше или по меньшей мере в 10 раз выше уровня экспрессии с CAG, EF1 α , конститутивного промотора (например, SV40, CMV, UBC, PGK и CBA) или неселективного регуляторного элемента (например, SEQ ID NO: 34, или ее функциональный фрагмент, или последовательность, обладающая по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей с ней) и как измеряют в анализе совместной локализации, описанном в настоящем описании.

[146] В предпочтительных случаях, один или более регуляторных элементов, описанных в настоящем описании, избирательно управляют экспрессией трансгена в ГАМК–эргической клетке, такой как ГАМК–эргическая клетка, которая экспрессирует парвальбумин, относительно по меньшей мере одного другого типа клеток CNS (например, по меньшей мере двух, по меньшей мере трех, по меньшей мере четырех, по меньшей мере пяти не PV клеток или двух или больше, трех или больше или четырех или больше не PV клеток и/или не PV ГАМК–эргических нейронов).

[147] В некоторых случаях, целевой тип клеток представляет собой ГАМК–эргический нейрон, который экспрессирует парвальбумин, или PV клетки.

[148] Один путь избирательной экспрессии трансгена в субпопуляции клеток в головном мозге состоит в использовании вирусного вектора, содержащего трансген, функционально связанный с селективным регуляторным элементом клеток определенного типа, или регуляторного элемента, который является селективным (или обладает селективной активностью) в субпопуляции клеток в головном мозге, например, PV клетках. Можно выбирать вирусный вектор, который обладает высокой инфекционностью без избирательности к конкретному типу клеток, тогда как регуляторный элемент придает избирательность. Например, селективный регуляторный элемент клеток определенного типа может управлять экспрессией трансгена в PV нейронах, но не в других нейронах.

[149] В некоторых случаях, настоящее раскрытие включает использование регуляторных элементов (т. е., селективных регуляторных элементов PV клеток), которые избирательно управляют экспрессией в PV нейронах.

[150] ГАМК–эргические клетки представляют собой тормозные нейроны, которые продуцируют γ -аминомасляную кислоту. ГАМК–эргические клетки можно идентифицировать по экспрессии декарбоксилазы глутаминовой кислоты 2 (GAD2). Другие маркеры ГАМК–эргических клеток включают GAD1, NKX2.1, DLX1, DLX5, SST, PV и VIP.

[151] В некоторых случаях, не PV клетка CNS представляет собой возбуждающий нейрон, дофаминергический нейрон, астроцит, микроглию, моторный нейрон или сосудистую клетку. В некоторых случаях, не ГАМК–эргический нейрон представляет собой клетку, которая не экспрессирует одно или более из GAD2, GAD1, NKX2.1, DLX1, DLX5, SST и VIP. В некоторых случаях, не PV нейрон представляет собой ГАМК–эргический нейрон, который не экспрессирует парвальбумин. В некоторых случаях другие клетки CNS относятся к типам клеток CNS, которые никогда не экспрессируют любое из PV, GAD2, GAD1, NKX2.1, DLX1, DLX5, SST и VIP.

[152] В некоторых случаях, регуляторный элемент, раскрытый в настоящем описании, селективен к PV–экспрессирующей клетке относительно по меньшей мере одной, двух, трех, четырех, пяти или больше чем пяти клеток CNS не PV типа. В некоторых случаях, типы не PV клеток включают не PV ГАМК–эргические клетки. В некоторых случаях, тип клеток, представляющий интерес, представляет собой PV клетку. В некоторых случаях, RE, селективные к PV клеткам, обозначают как селективные регуляторные элементы PV клеток.

[153] В некоторых случаях, селективные регуляторные элементы PV клеток, раскрытые в настоящем описании, включают последовательности SEQ ID NO: 1–32 или любое их сочетание.

[154] В некоторых случаях один или более селективных регуляторных элементов PV клеток или один или более регуляторных элементов, раскрытых в настоящем описании, используют для увеличения экспрессии трансгена в PV–экспрессирующих клетках по меньшей мере в 2, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 или больше раз по сравнению с экспрессией без регуляторного элемента. В некоторых случаях, RE в экспрессирующей кассете увеличивает экспрессию гена по меньшей мере на 1,5%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, или 50%, или больше чем 1,5%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% по сравнению с экспрессией без регуляторных элементов. В некоторых случаях, композиции и способы их использования включают экспрессирующие кассеты, содержащие один или более регуляторных элементов, которые ведут к 10–500% увеличению экспрессии трансгена, например, экспрессии SCN1A, SNC2A, SNC8A, SCN1B, SCN2B, KCNC1 (также известного как KV3.1), KCNC3 (также известного как KV3.3), STXBP1, ДНК–связывающего белка или, его варианта или функционального фрагмента, или его белка, по

сравнению с уровнем без регуляторных элементов или по сравнению с неселективным регуляторным элементом (например, CAG, EF1 α , конститутивный промотор, или SEQ ID NO: 34, или ее функциональный фрагмент, или последовательность, обладающая по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей с ней). В некоторых случаях, увеличение экспрессии гена и/или уровня белка любого одного из SCN1A, SNC2A, SNC8A, SCN1B, SCN2B, KCNC1, KCNC3 и STXBP1 составляет 1,5–5%, 5%–10%, 10–15%, 15–20%, 20–30%, 30–40%, 40–50%, 50–60%, 60–70%, 70–80%, 80–90%, 90–100%, 100–150%, 150–200%, 250–300%, 300–350%, 350–400%, 400–450%, 450–500%, или 1,5–20%, 20%–50%, 50%–100%, 100–200%, 200–300%, 300–400% или 400–500% по сравнению с уровнем без экспрессирующей кассеты или регуляторных элементов. В некоторых случаях, такая экспрессия гена или белка селективна к PV клеткам по сравнению с экспрессирующей кассетой, содержащей контроль (например, CAG, EF1 α , конститутивный промотор (например, SV40, CMV, UBC, PGK и CBA) или неселективный регуляторный элемент) или не селективный регуляторный элемент определенного типа клеток (например, SEQ ID NO: 34, или ее функциональный фрагмент, или последовательность, обладающая по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей с ней).

[155] В некоторых случаях, избирательность экспрессии в PV клетках можно вычислять посредством деления числа клеток, которые экспрессируют как PV, так и eGFP (трансген, функционально связанный с одним или более регуляторными элементами), на общее число клеток, которые экспрессируют eGFP, и умножения на 100 для преобразования в процентную долю. Селективные регуляторные элементы PV клеток, как раскрыто в настоящем описании, могут быть высоко селективными для экспрессии в PV клетках. Например, селективные регуляторные элементы PV клеток или один или более регуляторных элементов, раскрытых в настоящем описании могут проявлять приблизительно 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более чем приблизительно 99% избирательность к PV нейронам.

[156] В некоторых случаях, селективный регуляторный элемент PV клеток или любой регуляторный элемент, раскрытый в настоящем описании, придает избирательность экспрессии трансгена в PV нейронах на уровне, который статистически выше, чем контрольный регуляторный элемент, например, EF1 α или ранее известный регуляторный элемент. В некоторых случаях, статистическая разница между селективным регуляторным элементом PV клеток и контрольным регуляторным элементом составляет по меньшей мере 2–кратную, 5–кратную, 10–кратную, 20–кратную или больше чем 2–кратную разницу или больше чем 5–кратную, 10–кратную или 20–кратную разницу, как определяют любым одним из способов, описанных в настоящем описании, таких как анализ совместной локализации.

[157] Настоящее раскрытие включает регуляторные элементы, которые селективны к PV клеткам. Эти селективные к PV клеткам RE или селективные к любому типу клеток RE предпочтительно являются короткими, предпочтительно меньше чем приблизительно 1100 пар оснований, 1000 п. о., 900 п. о., 800 п. о., 700 п. о., 600 п. о., 500 п. о., 400 п. о., 300 п. о., 200 п. о. или меньше чем приблизительно 110 п. о. Селективные к PV клеткам RE или селективные к любому типу клеток RE могут составлять между 1050 п. о. и 100 п. о., между 100 п. о. и 500 п. о. или между 500 п. о. и 1050 п. о. Некоторые примеры селективных регуляторных элементов PV клеток предоставлены в SEQ ID NO: 1–32, или функциональном фрагменте или их сочетании. Другие селективные регуляторные элементы PV клеток, рассматриваемые в настоящем раскрытии, включают последовательности, обладающие по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей с любой из этих последовательностей, описанных в настоящем описании, или часть или фрагмент одной из последовательностей, описанных в настоящем описании.

[158] В некоторых случаях, селективный регуляторный элемент PV клеток или любой регуляторный элемент, раскрытый в настоящем описании, обладает по меньшей мере приблизительно 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше чем 99% идентичностью с последовательностью, описанной в настоящем описании, или фрагментом последовательности, описанной в настоящем описании. В некоторых случаях, селективный регуляторный элемент PV клеток имеет по меньшей мере приблизительно 80% идентичностью с по меньшей мере приблизительно 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 95% последовательности, описанной в настоящем описании, или ее функционального фрагмента.

[159] В некоторых случаях, селективный регуляторный элемент PV клеток обладает по меньшей мере 80% идентичностью с любой одной или более из SEQ ID NO: 1–32, или функциональным фрагментом или их сочетанием, или последовательностями, обладающими по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей с ними. В некоторых случаях, селективный регуляторный элемент PV клеток обладает 90% идентичностью с 50% или больше от последовательности SEQ ID NO: 1–22. В некоторых случаях, PV–селективный регуляторный элемент представляет собой функциональный фрагмент любой из SEQ ID NO: 1–32 или их сочетания. В некоторых случаях, функциональный фрагмент способен селективно экспрессировать трансген в PV клетках с по меньшей мере 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или более чем 95% избирательностью экспрессии в PV клетках.

[160] В некоторых случаях два или больше селективных регуляторных элементов PV клеток по этому раскрытию или любые два или больше регуляторных элементов, раскрытых в настоящем описании комбинируют для того, чтобы формировать комбинированные регуляторные элементы. В некоторых случаях, комбинируют два или

больше, три или больше, четыре или больше, пять или больше, шесть или больше, семь или больше, восемь или больше, девять или больше или десять или больше селективных регуляторных элементов PV клеток или множество регуляторных элементов, раскрытых в настоящем описании. Например, SEQ ID NO: 31 представляет собой комбинацию SEQ ID NO: 1 и 23–29. В качестве другого примера, SEQ ID NO: 32 представляет собой комбинацию SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 23–29. В некоторых случаях, фрагменты двух или больше PV–селективных регуляторных элементов можно комбинировать для того, чтобы формировать комбинированный регуляторный элемент. Например, 50% SEQ ID NO: 1 можно комбинировать с 30% SEQ ID NO: 8 и 90% SEQ ID NO: 30 для того, чтобы формировать комбинированный регуляторный элемент.

[161] В некоторых случаях, один или более селективных регуляторных элементов PV клеток по этому раскрытию или любой один или более регуляторных элементов, раскрытых в настоящем описании, избирательно экспрессирует функционально связанный трансген в PV нейронах по сравнению с одним или более другими типами клеток CNS. Количество этой селективной экспрессии можно определять посредством подсчета числа PV нейронов, которые экспрессируют поддающиеся обнаружению уровни связанного трансгена, в виде процентной доли общего числа клеток, экспрессирующих трансген, включая число не PV нейронов, которые экспрессируют трансген. Другими словами, избирательность PV регуляторного элемента в конкретном типе клеток или целевой клетке можно определять посредством измерения и/или сравнения числа PV нейронов (или целевых клеток), экспрессирующих трансген, который функционально связывают с регуляторным элементом, относительно числа не целевых типов клеток, которые экспрессируют трансген (или общего числа клеток, экспрессирующих трансген).

[162] В некоторых случаях, селективные регуляторные элементы PV клеток могут проявлять приблизительно 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или более чем приблизительно 99% избирательность к PV нейронам, PV нейронам в CNS или ГАМК–эргическим нейронам, которые также экспрессируют PV. В некоторых случаях, один или более регуляторных элементов по этому раскрытию могут проявлять приблизительно 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более чем приблизительно 99% избирательность к PV нейронам по сравнению с CAG или EF1 α или не селективным элементом определенного типа клеток или по сравнению с не PV клетками CNS или по сравнению с по меньшей мере одним, по меньшей мере двумя, по меньшей мере тремя, по меньшей мере четырьмя или по меньшей мере пятью другими не PV ГАМК–эргическими нейрональными подтипами в CNS.

[163] В некоторых случаях, PV–селективный регуляторный элемент придает избирательность экспрессии трансгена в PV нейронах на уровне, который статистически выше, чем контрольный регуляторный элемент, например, CAG, EF1 α , конститутивный промотор (например, SV40, CMV, UBC, PGK и CBA), неселективный регуляторный элемент или ранее известный регуляторный элемент. В некоторых случаях,

статистическая разница между селективным к PV клеткам RE и управляющим элементом составляет по меньшей мере 2-кратную, 5-кратную, 10-кратную, 20-кратную или больше чем 2-кратную разницу или больше чем 5-кратную, 10-кратную или 20-кратную разницу, как определяют любым одним из способов, описанных в настоящем описании. В некоторых случаях, избирательность в PV измеряют с использованием анализа совместной локализации, как раскрыто в настоящем описании.

[164] В некоторых аспектах, селективные регуляторные элементы клеток определенного типа, описанные в настоящем описании, можно использовать для избирательной модуляции экспрессии трансгена в определенном типе клеток CNS по сравнению с другими типами клеток CNS. Например, селективные регуляторные элементы клеток определенного типа, описанные в настоящем описании, можно использовать для избирательной модуляции экспрессии трансгена в PV клетках относительно других клеток CNS, включая другие типы нейронов. Для генной терапии, селективная экспрессия трансгена в целевом типе клеток и/или минимизированная экспрессия трансгена в не целевом типе клеток может быть желательной. Экспрессия трансгена в не предполагаемом типе клеток (например, не целевом типе клеток) может вести к нежелательному эффекту у субъекта. Экспрессия трансгена в не предполагаемом типе клеток может противодействовать терапевтическому эффекту трансгена в предполагаемом типе клеток. Например, трансген, предполагаемый для экспрессии в PV клетках, может оказывать негативный эффект на субъекта, если его экспрессируют в глутаматергических нейронах. Селективные регуляторные элементы клеток определенного типа, описанные в настоящем описании, можно использовать в экспрессирующих кассетах, чтобы обеспечивать подходящую экспрессию трансгена и/или снижать эффекты генной терапии вне мишени.

[165] Селективные регуляторные элементы клеток определенного типа в настоящем описании можно использовать в кассетах экспрессии гена, в соответствии с чем их функционально связывают с одним или более трансгенами. Такие кассеты экспрессии гена используют для того, чтобы доставлять трансгены в клетки для экспрессии. Экспрессирующая кассета может содержать селективный регуляторный элемент клеток определенного типа, как раскрыто в настоящем описании, комбинацию селективных регуляторных элементов клеток определенного типа или фрагмент селективного регуляторного элемента клеток определенного типа, как раскрыто в настоящем описании, функционально связанные с трансгеном.

[166] Предпочтительно, экспрессирующие кассеты в настоящем описании включают один или более селективных регуляторных элементов клеток определенного типа, функционально связанных с трансгеном, в соответствии с чем эти два не функционируют вместе в их эндогенном контексте *in vivo*. Например, трансген для β -субъединицы натриевого ионного канала, например, SCN1B, можно функционально связывать с одним или более регуляторными элементами, которые не функционируют в одном и том же контексте *in vivo*, или без возможности обнаружения управляют

экспрессией SCN1B эндогенно. Аналогичным образом, кассета нуклеиновой кислоты может содержать регулятор нейромедиатора, например, STXBP1, функционально связанный с регуляторным элементом, который не функционирует в том же контексте эндогенно или *in vivo*, или не находится в той же открытой рамке считывания, или не находится на той же хромосоме человека, или без возможности обнаружения управляет экспрессией STXBP1 *in vivo*. В некоторых случаях, селективный регуляторный элемент клеток определенного типа связывают с трансгеном, где селективный регуляторный элемент клеток определенного типа не регулирует эндогенный ген, соответствующий трансгену *in vivo*.

[167] В некоторых аспектах, селективные регуляторные элементы клеток определенного типа, раскрытые в настоящем описании, получают из последовательностей, выделенных из хромосомного локуса человека, отличного от локуса нативного гена, соответствующего трансгену. Таким образом, в некоторых случаях, экспрессирующая кассета содержит селективный регуляторный элемент(ы) определенного типа клеток, имеющий последовательность, получаемую из хромосомы, отличной от хромосомы, соответствующей трансгену в той же кассете. В других случаях, регуляторный элемент(ы) по раскрытию и трансген, которые функционально связывают в экспрессирующей кассете, получают из последовательностей, расположенных в геноме человека более чем в 20 т. о., или в отдаленных геномных местоположениях. Когда два или больше получаемых у человека регуляторных элемента используют в экспрессирующей кассете, два или больше регуляторных элементов могут иметь последовательности, расположенные в геноме человека более чем в 5 т. о., более чем в 10 т. о., более чем в 15 т. о. или больше чем в 20 т. о., или где два или больше регуляторных элементов не взаимодействуют в геноме друг с другом естественным образом.

[168] В некоторых случаях, экспрессирующая кассета, содержащая PV–селективные регуляторные элементы, может не содержать известные последовательности, получаемые из hSyn1 или промоторные последовательности GAD2. В некоторых случаях, PV–селективные регуляторные элементы не содержат полную промоторную последовательность любого одного из промоторов GAD2, GAD1, SYN1, NKX2.1, DLX1, DLX5, SST и VIP. В некоторых случаях, PV–селективные регуляторные элементы не содержат более чем 500 непрерывных пар оснований последовательности, полученной из промотора или одного или более из GAD2, GAD1, SYN1, NKX2.1, DLX1, DLX5, SST и VIP. В некоторых случаях, PV–селективные регуляторные элементы не содержат последовательности, которые находятся в пределах 1 т. о., 2 т. о., 3 т. о., 4 т. о., 5 т. о., 6 т. о., 7 т. о., 8 т. о., 9 т. о. или 10 т. о. от сайта инициации транскрипции любого одного из GAD2, SYN1, NKX2.1, DLX1, DLX5, SST и VIP.

[169] В некоторых случаях, трансген можно использовать для того, чтобы лечить заболевание, ассоциированное с конкретным типом клеток, представляющих интерес. В некоторых случаях, тип клеток, представляющий интерес, представляет собой нейрон, тормозной нейрон, ГАМК–эргический нейрон или PV нейрон. В некоторых случаях,

трансген представляет собой любой один или более из SCN1A, SNC2A, SNC8A, SCN1B, SCN2B, KV3.1, KV3.3 и STXBP1. В некоторых случаях, трансген представляет собой ДНК–связывающий белок, который модулирует экспрессию гена (например, транскрипционный активатор или транскрипционный репрессор, который модулирует экспрессию эндогенного гена). В некоторых случаях, трансген представляет собой редактирующий гены белок, такой как нуклеаза с цинковыми пальцами, подобная активатору транскрипции эффекторная нуклеаза, белок семейства Cas. В некоторых случаях, трансген представляет собой репортерный ген или поддающийся обнаружению маркер, такой как eGFP, tdTomato или RFP. В некоторых случаях, трансген представляет собой белок Cas, такой как Cas9.

[170] Трансгены, которые можно использовать для того, чтобы лечить состояние, ассоциированное с PV нейронными клетками, можно встраивать в вектор, кассету нуклеиновой кислоты или способ, как раскрыто в настоящем описании. Трансгены, используемые здесь, обычно не содержат интроны или не содержат более чем один интрон. Трансген можно получать из последовательности кДНК, а не из геномной последовательности. В некоторых случаях, трансгены могут содержать некоторые или все из их эндогенных интронов. В некоторых примерах такой трансген кодирует ДНК–связывающий домен или ионный канал. Примеры ДНК–связывающих доменов, которые можно кодировать в экспрессирующих кассетах по этому раскрытию, включают цинковые пальцы, Cas9, белок семейства Cas, dCas9, белок семейства dCas, или подобный активатору транскрипции эффектор (TALE). В некоторых случаях, трансген представляет собой ДНК–связывающий белок, который содержит ДНК–связывающий домен ДНК–связывающего белка или ДНК–расщепляющего белка (например, нуклеазы, рестрикционного фермента, рекомбиназы и т. д.), где ДНК–расщепляющий домен или нуклеазный домен дезактивирован, например, Cas с дезактивированной нуклеазной активностью (dCas), дезактивированная подобная активатору транскрипции эффекторная нуклеаза или белок с цинковыми пальцами с дезактивированной нуклеазной активностью. В некоторых случаях, ДНК–связывающий домен связывают с транскрипционным модулирующим доменом (например, доменом транскрипционного активатора или репрессора). В некоторых случаях, трансген содержит редактирующий гены белок, например, белок Cas, Cas9. В некоторых случаях, трансген представляет собой субъединицу или компонент ионного канала или мембранного белка или ген, ассоциированный с неврологическим состоянием или заболеванием, раскрытым в настоящем описании. Примеры трансгенов ионных каналов, которые можно использовать в экспрессирующих кассетах по этому раскрытию, включают потенциалзависимые и управляемые лигандами ионные каналы. Потенциалзависимые ионные каналы включают натриевые каналы, кальциевые каналы, калиевые каналы и протонные каналы. В некоторых случаях трансген кодирует субъединицу потенциалзависимого натриевого канала. Примеры субъединиц потенциалзависимых натриевых каналов включают SCN1B (NM_001037.4), SCN1A (NM_001165963.1) и SCN2B, (NM_004588.4).

[171] В некоторых случаях, трансген кодирует субъединицу потенциалзависимого калиевого канала. Примеры субъединиц потенциалзависимых натриевых каналов включают KCNC1 (NM_001112741.1) и KCNC3 (NM_004977.2). В некоторых случаях, трансген представляет собой любое одно или более из SCN1A, SNC2A, SNC8A, SCN1B, SCN2B, KV3.1, KV3.3, STXBP1, его варианта и функционального фрагмента. В некоторых случаях, трансген представляет собой последовательность, обладающую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или по меньшей мере 99,5% идентичностью последовательностей с любым одним из SCN1A, SNC2A, SNC8A, SCN1B, SCN2B, KV3.1, KV3.3, STXBP1, его варианта или функционального фрагмента. В некоторых случаях, такую идентичность последовательностей измеряют с использованием BLAST.

[172] В некоторых случаях, экспрессирующая кассета, раскрытая в настоящем описании, содержит один или более PV-селективных регуляторных элементов или один или более регуляторных элементов по этому раскрытию, функционально связанных с трансгеном, обладающим по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или по меньшей мере 99,5% идентичностью последовательностей с последовательностью, кодирующей любую одну из SEQ ID NO: 37–43, или ее функциональный фрагмент или вариант, или последовательности GenBank, соответствующие SEQ ID NO: 37–43. В некоторых случаях, экспрессирующая кассета, раскрытая в настоящем описании, содержит трансген, имеющий последовательность, соответствующую (i) последовательности SEQ ID NO: 37–43, или (ii) ее функциональному фрагменту, или (iii) последовательности, обладающей по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или по меньшей мере 99,5% идентичностью последовательностей с (i) или (ii).

[173] В некоторых примерах трансген представляет собой регулятор нейромедиатора, или его вариант или функциональный фрагмент. Регулятор нейромедиатора может быть вовлечен в регуляцию образования или выброса нейромедиатора в CNS. Например, регулятор нейромедиатора может способствовать синаптическому слиянию для того, чтобы высвободить нейромедиаторы. Пример регулятора нейромедиатора представляет собой STXBP1 (NM_001032221.3) или его функциональный фрагмент, или последовательность, обладающую по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей с ним. Трансген также может представлять собой субъединицу регулятора нейромедиатора.

[174] В определенном случае, экспрессирующая кассета по этому раскрытию может содержать AAV2 5' ITR, PV-селективный энхансер, PV-селективный промотор или комбинацию одного или более PV-селективных промоторов и энхансеров, кДНК SCN1B, WPRE, сигнал polyA hGH, PV-селективный регуляторный элемент и AAV2 3'ITR. В одном из примеров, экспрессирующая кассета содержит промотор AmpR и кодирующую последовательность AmpR, бактериальный участок начала репликации, AAV2 ITR, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 23–29, трансген (кодирующую последовательность, WPRE, сигнал polyA гормона роста человека, AAV2 ITR и точку начала репликации f1).

[175] В качестве другого примера, экспрессирующая кассета по этому раскрытию может содержать AAV2 5' ITR, энхансер, промотор, транскрипционный активатор эндогенного гена SCN1A, WPRE, сигнал polyA hGH, регуляторный элемент и AAV2 3'ITR. В некоторых случаях, экспрессирующая кассета содержит AAV2 5' ITR, промотор, интронный элемент, транскрипционный модификатор, синтетический polyA и AAV2 3' ITR. В некоторых случаях, экспрессирующая кассета по этому раскрытию может содержать AAV2 5' ITR, PV-селективный энхансер, PV-селективный промотор, последовательность, кодирующую транскрипционный активатор SCN1A или SCN1B, WPRE, сигнал polyA hGH, PV-селективный регуляторный элемент или любой из регуляторных элементов, раскрытых в настоящем описании и AAV2 3'ITR.

[176] Экспрессирующую кассету, содержащую один или более регуляторных элементов по этому раскрытию, можно использовать для того, чтобы лечить медицинское состояние. В некоторых случаях, экспрессирующую кассету, содержащую регуляторный элемент по этому раскрытию, используют для того, чтобы лечить неврологическое состояние или нейродегенеративное состояние. Неврологическое состояние может быть обусловлено известным генетическим событием или может иметь неизвестную причину.

[177] Неврологическое состояние может представлять собой заболевание, ассоциированное с PV нейронами. Неврологическое состояние может представлять собой заболевание, ассоциированное с тормозными нейронами, такими как PV нейроны. Заболевания или состояния, ассоциированные с PV нейронами, можно лечить посредством доставки экспрессирующей кассеты, несущей трансген и один или более селективных регуляторных элементов PV клеток или любые из регуляторных элементов, как раскрыто в настоящем описании, в клетку *in vivo*. В некоторых аспектах, экспрессирующие кассеты, содержащие трансген, функционально связанный с одним или более селективными регуляторными элементами PV клеток или любыми из регуляторных элементов, раскрытых в настоящем описании, можно использовать для того, чтобы лечить синдром Драве, болезнь Альцгеймера, эпилепсию, нейродегенеративное нарушение, таупатию, нейрональную гиповозбудимость и/или пароксизмы. В некоторых случаях, экспрессирующую кассету по этому раскрытию используют для того, чтобы лечить психиатрическое нарушение (например, шизофрению, обсессивно-компульсивное расстройство, зависимость, депрессию, беспокойство, психоз); нарушение аутического

спектра (например, синдром ломкой X-хромосомы, синдром Ретта); эпилепсию (например, синдром Драве, хроническую травматическую энцефалопатию, генерализованную эпилепсию с фебрильными пароксизмами плюс (GEFS+), эпилептическую энцефалопатию, эпилепсию височной доли, фокальную эпилепсию, туберозный склероз); и/или нейродегенерацию (например, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона). В некоторых случаях, неврологическое состояние или заболевание представляет собой любое связанное с пароксизмами и/или эпилепсией состояние или заболевание, в которое вовлечены PV нейроны.

[178] Большинство случаев синдрома Драве ассоциировано с мутациями в генах SCN1A и/или SCN2A. Мутации или аномалии в SCN1A также ассоциированы с пароксизмальными нарушениями, эпилепсией, аутизмом, семейной гемиплегической мигренью 3 типа (FHM3), генетической эпилепсией с фебрильными пароксизмами плюс (GEFS+) и эффективностью определенных лекарственных средств против пароксизмов. Например, мутация ICS5N+5G>A в SCN1A ассоциирована с максимальным безопасным количеством (дозой) лекарственных средств против пароксизмов фенитоина и карбамазепина.

[179] У некоторых пациентов с болезнью Альцгеймера в образование амилоида β (A β) вовлечено множество пептидов и протеазы, которые могут влиять на возбудимость нейронов, вызывая пароксизмы и понижающую регуляцию натриевого канала Nav1.1 в PV нейронах.

[180] Заболевания ассоциированные с нарушением функции PV нейронов, например, те, которые обусловлены мутациями с утратой функции в SCN1A или Nav1.1, включают: синдром Драве, синдром Отахара, эпилепсию, раннюю детскую эпилептическую энцефалопатию 6 (EIEE6), семейные фебрильные пароксизмы 3A (FEV3A), некупируемую детскую эпилепсию с генерализованными тонико-клоническими пароксизмами (ICEGTC), мигрень, семейную гемиплегическую 3 (FHM3), синдром Панайотопулоса, семейную фибрилляцию предсердий 13 (ATFB13), генерализованную эпилепсию с фебрильными пароксизмами плюс 1 типа (GEFS+ 1 типа), синдром Бругады, неспецифический дефект сердечной проводимости, генерализованную эпилепсию с фебрильными пароксизмами плюс, доброкачественные семейные детские пароксизмы, раннюю детскую эпилептическую энцефалопатию 11 (EIEE11), доброкачественную семейную детскую эпилепсию, нейродегенерацию, таупатии и болезнь Альцгеймера. В некоторых случаях, неврологическое состояние представляет собой синдром Драве. Синдром Драве ассоциирован с мутациями в генах SCN1A и/или SCN2A. В некоторых случаях один или более регуляторных элементов по этому раскрытию используют в генной терапии или экспрессирующей кассете для того, чтобы лечить неврологическое состояние или заболевание, ассоциированное с PV нейронами, например, психиатрическое нарушение (например, шизофрению, обсессивно-компульсивное расстройство, зависимость, депрессию, беспокойство, психоз); нарушение аутического спектра (например, синдром ломкой X-хромосомы, синдром Ретта); эпилепсию

(например, синдром Драве, хроническую травматическую энцефалопатию, генерализованную эпилепсию с фебрильными пароксизмами плюс (GEFS+), эпилептическую энцефалопатию, эпилепсию височной доли, фокальную эпилепсию, туберозный склероз); или нейродегенерацию (например, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона). В некоторых случаях, один или более регуляторных элементов по этому раскрытию (например, селективные регуляторные элементы PV нейронов) используют для того, чтобы лечить синдром Драве и/или болезнь Альцгеймера (например, в экспрессирующей кассете, векторе или генной терапии). В некоторых случаях, неврологическое состояние или заболевание представляет собой любое связанное с пароксизмами и/или эпилепсией состояние или заболевание, в которое вовлечены PV нейроны.

[181] Способы и композиции по этому раскрытию можно использовать для того, чтобы лечить субъекта, у которого диагностировано заболевание, например, неврологическое или нейродегенеративное заболевание. Субъект может представлять собой пациента, страдающего определенной формой эпилепсии. В некоторых случаях, субъектом является пациент с синдромом Драве. Субъект может представлять собой пациента, страдающего нейродегенеративным заболеванием, например, пациента с болезнью Альцгеймера. В некоторых случаях, эпилепсия, энцефалопатия и/или пароксизмы ассоциированы с генетической мутацией в SCN8A. В некоторых случаях, генетическая мутация в SCN8A может давать начало эпилептическим синдромам, например, синдрому Драве. В некоторых случаях, генетическая мутация в STXBP1 ассоциирована с энцефалопатией с эпилепсией, которая отличается рекуррентными пароксизмами.

[182] В некоторых случаях субъект, которого лечат одной или более композициями, описанными в настоящем описании, представляет собой того, у кого диагностирована мутация или генетическая аберрация в ионном канале или регуляторе нейромедиатора (например, связывающий синтаксин белок). Примеры таких мутаций включают мутации в SCN1A, SNC2A, SNC8A, SCN1B, SCN2B, KCNC1, KCNC3 и/или STXBP1 или их сочетание. Экспрессирующую кассету, содержащую селективный регуляторный элемент клеток определенного типа, как раскрыто в настоящем описании, можно доставлять субъекту для того, чтобы лечить или предотвращать заболевание с симптомами, ассоциированными с конкретным типом клеток. Например, экспрессирующую кассету, содержащую трансген, функционально связанный с одним или более селективными регуляторными элементами PV клеток, доставляют субъекту, который имеет симптомы или имеет риск развития симптомов, которые ассоциированы с PV нейронами.

[183] В некоторых случаях, лечение можно вводить субъекту с синдромом Драве или с риском его развития. Симптомы, ассоциированные с синдромом Драве, включают пароксизмы, дефекты памяти, задержку в развитии, слабый мышечный тонус и/или когнитивные проблемы. Лечение экспрессирующей кассетой по этому раскрытию может

вести к усовершенствованию одного или более симптомов, таких как снижение числа, длительности и/или интенсивности пароксизмов. Введение генной терапии, как раскрыто в настоящем описании, субъекту с риском развития синдрома Драве может предотвращать развитие или замедлять прогрессирование одного или более симптомов.

[184] В другом примере лечение можно вводить субъекту, страдающему болезнью Альцгеймера. Симптомы, ассоциированные с болезнью Альцгеймера, включают кратковременные потери памяти, когнитивные затруднения, пароксизмы и затруднения в речи, исполнительских функциях, восприятии (агнозия) и выполнении движений (апраксия). Лечение экспрессирующей кассетой по этому раскрытию может вести к усовершенствованию одного или более симптомов болезни Альцгеймера, таких как снижение прогрессирования потери памяти, или предотвращению одного или более симптомов. В некоторых случаях, лечение может вести к коррекции активности головного мозга с высокой гамма-мощностью. Лечение может вести к снижению частоты пароксизмов и/или тяжести пароксизмов или снижению активности с высокой гамма-мощностью на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60% или 70%. В некоторых случаях, лечение может вести к усовершенствованию когнитивной функции. Обучение и/или память можно усовершенствовать на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% или больше чем 100%.

[185] Способы и композиции по этому раскрытию можно использовать для того, чтобы лечить субъекта, который имеет риск развития заболевания. Может быть известно, что субъект предрасположен к заболеванию, например, неврологическому заболеванию или заболеванию, ассоциированному с эпилепсией, пароксизмами и/или энцефалопатией. Субъект может быть предрасположен к заболеванию из-за генетического события или из-за известных факторов риска. Например, субъект может нести мутацию в SCN1A, которая ассоциирована с синдромом Драве. В некоторых случаях субъект может быть предрасположен к заболеванию, такому как болезнь Альцгеймера, из-за возраста субъекта.

[186] Лечение может вести к снижению или прекращению симптомов. Например, лечение может улучшать обучение, память, когнитивную функцию и/или двигательную функцию; снижать частоту и/или длительность пароксизмов; и/или снижать температурную чувствительность (или увеличивать температурный порог для инициации пароксизма).

[187] В некоторых случаях целевой тип клеток генной терапии или экспрессирующей кассеты, раскрытых в настоящем описании, представляет собой PV клетку. В некоторых случаях, не целевые подтипы клеток представляют собой по меньшей мере один, по меньшей мере два, по меньшей мере три или по меньшей мере четыре не PV ГАМК-эргических подтипа, раскрытых в настоящем описании. В некоторых случаях, экспрессирующая кассета, содержащая регуляторный элемент, раскрытый в настоящем описании, селективна к PV клеткам относительно всех не PV клеток CNS. В некоторых случаях, избирательность к определенному типу клеток

измеряют в соответствии с анализом совместной локализации, раскрытым в настоящем описании. В некоторых случаях, избирательность к определенному типу клеток измеряют с использованием мыши, которая экспрессирует Cre в целевом типе клеток.

[188] В некоторых случаях, лечение не ведет к нежелательной реакции для субъекта. Лечение с использованием генной терапии, содержащей PV–селективный регуляторный элемент, может вызывать меньшие или менее тяжелые нежелательные реакции у субъекта, чем лечение с использованием схожей генной терапии, содержащей тот же трансген, связанный с неселективным регуляторным элементом.

[189] В различных аспектах любую экспрессирующую кассету, раскрытую в настоящем описании, можно адаптировать или использовать для генной терапии (например, gAAV или gAAV9 генной терапии), чтобы лечить любое одно или более из синдрома Драве, болезни Альцгеймера, эпилепсии, нейродегенерации, таупатии, нейрональной гиповозбудимости и/или пароксизма. В некоторых случаях, генная терапия содержит любое одно или более, два или больше, три или больше, четыре или больше, пять или больше, шесть или больше, семь или больше, восемь или больше, девять или больше или десять или больше из SEQ ID NO: 1–32, или функционального фрагмента или их сочетание, или последовательностей, обладающих по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей с ними, которые функционально связаны с трансгеном. В некоторых случаях, генная терапия содержит экспрессирующую кассету по этому раскрытию. В некоторых случаях генная терапия содержит один или более регуляторных элементов, раскрытых в настоящем описании, функционально связанных с любым трансгеном (например, репортерным трансгеном или терапевтическим трансгеном) так, что регуляторные элементы управляют селективной экспрессией или преимущественной экспрессией в по меньшей мере одном целевом типе клеток на уровне, который статистически значимо выше, чем экспрессия под управлением CAG или EF1 α или неселективного регуляторного элемента, когда он функционально связан с тем же трансгеном, или с помощью той же конструкции без регуляторных элементов. В некоторых случаях, статистически значимо более высокий обозначает, что регуляторные элементы управляют селективной экспрессией в целевом типе клеток на уровне, который по меньшей мере в 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10, 10,5, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100 раз выше уровня экспрессии с помощью CAG, EF1 α , конститутивного промотора или неселективного регуляторного элемента, когда он функционально связан с тем же трансгеном в целевом типе клеток, или с помощью той же конструкции без регуляторных элементов. В некоторых случаях, такую селективную экспрессию в определенном типе клеток анализируют с использованием анализа совместной локализации, как раскрыто в настоящем описании. В некоторых случаях, трансген представляет собой любой один или более из SCN1A, SNC2A, SNC8A, SCN1B, SCN2B, KV3.1, KV3.3, STXBP1 и его функционального фрагмента. В некоторых случаях, трансген

представляет собой ДНК–связывающий белок, который модулирует экспрессию эндогенного гена, такую как транскрипционный модулятор, транскрипционный активатор или транскрипционный репрессор. В некоторых случаях, трансген представляет собой ДНК–связывающий белок, который содержит ДНК–связывающий домен ДНК–связывающего белка или ДНК–расщепляющего белка (например, нуклеазы, рестрикционного фермента, рекомбиназы и т. д.), где ДНК–расщепляющий домен или нуклеазный домен дезактивирован, например, Cas с дезактивированной нуклеазной активностью (dCas), дезактивированная подобная активатору транскрипции эффекторная нуклеаза или белок с цинковыми пальцами с дезактивированной нуклеазной активностью. В некоторых случаях, ДНК–связывающий домен связывают с транскрипционным модулирующим доменом (например, доменом транскрипционного активатора или репрессора). В некоторых случаях, трансген представляет собой редактирующий гены белок, такой как нуклеаза с цинковыми пальцами или подобная активатору транскрипции эффекторная нуклеаза. В некоторых случаях, трансген представляет собой репортерный ген или поддающийся обнаружению маркер, такой как eGFP, tdTomato или RFP. В некоторых случаях, трансген представляет собой белок Cas, такой как Cas9.

[190] В некоторых случаях, генную терапию, содержащую экспрессирующую кассету, раскрытую в настоящем описании, используют для того, чтобы лечить неврологическое состояние или заболевание. В некоторых случаях, генную терапию, содержащую экспрессирующую кассету, раскрытую в настоящем описании, используют для того, чтобы лечить неврологическое состояние или заболевание, в котором экспрессирующая кассета содержит любое одно или более, два или больше, три или больше, четыре или больше, пять или больше, шесть или больше, семь или больше, восемь или больше, девять или больше или десять или больше из SEQ ID NO: 1–32, или функционального фрагмента или их сочетание, или последовательностей, обладающих по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей с ними, которые функционально связаны с трансгеном. В некоторых случаях, трансген представляет собой любой один или более из SCN1A, SNC2A, SNC8A, SCN1B, SCN2B, KV3.1, KV3.3, STXBP1, ДНК–связывающего белка и его функционального фрагмента. В некоторых случаях, генную терапию, содержащую экспрессирующую кассету, раскрытую в настоящем описании, используют для того, чтобы лечить синдром Драве. В некоторых аспектах, генную терапию, содержащую экспрессирующую кассету, раскрытую в настоящем описании, используют для того, чтобы лечить болезнь Альцгеймера. В некоторых случаях, генную терапию, содержащую экспрессирующую кассету, раскрытую в настоящем описании, используют для того, чтобы лечить симптомы эпилепсии и/или пароксизмов, которые ассоциированы с синдромом Драве и/или болезнью Альцгеймера. В некоторых случаях, лечение любого одного из синдрома Драве, болезни Альцгеймера, эпилепсии, нейродегенерации, таупатии, нейрональной гиповозбудимости и/или пароксизмов включает доставку или введение генной терапии по этому раскрытию в

клетку субъекта, нуждающегося в этом. В некоторых случаях, субъект, нуждающийся в этом, имеет риск или имеет любое из синдрома Драве, болезни Альцгеймера, эпилепсии и/или пароксизмов. В некоторых случаях, субъектом является ребенок или несовершеннолетний. В некоторых случаях, генную терапию, содержащую экспрессирующую кассету, раскрытую в настоящем описании, используют для того, чтобы лечить младенца, ребенка или несовершеннолетнего с диагнозом или риском развития синдрома Драве. В некоторых случаях, генную терапию, содержащую экспрессирующую кассету, раскрытую в настоящем описании, используют для того, чтобы лечить субъекта, содержащего мутацию или генетический дефект в любом одном или более из SCN1A, SNC2A, SNC8A, SCN1B, SCN2B, KV3.1, KV3.3 и STXBP1.

[191] В некоторых аспектах, настоящее раскрытие предусматривает способ лечения любого одного из синдрома Драве, болезни Альцгеймера, эпилепсии, нейродегенерации, таупатии, нейронального гиповозбудимости и/или пароксизмов, который включает введение генной терапии в клетку субъекта, где генная терапия содержит экспрессирующую кассету, раскрытую в настоящем описании. В некоторых случаях, такая экспрессирующая кассета содержит любое одно или более из SEQ ID NO: 1–32, или функционального фрагмента или их сочетания, или последовательностей, обладающих по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей с ними, которые функционально связаны с трансгеном, где трансген представляет собой любой один из SCN1A, SNC2A, SNC8A, SCN1B, SCN2B, KV3.1, KV3.3, STXBP1 и его функционального фрагмента. В некоторых случаях, трансген представляет собой субъединицу натриевого ионного канала или калиевого ионного канала. В некоторых случаях, трансген представляет собой связывающий синтаксин белок. В некоторых случаях, трансген представляет собой транскрипционный модулятор, например, транскрипционный активатор или транскрипционный репрессор. В некоторых случаях, трансген представляет собой транскрипционный модулятор, который модулирует экспрессию эндогенного гена (например, SCN1A, SNC2A, SNC8A, SCN1B, SCN2B, KV3.1, KV3.3 или STXBP1). В некоторых случаях, трансген представляет собой редактирующий гены белок, такой как нуклеаза с цинковыми пальцами или подобная активатору транскрипции эффекторная нуклеаза. В некоторых случаях, трансген представляет собой белок Cas, такой как Cas9.

[192] В других аспектах, настоящее раскрытие предусматривает способ модификации любой генной терапии, разработанной для лечения синдрома Драве, болезни Альцгеймера, эпилепсии, нейродегенерации, таупатии, нейрональной гиповозбудимости и/или пароксизмов путем добавления одного или более регуляторных элементов, раскрытых в настоящем описании, чтобы усовершенствовать избирательность генной терапии к определенному типу клеток. В некоторых случаях, генная терапия представляет собой gAAV генную терапию.

[193] В некоторых случаях, лечение с использованием экспрессирующей кассеты, раскрытой в настоящем описании, снижает длительность и/или частоту пароксизмов,

например, пароксизмов, ассоциированных с синдромом Драве, по меньшей мере на 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%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% по сравнению с контролем без лечения или по сравнению с уровнем до лечения.

[194] В некоторых случаях, лечение с использованием экспрессирующей кассеты, раскрытой в настоящем описании, снижает активность с высокой гамма-мощностью (например, активность с высокой гамма-мощностью, ассоциированную с болезнью Альцгеймера) по меньшей мере на 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%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% по сравнению с контролем без лечения или по сравнению с уровнем до лечения.

[195] В одном из аспектов, настоящее раскрытие предусматривает кассету нуклеиновой кислоты по этому раскрытию, которая содержит один или более регуляторных элементов, функционально связанных с трансгеном, которые ведут к селективной экспрессии в целевом типе клеток относительно одного или более не целевых типов клеток, например, к селективной экспрессии в PV нейронах в CNS относительно одной или более клеток CNS не PV типа. В некоторых случаях, каждый из регуляторных элементов содержит (i) последовательность SEQ ID NO: 1–32, (ii) функциональный фрагмент или их сочетание или (iii) последовательность с по меньшей мере 80% идентичностью последовательностей с (i) или (ii). В некоторых случаях, процент идентичности последовательностей можно измерять с использованием BLAST. В некоторых случаях, по меньшей мере один из регуляторных элементов получают у человека. В некоторых случаях, по меньшей мере один из регуляторных элементов получают у не относящегося к человеку млекопитающего. В некоторых случаях, регуляторные элементы являются не встречаемыми в природе. В некоторых случаях, регуляторные элементы ведут к избирательности экспрессии в PV клетках, которая больше, чем экспрессия трансгена, функционально связанного с CAG или EF1 α или неселективным регуляторным элементом, как измеряют с помощью анализа совместной локализации. В некоторых случаях, трансген представляет собой любой один или более из SCN1A, SNC2A, SNC8A, SCN1B, SCN2B, KV3.1, KV3.3 и STXBP1, или его функционального фрагмента, или последовательностей, обладающих по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей с ними. В некоторых случаях, трансген представляет собой ДНК-связывающий белок, который модулирует экспрессию гена (например, эндогенный ген, такой как SCN1A, SNC2A, SNC8A, SCN1B, SCN2B, KV3.1, KV3.3 и STXBP1), такой как транскрипционный модулятор, транскрипционный активатор или транскрипционный репрессор. В некоторых случаях, трансген представляет собой редактирующий гены белок, такой как нуклеаза с цинковыми пальцами или подобная

активатору транскрипции эффекторная нуклеаза. В некоторых случаях, трансген представляет собой репортерный ген или поддающийся обнаружению маркер, такой как eGFP, tdTomato или RFP. В некоторых случаях, трансген представляет собой белок Cas, такой как Cas9. В некоторых случаях, регуляторные элементы ведут к селективной экспрессии в PV клетках на уровне, который составляет по меньшей мере 0,5 раза выше, по меньшей мере 0,6 раза выше, по меньшей мере 0,7 раза выше, по меньшей мере 0,8 раза выше, по меньшей мере 0,9 раза выше, по меньшей мере 1,1 раза выше, по меньшей мере 1,2 раза выше, по меньшей мере 1,3 раза выше, по меньшей мере 1,4 раза выше, по меньшей мере в 1,5 раза выше, по меньшей мере в 2 раза выше, по меньшей мере в 3 раза выше, по меньшей мере в 4 раза выше, по меньшей мере в 5 раз выше, по меньшей мере в 6 раз выше, по меньшей мере в 7 раз выше, по меньшей мере в 8 раз выше, по меньшей мере в 9 раз выше, по меньшей мере в 10 раз выше, по меньшей мере 11 раз выше, по меньшей мере 12 раз выше, по меньшей мере 13 раз выше, по меньшей мере 14 раз выше, по меньшей мере в 15 раз выше, по меньшей мере 16 раз выше, по меньшей мере 17 раз выше, по меньшей мере 18 раз выше, по меньшей мере 19 раз выше, по меньшей мере в 20 раз выше, по меньшей мере в 25 раз выше, по меньшей мере 30 раз выше, по меньшей мере 40 раз выше, по меньшей мере в 50 раз выше, по меньшей мере 60 раз выше, по меньшей мере 70 раз выше, по меньшей мере 80 раз выше, по меньшей мере 90 раз выше, по меньшей мере 100 раз выше по сравнению с таковым для CAG или EF1 α или неселективного регуляторного элемента, как измеряют с помощью анализа совместной локализации. В некоторых случаях, кратная разница относится к кратной разнице между процентной долей eGFP+, PV+ клеток, которая является результатом одного или более регуляторных элементов, и таковой для неселективного регуляторного элемента. В некоторых случаях, анализ совместной локализации представляет собой иммуногистохимический анализ, как описано ниже в примере 5. В некоторых случаях, анализ совместной локализации осуществляют с использованием коммерчески доступного антитела против PV. В некоторых случаях, трансген кодирует субъединицу ионного канала, регулятор нейромедиатора или его вариант или функциональный фрагмент. В некоторых случаях, субъединица ионного канала представляет собой α -субъединицу или β -субъединицу натриевого ионного канала или субъединицу калиевого ионного канала. В некоторых случаях, трансген представляет собой любое из (i) SCN1A, SNC2A, SNC8A, SCN1B, SCN2B, KV3.1, KV3.3, или ДНК-связывающего белка; (ii) его функционального фрагмента; или (iii) последовательности, обладающей по меньшей мере 80% идентичностью последовательностей с (i) или (ii). В некоторых случаях, регулятор нейромедиатора представляет собой (i) STXBP1, (ii) его функциональный фрагмент, или (iii) последовательность, обладающую по меньшей мере 80% идентичностью с (i) или (ii). В некоторых случаях, регуляторные элементы и функционально связанный трансген располагаются на различных хромосомах. В некоторых случаях, регуляторные элементы совместно составляют меньше чем 2,5 т. о., меньше чем 1,5 т. о., меньше чем 1 т. о. или меньше чем 500 п. о. в размере. В некоторых случаях, не PV клетки содержат любую одно

или более из клеток CNS не PV типа, включая в качестве неограничивающих примеров возбуждающие нейроны, дофаминергические нейроны, астроциты, микроглию или моторные нейроны. В некоторых случаях, кассета нуклеиновой кислоты представляет собой линейную конструкцию. В некоторых случаях кассета нуклеиновой кислоты представляет собой вектор. В некоторых случаях кассета нуклеиновой кислоты представляет собой плазмиду. В некоторых случаях, вектор представляет собой вирусный вектор. В некоторых случаях, вирусный вектор представляет собой аденоассоциированный вирусный (AAV) вектор. В некоторых случаях, AAV вектор представляет собой AAV1, AAV8, AAV9, scAAV1, scAAV8 или scAAV9. В некоторых случаях, вирусный вектор представляет собой лентивирусный вектор. В некоторых случаях, регуляторные элементы содержат меньше чем 600 п. о. непрерывной последовательности в пределах 10 т. о. от сайта инициации транскрипции GAD2, GAD1, SYN1, NKX2.1, DLX1, DLX5/6, SST, PV и/или VIP.

[196] В различных вариантах осуществления, раскрытых в настоящем описании, регуляторный элемент составляет меньше чем 2050 п. о., 2000 п. о., 1900 п. о., 1800 п. о., 1700 п. о., 1600 п. о., 1500 п. о., 1400 п. о., 1300 п. о., 1200 п. о., 1100 п. о., 1000 п. о., 900 п. о., 800 п. о., 700 п. о., 600 п. о., 500 п. о., 400 п. о., 300 п. о., 200 п. о., 100 п. о., 90 п. о., 80 п. о., 70 п. о., 60 п. о., 50 п. о., 40 п. о., 30 п. о., 20 п. о., 10 п. о. или 5 п. о. В различных вариантах осуществления, раскрытых в настоящем описании, экспрессирующая кассета содержит трансген, который больше, чем типичный размер трансгена в стандартном вирусном векторе, например, AAV. В некоторых аспектах, экспрессирующая кассета по любому варианту осуществления, раскрытому в настоящем описании, содержит трансген, который составляет по меньшей мере 1 т. о., 1,5 т. о., 2 т. о., 2,5 т. о., 3 т. о., 3,5 т. о., 4 т. о., 4,5 т. о., 5 т. о., 5,5 т. о., 6 т. о., 6,5 т. о., 7 т. о., 7,5 т. о. или 8 т. о. В некоторых аспектах, любой вариант осуществления, раскрытый в настоящем описании, содержит экспрессирующую кассету (например, AAV), которая содержит трансген, который составляет более чем 1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9 или 4 т. о. в размере. В некоторых аспектах, любой вариант осуществления, раскрытый в настоящем описании, дополнительно может содержать одну или более гетерологичных последовательностей нуклеиновой кислоты или элементов.

[197] В одном из аспектов, способ лечения неврологического нарушения или состояния у нуждающегося в этом субъекта включает доставку терапевтически эффективного количества кассеты нуклеиновой кислоты, описанной в настоящем описании. В другом аспекте способ увеличения селективной экспрессии трансгена в PV нейронах включает приведение в контакт клетки с кассетой нуклеиновой кислоты, описанной в настоящем описании. В некоторых случаях, способ по любому варианту осуществления, раскрытому в настоящем описании, используют для того, чтобы лечить неврологическое состояние или заболевание, например, психиатрическое нарушение (например, шизофрению, обсессивно-компульсивное расстройство, зависимость,

депрессию, беспокойство, психоз); нарушение аутического спектра (например, синдром ломкой X-хромосомы, синдром Ретта); эпилепсию (например, синдром Драве, хроническую травматическую энцефалопатию, генерализованную эпилепсию с фебрильными пароксизмами плюс (GEFS+), эпилептическую энцефалопатию, эпилепсию височной доли, фокальную эпилепсию, туберозный склероз); или нейродегенерацию (например, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона). В некоторых случаях, способ по любому варианту осуществления, раскрытому в настоящем описании, можно использовать для того, чтобы лечить синдром Драве. Способ по любому варианту осуществления, раскрытому в настоящем описании, можно использовать для того, чтобы лечить болезнь Альцгеймера. В некоторых случаях, способы и/или композиции по этому раскрытию можно использовать для того, чтобы лечить любое неврологическое состояние или заболевание, ассоциированное с пароксизмом и/или эпилепсией и/или в которое вовлечены PV нейроны.

[198] В одном из аспектов, неврологическое состояние, описанное в настоящем описании, лечат с использованием генной терапии, предпочтительно той, которая ведет к преимущественной экспрессии в одном типе ткани или типе клеток относительно других, например, PV нейроне, как определяют через анализ совместной локализации. В некоторых случаях, генная терапия представляет собой AAV.

[199] В одном из аспектов, способ направления экспрессии любого трансгена в PV нейроны в CNS включает функциональное связывание одного или более селективных регуляторных элементов PV нейронов с трансгеном. В некоторых случаях, регуляторные элементы содержат одну или более последовательностей SEQ ID NO: 1–32, или последовательностей с по меньшей мере 80% идентичностью последовательностей с SEQ ID NO: 1–32, или ее функциональный фрагмент. В некоторых случаях, регуляторные элементы ведут к селективной экспрессии в PV нейронах на уровне, который по меньшей мере в 2 раза выше, по меньшей мере в 5 раз выше, или по меньшей мере в 7 раз выше, или по меньшей мере в 10 раз выше по сравнению с CAG или EF1 α или неселективным регуляторным элементом, функционально связанным с трансгеном, как измеряют с помощью анализа совместной локализации. В некоторых случаях, трансген представляет собой SCN1A, SNC2A, SNC8A, SCN1B, SCN2B, KV3.1, KV3.3, STXBP1, ДНК-связывающий белок или его функциональный фрагмент. В некоторых случаях, регуляторные элементы и трансген находятся в AAV. В некоторых случаях, AAV представляет собой AAV9.

[200] В одном из аспектов, способ лечения неврологического состояния или нарушения у нуждающегося в этом субъекта включает приведение в контакт клетки с кассетой нуклеиновой кислоты, содержащей один или более регуляторных элементов, функционально связанных с трансгеном, который ведет к селективной экспрессии в PV нейронах относительно одной или более не PV клеток CNS. В некоторых случаях, регуляторные элементы содержат одно или более из SEQ ID NO: 1–32, или функционального фрагмента или их сочетание, или последовательностей, обладающих по

меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательностей с ними. В некоторых случаях, трансген представляет собой субъединицу потенциалзависимого ионного канала, или ее вариант или функциональный фрагмент. В некоторых случаях, субъединица представляет собой β -субъединицу натриевого ионного канала. В некоторых случаях, субъединица представляет собой α -субъединицу натриевого ионного канала. В некоторых случаях, субъединица относится к калиевому ионному каналу. В некоторых случаях, трансген представляет собой любое из (i) SCN1A, SNC2A, SNC8A, SCN1B, SCN2B, KV3.1, KV3.3, ДНК-связывающего белка или STXBP1; (ii) его функционального фрагмента; или (iii) последовательности, обладающей по меньшей мере 80% идентичностью последовательностей с (i) или (ii). В некоторых случаях, неврологическое состояние или нарушение ассоциировано с гаплонедостаточностью или мутацией в любом из SCN1A, SCN1B, SCN2B, KV3.1 и KV3.3. В некоторых случаях, неврологическое состояние или нарушение представляет собой синдром Драве. В некоторых случаях, неврологическое состояние или нарушение представляет собой болезнь Альцгеймера. В некоторых случаях, неврологическое состояние или заболевание представляет собой психиатрическое нарушение (например, шизофрению, обсессивно-компульсивное расстройство, зависимость, депрессию, беспокойство, психоз); нарушение аутического спектра (например, синдром ломкой X-хромосомы, синдром Ретта); эпилепсию (например, хроническую травматическую энцефалопатию, генерализованную эпилепсию с фебрильными пароксизмами плюс (GEFS+), эпилептическую энцефалопатию, эпилепсию височной доли, фокальную эпилепсию, туберозный склероз); или нейродегенерацию (например, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона). В некоторых случаях, неврологическое состояние или заболевание представляет собой любое связанное с пароксизмами и/или эпилепсией состояние или заболевание, в которое вовлечены PV нейроны. В некоторых случаях, кассета нуклеиновой кислоты ведет к селективной экспрессии в PV нейронах на уровне, который по меньшей мере в 2 раза выше, по меньшей мере в 5 раз выше, или по меньшей мере в 7 раз выше или по меньшей мере в 10 раз выше по сравнению с CAG или EF1 α или неселективным регуляторным элементом, функционально связанным с трансгеном, как измеряют с помощью анализа совместной локализации. В некоторых случаях, кассета нуклеиновой кислоты находится в AAV. В некоторых случаях, AAV представляет собой AAV9.

[201] В одном из аспектов, способ лечения синдрома Драве включает приведение в контакт клетки с AAV, содержащим трансген, который представляет собой любое из (i) SCN1A, SCN1B, SCN2B, ДНК-связывающего белка, (ii) его функционального фрагмента, или (iii) последовательности, обладающей по меньшей мере 80% идентичностью последовательностей с (i) или (ii). В некоторых случаях, AAV дополнительно содержит один или более селективных регуляторных элементов PV нейронов или любой из регуляторных элементов, раскрытых в настоящем описании, функционально связанный с трансгеном. В некоторых случаях, каждый из регуляторных элементов независимо

содержит последовательность, содержащую любое из SEQ ID NO: 1–32, или любого функционального фрагмента или их сочетания, или последовательности, обладающей по меньшей мере 80% идентичностью последовательностей с любой одной из SEQ ID NO: 1–32.

[202] В другом аспекте способ лечения болезни Альцгеймера включает приведение в контакт клетки с AAV, содержащим трансген, который представляет собой любое из (i) SCN1A, SCN2B, KV3.1, KV3.3 и STXBP1, (ii) его функционального фрагмента и (iii) последовательности, обладающей по меньшей мере 80% идентичностью последовательностей с (i) или (ii). В некоторых случаях, AAV дополнительно содержит один или более селективных регуляторных элементов PV нейронов, функционально связанных с трансгеном. В некоторых случаях, каждый из регуляторных элементов независимо содержит последовательность, содержащую любое из SEQ ID NO: 1–32, или любого функционального фрагмента или их сочетания, или последовательности, обладающей по меньшей мере 80% идентичностью последовательностей с любой одной из SEQ ID NO: 1–32.

ПРИМЕРЫ

[203] Эти примеры предоставлены только в иллюстративных целях и не ограничивают объем формулы изобретения, предоставленной в настоящем описании.

ПРИМЕР 1

Идентификация предполагаемых PV–селективных регуляторных элементов

[204] Для того чтобы идентифицировать и осуществлять скрининг предполагаемого регуляторного элемента, который селективен к PV клеткам, можно собирать PV клетки у мыши с нокином R26–CAG–LSL–Sun1–sfGFP–Мус, используя аффинную очистку, например, используя антитела против GFP или против Мус и покрытые белком G магнитные бусы. PV клетки можно обогащать с использованием покрытых антителами против PV бус или матрицы аффинной очистки. Затем из PV клеток выделяют ядра. Ядерную РНК можно выделять из ядер и конвертировать в кДНК и амплифицировать с использованием Nugen Ovation RNA–seq System V2 (Nugen 7102), после чего следует секвенирование с использованием Illumina HiSeq 2500. Геномную ДНК можно выделять из ядер, фрагментировать и использовать для получения библиотек MethylC–seq, которые можно секвенировать с использованием Illumina HiSeq 2000. Для того чтобы создавать библиотеку ATAC–seq, ядра, связанные с бусами, подвергают транспозиции с использованием транспозазы Tn5 (Illumina FC–121–1030). После 9–12 циклов ПЦР амплификации, библиотеки секвенируют с использованием Illumina HiSeq 2500. Для того чтобы создавать библиотеку ChIP–seq, ядра PV клеток расщепляют до мононуклеосом с использованием микрококковой нуклеазы, после чего следует солевое экстрагирование хроматина и нативный ChIP и конструирование библиотеки, которую можно секвенировать на Illumina HiSeq 2500. После секвенирования этих библиотек, последовательности картируют для того, чтобы идентифицировать корреляции и паттерны гипометилирования в CG–богатых областях, модификации гистонов, сайты

связывания транскрипционных факторов и паттерны, ассоциированные с высоко экспрессируемыми транскрипционными факторами в PV клетках. Пересекающиеся признаки и корреляции из нескольких анализов и/или библиотек, описанных выше, обеспечивают сходящиеся свидетельства для идентификации кандидатных последовательностей, которые являются предполагаемыми PV–селективными регуляторными элементами. Предполагаемые PV–селективные регуляторные элементы дополнительно можно тестировать с использованием анализа совместной локализации, как описано в примере 5 далее. Предполагаемые PV–селективные регуляторные элементы также можно тестировать у мыши B6 PV–Cre (Jackson Laboratory), которая представляет собой мышь с нокином B6 PV–Cre, которая экспрессирует рекомбиназу Cre в парвальбумин–экспрессирующих, как описано в примере 2 далее. После валидации PV–избирательности регуляторных элементов, регуляторные элементы можно функционально связывать с трансгеном, чтобы направленно воздействовать на экспрессию избирательно к PV клеткам относительно по меньшей мере одной, двух, трех, четырех, пяти или больше чем пяти не PV клеток.

ПРИМЕР 2

Избирательность к PV нейронам у мыши PV–Cre

[205] Избирательность к PV нейронам можно определять с использованием флуоресцентной визуализации. AAV9 векторы, содержащие eGFP, функционально связанный с (i) контрольным промотором (EF1a); или (ii) PV–селективным RE, идентифицированным выше в примере 1; или (iii) PV–селективным RE, выбранным из SEQ ID NO: 1–32; и AAV9 векторы, содержащие Cre–зависимый tdTomato совместно инъецируют мыши B6 PV–Cre (Jackson Labs). PV–Cre представляет собой мышь с нокином, которая экспрессирует рекомбиназу Cre в экспрессирующих парвальбумин нейронах (таких как вставочные нейроны в головном мозге и проприоцептивные афферентные рецепторные нейроны в дорсальных корешковых ганглиях), без нарушения эндогенной экспрессии Pvalb.

[206] Мышам выполняли инфузии билатерально с использованием 1,5 мкл AAV9 вектора (от 5^{12} до 1^{13} гк/мл) в дорсальный и вентральный гиппокамп со скоростью 0,3 мкл/мин и периодом покоя 4 мин после инъекции. Мышей анестезируют для инъекции. Животных помещают в стереотаксическую раму (Kopf instruments, USA), используя следующие координаты для дорсального гиппокампа (AP –2,0 мм, латеральн. $\pm 1,5$, DV – 1,4 мм от твердой мозговой оболочки) и вентрального гиппокампа (AP –3,1 мм, латеральн. $\pm 2,8$, DV –3,8 мм от твердой мозговой оболочки). Шприц Гамильтона (модель № 80308; 10 мкл шприц с соответствующей тупоконечной иглой 30 ga) можно использовать со стереотаксическим микроманипулятором, чтобы определять и сверлить отверстия буром. Дрель используют только для того, чтобы проходить кость. После сверления, инфузионную канюлю опускают в головной мозг до глубины желаемого местоположения для инъекции, например, объем инъекции: 1,5 мкл; скорость инъекции: 0,3 мкл/мин. Перед инфузией, иглу оставляют для уравнивания на 1 минуту. Когда доставку

завершают, иглу оставляют на 4 мин и затем вынимают в течение приблизительно 1 мин. Когда все инфузии завершают, кожный разрез закрывают швами и вводят послеоперационные аналгетики. Мыши после лечения проходят ежедневные ветеринарные осмотры в течение оставшейся части исследования и проходят взвешивание раз в неделю для того, чтобы осуществлять мониторинг массы тела.

[207] Для сбора ткани мышей умерщвляют через передозировку изофлурана и перфузируют 4% параформальдегидом (PFA). Кусок ткани головного мозга, содержащий гиппокамп, извлекают и помещают в 4% PFA при 4°C по меньшей мере на 12 часов. Затем ткань головного мозга дегидратируют в 30% сахарозе (в фосфатно-солевом буфере) при 4°C до тех пор, пока ткань не опустится на дно пробирки. Ткань головного мозга заливают в Tissue-Tek OCT для получения срезов в криостате. Срезы ткани головного мозга окрашивают по eGFP и tdTomato с использованием стандартных иммуногистохимических процедур с использованием поликлонального антитела кролика против RFP (Rockland Antibodies and Assay) и поликлонального антитела курицы против eGFP (Aves Labs). Флуоресцентную микроскопическую визуализацию используют для того, чтобы визуализировать клетки. eGFP, или зеленая флуоресценция, соответствует всей генной экспрессии. Красная флуоресценция tdTomato соответствует PV+ клеткам. Перекрытие двух флуоресцентных сигналов, которые можно визуализировать как желтые или белые клетки, представляет PV+ клетки, которые экспрессируют трансген eGFP. Ожидают, что AAV9 векторы, содержащие PV-селективный регуляторный элемент, дадут более высокое число клеток, которые являются eGFP+ и PV+ по сравнению с контрольным промотором (EF1a). Например, ожидают, что флуоресцентная визуализация клеток мышей, которым инъецировали AAV9, содержащие любой один из PV-селективных RE (например, SEQ ID NO: 1–32 или предполагаемые REы, идентифицированные в примере 1), демонстрирует более высокое число eGFP+ клеток, которые также являются PV+. Избирательность PV клеток можно определять количественно как процентную долю всех eGFP+ клеток, которые также являются PV+.

ПРИМЕР 3

Уменьшение пароксизмов в модели синдрома Драве на мышах

[208] Мышей B6(Cg)–Scn1atm1.1Dsf/J получали из Dravet syndrome European Federation через Jackson Laboratories. Эти мыши содержат ассоциированную с синдромом Драве мутацию в экзоне 24 в SCN1A (A на V в положении 1783). Мыши также содержат фланкированный сайтами loxP экзон 24 с последовательностью дикого типа. Без манипуляций этот штамм мышей экспрессирует две копии WT аллеля SCN1A. Однако при доставке AAV, экспрессирующего рекомбиназу Cre, любая клетка, на которую направленно воздействовали с помощью AAV, будет переключаться на экспрессию одной копии мутантного аллеля. При экспрессии субъединицы мутантного SCN1A мыши развивают самопроизвольные пароксизмы в пределах 10 суток.

[209] Мыши B6(Cg)–Scn1atm1.1Dsf/J и контрольные мыши C57Bl6 получали инъекции, как в примере 2, с использованием AAV, экспрессирующих рекомбиназу CRE

под управлением промотора EF1 α , и AAV, содержащего селективный регуляторный элемент PV клеток SEQ ID NO: 32, который управляет экспрессией eGFP (SEQ ID NO: 36) или SCN1B (SEQ ID NO: 37). Когда все четыре инфузии завершали, непосредственно осуществляли телеметрическую имплантацию, (F20–EET, Data Sciences International). Осуществляли мониторинг данных электрокортикограммы непрерывно в течение 14 суток с 10 суток после хирургического вмешательства. Анализировали данные электрокортикограммы и все эпизоды пароксизмов регистрировали, аннотировали датой, временем начала, временем окончания, длительностью пароксизмов и оценкой тяжести. Фиг. 1 иллюстрирует частоту пароксизмов в 12-часовых интервалах за 14 суток после лечения. Мыши, которых лечили с использованием SCN1B, демонстрировали тенденцию к более низкой частоте пароксизмов по сравнению с контрольными животными.

[210] Это наблюдение находилось в соответствии с мнением о том, что β -единица натриевого ионного канала, например, SCN1B, может вносить вклад в направленную миграцию и сборку натриевого ионного канала и что увеличение экспрессии β -единицы избирательно в PV нейронах может вести к увеличенной направленной миграции и сборке Nav1.1 канала, таким образом приводя к тенденции к более низкой частоте пароксизмов и длительности у мышей, которых лечат SCN1B генной терапией.

ПРИМЕР 4

Лечение болезни Альцгеймера в модели на мышах

[211] Самок мышей APP/PS1 и WT мышей, которых разводили в PsychoGenics, использовали в исследовании. Мыши APP/PS1 содержат трансгены человека как для белка–предшественника амилоида β (APP), несущего шведскую мутацию (670 G–T и 671 A–C), так и пресенилина 1 (PSEN1), содержащего мутацию L166P, оба под управлением промотора Thy1. Эти мыши развивают симптомы болезни Альцгеймера, в том числе амилоидные бляшки и дефекты памяти. Дополнительное описание этих мышей можно найти в Radde et al, 2006 (Radde, Rebecca, et al. «A β 42–driven cerebral amyloidosis in transgenic mice reveals early and robust pathology». EMBO reports 7.9 (2006): 940–946).

[212] Мышей APP/PS1 использовали в качестве модели для того, чтобы определять эффект лечения с использованием SCN1B под управлением RE, оказываемый на симптомы болезни Альцгеймера. Мыши APP/PS1 и не трансгенные контроли получали инъекции или контрольного вектора, экспрессирующего eGFP, или лечебного вектора, экспрессирующего SCN1B, оба под управлением SEQ ID NO: 32; и им имплантировали EET передатчик, как в примере 3. Активность головного мозга оценивали в течение 24 часов 4 недели после хирургического вмешательства. Автоматически анализировали данные электрокортикограммы и сравнивали уровни мощности в различных частотных диапазонах. Фиг. 2 иллюстрирует высокую гамма–мощность (50–100 Гц) у не трансгенных контролей (WT), APP/PS1, и мышей APP/PS1, которых лечили с использованием SCN1B. Повышенная активность с высокой гамма–мощностью ассоциирована с пароксизмами у пациентов с болезнью Альцгеймера и пациентов с эпилепсией. Мыши APP/PS1 демонстрировали более высокий уровень активности с

высокой гамма-мощностью, чем контрольные мыши. Однако увеличению отсутствовало у мышей, получавших лечение, что указывает на эффективное лечение вектором.

ПРИМЕР 5

Избирательность к PV нейронам у мыши C57BL/6J (WT)

[213] Избирательность различных RE, раскрытых в настоящем описании, тестировали для селективной экспрессии гена в PV нейронах с использованием иммуногистохимических способов. Линию мышей C57BL/6J (WT) использовали для PV иммуногистохимического анализа. Экспрессирующие кассеты содержат репортерный трансген eGFP, функционально связанный с регуляторным элементом (SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 8) или CAG промотором в AAV9 конструкции.

[214] Системные инфузии детенышам: в постнатальные сутки 1 мыши C57BL/6J получали инфузии через инъекцию в лицевую вену с использованием AA9 вектора (от 1 E^{12} до 3 E^{12}) и 300 Ед инсулинового шприца с иглой 31 G. Для сбора ткани мышей умерщвляли через 21 сутки после инфузии через передозировку пентобарбитала натрия (i.p.) и осуществляли перфузию гепаринизированным (2,5 МЕ/мл) солевым раствором, после чего следовала перфузия 4% формальдегидом. Головной мозг удаляли и затем фиксировали погружением в 4% формальдегид на 24–48 часов при 4 градусах по Цельсию. Затем головной мозг помещали в PBS, содержащий 30% сахарозу, и оставляли погружаться при 4 градусах по Цельсию (□2–3 суток). После погружения индивидуальные полушария головного мозга замораживали в Tissue-Tek OCT с срединной линией, обращенной вниз. Замороженный головной мозг обрабатывали для сагиттальных срезов на криостате и помещали в PBS свободно плавать. Срезы окрашивали на eGFP и парвальбумин (PV) с использованием стандартных иммуногистохимических процедур с использованием антител курицы против GFP (Aves Lab, GFP-1020) и мыши против PV (Sigma, P3088).

[215] Системные инфузии взрослым: мыши C57BL/6 в возрасте 4 недель получали инфузию через инъекцию в хвостовую вену с использованием 60 мкл AAV9 вектора ($4,9^{13}$ до 1^{14} гк/мл), экспрессирующего eGFP. Для сбора ткани мышей умерщвляли через 21 сутки после инфузии через передозировку изофлурана, и целый головной мозг извлекали, промывали в PBS и помещали в отдельные 5 мл пробирки, содержащие ледяной 4% формальдегид. Ткань фиксировали при 4 градусах по Цельсию в течение ночи. В следующие сутки головной мозг помещали в PBS, содержащий 30% сахарозу, и оставляли погружаться при 4 градусах по Цельсию. После погружения индивидуальные полушария головного мозга замораживали в Tissue-Tek OCT со срединной линией, обращенной вниз. Замороженный головной мозг обрабатывали для сагиттальных срезов на криостате и помещали в PBS свободно плавать. Срезы окрашивали на EGFP и парвальбумин (PV) с использованием стандартных иммуногистохимических процедур с использованием антител курицы против GFP (Aves Lab, GFP-1020) и мыши против PV (Sigma, P3088).

[216] Иммуногистохимический протокол: иммуногистохимию использовали для того, чтобы анализировать совместную локализацию eGFP сигнала и PV сигнала с

использованием антитела против PV, где наложение сигналов показано как белые или светло-серые пятна на изображениях на верхних панелях (слитые), где репрезентативное наложение показано стрелками. Наложение eGFP и PV флуоресценции указывает на экспрессию в PV клетках. Такие эксперименты можно использовать для того, чтобы определять селективную экспрессию при экспрессии в PV клетках. Для того чтобы осуществлять иммуногистохимические эксперименты, ткани, полученные у каждой мыши, блокировали блокирующим буферным раствором (содержащим 3% BSA, 3% NGS, 0,3% Triton X-100, 0,2% Tween-20 в $1 \times$ PBS) в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем ткани инкубировали с первичными антителами в блокирующем буфере в течение ночи при 4C, промывали три раза в 1 мл $1 \times$ PBS, каждый с 5-минутным интервалом. Затем ткани инкубировали со вторичными антителами в блокирующем буфере в течение 1 часа при комнатной температуре, после чего следует промывание три раза, каждый раз в 1 мл $1 \times$ PBS и с 5-минутными интервалами. Ткани инкубировали DAPI (1:1000) в PBS буфере в течение 5 минут и промывали два раза в 1 мл $1 \times$ PBS. Ткани закрепляли на предметных стеклах, визуализировали и анализировали с использованием флуоресцентного микроскопа. Изображения получали с использованием системы визуализации Vectra 3 (Perkin Elmer) и количественно определяли совместное мечение при окрашивании eGFP и PV с использованием inForm-Tissue Finder, передового программного обеспечения анализа изображений, или оценивали вручную. По меньшей мере 80 GFP положительных клеток подсчитывали на каждой панели прежде, чем определять процентную долю совместной локализации.

[217] Фиг. 3А–3С иллюстрирует результаты иммуногистохимических экспериментов, которые выполняли у детенышей после системных инъекций AAV9. Фиг. 4А–4С иллюстрируют результаты схожих иммуногистохимических экспериментов, которые выполняли у взрослых мышей после инъекций AAV9.

[218] Фиг. 3А иллюстрирует наложение иммуногистохимических экспериментов, которые выполняли у детенышей после системных инъекций AAV9. Фиг. 3В иллюстрирует количественное определение совместной локализации в иммуногистохимических экспериментах, где избирательность к PV клеткам измеряли как процентную долю GFP+ клеток, которые также были PV+, по сравнению с экспрессией eGFP под управлением промотора CAG.

[219] Фиг. 4А иллюстрирует наложение иммуногистохимических экспериментов, которое выполняли у взрослых мышей после системных инъекций AAV9. Фиг. 4В иллюстрирует количественное определение совместной локализации иммуногистохимических экспериментов, в которых избирательность PV клеток измеряли как процентную долю GFP+ клеток, которые также были PV+, по сравнению с eGFP экспрессией под управлением EF1 α .

[220] По оценкам, ГАМК-эргические нейроны составляют приблизительно 20% CNS, тогда как PV клетки составляют приблизительно 40% ГАМК-эргических нейронов, что обозначает, что PV клетки составляют приблизительно 8% всех нейронов в CNS. См.

Pelkey, KA et al., 2017; и Lee, S. et al., 2010. Таким образом, можно предсказывать, что приблизительно 8% клеток, меченных неселективным регуляторным элементом (например, CAG, EF1 α или конститутивным промотором), будут PV–положительными, или в пределах этого диапазона. Следовательно, экспрессия в PV клетках выше 8% указывает на увеличенную избирательность в PV клетках. Стоит отметить, что инъекции AAV9, содержащие регуляторный элемент SEQ ID NO: 8, вели к приблизительно 60% клеток в качестве PV–положительных, что было в 7,5 раза выше, чем то, что ожидали по распределению PV клеток.

[221] Схожие иммуногистохимические эксперименты, как описано выше, осуществляли для того, чтобы определять селективную экспрессию дополнительных регуляторных элементов, SEQ ID NO: 2–7 и 9–22 по сравнению с неселективным регуляторным элементом, обладающим последовательностью SEQ ID NO: 34, помимо того, что AAVDJ вирусный вектор использовали для того, чтобы доставлять eGFP, функционально связанный с регуляторным элементом, мышам C57BL/6J (WT). Такой AAVDJ вирус инъецировали непосредственно в CNS в гиппокамп взрослых мышей. По меньшей мере 80 GFP положительных клеток подсчитывали в каждом эксперименте перед вычислением процентной доли совместной локализации или избирательности как процентной доли GFP положительных клеток, которые также были PV–положительными. Фиг. 5A–5F иллюстрируют флуоресцентную визуализацию, используемую для определения совместной локализации, или избирательности, измеряемой как процентная доля eGFP положительных клеток, которые также были PV–положительными, и в сравнении с сигналом неселективного регуляторного элемента SEQ ID NO: 34. Клетки, которые положительны по маркеру, выглядят как белые/серые клетки на изображениях. Слитые изображения иллюстрируют перекрытие между соответствующими изображениями eGFP и против PV. Клетки, положительные как по eGFP, так и по PV, выглядят как белые/светло–серые клетки на слитом изображении. Фиг. 6 иллюстрирует количественное определение анализа совместной локализации, измеряемое как процентная доля eGFP+ клеток, которые также являлись PV+.

ПРИМЕР 6

Лечение синдрома Драве у различных линий мышей

[222] Лечение синдрома Драве и/или его симптомов с использованием экспрессирующих кассет, описанных в настоящем описании, можно тестировать на различных линиях мышей, таких как линии мышей B6(Cg)–Scn1atm1.1Dsf/J, как описано выше, Scn1atm1Kea и Scn1a–R1470X. Эти линии мышей представляют собой устоявшиеся модели на мышах для синдрома Драве. Линиям мышей Scn1atm1Kea и Scn1a–R1470X не нужна рекомбиназа CRE.

[223] Мышь Scn1atm1Kea (доступны в Jackson Laboratory; описаны в Hawkins et al., Scientific Reports, том 7: 15327 (2017)) содержит делецию первого кодирующего экзона SCN1A. Мыши, гомозиготные по нокаутному аллелю SCN1A, отличаются тремором, атаксией, пароксизмами и погибают к 16–м постнатальным суткам. Гетерозиготные мыши

с признаками C57BL/6 развивают самопроизвольные пароксизмы и погибают за недели. Такой штамм мышей можно использовать для исследования безопасности и эффекта при лечении эпилепсии и синдрома Драве. Дополнительную информацию см. в Miller et al., *Genes Brain Behav.* 2014 Feb;13(2):163–72.

[224] Мышь *Scn1a*–R1470X представляет собой мышь с нокином, которая несет преждевременный терминирующий кодон, R1407X, в экзоне 21 гена *SCN1A*. Та же мутация идентифицирована в качестве патогенной мутации у трех неродственных пациентов с SMEI. Детеныши *Scn1a*RX/RX отличаются рецидивирующими самопроизвольными пароксизмами на 12 постнатальные сутки, включая тонико–клонические и клонические пароксизмы на 12–16 постнатальные сутки, и ритмичные дергающиеся движения и непреднамеренные сокращения мышц. Дополнительную информацию см. в Ogiwara et al., *Journal of Neuroscience*, May 30, 2007, 27 (22) 5903–5914.

[225] Для того чтобы тестировать композиции, описанные в настоящем описании, такие как AAV генная терапия, и лечение с использованием такой генной терапии, мышам с синдромом Драве из каждого из штаммов мышей, описанных выше, и контрольным мышам (например, мышь дикого типа или мышь с синдромом Драве без лечения для штамма) инъецируют (например, вводят посредством интраперитонеальной инъекции) AAV, экспрессирующие или eGFP или другой репортерный ген, или экспрессирующую кассету, содержащую один или более PV–селективных RE (например, SEQ ID NO: 1–32), как раскрыто в настоящем описании, функционально связанных с трансгеном, раскрытым в настоящем описании, таким как *SCN1A*, *SCN1B* или *SCN2B*, или любой из SEQ ID NO: 37–39, или ее вариантом или функциональным фрагментом. После инъекций AAV, осуществляют мониторинг выживаемости мышей с течением времени. Мониторинг всех мышей осуществляли ежедневно по общему состоянию здоровья (например, массе, гидратации, грумингу и подвижности) и регистрировали гибель. Телеметрическую имплантацию можно осуществлять непосредственно после инъекций AAV (F20–EET, Data Sciences International). Данные электрокортикограммы можно регистрировать и осуществлять их мониторинг непрерывно в течение по меньшей мере 14 суток от 10 суток после хирургического вмешательства. Все эпизоды пароксизмов можно регистрировать в течение по меньшей мере 14 суток после лечения AAV, аннотировать датой, временем начала, временем окончания, длительностью и оценкой тяжести. Снижение частоты и/или длительности пароксизмов после лечения с использованием AAV, как описано выше, по сравнению с eGFP контролем или контролем без лечения, указывает на эффект генной терапии при снижении симптомов и/или тяжести синдрома Драве.

[226] После лечения мышей с использованием AAV можно осуществлять мониторинг уровней экспрессии трансгена (например, *SCN1A*; *SCN1B*; *SCN2B*; ДНК–связывающего белка, такого как транскрипционный активатор, который модулирует эндогенный *SCN1A*, *SCN1B* или *SCN2B*; любой из SEQ ID NO: 37–39; или любого ее варианта или функционального фрагмента) с течением времени с использованием различных способов ПЦР и/или секвенирования для того, чтобы показывать, что лечение

AAV может вести к увеличению экспрессии гена в PV клетках. Анализ нозерн-блоттинга и гибридизацию *in situ* также можно использовать для того, чтобы анализировать экспрессию трансгена *in vivo*. Также после лечения можно осуществлять мониторинг уровня белка, экспрессируемого с белка, чтобы показывать что увеличение экспрессии трансгена коррелирует с увеличением соответствующего белка *in vivo*. Уровни белка можно анализировать с использованием различных способов, включая в качестве неограничивающих примеров, анализ вестерн-блоттинга, анализы иммуногистохимии, иммунофлуоресцентной гистохимии и/или ELISA. Формирование функциональных потенциалзависимых натриевых ионных каналов также можно анализировать с использованием анализа фиксации тока.

[227] Индуцированные гипертермией пароксизмы можно оценивать для того, чтобы сравнивать мышей дикого типа и/или мышей с синдромом Драве без лечения с мышами с синдромом Драве, которых лечили генной терапией AAV, содержащей экспрессирующую кассету, описанную в настоящем описании (например, экспрессирующую кассету, содержащую один или более RE по этому раскрытию, функционально связанных с трансгеном по этому раскрытию, таким как SCN1A, SNC2A, SNC8A, SCN1B, SCN2B, его функциональный фрагмент или ДНК-связывающий белок, который модулирует эндогенный SCN1A, SNC2A, SNC8A, SCN1B или SCN2B). В таких экспериментах осуществляют мониторинг центральной температуры тела с использованием ректального температурного зонда RET-3 (Physitemp Instruments, Inc, New Jersey, USA) и управление с помощью лампы обогрева, соединенной с температурным регулятором грызуна (TCAT-2DF, Physitemp), который переконфигурирован с использованием контроллера Partlow 1160+ (West Control Solutions, Brighton, UK). Температуру тела поднимали на 0,5 °C каждые две минуты до начала первой клонической судороги. По сравнению с мышами с синдромом Драве без лечения, ожидали, что мыши с синдромом Драве, которых лечили генной терапией AAV, имеют более высокую пороговую температуру перед началом первой клонической судороги и/или имеют более высокую долю мышей, которые остаются без пароксизмов при максимальной тестируемой температуре.

[228] Различные дозы AAV, содержащего экспрессирующую кассету, также можно вводить мышам для того, чтобы определять профиль безопасности и эффекта для каждого лечения генной терапией. Эти доклинические исследования также могут давать информацию об оптимальной дозе(ах) генной терапии для использования при лечении синдрома Драве.

ПРИМЕР 7

Лечение болезни Альцгеймера у мыши

[229] Самок мышей APP/PS1 и мышей дикого типа (WT), которых разводят в PsychoGenics и которые представляют собой общепринятую модель болезни Альцгеймера на мышах, можно использовать для исследования безопасности и эффекта композиций, описанных в настоящем описании, при лечении болезни Альцгеймера, которые содержат

один или более PV–селективных RE. Мыши APP/PS1 описаны выше в примере 4.

[230] Мышам APP/PS1 и не трансгенным контролям инъецируют или контрольный AAV вектор, экспрессирующий eGFP, или лечебный AAV вектор, содержащий один или более PV–селективных RE, раскрытых в настоящем описании, например, SEQ ID NO: 1–32, функционально связанных с трансгеном, который является дефицитным или ослабленным при болезни Альцгеймера, таким как SCN1A, SNC2A, SNC8A, SCN1B, SCN2B, KV3.1, KV3.3, STXBP1, ДНК–связывающий белок, который модулирует эндогенный ген (например, SCN1A, SNC2A, SNC8A, SCN1B, SCN2B, KV3.1, KV3.3 или STXBP1) или любая одна из SEQ ID NO: 37–43 или ее функциональный фрагмент.

[231] После инъекций AAV, осуществляют мониторинг выживаемости мышей с течением времени. Мониторинг всех мышей осуществляют ежедневно по общему состоянию здоровья (например, массе, гидратации, грумингу и подвижности) и регистрируют гибели. После инъекций AAV, мышам также имплантируют ЕЕТ передатчик, как описано выше в примере 3. Активность головного мозга можно регистрировать и осуществлять ее мониторинг 24 часа в течение по меньшей мере 4 недель после хирургического вмешательства. Можно автоматически анализировать данные электрокортикограммы и сравнивать уровни мощности в различных частотных диапазонах (50–100 Гц) в различных группах: WT мыши, мыши APP/PS1 без лечения и мыши APP/PS1 с AAV лечением, каждую лечили AAV генной терапией, как описано выше. Увеличенная активность с высокой гамма–мощностью ассоциирована с пароксизмами у пациентов с болезнью Альцгеймера и пациентов с эпилепсией. Таким образом, ожидали, что мыши APP/PS1 без лечения демонстрируют более высокий уровень активности с высокой гамма–мощностью, чем контрольные мыши, хотя ожидают, что это увеличение будет отсутствовать или будет снижено у мышей, которых лечили, что указывает на эффективное лечение с использованием AAV генной терапии.

[232] После лечения мышей с использованием AAV, можно осуществлять мониторинг уровней экспрессии трансгена с течением времени, используя различные способы ПЦР и/или секвенирования, чтобы показывать, что AAV лечение может вести к увеличению эндогенной экспрессии трансгена. Анализ нозерн–блоттинга и гибридизацию *in situ* также можно использовать для того, чтобы анализировать экспрессию гена *in vivo*. Также после лечения можно осуществлять мониторинг уровня белка, экспрессируемого с трансгена, чтобы показывать, что увеличение экспрессии гена коррелирует с увеличением уровней белка. Уровень белка можно анализировать с использованием различных способов, включая в качестве неограничивающих примеров анализ вестерн–блоттинга, иммуногистохимию и/или анализы ELISA. Формирование функциональных потенциалзависимых натриевых или калиевых ионных каналов также можно анализировать с использованием анализа фиксации тока.

[233] Различные дозы AAV, содержащего экспрессирующую кассету, также можно вводить мышам для того, чтобы определять профиль безопасности и эффекта для каждого лечения генной терапией. Эти доклинические исследования также могут давать

информацию об оптимальной дозе(ах) генной терапии для использования при лечении болезни Альцгеймера.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Кассета нуклеиновой кислоты, содержащая:
один или более регуляторных элементов, функционально связанных с трансгеном, который ведет к селективной экспрессии в парвальбуминовых (PV) нейронах в CNS относительно одной или более не PV клеток в CNS.
2. Кассета нуклеиновой кислоты по п. 1, где каждый регуляторный элемент содержит (i) последовательность SEQ ID NO: 1–32, (ii) функциональный фрагмент или их сочетание или (iii) последовательность с по меньшей мере 80% идентичностью последовательностей с (i) или (ii).
3. Кассета нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1–2, где по меньшей мере один из регуляторных элементов получают у человека.
4. Кассета нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1–2, где по меньшей мере один из регуляторных элементов получают у не относящегося к человеку млекопитающего.
5. Кассета нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1–2, где регуляторные элементы являются не встречаемыми в природе.
6. Кассета нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1–2, где регуляторные элементы ведут к селективной экспрессии трансгена в PV нейронах, которая больше, чем экспрессия того же трансгена, когда он функционально связан с неселективным регуляторным элементом, как измеряют с помощью анализа совместной локализации.
7. Кассета нуклеиновой кислоты по п. 6, где неселективный регуляторный элемент представляет собой конститутивный промотор.
8. Кассета нуклеиновой кислоты по п. 6, где неселективный регуляторный элемент представляет собой любое из CAG, EF1 α , SV40, CMV, UBC, PGK и CBA.
9. Кассета нуклеиновой кислоты по п. 6, где регуляторные элементы ведут к селективной экспрессии трансгена в PV нейронах на уровне, который по меньшей мере в 2 раза выше, по меньшей мере в 5 раз выше или по меньшей мере в 10 раз выше по сравнению с селективной экспрессией трансгена в PV нейронах, когда он функционально связан с неселективным регуляторным элементом, как измеряют с помощью анализа совместной локализации.
10. Кассета нуклеиновой кислоты по п. 6, где регуляторные элементы ведут к селективной экспрессии в PV нейронах, которая составляет по меньшей мере на 2%, по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, 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% или по меньшей мере на 95% выше, чем экспрессия в PV нейронах, когда трансген функционально связывают с неселективным регуляторным элементом.
11. Кассета нуклеиновой кислоты по п. 6, где регуляторные элементы ведут к

селективной экспрессии в PV нейронах, которая приблизительно в 1,5 раза, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 7,5 раза, 8 раз, 9 раз или 10 раз выше, чем ожидают для естественного распределения PV нейронов в CNS.

12. Кассета нуклеиновой кислоты по п. 6, где анализ совместной локализации представляет собой иммуногистохимический анализ.

13. Кассета нуклеиновой кислоты по п. 12, где иммуногистохимический анализ содержит антитело против PV.

14. Кассета нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1–2, где трансген кодирует субъединицу ионного канала, регулятор нейромедиатора, ДНК–связывающий домен, редактирующий гены белок или его вариант или функциональный фрагмент.

15. Кассета нуклеиновой кислоты по п. 14, где субъединица ионного канала представляет собой α –субъединицу или β –субъединицу натриевого ионного канала или субъединицу калиевого ионного канала.

16. Кассета нуклеиновой кислоты по п. 15, где трансген содержит любое из (i) SEQ ID NO: 37–43; (ii) ее функционального фрагмента; или (iii) последовательности, обладающей по меньшей мере 80% идентичностью последовательностей с (i) или (ii).

17. Кассета нуклеиновой кислоты по п. 15, где трансген содержит (i) SCN1A, SNC2A, SNC8A, SCN1B, SCN2B, KV3.1 или KV3.3; (ii) ее функциональный фрагмент; или (iii) последовательность, обладающую по меньшей мере 80% идентичностью последовательностей с (i) или (ii).

18. Кассета нуклеиновой кислоты по п. 14, где трансген представляет собой регулятор нейромедиатора, который содержит (i) STXBP1, (ii) его функциональный фрагмент, или (iii) последовательность, обладающую по меньшей мере 80% идентичностью последовательностей с (i) или (ii).

19. Кассета нуклеиновой кислоты по п. 14, где трансген содержит ДНК–связывающий белок, который модулирует экспрессию эндогенного гена.

20. Кассета нуклеиновой кислоты по п. 19, где эндогенный ген представляет собой SCN1A, SNC2A, SNC8A, SCN1B, SCN2B, KV3.1, KV3.2, KV3.3 или STXBP1.

21. Кассета нуклеиновой кислоты по п. 14, где трансген содержит редактирующий гены белок.

22. Кассета нуклеиновой кислоты по п. 21, где редактирующий гены белок представляет собой белок Cas.

23. Кассета нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1–2, где регуляторные элементы совместно составляют меньше чем 2,5 т. о., меньше чем 1,5 т. о., меньше чем 1 т. о. или меньше чем 500 п. о. в размере.

24. Кассета нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1–2, где не PV клетки содержат один или более типов не PV клеток в CNS.

25. Кассета нуклеиновой кислоты по п. 24, где не PV клетки содержат одно или более из возбуждающих нейронов, дофаминергических нейронов, астроцитов, микроглии и моторных нейронов.

26. Кассета нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1–2, где кассета нуклеиновой кислоты представляет собой линейную конструкцию.

27. Кассета нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1–2, где кассета нуклеиновой кислоты представляет собой вектор.

28. Кассета нуклеиновой кислоты по п. 27, где вектор представляет собой плазмиду.

29. Кассета нуклеиновой кислоты по п. 28, где вектор представляет собой вирусный вектор.

30. Кассета нуклеиновой кислоты по п. 29, где вирусный вектор представляет собой аденоассоциированный вирусный (AAV) вектор.

31. Кассета нуклеиновой кислоты по п. 30, где AAV вектор представляет собой AAV1, AAV8, AAV9, scAAV1, scAAV8 или scAAV9.

32. Кассета нуклеиновой кислоты по п. 29, где вирусный вектор представляет собой лентивирусный вектор.

33. Кассета нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1–2, где регуляторные элементы содержат меньше чем 600 п. о. непрерывной последовательности в пределах 10 т. о. от сайта инициации транскрипции GAD2, GAD1, SYN1, NKX2.1, DLX1, DLX5/6, SST, PV или VIP.

34. Способ лечения неврологического нарушения или состояния у нуждающегося в этом субъекта, способ включает доставку терапевтически эффективного количества кассеты нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1–33.

35. Способ увеличения селективной экспрессии трансгена в PV нейронах в CNS, который включает приведение в контакт клетки с кассетой нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1–33.

36. Способ направления экспрессии любого трансгена в PV нейроны в CNS, способ включает функциональное связывание одного или более селективных регуляторных элементов PV нейронов с трансгеном.

37. Способ по п. 36, где каждый из регуляторных элементов содержит (i) последовательность SEQ ID NO: 1–32, (ii) функциональный фрагмент или их сочетание или (iii) последовательность с по меньшей мере 80% идентичностью последовательностей с (i) или (ii).

38. Способ по любому из пп. 36–37, где регуляторные элементы ведут к селективной экспрессии трансгена в PV нейронах, которая больше, чем экспрессия того же трансгена, когда он функционально связан с неселективным регуляторным элементом, как измеряют с помощью анализа совместной локализации.

39. Способ по п. 38, где неселективный регуляторный элемент представляет собой конститутивный промотор.

40. Способ по п. 38, где неселективный регуляторный элемент представляет собой любое из CAG, EF1 α , SV40, CMV, UBC, PGK и CBA.

41. Способ по п. 38, где регуляторные элементы ведут к селективной экспрессии

трансгена в PV нейронах на уровне, который по меньшей мере в 2 раза выше, по меньшей мере в 5 раз выше, или по меньшей мере в 7 раз выше, или по меньшей мере в 10 раз выше по сравнению с неселективным регуляторным элементом, когда он функционально связан с трансгеном, как измеряют с помощью анализа совместной локализации.

42. Способ по п. 38, где регуляторные элементы ведут к селективной экспрессии в PV нейронах, которая по меньшей мере на 2%, по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, 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% или по меньшей мере на 95% выше, чем экспрессия в PV нейронах, когда трансген функционально связывают с неселективным регуляторным элементом.

43. Способ по п. 38, где регуляторные элементы ведут к селективной экспрессии в PV нейронах, которая приблизительно в 1,5 раза, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 7,5 раза, 8 раз, 9 раз или 10 раз выше, чем ожидают для естественного распределения PV нейронов в CNS.

44. Способ по любому из пп. 36–37, где трансген представляет собой любое из SCN1A, SNC2A, SNC8A, SCN1B, SCN2B, KV3.1, KV3.3, STXBP1, ДНК-связывающего белка, редактирующего гены белка или его функционального фрагмента.

45. Способ по любому из пп. 36–37, где регуляторные элементы и трансген находятся в AAV.

46. Способ по п. 45, где AAV представляет собой AAV9.

47. Способ лечения неврологического состояния или нарушения у нуждающегося в этом субъекта, способ включает приведение в контакт клетки с кассетой нуклеиновой кислоты, содержащей: один или более регуляторных элементов, функционально связанных с трансгеном, что ведет к селективной экспрессии трансгена в PV нейронах относительно одной или более не PV клеток в CNS.

48. Способ по п. 47, где каждый из регуляторных элементов содержит (i) последовательность SEQ ID NO: 1–32, (ii) функциональный фрагмент или их сочетание или (iii) последовательность с по меньшей мере 80% идентичностью последовательностей с (i) или (ii).

49. Способ по любому из пп. 47–48, где трансген представляет собой субъединицу потенциалзависимого ионного канала или ее вариант или функциональный фрагмент.

50. Способ по п. 49, где субъединица представляет собой β -субъединицу натриевого ионного канала.

51. Способ по п. 49, где субъединица представляет собой α -субъединицу натриевого ионного канала.

52. Способ по п. 49, где субъединица относится к калиевому ионному каналу.

53. Способ по любому из пп. 47–48, где трансген представляет собой любое из (i)

SCN1A, SCN1B, SCN2B, KV3.1 и KV3.3; (ii) его функционального фрагмента; или (iii) последовательности, обладающей по меньшей мере 80% идентичностью последовательностей с (i) или (ii).

54. Способ по любому из пп. 47–48, где трансген представляет собой ДНК–связывающий белок.

55. Способ по п. 54, где ДНК–связывающий белок модулирует эндогенный ген.

56. Способ по п. 55, где эндогенный ген представляет собой SCN1A, SNC2A, SNC8A, SCN1B, SCN2B, KV3.1, KV3.3 или STXBP1.

57. Способ по любому из пп. 47–48, где трансген представляет собой редактирующий гены белок.

58. Способ по п. 57, где редактирующий гены белок представляет собой белок Cas.

59. Способ по любому из пп. 47–48, где неврологическое состояние или нарушение ассоциировано с гаплонедостаточностью или мутацией в любом из SCN1A, SNC2A, SNC8A, SCN1B, SCN2B, KV3.1, KV3.3 и STXBP1.

60. Способ по любому из пп. 47–48, где неврологическое состояние или нарушение представляет собой эпилепсию, нейродегенерацию, таупатию или нейрональную гиповозбудимость.

61. Способ по любому одному из 47–48, где неврологическое состояние или нарушение представляет собой синдром Драве.

62. Способ по любому из пп. 47–48, где неврологическое состояние или нарушение представляет собой болезнь Альцгеймера.

63. Способ по любому из пп. 47–48, где регуляторные элементы ведут к селективной экспрессии трансгена в PV нейронах, которая больше, чем экспрессия того же трансгена, когда он функционально связан с неселективным регуляторным элементом, как измеряют с помощью анализа совместной локализации.

64. Способ по п. 63, где неселективный регуляторный элемент представляет собой конститутивный промотор.

65. Способ по п. 64, где неселективный регуляторный элемент представляет собой любое из CAG, EF1 α , SV40, CMV, UBC, PGK и CBA.

66. Способ по любому из пп. 64–65, где регуляторные элементы ведут к селективной экспрессии в PV нейронах на уровне, который по меньшей мере в 2 раза выше, по меньшей мере в 5 раз выше, или по меньшей мере в 7 раз выше или по меньшей мере в 10 раз выше по сравнению с неселективным регуляторным элементом, когда он функционально связан с трансгеном, как измеряют с помощью анализа совместной локализации.

67. Способ по любому из пп. 64–65, где регуляторные элементы ведут к селективной экспрессии в PV нейронах, которая по меньшей мере на 2%, по меньшей мере на 5%, по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 15%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 35%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на

55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, 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% или по меньшей мере на 95% выше, чем экспрессия в PV нейронах, когда трансген функционально связывают с неселективным регуляторным элементом.

68. Способ по любому из пп. 64–65, где регуляторные элементы ведут к селективной экспрессии в PV нейронах, которая приблизительно в 1,5 раза, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 7,5 раза, 8 раз, 9 раз или 10 раз выше, чем ожидают для естественного распределения PV нейронов в CNS.

69. Способ по любому из пп. 47–48, где кассета нуклеиновой кислоты находится в AAV.

70. Способ по п. 69, где AAV представляет собой AAV9.

71. Способ лечения синдрома Драве, который включает приведение в контакт клетки с AAV, содержащим трансген, где трансген представляет собой любое из (i) SCN1A, SNC2A, SNC8A, SCN1B, SCN2B или ДНК–связывающего белка, (ii) его функционального фрагмента и (iii) последовательности, обладающей по меньшей мере 80% идентичностью последовательностей с (i) или (ii).

72. Способ по п. 71, где ДНК–связывающий белок модулирует эндогенный ген.

73. Способ по п. 72, где эндогенный ген представляет собой SCN1A, SNC2A, SNC8A, SCN1B или SCN2B.

74. Способ по любому из пп. 71–73, где AAV дополнительно содержит один или более селективных регуляторных элементов PV нейронов, функционально связанных с трансгеном.

75. Способ по п. 74, где каждый из регуляторных элементов независимо содержит (i) последовательность SEQ ID NO: 1–32, (ii) функциональный фрагмент или их сочетание или (iii) последовательность с по меньшей мере 80% идентичностью последовательностей с (i) или (ii).

76. Способ лечения болезни Альцгеймера, который включает приведение в контакт клетки с AAV, содержащим трансген, где трансген представляет собой любое из (i) SCN1A, SNC2A, SNC8A, SCN1B, SCN2B, KV3.1, KV3.3, STXBP1 или ДНК–связывающего белка; (ii) его функционального фрагмента; и (iii) последовательности, обладающей по меньшей мере 80% идентичностью последовательностей с (i) или (ii).

77. Способ по п. 76, где ДНК–связывающий белок модулирует эндогенный ген.

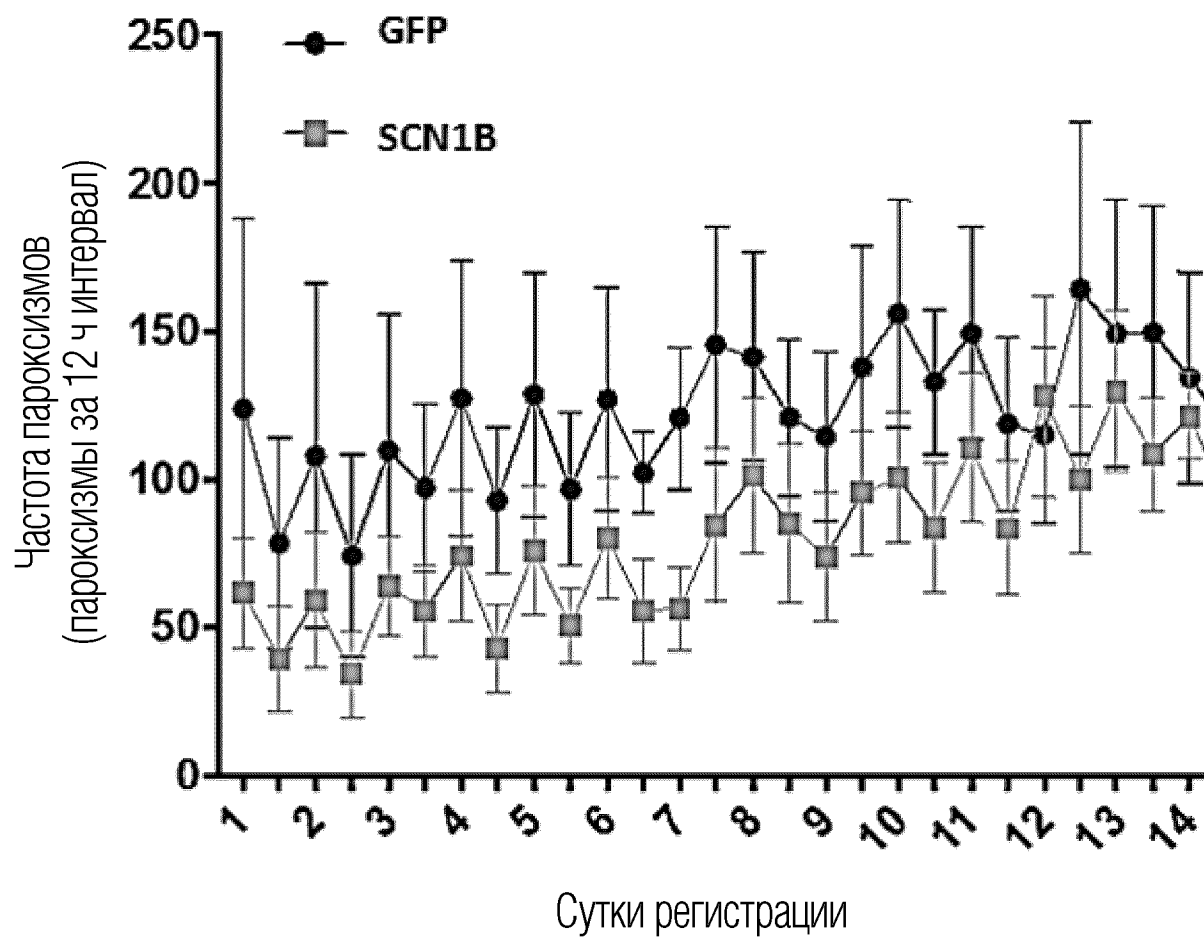
78. Способ по п. 77, где эндогенный ген представляет собой SCN1A, SNC2A, SNC8A, SCN1B, SCN2B, KV3.1, KV3.3 или STXBP1.

79. Способ по любому из пп. 76–78, где AAV дополнительно содержит один или более селективных регуляторных элементов PV нейронов, функционально связанных с трансгеном.

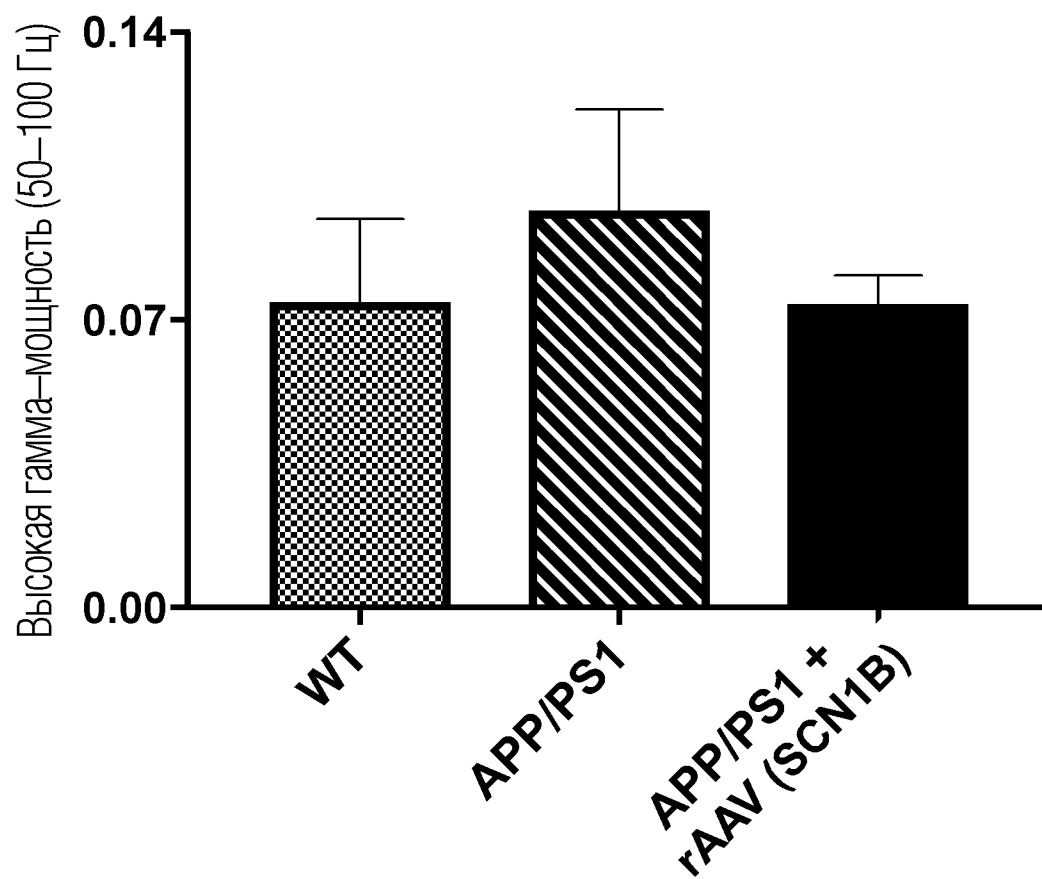
80. Способ по п. 79, где каждый из регуляторных элементов независимо содержит (i) последовательность SEQ ID NO: 1–32, (ii) функциональный фрагмент или их сочетание или (iii) последовательность с

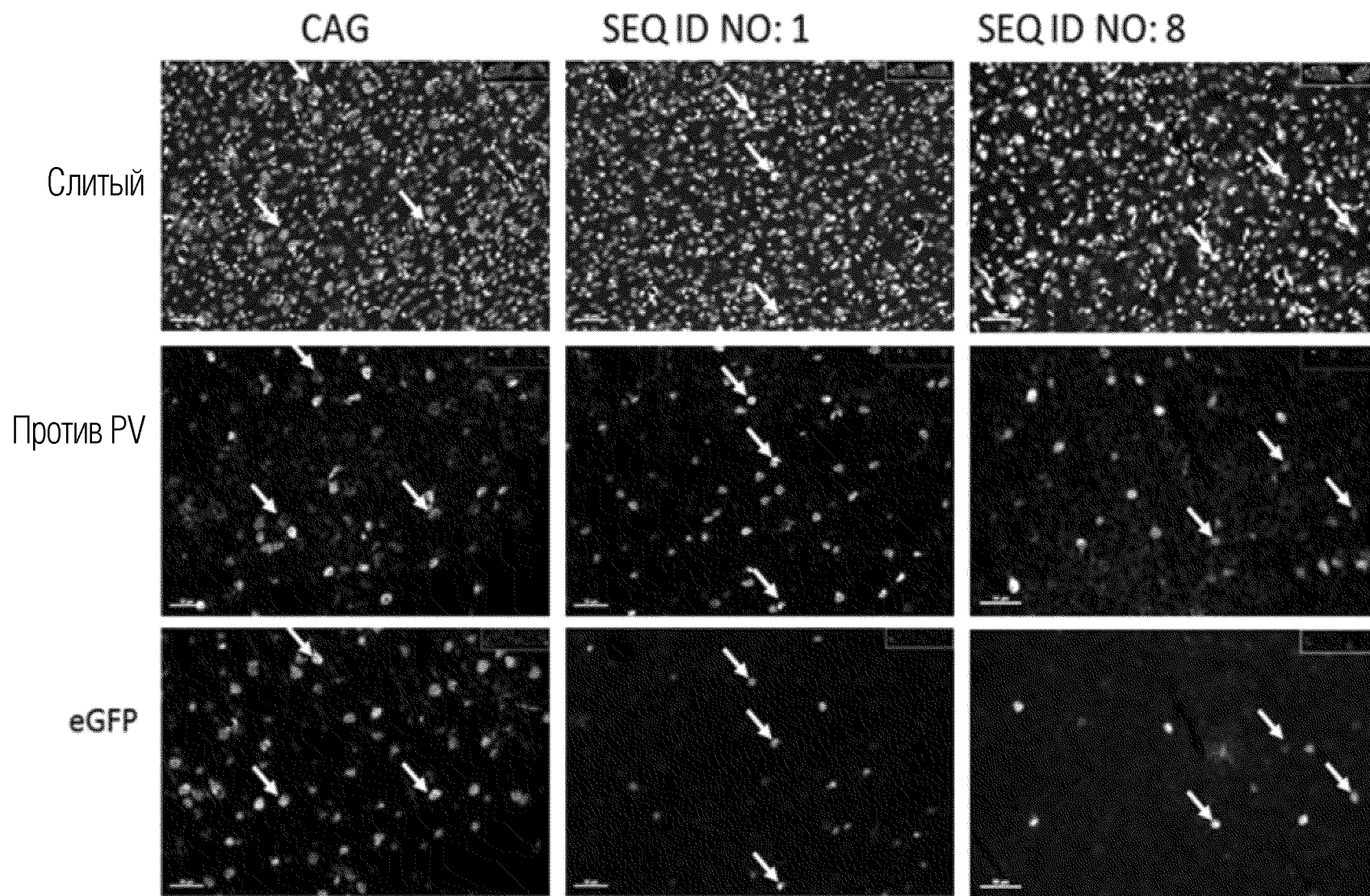
по меньшей мере 80% идентичностью последовательностей с (i) или (ii).

ФИГ. 1



ФИГ. 2

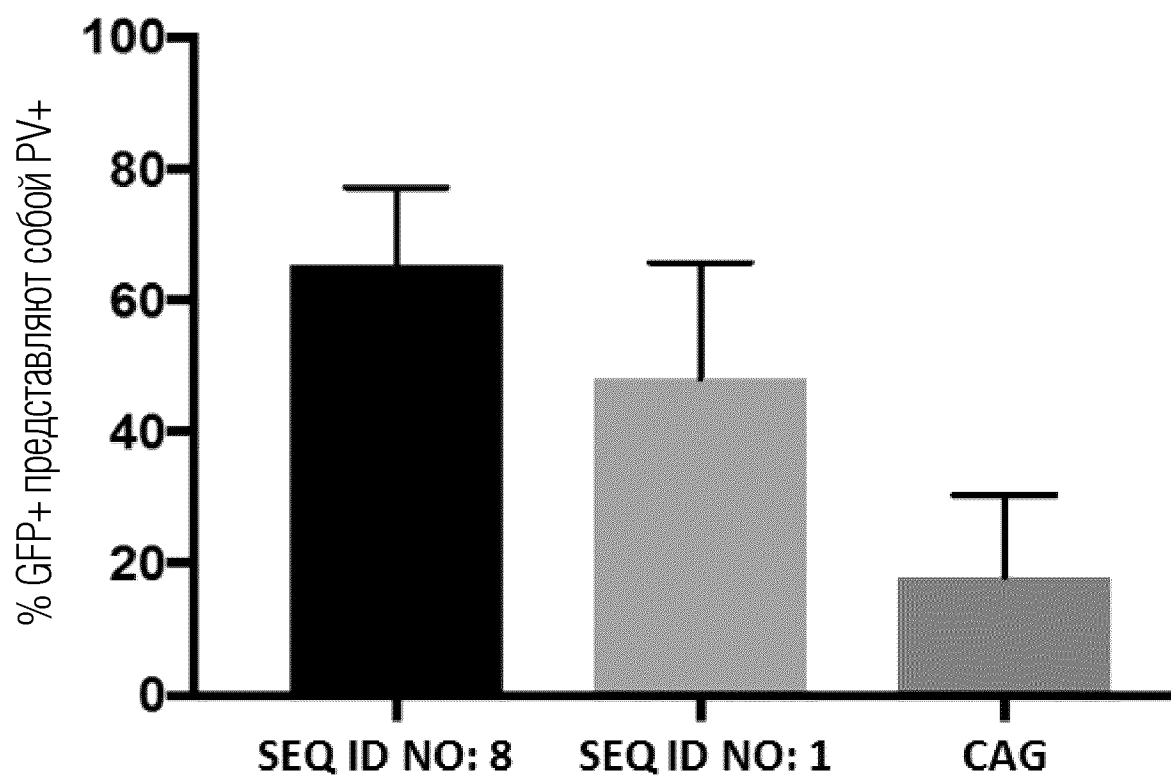


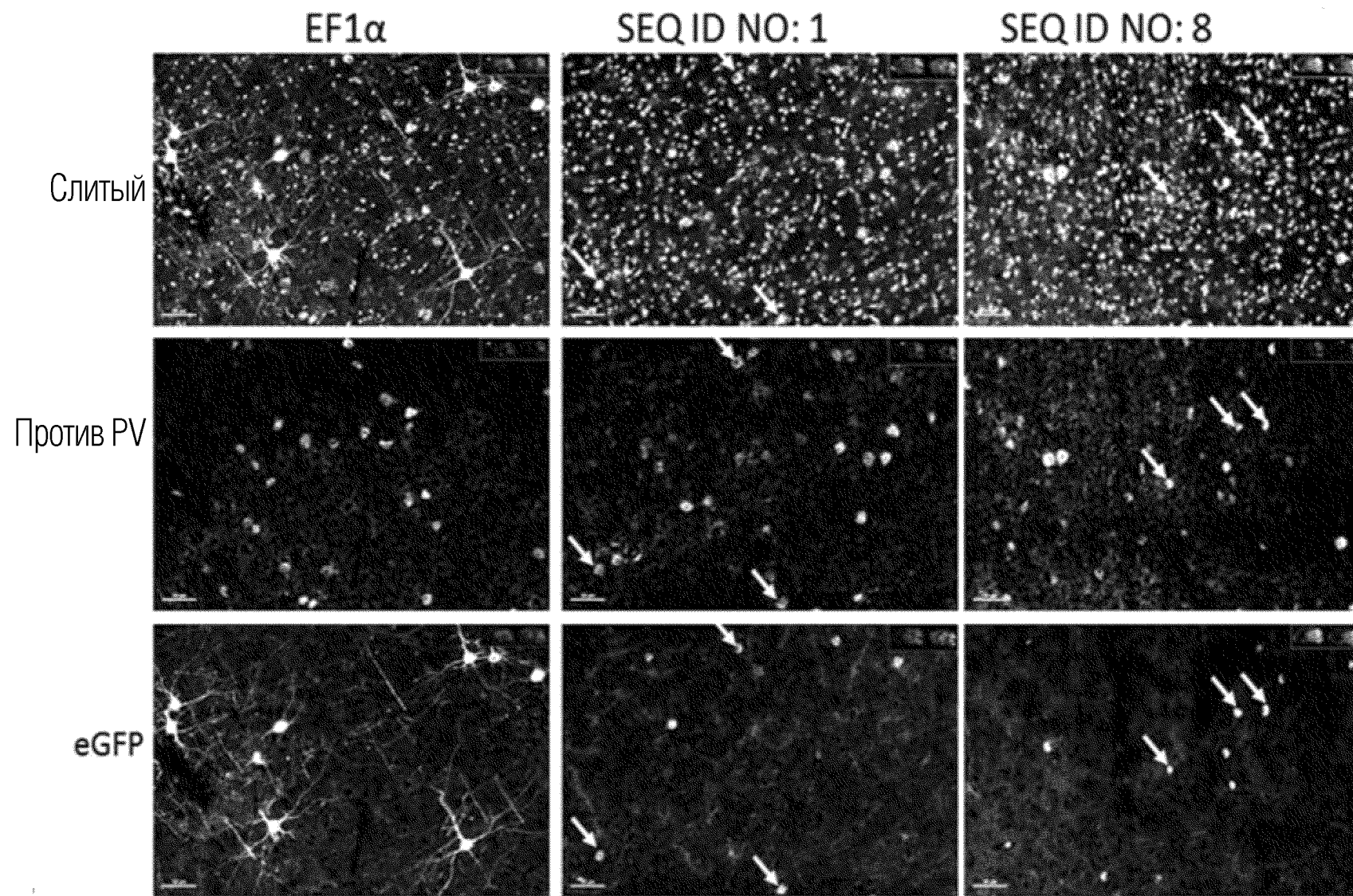


3/14

ФИГ. 3А

ФИГ. 3В



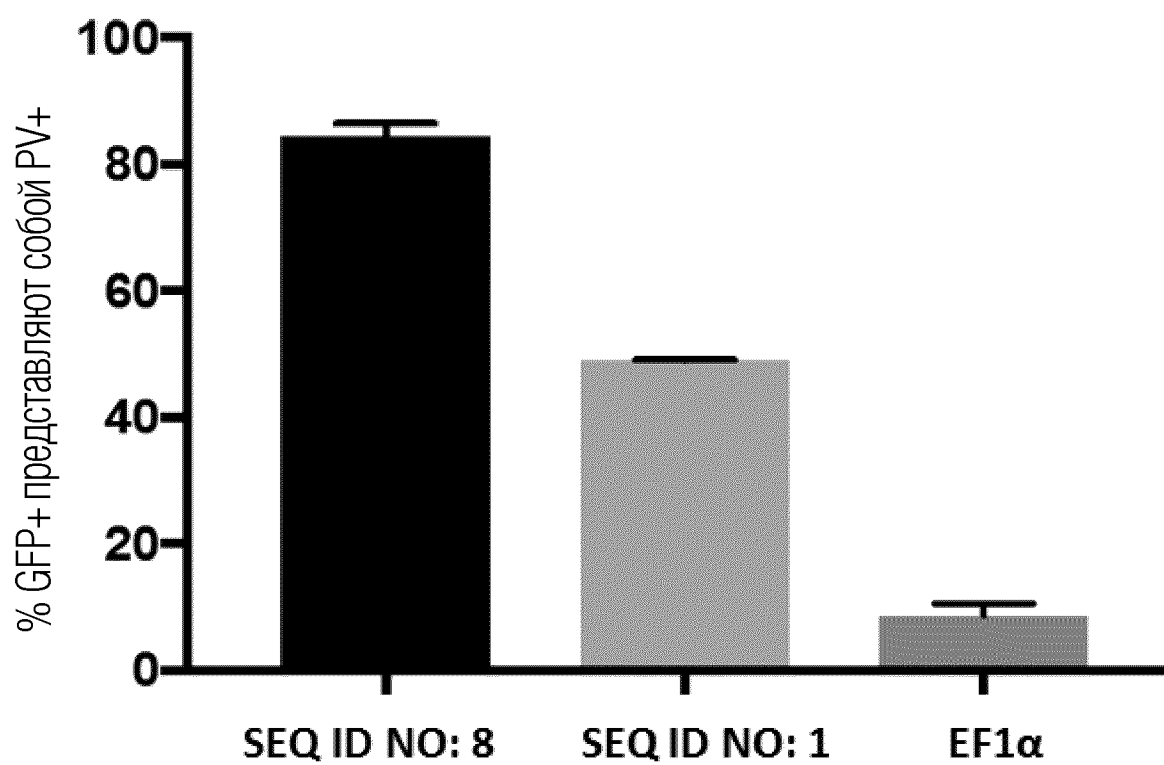


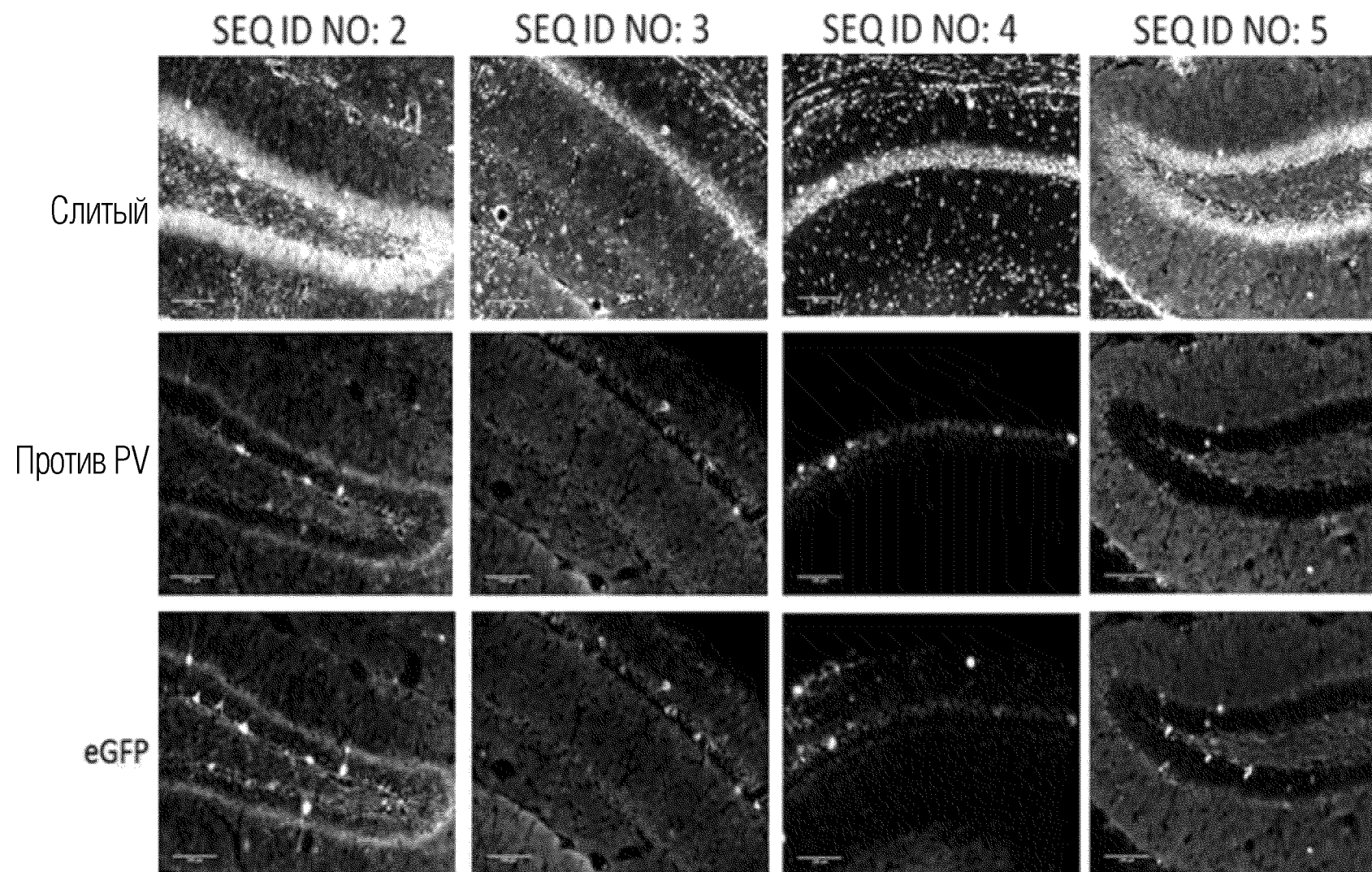
5/14

ФИГ. 4А

6/14

ФИГ. 4В

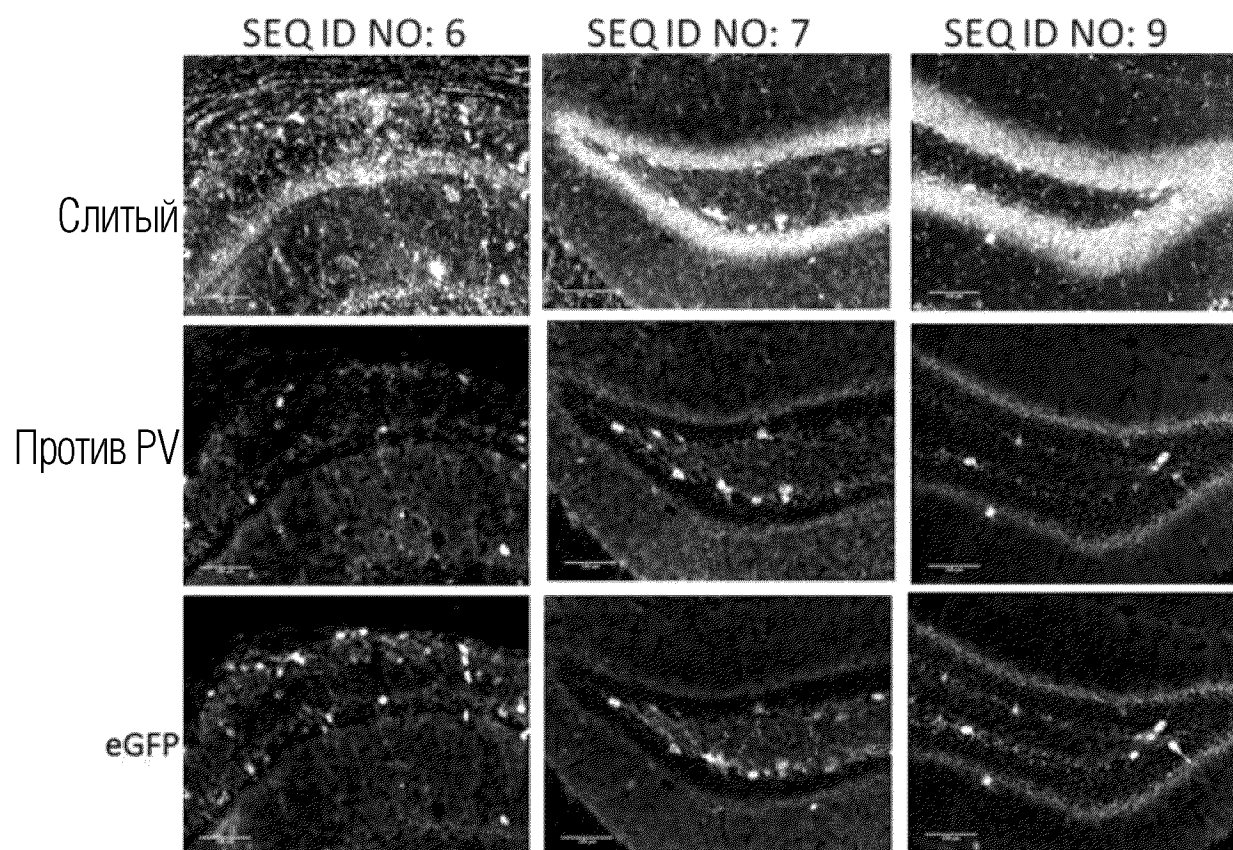


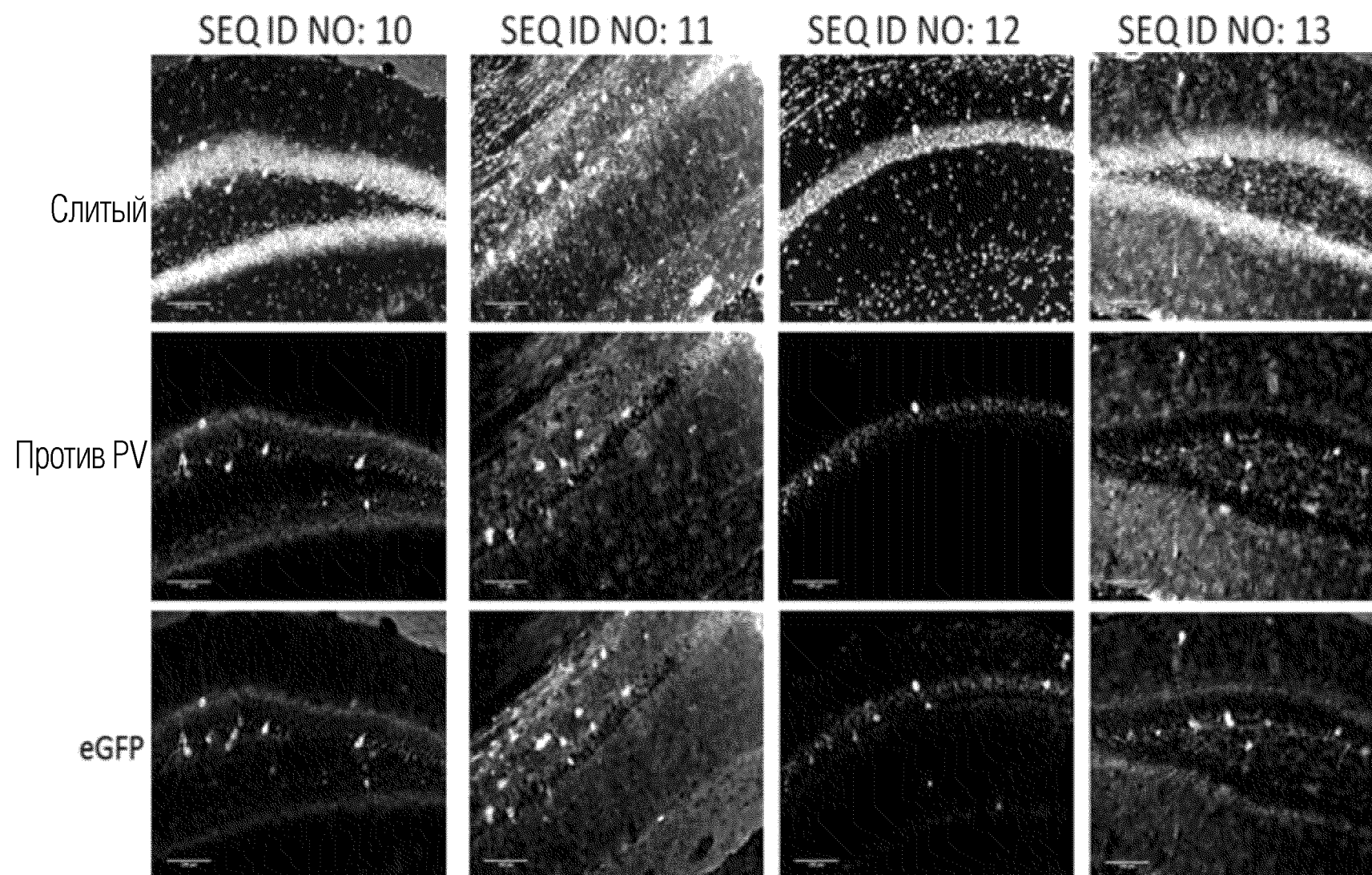


7/14

ФИГ. 5А

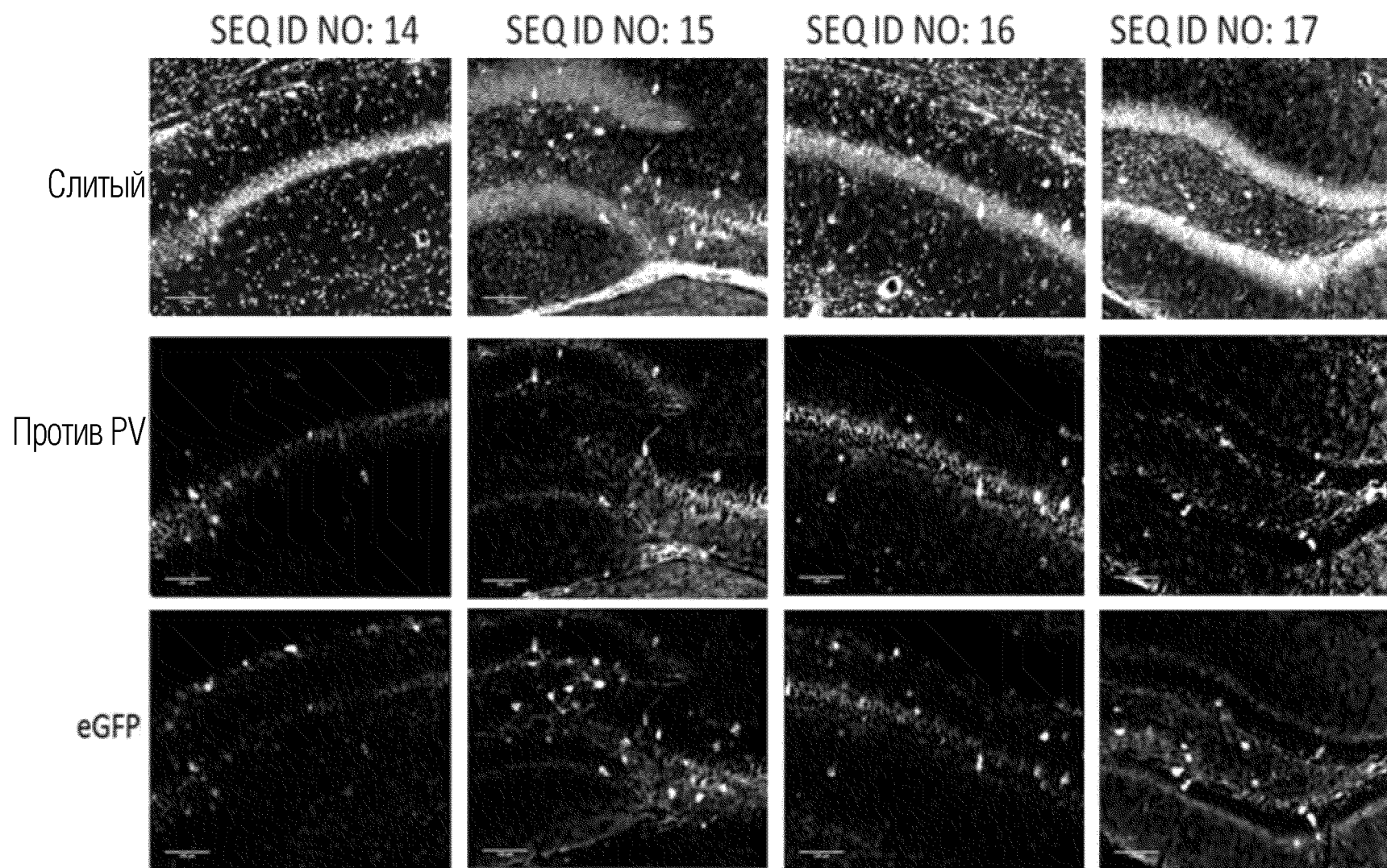
ФИГ. 5В





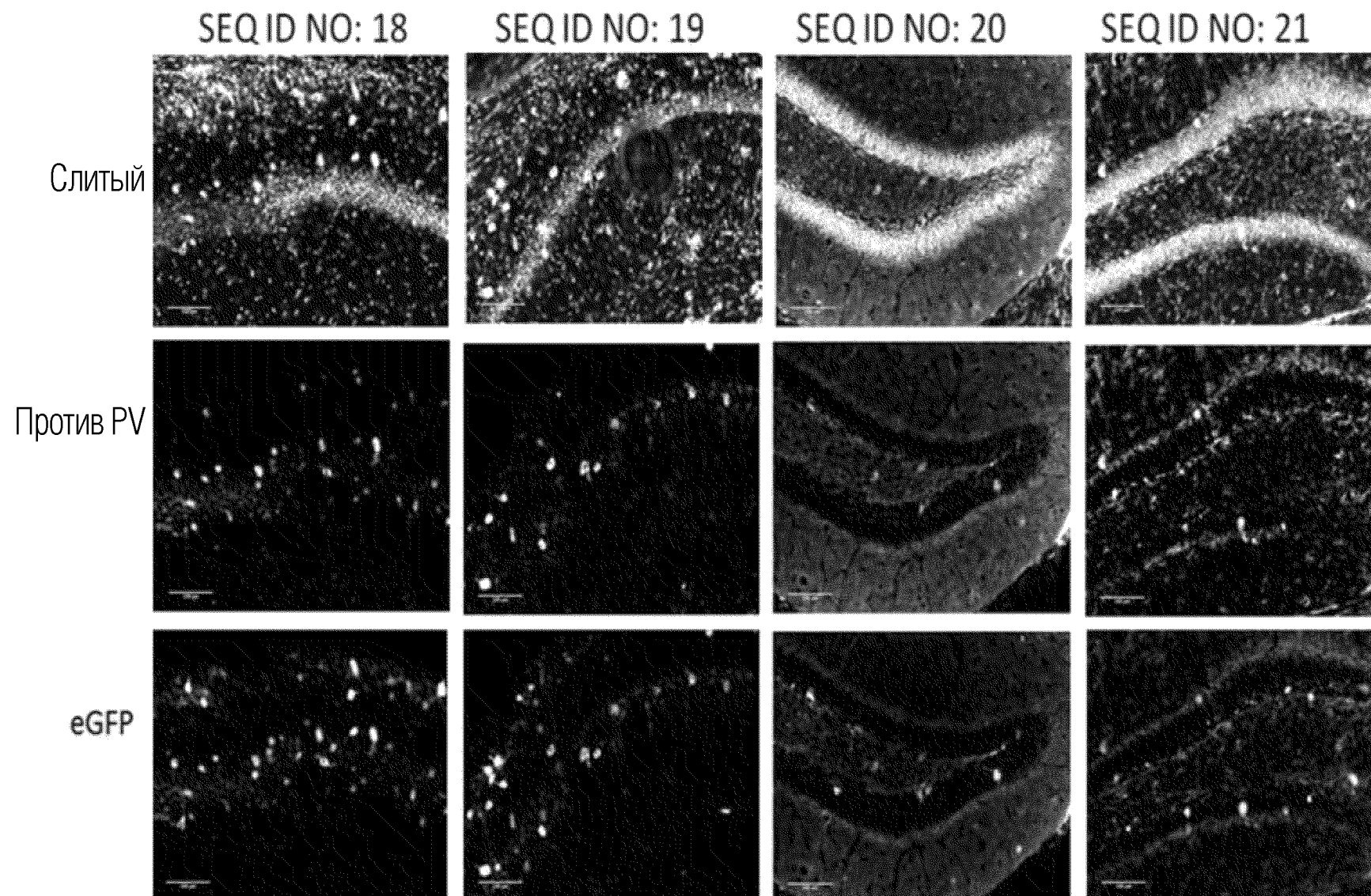
9/14

ФИГ. 5С



10/14

ФИГ. 5D

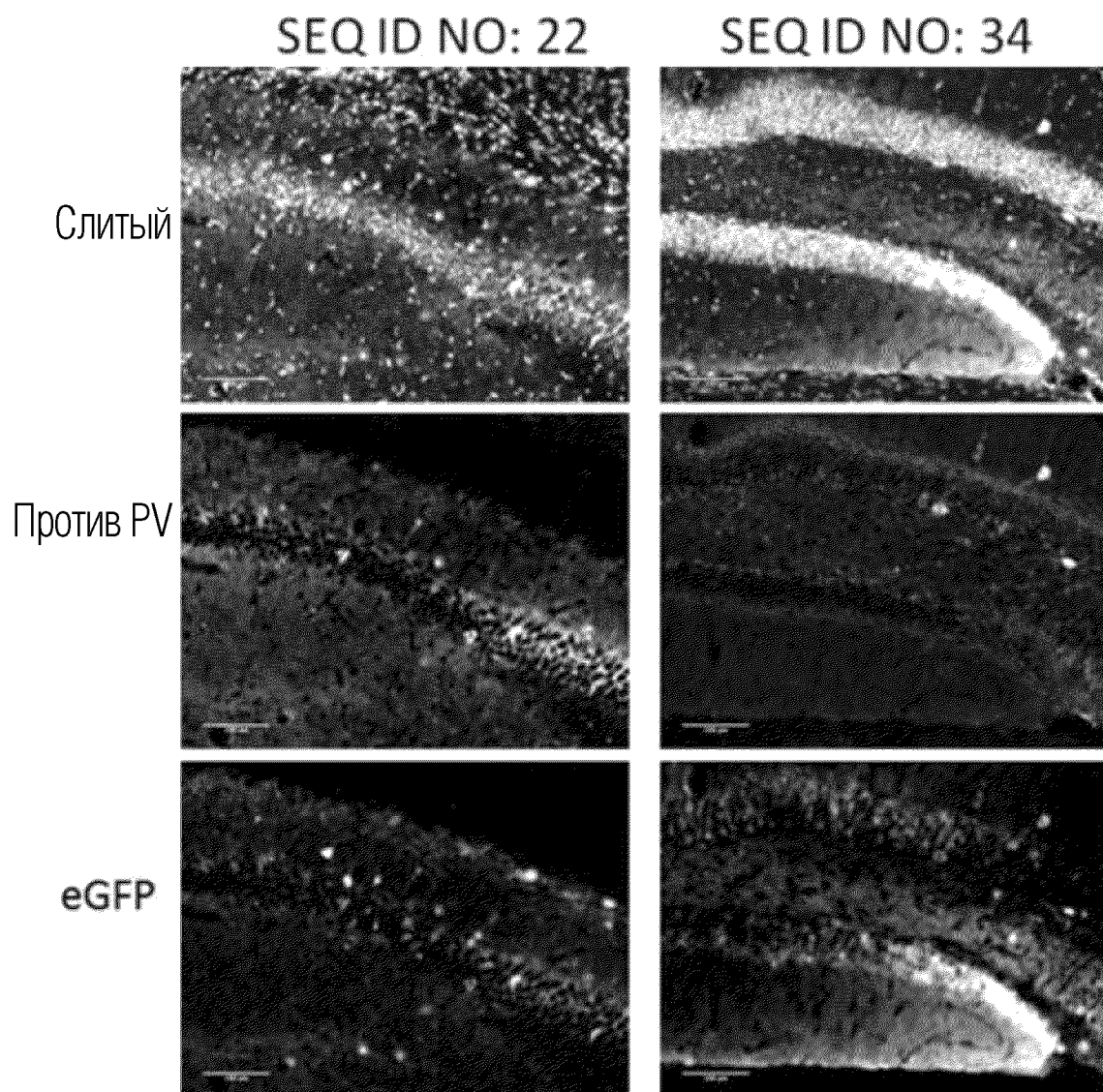


11/14

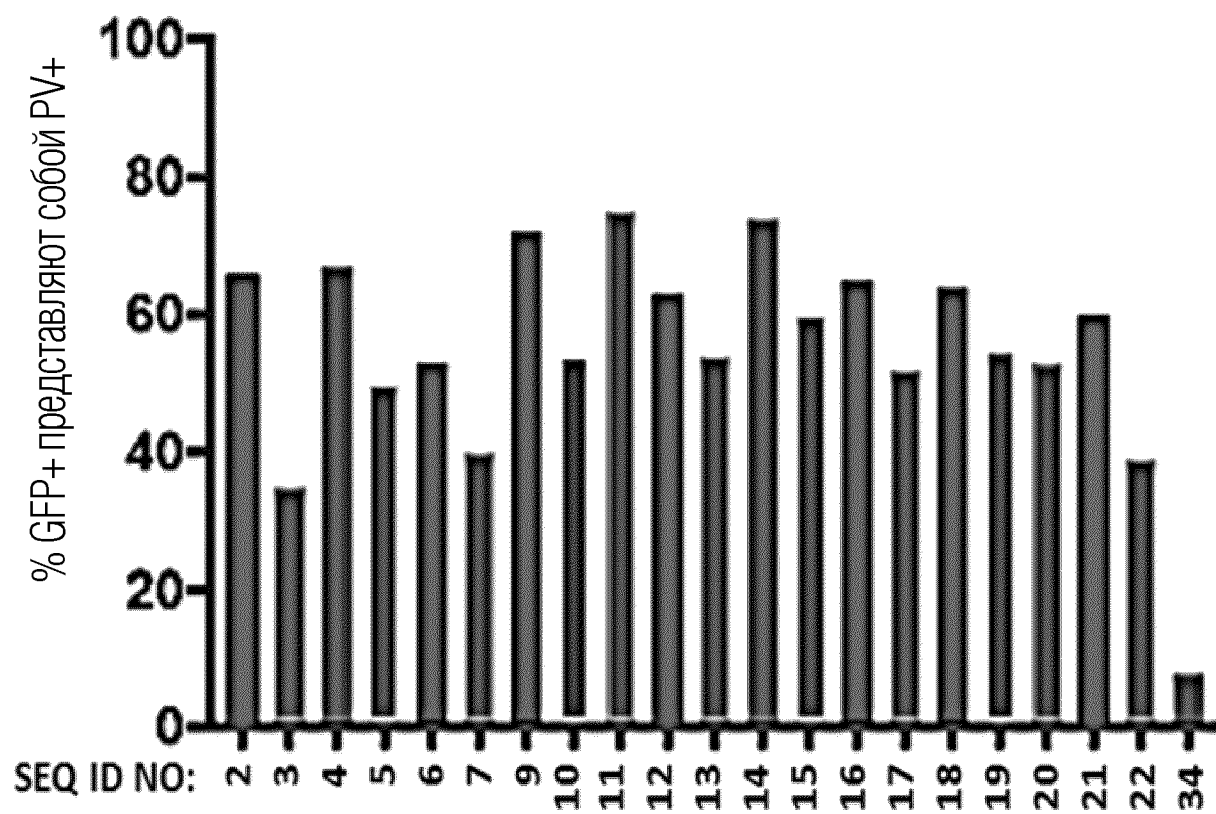
ФИГ. 5Е

12/14

ФИГ. 5F



ФИГ. 6



ФИГ. 7

