

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201992882** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.05.25

(51) Int. Cl. **C12N 15/86** (2006.01)
C12N 15/117 (2010.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.06.06

**(54) САМОРЕГУЛИРУЕМЫЕ ВЕКТОРЫ НА ОСНОВЕ AAV ДЛЯ БЕЗОПАСНОЙ
ЭКСПРЕССИИ MeCP2 ПРИ СИНДРОМЕ РЕТТА**

(31) **62/516,060**

(32) **2017.06.06**

(33) **US**

(86) **PCT/US2018/036200**

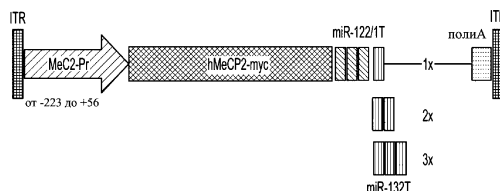
(87) **WO 2018/226785 2018.12.13**

(71) Заявитель:
**ЮНИВЕРСИТИ ОФ
МАССАЧУСЕТТС (US)**

(72) Изобретатель:
**Эстевес Мигель Сена, Гао Гуанпин,
Грин Майкл Р., Ван Дэн, Симоне
Тесса Мерседес (US)**

(74) Представитель:
**Гизатуллина Е.М., Угрюмов В.М.,
Строкова О.В., Гизатуллин Ш.Ф.,
Глухарёва А.О. (RU)**

(57) В соответствии с некоторыми аспектами настоящее изобретение относится к композициям и способам конструирования трансгена. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретение относится к саморегулируемым рекомбинантным нуклеиновым кислотам, вирусным векторам и фармацевтическим композициям, содержащим трансген MeCP2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления композиции и способы, описанные в настоящем изобретении, являются пригодными для лечения заболеваний и нарушений, ассоциированных с мутацией с потерей функции, например синдрома Ретта.



A1

201992882

201992882

A1

САМОРЕГУЛИРУЕМЫЕ ВЕКТОРЫ НА ОСНОВЕ AAV ДЛЯ БЕЗОПАСНОЙ ЭКСПРЕССИИ МЕСР2 ПРИ СИНДРОМЕ РЕТТА

ОПИСАНИЕ

Родственные заявки

Согласно настоящей заявке испрашивается приоритет в соответствии с §119(e) раздела 35 Кодекса законов США по дате подачи предварительной заявки на патент США с серийным номером 62/516060, поданной 6 июня 2017 года, полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

Синдром Ретта представляет собой неврологическое заболевание, вызванное мутациями с потерей функции в гене МЕСР2. Наблюдали, что восстановление экспрессии МЕСР2 в постнатальный период является эффективным в обращении развития некоторых из фенотипов, присутствующих у МЕСР2 мышей, но остаются вопросы в отношении безопасности. Кроме того, в исследованиях, оценивающих терапевтическую эффективность определенных векторов с МЕСР2, кодирующих изоформу e1, наблюдали только частичное избавление от фенотипов, характерных для синдрома Ретта. Эти исследования, как правило, сосредоточивались на внутрисосудистой (IV) или интрацеребровентрикулярной (ICV) доставке в неонатальный период и в некоторых случаях столкнулись с летальной печеночной токсичностью и поджатию задней конечности.

Краткое раскрытие настоящего изобретения

Аспекты настоящего раскрытия относятся к открытию, что определенные комбинации регуляторных элементов для miRNA (MRE), например, сайтов связывания miRNA, ассоциированных с петлями отрицательной обратной связи для экспрессии гена, и сайтов связывания miRNA, которые нарушают нацеливание экспрессии трансгена на нецелевые ткани, обеспечивают возможность настраиваемой экспрессии трансгена в пределах узкого диапазона, совместимого с нормальным функционированием белка и избеганием нецелевой токсичности трансгена. Вследствие этого, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления композиции и способы, описанные в настоящем раскрытии, являются пригодными для лечения заболеваний и нарушений,

ассоциированных с мутациями с потерей функции, например, синдрома Ретта, который ассоциирован с мутациями с потерей функции в гене *MECP2*.

Соответственно, в соответствии с некоторыми аспектами настоящее раскрытие относится к способу конструирования трансгена, при этом способ предусматривает: выбор первого гена, кодирующего первый продукт в клетке; выбор второго гена, кодирующего второй продукт в клетке; определение того, что экспрессия второго продукта положительно регулируется первым продуктом в клетке; выбор miRNA; определение того, что экспрессия miRNA положительно регулируется вторым продуктом в клетке; и конструирование трансгена для экспрессии в клетке транскрипта, имеющего кодирующий участок, который кодирует первый продукт, и имеющего один или несколько сайтов связывания для miRNA.

В соответствии с некоторыми аспектами настоящее раскрытие относится к способу конструирования трансгена, при этом способ предусматривает: выбор первого гена, кодирующего первый продукт в клетке; выбор miRNA, экспрессия которой положительно регулируется первым продуктом в клетке; и конструирование трансгена, который экспрессирует транскрипт, имеющий кодирующий участок, который кодирует первый продукт, и 3'-некодирующий участок, содержащий один или несколько сайтов связывания для miRNA.

В соответствии с некоторыми аспектами настоящее раскрытие относится к способу конструирования трансгена, при этом способ предусматривает: выбор первого гена, кодирующего первый продукт в клетке; выбор второго гена, кодирующего второй продукт в клетке; определение того, что экспрессия второго продукта положительно регулируется первым продуктом в клетке; выбор miRNA; определение того, что экспрессия miRNA положительно регулируется вторым продуктом в клетке; и конструирование трансгена для экспрессии в клетке транскрипта, имеющего кодирующий участок, который кодирует первый продукт, и 3'-некодирующий участок, содержащий один или несколько сайтов связывания для miRNA.

В соответствии с некоторыми аспектами настоящее раскрытие относится к рекомбинантной нуклеиновой кислоте, кодирующей транскрипт, имеющий i) кодирующий участок, который кодирует белок, и ii) два или больше сайтов связывания miRNA, при этом два или больше сайтов связывания miRNA содержат: по меньшей мере один первый сайт связывания miRNA, специфический в отношении первой miRNA, которая положительно регулируется экспрессией белка в клетке целевой ткани; и по меньшей мере один второй сайт связывания miRNA, специфический в отношении второй miRNA, которая экспрессируется независимо от экспрессии белка в клетках нецелевой ткани.

В соответствии с некоторыми аспектами настоящее раскрытие относится к рекомбинантной нуклеиновой кислоте, кодирующей транскрипт, имеющий кодирующий участок, который кодирует белок человеческого MeCP2 или его функциональный фрагмент, и 3'-некодирующий участок, содержащий один или несколько сайтов связывания miRNA, при этом один или несколько сайтов связывания miRNA содержат: по меньшей мере один сайт связывания miRNA, специфический в отношении miRNA, которая отрицательно регулирует экспрессию транскрипта; и по меньшей мере один сайт связывания miRNA, специфический в отношении miRNA, которая ингибирует экспрессию транскрипта в нецелевой ткани.

В соответствии с некоторыми аспектами настоящее раскрытие относится к рекомбинантной нуклеиновой кислоте, кодирующей транскрипт, имеющий: кодирующий участок, который кодирует человеческий MeCP2 или его функциональный фрагмент, и 3'-некодирующий участок, содержащий один или несколько сайтов связывания miRNA, при этом транскрипт фланкирован инвертированными концевыми повторами (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ITR AAV представляет собой ITR AAV2, AAV3, AAV4, AAV5 или AAV6. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ITR AAV представляют собой ITR AAV2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ITR представляют собой искусственные последовательности, которые заменяют функцию ITR, например, которые раскрыты в международной заявке WO/2016/172008.

В соответствии с некоторыми аспектами настоящее раскрытие относится к вирусному вектору, содержащему рекомбинантную нуклеиновую кислоту, которая описана в настоящем раскрытии. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV), аденовирусный вектор, лентивирусный вектор, вектор на основе вируса герпеса или вектор на основе бакуловируса.

В соответствии с некоторыми аспектами настоящее раскрытие относится к рекомбинантному аденоассоциированному вирусу (rAAV), содержащему: рекомбинантную нуклеиновую кислоту, которая описана в настоящем раскрытии; по меньшей мере один инвертированный концевой повтор (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV) и белок капсида.

В соответствии с некоторыми аспектами настоящее раскрытие относится к вектору на основе рекомбинантного AAV (rAAV) для саморегулируемой экспрессии белка, при этом вектор на основе rAAV содержит нуклеиновую кислоту, сконструированную для экспрессии в клетке целевой ткани транскрипта, кодирующего белок, при этом транскрипт

содержит по меньшей мере один первый сайт связывания miRNA, специфический в отношении первой miRNA, причем экспрессия первой miRNA положительно регулируется экспрессией белка в клетке.

В соответствии с некоторыми аспектами настоящее раскрытие относится к композиции, содержащей рекомбинантную нуклеиновую кислоту, которая описана в настоящем раскрытии, или gAAV, который описан в настоящем раскрытии, и фармацевтически приемлемое вспомогательное средство. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления композиция составлена для инъекции, например, системной инъекции (*например*, внутривенной инъекции) или интратекальной инъекции.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления первый продукт представляет собой белок. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления белок представляет собой MeCP2, например, изоформу e1 MeCP2 или изоформу e2 MeCP2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления первый продукт представляет собой miRNA или длинную некодирующую РНК.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления второй продукт представляет собой белок или нуклеиновую кислоту. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления второй продукт представляет собой нейротрофический фактор кости (BDNF). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления нуклеиновая кислота представляет собой miRNA (*например*, miR-132). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления первая miRNA представляет собой miR-132.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления по меньшей мере один сайт связывания miRNA, специфический в отношении miRNA, которая отрицательно регулирует экспрессию транскрипта, содержит сайт связывания miR-132, например, два или три сайта связывания miR-132.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления по меньшей мере один сайт связывания miRNA, специфический в отношении miRNA, которая ингибирует экспрессию транскрипта в нецелевой ткани, содержит сайт связывания miR-1, сайт связывания miR-122 или сайт связывания miR-1 и miR-122. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления по меньшей мере один сайт связывания miRNA, специфический в отношении miRNA, которая ингибирует экспрессию транскрипта в нецелевой ткани, содержит три сайта связывания miR-1 (*например*, 3x-miR-1) и три сайта связывания miR-122 (*например*, 3x-miR-122).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления способы, описанные в настоящем раскрытии, дополнительно предусматривают стадию конструирования 3'-некодирующего участка транскрипта, чтобы он содержал один или несколько сайтов

связывания для одной или нескольких нарушающих нацеливание miRNA. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления одна или несколько нарушающих нацеливание miRNA ингибируют экспрессию трансгена в печени, сердце, легком, мышце, поджелудочной железе или иммунных (*например*, антиген-презентирующих) клетках. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления одна или несколько нарушающих нацеливание miRNA представляют собой miR-122, miR-1 или miR-122 и miR-1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления одна или несколько нарушающих нацеливание miRNA ингибируют экспрессию трансгена в иммунных клетках, таких как антиген-презентирующие клетки (*например*, дендритные клетки, макрофаги и т.д.). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления одна или несколько нарушающих нацеливание miRNA представляют собой miR-15a, miR-16-1, miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b-1, miR-21, miR-29a, miR-29b, miR-29c, miR-30b, miR-31, miR-34a, miR-92a-1, miR-106a, miR-125a, miR-125b, miR-126, miR-142-3p, miR-146a, miR-150, miR-155, miR-181a, miR-223 или miR-424.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления сайт связывания miRNA или сайты связывания miRNA расположены между последним кодоном кодирующего участка и поли-A-хвостом транскрипта.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления способов, описанных в настоящем раскрытии, стадия конструирования трансгена предусматривает вставку трансгена в вектор. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления вектор представляет собой клонирующий вектор, экспрессионный вектор, плазмидный или вирусный вектор.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления рекомбинантная нуклеиновая кислота дополнительно содержит промотор, например, промотор мышинового MeCP2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления промотор мышинового MeCP2 содержит последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 3.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления рекомбинантная нуклеиновая кислота расположена на плазмиде.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления белок капсида представляет собой белок капсида, который способствует пересечению rAAV гематоэнцефалического барьера субъекта. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления белок капсида имеет серотип, выбранный из группы, состоящей из AAV-PHP.B, AAV1, AAV2, AAV2i8, AAV2.5, AAV5, AAV6, AAV8, AAVrh8, AAV9, AAVrh10, AAV-B1, AAV9.45A-String (*например*, AAV9.45-AS), AAV9.45Angiopep, AAV9.47-Angiopep, и AAV9.47-AS, AAV5, AAVrh39, AAVrh43, CAM130, и AAV9HR. В

соответствии с некоторыми вариантами осуществления белок капсида имеет серотип, который описан в международной заявке WO2015/127128, WO2016/054554, WO2016/054557 или WO2016/065001. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления белок капсида содержит или состоит из последовательности, изложенной в SEQ ID NO: 14 или 15 (*например*, AAV-PHP.B или AAV9).

В соответствии с некоторыми аспектами настоящее раскрытие относится к способу лечения синдрома Ретта у субъекта, при этом способ предусматривает введение субъекту с синдромом Ретта или с подозрением на синдром Ретта эффективного количества: рекомбинантной нуклеиновой кислоты, которая описана в настоящем раскрытии; гAAV, который описан в настоящем раскрытии; или композиции, которая описана в настоящем раскрытии.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления субъект представляет собой субъекта-человека. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления субъект имеет возраст менее одного года. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления субъект характеризуется мутацией по меньшей мере в одной копии гена MeCP2, например, мутацией с потерей функции.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления рекомбинантную нуклеиновую кислоту, гAAV или композицию, которые описаны в настоящем раскрытии, вводят посредством инъекции, например, системной инъекции (*например*, внутривенной инъекции) или интратекальной инъекции. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления введение приводит в результате к пересечению эффективным количеством рекомбинантной нуклеиновой кислоты, гAAV или композиции гематоэнцефалического барьера субъекта. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления введение приводит в результате к нетоксичному уровню экспрессии MeCP2 в головном мозге субъекта.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1A-1B представлена характеристика новых векторов AAV-MeCP2 для безопасной и эффективной генной терапии при синдроме Ретта. На фиг. 1A представлено схематическое изображение гомеостатического механизма ауторегуляции MeCP2. На фиг. 1B представлено схематическое изображение структуры саморегулируемых векторов AAV-MeCP2, кодирующих человеческий MeCP2-e1 с меткой тус под управлением промотора мышинового MeCP2 (с -223 по +56) и различными элементами, распознаваемыми микроРНК (*например*, miR-122/1T; miR-132T).

На фиг. 2А-2С представлена эффективная экспрессия AAV2-MeCP2 в клетках HEK293T. На фиг. 2А представлена экспрессия MeCP2, измеренная с помощью Вестерн-блоттинга. На фиг. 2В представлена экспрессия MeCP2, измеренная с помощью нормализованного анализа экспрессии белка (фиг. 2В). На фиг. 2С представлен профиль токсичности у клеток 293T, трансдуцированных AAV2-MeCP2, в течение четырех суток при дозе 30000 gc(копий генома)/клетка.

На фиг. 3А-3С представлена экспрессия AAV2-MeCP2 в нейронах коры головного мозга мыши. На фиг. 3А представлены результаты для первичных нейронов коры головного мозга мышей, которых трансдуцировали дозами вектора на основе AAV в диапазоне от 1Е3-1Е5 vg(вирусных геномов)/клетка, в том числе AAV-GFP в качестве контроля. На фиг. 3В представлены результаты анализа экспрессии hMeCP2-тус методом Вестерн-блоттинга в нейронах через 5 суток после инфицирования 3Е4 геномов вектора (доза)/клетка. На фиг. 3С представлена экспрессия miR-132 в ответ на повторную доставку AAV2-MeCP2.

На фиг. 4А-4С представлены репрезентативные данные, полученные в результате *in vivo* экспериментов на мышах. На фиг. 4А представлены данные для мышей дикого типа, которым вводили инъекцией через лицевую вену в 1 сутки после рождения AAV, который кодирует изоформу e1 человеческого MeCP2, содержащий 0, 1, 2 или 3 последовательности-мишени miR-132. Животных дикого типа умерщвляли через 3 месяца после инъекции и целый головной мозг, ткань сердца и печени подвергали экстракции общей РНК, синтезу кДНК и qRT-PCR (количественная ПЦР с обратной транскрипцией) с применением праймеров, специфических в отношении изоформы e1 человеческого MeCP2. Данные нормализовали к AAV-MeCP2, содержащему 3 последовательности-мишени miR-132, который принимали за 1. На фиг. 4В представлен анализ экспрессии гена изоформы e1 человеческого MeCP2 в головном мозге мышей дикого типа после внутривенной инъекции AAV-MeCP2. На фиг. 4С представлен анализ экспрессии гена изоформы e1 человеческого MeCP2 в головном мозге мышей дикого типа после внутривенной инъекции AAV-MeCP2.

На фиг. 5 представлена экспрессия MeCP2, запускаемая конструкциями, описанными в настоящем раскрытии, которые эффективно нарушают нацеливание на сердце и печень.

Подробное раскрытие настоящего изобретения

Аспекты настоящего раскрытия относятся, отчасти, к векторам на основе AAV, способным к саморегуляции уровней экспрессии трансгена (*например*, MeCP2), для предупреждения токсичности, связанной со сверхэкспрессией. В соответствии с

некоторыми вариантами осуществления механизм саморегуляции основывается на присутствии нескольких копий регуляторного элемента для miRNA (*например*, одного или нескольких сайтов связывания miR-132) в 3'UTR кассеты с трансгеном. Как дополнительно описано в разделе Примеры, векторы на основе AAV, способные к саморегуляции экспрессии трансгена, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления характеризуются улучшенной эффективностью и профилем безопасности по сравнению с другими векторами на основе AAV, *например*, векторами на основе AAV, содержащими только нативные промоторы трансгена. Следует понимать, что наблюдения, описанные в разделе Примеры в контексте конструкций miR-132/MeCP2, являются применимыми к другим конструкциям для экспрессии трансгена, содержащим сайты связывания других miR, которые регулируют экспрессию белка (*например*, посредством петли отрицательной обратной связи).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления пути доставки, которые наиболее вероятно опосредуют повсеместную доставку гена в ЦНС (*например*, системная инъекция и интратекальная инъекция), вероятно, приводят в результате к высокому уровню трансдукции периферических органов, в которых экспрессия трансгена (*например*, MeCP2) может становится токсичной. Настоящее раскрытие основывается, отчасти, на понимании, что объединение регуляторных элементов для miRNA (MRE), таких как сайты связывания miRNA (*например*, сайты связывания miR-122 и сайты связывания miR-1), с MRE, ассоциированными с петлями отрицательной обратной связи, регулирующими экспрессию белка (*например*, сайты связывания miR-132 в случае MeCP2), одновременно регулирует уровни экспрессии трансгена и нарушает нацеливание экспрессии трансгена на периферические органы.

Соответственно, в соответствии с некоторыми аспектами настоящее раскрытие относится к способу конструирования трансгена, при этом способ предусматривает: выбор первого гена, кодирующего первый продукт в клетке; выбор miRNA, экспрессия которой положительно регулируется первым продуктом в клетке; и конструирование трансгена, который экспрессирует транскрипт, имеющий кодирующий участок, который кодирует первый продукт, и один или несколько сайтов связывания для miRNA. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления один или несколько сайтов связывания для miRNA расположены в 3'-некодирующем участке транскрипта.

В соответствии с некоторыми аспектами настоящее раскрытие относится к способу конструирования трансгена, при этом способ предусматривает: выбор первого гена, кодирующего первый продукт в клетке; выбор второго гена, кодирующего второй продукт в клетке; определение того, что экспрессия второго продукта положительно регулируется

первым продуктом в клетке; выбор miRNA; определение того, что экспрессия miRNA положительно регулируется вторым продуктом в клетке; и конструирование трансгена для экспрессии в клетке транскрипта, имеющего кодирующий участок, который кодирует первый продукт, и один или несколько сайтов связывания для miRNA. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления один или несколько сайтов связывания для miRNA расположены в 3'-некодирующем участке транскрипта.

В контексте данного документа «конструирование трансгена» относится к получению (*например*, синтезу) рекомбинантной нуклеиновой кислоты с применением методик клонирования гена, таких как полимеразная цепная реакция (ПЦР), расщепление рестрикционными ферментами и лигирование нуклеиновой кислоты *in vitro*, например, как описано в Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

В контексте данного документа «продукт» или «продукт гена» относится к нуклеиновой кислоте (*например*, РНК транскрипту, дцРНК, miRNA и т.д.), пептиду, белку или полипептиду, которые транскрибируются и/или транслируются с последовательности нуклеиновой кислоты (*например*, ДНК или РНК). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления продукт представляет собой РНК транскрипт, содержащий кодирующий белок участок. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления кодирующий белок участок кодирует белок, ассоциированный с заболеванием, вызванным мутацией с потерей функции (*например*, MeCP2). Дополнительные примеры белков, ассоциированных с заболеванием, вызванным мутацией с потерей функции, включают в себя, без ограничения, тирозиназу (тирозинемия), лизосомальную кислую бета-галактозидазу (GM1-ганглиозидоз), бета-гексозаминидазу А и В (болезнь Тея-Сакса и Сандхоффа), аспартоацилазу (ASPA; болезнь Канавана), аспартилглюкозаминидазу (апартилглюкозаминурия), пальмитоил-протеинтиоэстеразу (детская форма болезни Баттена), трипептидил-пептидазу (поздняя детская форма болезни Баттена), α -галактозидазу (болезнь Фабри), α -фукозидазу (фукозидоз), защитный белок/катепсин А (галактосиалидоз), β -глюкозидазу (болезнь Гоше), галактозилцерамидазу (глобоидно-клеточная лейкодистрофия), α -маннозидазу (α -маннозидоз), арилсульфатазу А (метахроматическая лейкодистрофия), α -L-идуронидазу (мукополисахаридоз I), α -N-ацетилглюкозаминидазу (мукополисахаридоз IIIB), арилсульфатазу В (мукополисахаридоз VI), β -глюкуронидазу (мукополисахаридоз VII), кислую сфингомиелиназу (болезнь Ниманна-Пика), α -глюкозидазу (болезнь Помпе) и кислую липазу (болезнь Вольмана), FOXG1 (синдром FOXG1), CDKL5, N-GlyI, Glut-1 (болезнь де Виво) и т.д.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления продукт представляет собой интерферирующую нуклеиновую кислоту, например, miRNA, которая регулирует экспрессию или активность продукта гена.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления один продукт регулирует экспрессию гена или экспрессию белка второго продукта. Регуляция экспрессии или трансляции продукта гена может быть положительной или отрицательной. «Положительная регуляция» относится к повышению экспрессии или активности гена (*например*, в результате экспрессии или активности продукта другого гена). «Отрицательная регуляция» относится к снижению или ингибированию экспрессии или активности гена (*например*, в результате экспрессии или активности продукта другого гена посредством петли обратной связи).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления продукты гена, такие как факторы роста, транскрипционные факторы (*например*, как описано в Wang et al. Nucleic Acids Res. 2010 Jan; 38 (номер в базе данных): D119–D122), *и т.д.*, являются способными к регуляции экспрессии или активности трансгена в клетке или у субъекта. Примеры факторов роста включают в себя нейротрофины, такие как нейротрофический фактор головного мозга (BDNF), фактор роста нервов (NGF), нейротрофин 3, нейротрофин 4, глиальный нейротрофический фактор (GDNF), цилиарный нейротрофический фактор (CNTF), фактор роста фибробластов (FGF1-23), нейротурин, инсулиноподобный фактор роста 1 (IGF-1), инсулиноподобный фактор роста 2 (IGF-2) *и т.д.*

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления трансгены, которые описаны в настоящем раскрытии, сконструированы таким образом, чтобы содержать по меньшей мере один регуляторный элемент для miRNA (*например*, сайт связывания miRNA), который ассоциирован с регуляторной петлей экспрессии гена (*например*, петлями отрицательной обратной связи, петлями положительной обратной связи *и т.д.*). В целом, регуляторные петли экспрессии гена могут быть эндогенными по отношению к клетке или искусственными (*например*, один или несколько элементов петли обратной связи обеспечивают вместе с трансгеном). В одном примере петли отрицательной обратной связи экспрессия MeCP2 в клетке вызывает повышение содержания нейротрофического фактора головного мозга (BDNF) в клетке, который, в свою очередь, повышает экспрессию miR-132, которая, в свою очередь, регулирует экспрессию MeCP2 (фиг. 1). Следует понимать, что в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие относится к петлям положительной обратной связи, которые можно применять для усиления экспрессии трансгена.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления трансгена, которые описаны в настоящем раскрытии, сконструированы таким образом, чтобы содержать по меньшей мере один регуляторный элемент для miRNA (*например*, сайт связывания miRNA), который нарушает нацеливание экспрессии трансгена на одну или несколько нецелевых тканей. В контексте данного документа «нецелевая ткань» относится к ткани (*например*, клеткам ткани), в которой экспрессия трансгена является нежелательной. Например, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления сверхэкспрессия MeCP2 в клетке приводит в результате к цитотоксичности в печени; в этом контексте ткань печени (*например*, клетки печени) является нецелевой тканью. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления нецелевая ткань представляет собой печень (*например*, клетки печени), сердце (*например*, клетки сердца), поджелудочную железу (*например*, клетки поджелудочной железы), мышцу (*например*, мышечные клетки), иммунную клетку (*например*, антиген-презентирующую клетку и т.д.) или любую их комбинацию.

В контексте данного документа «целевая ткань» относится к ткани (*например*, клеткам ткани), в которой экспрессия трансгена является предпочтительной по сравнению с другими тканями, такими как нецелевые ткани. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления целевая ткань представляет собой ткань ЦНС (*например*, клетки ЦНС, такие как нейроны). Неограничивающие примеры ткани ЦНС включают в себя ткань головного мозга (*например*, нейроны, глиальные клетки и т.д.) и ткань спинного мозга.

Обычно один или несколько сайтов связывания miRNA в транскрипте, кодируемом трансгеном, расположены в 3'-нетранслируемом участке (3'UTR) транскрипта. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления один или несколько сайтов связывания miRNA расположены между последним кодоном кодирующего участка транскрипта и поли-А-хвостом транскрипта. Тем не менее, следует понимать, что в соответствии с некоторыми вариантами осуществления один или несколько сайтов связывания miRNA расположены в участке, отличном от 3'UTR транскрипта, например, в интроне на 5'-конце транскрипта. Число сайтов связывания miRNA, встроенных посредством конструирования в трансген, который описан в настоящем раскрытии, будет варьировать в зависимости от продукта гена, кодируемого трансгеном, и может быть определено эмпирически квалифицированным специалистом без чрезмерного количества экспериментов. Например, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления трансген, который описан в настоящем раскрытии, содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 сайтов связывания miRNA. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления трансген, который описан в настоящем раскрытии, содержит более 10 (*например*, любое

целое число от 11 до 100) сайтов связывания miRNA. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления трансген, который описан в настоящем раскрытии, содержит 3, 4 или 5 сайтов связывания miRNA. Каждый из одного или нескольких сайтов связывания miRNA может связываться с одной и той же miRNA или отличной miRNA. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления трансген, который описан в настоящем раскрытии, содержит один или несколько (*например*, 3) сайтов связывания miR-122, один или несколько (*например*, 3) сайтов связывания miR-1 и три сайта связывания miR-132.

Рекомбинантные нуклеиновые кислоты

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления трансген, который описан в настоящем раскрытии, кодируется рекомбинантной нуклеиновой кислотой. Последовательность «нуклеиновой кислоты» относится к последовательностям ДНК или РНК. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления белки и нуклеиновые кислоты согласно настоящему раскрытию являются выделенными. В контексте данного документа термин «выделенный» означает полученный искусственно. В контексте данного документа применительно к нуклеиновым кислотам термин «выделенный» означает: (i) амплифицированный *in vitro*, например, с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР); (ii) полученный рекомбинантно с помощью клонирования; (iii) очищенный посредством расщепления и разделения на геле; или (iv) синтезированный, например, с помощью химического синтеза. Выделенная нуклеиновая кислота представляет собой нуклеиновую кислоту, которая легко поддается манипуляции с помощью методик с использованием рекомбинантной ДНК, хорошо известных в уровне техники. Таким образом, нуклеотидная последовательность, которая содержится в векторе, в котором 5' и 3' сайты рестрикции являются известными, или для которой были раскрыты последовательности праймеров для полимеразной цепной реакции (ПЦР), считается выделенной, но последовательность нуклеиновой кислоты, существующая в своем нативном состоянии в своем естественном хозяине не считается таковой. Выделенная нуклеиновая кислота может быть, по существу, очищенной, но не обязательно является таковой. Например, нуклеиновая кислота, которая является выделенной в клонирующем или экспрессионном векторе, не является чистой в том смысле, что она может составлять только малый процент материала в клетке, в которой она находится. Тем не менее, такая нуклеиновая кислота является выделенной в контексте термина, используемого в данном документе, поскольку она легко поддается манипуляции с помощью стандартных методик, известных квалифицированным специалистам в данной области техники. При использовании в данном документе применительно к белкам или пептидам термин «выделенный» относится к белку или пептиду, который был выделен из

своего естественного окружения или получен искусственно (*например*, с помощью химического синтеза, с помощью технологии с использованием рекомбинантной ДНК *и т.д.*).

Квалифицированному специалисту также будет понятно, что консервативные аминокислотные замены могут быть выполнены для того, чтобы обеспечить функционально эквивалентные варианты или гомологи белков капсида. В соответствии с некоторыми аспектами настоящим раскрытием охвачены изменения последовательности, которые приводят в результате к консервативным аминокислотным заменам. В контексте данного документа консервативная аминокислотная замена относится к аминокислотной замене, которая не изменяет характеристики относительного заряда или размера белка, в котором выполнена аминокислотная замена. Варианты могут быть получены в соответствии со способами изменения полипептидной последовательности, известными квалифицированному специалисту в данной области техники, такими как находящиеся в источниках, в которых собраны такие способы, *например*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrook, *et al.*, eds., Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989, или Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel, *et al.*, eds., John Wiley & Sons, Inc., New York. Консервативные замены аминокислот включают в себя замены, производимые между аминокислотами в составе следующих групп: (a) M, I, L, V; (b) F, Y, W; (c) K, R, H; (d) A, G; (e) S, T; (f) Q, N и (g) E, D. Таким образом, можно произвести консервативные аминокислотные замены в аминокислотной последовательности белков и полипептидов, раскрытых в данном документе.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления нуклеиновая кислота, которая описана в настоящем раскрытии, содержится в векторе. В контексте данного документа термин «вектор» включает в себя любой генетический элемент, такой как плазида, фаг, транспозон, космида, хромосома, искусственная хромосома, вирус, вирион *и т.д.*, который является способным к репликации, когда он ассоциирован с соответствующими управляющими элементами, и который может переносить последовательности генов между клетками. Таким образом, термин включает в себя средства для клонирования и экспрессии, а также вирусные векторы. Примеры вирусных векторов включают в себя аденовирусный вектор, вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV), лентивирусные векторы, векторы на основе вируса герпеса, векторы на основе бакуловируса *и т.д.*

В соответствии с некоторыми аспектами настоящее раскрытие относится к композициям и способам для экспрессии белка MeCP2 в клетке или у субъекта. «MeCP2» относится к метил-CpG-связывающему белку 2, который кодируется геном *MeCP2* и играет важные роли (*например*, функционирует в качестве транскрипционного репрессора или транскрипционного активатора) в нервных клетках, таких как зрелые нейроны. Один пример гена *MeCP2* представлен под номером доступа в GenBank NM_001110792 (MeCP2-e1). Другой пример гена *MeCP2* представлен под номером доступа в GenBank NM_001110792 (MeCP2-e2). Ген *MeCP2* кодирует две изоформы белка MeCP2, называемые изоформой e1 MeCP2 и изоформой e2 MeCP2, которые отличаются длиной их N-конца. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изоформа e1 MeCP2 представлена последовательностью, изложенной в SEQ ID NO: 1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изоформа e2 MeCP2 представлена последовательностью, изложенной в SEQ ID NO: 2.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления трансген (*например*, рекомбинантная нуклеиновая кислота) кодирует функциональный фрагмент белка MeCP2 (*например*, фрагмент изоформы e1 или изоформы e2). «Функциональный фрагмент» MeCP2 представляет собой усеченный белок MeCP2, который сохраняет естественную функцию (*например*, транскрипционный активатор или транскрипционный репрессор) белка MeCP2 дикого типа (*например*, полноразмерного белка). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления функциональный фрагмент MeCP2 содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более усечений аминокислот по сравнению с полноразмерным белком MeCP2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления функциональный фрагмент MeCP2 содержит приблизительно от 1 до 10, от 5 до 50, от 20 до 100 усечений аминокислот по сравнению с полноразмерным белком MeCP2.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления трансген (*например*, рекомбинантная нуклеиновая кислота) кодирует вариант белка MeCP2 (*например*, вариант изоформы e1 или изоформы e2). Вариант белка MeCP2 может характеризоваться идентичностью, составляющей от приблизительно 50% до приблизительно 99,9%, с белком MeCP2 дикого типа (*например*, SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления вариант MeCP2 является приблизительно на 50%, приблизительно на 60%, приблизительно на 70%, приблизительно на 80%, приблизительно на 90%, приблизительно на 95% или приблизительно на 99% идентичным белку MeCP2 дикого типа (*например*, SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2).

Настоящее раскрытие основывается, отчасти, на понимании, что объединение регуляторных элементов для miRNA (MRE), таких как сайты связывания miRNA (*например*, сайты связывания miR-122 и сайты связывания miR-1), с MRE, ассоциированными с петлями отрицательной обратной связи, регулирующими экспрессию белка (*например*, сайты связывания miR-132 в случае MeCP2), одновременно регулирует уровни экспрессии трансгена и нарушает нацеливание экспрессии трансгена на периферические органы.

miRNA и другие малые интерферирующие нуклеиновые кислоты регулируют экспрессию гена посредством расщепления/разрушения РНК транскрипта-мишени или трансляционной репрессии информационной РНК(мРНК)-мишени. miRNA экспрессируются в нативном состоянии, как правило, в виде конечных 19-25 нетранслируемых РНК-продуктов. miRNA проявляют свою активность посредством последовательность-специфических взаимодействий с 3'-нетранслируемыми участками (UTR) мРНК-мишеней. Эти эндогенно экспрессирующиеся miRNA образуют шпильчатые предшественники, которые затем подвергаются процессингу в дуплекс miRNA, а в дальнейшем в «зрелую» одноцепочечную молекулу miRNA. Эта зрелая miRNA управляет мультибелковым комплексом, miRISC, который идентифицирует целевой сайт, *например*, в участках 3' UTR, в мРНК-мишени на основании их комплементарности зрелой miRNA.

Следующий неограничивающий перечень генов miRNA и их гомологи являются пригодными в способах и композициях согласно настоящему раскрытию (*например*, для опосредования саморегулируемой экспрессии или нарушения нацеливания трансгена): hsa-let-7a, hsa-let-7a*, hsa-let-7b, hsa-let-7b*, hsa-let-7c, hsa-let-7c*, hsa-let-7d, hsa-let-7d*, hsa-let-7e, hsa-let-7e*, hsa-let-7f, hsa-let-7f-1*, hsa-let-7f-2*, hsa-let-7g, hsa-let-7g*, hsa-let-7i, hsa-let-7i*, hsa-miR-1, hsa-miR-100, hsa-miR-100*, hsa-miR-101, hsa-miR-101*, hsa-miR-103, hsa-miR-105, hsa-miR-105*, hsa-miR-106a, hsa-miR-106a*, hsa-miR-106b, hsa-miR-106b*, hsa-miR-107, hsa-miR-10a, hsa-miR-10a*, hsa-miR-10b, hsa-miR-10b*, hsa-miR-1178, hsa-miR-1179, hsa-miR-1180, hsa-miR-1181, hsa-miR-1182, hsa-miR-1183, hsa-miR-1184, hsa-miR-1185, hsa-miR-1197, hsa-miR-1200, hsa-miR-1201, hsa-miR-1202, hsa-miR-1203, hsa-miR-1204, hsa-miR-1205, hsa-miR-1206, hsa-miR-1207-3p, hsa-miR-1207-5p, hsa-miR-1208, hsa-miR-122, hsa-miR-122*, hsa-miR-1224-3p, hsa-miR-1224-5p, hsa-miR-1225-3p, hsa-miR-1225-5p, hsa-miR-1226, hsa-miR-1226*, hsa-miR-1227, hsa-miR-1228, hsa-miR-1228*, hsa-miR-1229, hsa-miR-1231, hsa-miR-1233, hsa-miR-1234, hsa-miR-1236, hsa-miR-1237, hsa-miR-1238, hsa-miR-124, hsa-miR-124*, hsa-miR-1243, hsa-miR-1244, hsa-miR-1245, hsa-miR-1246, hsa-miR-1247, hsa-miR-1248, hsa-miR-1249, hsa-miR-1250, hsa-miR-1251, hsa-miR-1252, hsa-miR-1253, hsa-miR-1254, hsa-miR-1255a, hsa-miR-1255b, hsa-miR-1256, hsa-miR-1257, hsa-

miR-1258, hsa-miR-1259, hsa-miR-125a-3p, hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-125b, hsa-miR-125b-1*, hsa-miR-125b-2*, hsa-miR-126, hsa-miR-126*, hsa-miR-1260, hsa-miR-1261, hsa-miR-1262, hsa-miR-1263, hsa-miR-1264, hsa-miR-1265, hsa-miR-1266, hsa-miR-1267, hsa-miR-1268, hsa-miR-1269, hsa-miR-1270, hsa-miR-1271, hsa-miR-1272, hsa-miR-1273, hsa-miR-127-3p, hsa-miR-1274a, hsa-miR-1274b, hsa-miR-1275, hsa-miR-127-5p, hsa-miR-1276, hsa-miR-1277, hsa-miR-1278, hsa-miR-1279, hsa-miR-128, hsa-miR-1280, hsa-miR-1281, hsa-miR-1282, hsa-miR-1283, hsa-miR-1284, hsa-miR-1285, hsa-miR-1286, hsa-miR-1287, hsa-miR-1288, hsa-miR-1289, hsa-miR-129*, hsa-miR-1290, hsa-miR-1291, hsa-miR-1292, hsa-miR-1293, hsa-miR-129-3p, hsa-miR-1294, hsa-miR-1295, hsa-miR-129-5p, hsa-miR-1296, hsa-miR-1297, hsa-miR-1298, hsa-miR-1299, hsa-miR-1300, hsa-miR-1301, hsa-miR-1302, hsa-miR-1303, hsa-miR-1304, hsa-miR-1305, hsa-miR-1306, hsa-miR-1307, hsa-miR-1308, hsa-miR-130a, hsa-miR-130a*, hsa-miR-130b, hsa-miR-130b*, hsa-miR-132, hsa-miR-132*, hsa-miR-1321, hsa-miR-1322, hsa-miR-1323, hsa-miR-1324, hsa-miR-133a, hsa-miR-133b, hsa-miR-134, hsa-miR-135a, hsa-miR-135a*, hsa-miR-135b, hsa-miR-135b*, hsa-miR-136, hsa-miR-136*, hsa-miR-137, hsa-miR-138, hsa-miR-138-1*, hsa-miR-138-2*, hsa-miR-139-3p, hsa-miR-139-5p, hsa-miR-140-3p, hsa-miR-140-5p, hsa-miR-141, hsa-miR-141*, hsa-miR-142-3p, hsa-miR-142-5p, hsa-miR-143, hsa-miR-143*, hsa-miR-144, hsa-miR-144*, hsa-miR-145, hsa-miR-145*, hsa-miR-146a, hsa-miR-146a*, hsa-miR-146b-3p, hsa-miR-146b-5p, hsa-miR-147, hsa-miR-147b, hsa-miR-148a, hsa-miR-148a*, hsa-miR-148b, hsa-miR-148b*, hsa-miR-149, hsa-miR-149*, hsa-miR-150, hsa-miR-150*, hsa-miR-151-3p, hsa-miR-151-5p, hsa-miR-152, hsa-miR-153, hsa-miR-154, hsa-miR-154*, hsa-miR-155, hsa-miR-155*, hsa-miR-15a, hsa-miR-15a*, hsa-miR-15b, hsa-miR-15b*, hsa-miR-16, hsa-miR-16-1*, hsa-miR-16-2*, hsa-miR-17, hsa-miR-17*, hsa-miR-181a, hsa-miR-181a*, hsa-miR-181a-2*, hsa-miR-181b, hsa-miR-181c, hsa-miR-181c*, hsa-miR-181d, hsa-miR-182, hsa-miR-182*, hsa-miR-1825, hsa-miR-1826, hsa-miR-1827, hsa-miR-183, hsa-miR-183*, hsa-miR-184, hsa-miR-185, hsa-miR-185*, hsa-miR-186, hsa-miR-186*, hsa-miR-187, hsa-miR-187*, hsa-miR-188-3p, hsa-miR-188-5p, hsa-miR-18a, hsa-miR-18a*, hsa-miR-18b, hsa-miR-18b*, hsa-miR-190, hsa-miR-190b, hsa-miR-191, hsa-miR-191*, hsa-miR-192, hsa-miR-192*, hsa-miR-193a-3p, hsa-miR-193a-5p, hsa-miR-193b, hsa-miR-193b*, hsa-miR-194, hsa-miR-194*, hsa-miR-195, hsa-miR-195*, hsa-miR-196a, hsa-miR-196a*, hsa-miR-196b, hsa-miR-197, hsa-miR-198, hsa-miR-199a-3p, hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-199b-5p, hsa-miR-19a, hsa-miR-19a*, hsa-miR-19b, hsa-miR-19b-1*, hsa-miR-19b-2*, hsa-miR-200a, hsa-miR-200a*, hsa-miR-200b, hsa-miR-200b*, hsa-miR-200c, hsa-miR-200c*, hsa-miR-202, hsa-miR-202*, hsa-miR-203, hsa-miR-204, hsa-miR-205, hsa-miR-206, hsa-miR-208a, hsa-miR-208b, hsa-miR-20a, hsa-miR-20a*, hsa-miR-20b, hsa-miR-20b*, hsa-miR-21, hsa-miR-21*, hsa-miR-210, hsa-miR-211, hsa-miR-212, hsa-miR-214, hsa-miR-214*, hsa-miR-215, hsa-miR-216a, hsa-

miR-216b, hsa-miR-217, hsa-miR-218, hsa-miR-218-1*, hsa-miR-218-2*, hsa-miR-219-1-3p, hsa-miR-219-2-3p, hsa-miR-219-5p, hsa-miR-22, hsa-miR-22*, hsa-miR-220a, hsa-miR-220b, hsa-miR-220c, hsa-miR-221, hsa-miR-221*, hsa-miR-222, hsa-miR-222*, hsa-miR-223, hsa-miR-223*, hsa-miR-224, hsa-miR-23a, hsa-miR-23a*, hsa-miR-23b, hsa-miR-23b*, hsa-miR-24, hsa-miR-24-1*, hsa-miR-24-2*, hsa-miR-25, hsa-miR-25*, hsa-miR-26a, hsa-miR-26a-1*, hsa-miR-26a-2*, hsa-miR-26b, hsa-miR-26b*, hsa-miR-27a, hsa-miR-27a*, hsa-miR-27b, hsa-miR-27b*, hsa-miR-28-3p, hsa-miR-28-5p, hsa-miR-296-3p, hsa-miR-296-5p, hsa-miR-297, hsa-miR-298, hsa-miR-299-3p, hsa-miR-299-5p, hsa-miR-29a, hsa-miR-29a*, hsa-miR-29b, hsa-miR-29b-1*, hsa-miR-29b-2*, hsa-miR-29c, hsa-miR-29c*, hsa-miR-300, hsa-miR-301a, hsa-miR-301b, hsa-miR-302a, hsa-miR-302a*, hsa-miR-302b, hsa-miR-302b*, hsa-miR-302c, hsa-miR-302c*, hsa-miR-302d, hsa-miR-302d*, hsa-miR-302e, hsa-miR-302f, hsa-miR-30a, hsa-miR-30a*, hsa-miR-30b, hsa-miR-30b*, hsa-miR-30c, hsa-miR-30c-1*, hsa-miR-30c-2*, hsa-miR-30d, hsa-miR-30d*, hsa-miR-30e, hsa-miR-30e*, hsa-miR-31, hsa-miR-31*, hsa-miR-32, hsa-miR-32*, hsa-miR-320a, hsa-miR-320b, hsa-miR-320c, hsa-miR-320d, hsa-miR-323-3p, hsa-miR-323-5p, hsa-miR-324-3p, hsa-miR-324-5p, hsa-miR-325, hsa-miR-326, hsa-miR-328, hsa-miR-329, hsa-miR-330-3p, hsa-miR-330-5p, hsa-miR-331-3p, hsa-miR-331-5p, hsa-miR-335, hsa-miR-335*, hsa-miR-337-3p, hsa-miR-337-5p, hsa-miR-338-3p, hsa-miR-338-5p, hsa-miR-339-3p, hsa-miR-339-5p, hsa-miR-33a, hsa-miR-33a*, hsa-miR-33b, hsa-miR-33b*, hsa-miR-340, hsa-miR-340*, hsa-miR-342-3p, hsa-miR-342-5p, hsa-miR-345, hsa-miR-346, hsa-miR-34a, hsa-miR-34a*, hsa-miR-34b, hsa-miR-34b*, hsa-miR-34c-3p, hsa-miR-34c-5p, hsa-miR-361-3p, hsa-miR-361-5p, hsa-miR-362-3p, hsa-miR-362-5p, hsa-miR-363, hsa-miR-363*, hsa-miR-365, hsa-miR-367, hsa-miR-367*, hsa-miR-369-3p, hsa-miR-369-5p, hsa-miR-370, hsa-miR-371-3p, hsa-miR-371-5p, hsa-miR-372, hsa-miR-373, hsa-miR-373*, hsa-miR-374a, hsa-miR-374a*, hsa-miR-374b, hsa-miR-374b*, hsa-miR-375, hsa-miR-376a, hsa-miR-376a*, hsa-miR-376b, hsa-miR-376c, hsa-miR-377, hsa-miR-377*, hsa-miR-378, hsa-miR-378*, hsa-miR-379, hsa-miR-379*, hsa-miR-380, hsa-miR-380*, hsa-miR-381, hsa-miR-382, hsa-miR-383, hsa-miR-384, hsa-miR-409-3p, hsa-miR-409-5p, hsa-miR-410, hsa-miR-411, hsa-miR-411*, hsa-miR-412, hsa-miR-421, hsa-miR-422a, hsa-miR-423-3p, hsa-miR-423-5p, hsa-miR-424, hsa-miR-424*, hsa-miR-425, hsa-miR-425*, hsa-miR-429, hsa-miR-431, hsa-miR-431*, hsa-miR-432, hsa-miR-432*, hsa-miR-433, hsa-miR-448, hsa-miR-449a, hsa-miR-449b, hsa-miR-450a, hsa-miR-450b-3p, hsa-miR-450b-5p, hsa-miR-451, hsa-miR-452, hsa-miR-452*, hsa-miR-453, hsa-miR-454, hsa-miR-454*, hsa-miR-455-3p, hsa-miR-455-5p, hsa-miR-483-3p, hsa-miR-483-5p, hsa-miR-484, hsa-miR-485-3p, hsa-miR-485-5p, hsa-miR-486-3p, hsa-miR-486-5p, hsa-miR-487a, hsa-miR-487b, hsa-miR-488, hsa-miR-488*, hsa-miR-489, hsa-miR-490-3p, hsa-miR-490-5p, hsa-miR-491-3p, hsa-miR-491-5p, hsa-miR-492, hsa-miR-493, hsa-miR-493*, hsa-miR-494, hsa-miR-495, hsa-miR-

496, hsa-miR-497, hsa-miR-497*, hsa-miR-498, hsa-miR-499-3p, hsa-miR-499-5p, hsa-miR-500, hsa-miR-500*, hsa-miR-501-3p, hsa-miR-501-5p, hsa-miR-502-3p, hsa-miR-502-5p, hsa-miR-503, hsa-miR-504, hsa-miR-505, hsa-miR-505*, hsa-miR-506, hsa-miR-507, hsa-miR-508-3p, hsa-miR-508-5p, hsa-miR-509-3-5p, hsa-miR-509-3p, hsa-miR-509-5p, hsa-miR-510, hsa-miR-511, hsa-miR-512-3p, hsa-miR-512-5p, hsa-miR-513a-3p, hsa-miR-513a-5p, hsa-miR-513b, hsa-miR-513c, hsa-miR-514, hsa-miR-515-3p, hsa-miR-515-5p, hsa-miR-516a-3p, hsa-miR-516a-5p, hsa-miR-516b, hsa-miR-517*, hsa-miR-517a, hsa-miR-517b, hsa-miR-517c, hsa-miR-518a-3p, hsa-miR-518a-5p, hsa-miR-518b, hsa-miR-518c, hsa-miR-518c*, hsa-miR-518d-3p, hsa-miR-518d-5p, hsa-miR-518e, hsa-miR-518e*, hsa-miR-518f, hsa-miR-518f*, hsa-miR-519a, hsa-miR-519b-3p, hsa-miR-519c-3p, hsa-miR-519d, hsa-miR-519e, hsa-miR-519e*, hsa-miR-520a-3p, hsa-miR-520a-5p, hsa-miR-520b, hsa-miR-520c-3p, hsa-miR-520d-3p, hsa-miR-520d-5p, hsa-miR-520e, hsa-miR-520f, hsa-miR-520g, hsa-miR-520h, hsa-miR-521, hsa-miR-522, hsa-miR-523, hsa-miR-524-3p, hsa-miR-524-5p, hsa-miR-525-3p, hsa-miR-525-5p, hsa-miR-526b, hsa-miR-526b*, hsa-miR-532-3p, hsa-miR-532-5p, hsa-miR-539, hsa-miR-541, hsa-miR-541*, hsa-miR-542-3p, hsa-miR-542-5p, hsa-miR-543, hsa-miR-544, hsa-miR-545, hsa-miR-545*, hsa-miR-548a-3p, hsa-miR-548a-5p, hsa-miR-548b-3p, hsa-miR-548b-5p, hsa-miR-548c-3p, hsa-miR-548c-5p, hsa-miR-548d-3p, hsa-miR-548d-5p, hsa-miR-548e, hsa-miR-548f, hsa-miR-548g, hsa-miR-548h, hsa-miR-548i, hsa-miR-548j, hsa-miR-548k, hsa-miR-548l, hsa-miR-548m, hsa-miR-548n, hsa-miR-548o, hsa-miR-548p, hsa-miR-549, hsa-miR-550, hsa-miR-550*, hsa-miR-551a, hsa-miR-551b, hsa-miR-551b*, hsa-miR-552, hsa-miR-553, hsa-miR-554, hsa-miR-555, hsa-miR-556-3p, hsa-miR-556-5p, hsa-miR-557, hsa-miR-558, hsa-miR-559, hsa-miR-561, hsa-miR-562, hsa-miR-563, hsa-miR-564, hsa-miR-566, hsa-miR-567, hsa-miR-568, hsa-miR-569, hsa-miR-570, hsa-miR-571, hsa-miR-572, hsa-miR-573, hsa-miR-574-3p, hsa-miR-574-5p, hsa-miR-575, hsa-miR-576-3p, hsa-miR-576-5p, hsa-miR-577, hsa-miR-578, hsa-miR-579, hsa-miR-580, hsa-miR-581, hsa-miR-582-3p, hsa-miR-582-5p, hsa-miR-583, hsa-miR-584, hsa-miR-585, hsa-miR-586, hsa-miR-587, hsa-miR-588, hsa-miR-589, hsa-miR-589*, hsa-miR-590-3p, hsa-miR-590-5p, hsa-miR-591, hsa-miR-592, hsa-miR-593, hsa-miR-593*, hsa-miR-595, hsa-miR-596, hsa-miR-597, hsa-miR-598, hsa-miR-599, hsa-miR-600, hsa-miR-601, hsa-miR-602, hsa-miR-603, hsa-miR-604, hsa-miR-605, hsa-miR-606, hsa-miR-607, hsa-miR-608, hsa-miR-609, hsa-miR-610, hsa-miR-611, hsa-miR-612, hsa-miR-613, hsa-miR-614, hsa-miR-615-3p, hsa-miR-615-5p, hsa-miR-616, hsa-miR-616*, hsa-miR-617, hsa-miR-618, hsa-miR-619, hsa-miR-620, hsa-miR-621, hsa-miR-622, hsa-miR-623, hsa-miR-624, hsa-miR-624*, hsa-miR-625, hsa-miR-625*, hsa-miR-626, hsa-miR-627, hsa-miR-628-3p, hsa-miR-628-5p, hsa-miR-629, hsa-miR-629*, hsa-miR-630, hsa-miR-631, hsa-miR-632, hsa-miR-633, hsa-miR-634, hsa-miR-635, hsa-miR-636, hsa-miR-637, hsa-miR-638, hsa-miR-639, hsa-miR-640, hsa-miR-641, hsa-miR-

642, hsa-miR-643, hsa-miR-644, hsa-miR-645, hsa-miR-646, hsa-miR-647, hsa-miR-648, hsa-miR-649, hsa-miR-650, hsa-miR-651, hsa-miR-652, hsa-miR-653, hsa-miR-654-3p, hsa-miR-654-5p, hsa-miR-655, hsa-miR-656, hsa-miR-657, hsa-miR-658, hsa-miR-659, hsa-miR-660, hsa-miR-661, hsa-miR-662, hsa-miR-663, hsa-miR-663b, hsa-miR-664, hsa-miR-664*, hsa-miR-665, hsa-miR-668, hsa-miR-671-3p, hsa-miR-671-5p, hsa-miR-675, hsa-miR-7, hsa-miR-708, hsa-miR-708*, hsa-miR-7-1*, hsa-miR-7-2*, hsa-miR-720, hsa-miR-744, hsa-miR-744*, hsa-miR-758, hsa-miR-760, hsa-miR-765, hsa-miR-766, hsa-miR-767-3p, hsa-miR-767-5p, hsa-miR-768-3p, hsa-miR-768-5p, hsa-miR-769-3p, hsa-miR-769-5p, hsa-miR-770-5p, hsa-miR-802, hsa-miR-873, hsa-miR-874, hsa-miR-875-3p, hsa-miR-875-5p, hsa-miR-876-3p, hsa-miR-876-5p, hsa-miR-877, hsa-miR-877*, hsa-miR-885-3p, hsa-miR-885-5p, hsa-miR-886-3p, hsa-miR-886-5p, hsa-miR-887, hsa-miR-888, hsa-miR-888*, hsa-miR-889, hsa-miR-890, hsa-miR-891a, hsa-miR-891b, hsa-miR-892a, hsa-miR-892b, hsa-miR-9, hsa-miR-9*, hsa-miR-920, hsa-miR-921, hsa-miR-922, hsa-miR-923, hsa-miR-924, hsa-miR-92a, hsa-miR-92a-1*, hsa-miR-92a-2*, hsa-miR-92b, hsa-miR-92b*, hsa-miR-93, hsa-miR-93*, hsa-miR-933, hsa-miR-934, hsa-miR-935, hsa-miR-936, hsa-miR-937, hsa-miR-938, hsa-miR-939, hsa-miR-940, hsa-miR-941, hsa-miR-942, hsa-miR-943, hsa-miR-944, hsa-miR-95, hsa-miR-96, hsa-miR-96*, hsa-miR-98, hsa-miR-99a, hsa-miR-99a*, hsa-miR-99b и hsa-miR-99b*.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления один или несколько сайтов связывания в конструкции, которая описана в настоящем раскрытии (*например*, рекомбинантная нуклеиновая кислота, вектор на основе AAV, rAAV и т.д.), нарушают нацеливание экспрессии трансгена на клетку иммунной системы (*например*, антиген-презентирующую клетку (APC)). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления miRNA, которая нарушает нацеливание экспрессии трансгена на иммунную клетку (*например*, антиген-презентирующую клетку), называется ассоциированной с иммунными клетками miRNA. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ассоциированная с иммунными клетками miRNA представляет собой miRNA, экспрессирующуюся в иммунных клетках, которая проявляет по меньшей мере 2-кратно, 3-кратно, 4-кратно, 5-кратно, 6-кратно, 7-кратно, 8-кратно, 9-кратно, 10-кратно более высокий уровень экспрессии в иммунной клетке по сравнению с клеткой, отличной от иммунной клетки (*например*, контрольной клеткой, такой как клетка HeLa, клетка HEK293, мезенхимальная клетка и т.д.). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления клетка иммунной системы (иммунная клетка), в которой экспрессируется ассоциированная с иммунными клетками miRNA, представляет собой В-клетку, Т-клетку, Т-киллерную клетку, Т-хелперную клетку, $\gamma\delta$ Т-клетку, дендритную клетку, макрофаг, моноцит, клетку сосудистого эндотелия или другую иммунную клетку. В соответствии с некоторыми

вариантами осуществления клетка иммунной системы представляет собой В-клетку, экспрессирующую один или несколько из следующих маркеров: B220, BLAST-2 (EBVCS), Bu-1, CD19, CD20 (L26), CD22, CD24, CD27, CD57, CD72, CD79a, CD79b, CD86, chB6, D8/17, FMC7, L26, M17, MUM-1, Pax-5 (BSAP) и PC47H. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления клетка иммунной системы представляет собой Т-клетку, экспрессирующую один или несколько из следующих маркеров: ART2, CD1a, CD1d, CD11b (Mac-1), CD134 (OX40), CD150, CD2, CD25 (альфа-рецептор интерлейкина 2), CD3, CD38, CD4, CD45RO, CD5, CD7, CD72, CD8, CRTAM, FOXP3, FT2, GPCA, HLA-DR, HML-1, HT23A, Leu-22, Ly-2, Ly-m22, MICG, MRC OX 8, MRC OX-22, OX40, PD-1 (белок 1 программируемой гибели клетки), RT6, TCR (Т-клеточный рецептор), Thy-1 (CD90) и TSA-2 (общий тимусный Ag-2). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ассоциированная с иммунными клетками miRNA является выбранной из: miR-15a, miR-16-1, miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-19b-1, miR-20a, miR-21, miR-29a/b/c, miR-30b, miR-31, miR-34a, miR-92a-1, miR-106a, miR-125a/b, miR-142-3p, miR-146a, miR-150, miR-155, miR-181a, miR-223 и miR-424, miR-221, miR-222, let-7i, miR-148 и miR-152.

Векторы на основе рекомбинантного AAV (векторы на основе rAAV)

«Векторы на основе рекомбинантного AAV (rAAV)» согласно настоящему раскрытию, как правило, состоят, как минимум, из трансгена и его регуляторных последовательностей, а также 5' и 3' инвертированных концевых повторов (ITR) AAV. Он представляет собой вектор на основе рекомбинантного AAV, который упакован в белок капсида, и который доставляют в выбранную целевую клетку. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления трансген представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, гетерологичную по отношению к последовательностям вектора, которая кодирует полипептид, белок, функциональную молекулу РНК (*например*, gRNA) или другой продукт гена, представляющий интерес. Кодированная последовательность нуклеиновой кислоты является функционально связанной с регуляторными компонентами таким образом, который обеспечивает возможность транскрипции, трансляции и/или экспрессии трансгена в клетке целевой ткани.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие относится к вектору на основе рекомбинантного AAV (rAAV), содержащему последовательность нуклеиновой кислоты, включающую в себя промотор, функционально связанный с трансгеном, при этом трансген кодирует белок MeCP2 (*например*, изоформу e1 MeCP2). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления вектор на основе rAAV дополнительно содержит последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие одну

или несколько последовательностей инвертированных концевых повторов (ITR) AAV, например, ITR AAV2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления вектор на основе гAAV дополнительно содержит последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие один или несколько ITR AAV, выбранных из группы, состоящей из AAV3, AAV4, AAV5 и AAV6. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления ITR представляют собой искусственные последовательности, которые заменяют функцию ITR, например, которые раскрыты в международной заявке WO/2016/172008.

Последовательности AAV в векторе, как правило, содержат цис-действующие последовательности 5' и 3' инвертированных концевых повторов (см., *например*, В. J. Carter, в "Handbook of Parvoviruses", ed., Р. Tijsser, CRC Press, pp. 155 168 (1990)). Последовательности ITR имеют длину приблизительно 145 п.о. Предпочтительно, в молекуле применяют, по существу, полные последовательности, кодирующие ITR, хотя допустимой является некоторая степень незначительной модификации этих последовательностей. Способность к модификации этих последовательностей ITR находится в рамках квалификации специалиста в данной области техники. (см., *например*, тексты, такие как Sambrook et al, "Molecular Cloning. A Laboratory Manual", 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989); и К. Fisher *et al.*, J Virol., 70:520 532 (1996)). Примером такой молекулы, используемой в настоящем раскрытии, является «цис-действующая» плаزمид, содержащая трансген, в которой последовательность выбранного трансгена и ассоциированные регуляторные элементы являются фланкированными последовательностями 5' и 3' ITR AAV. Последовательности ITR AAV можно получить из любого известного AAV, в том числе идентифицированных в настоящее время типов AAV млекопитающих (*например*, последовательности ITR AAV2, AAV3, AAV4, AAV5 или AAV6).

Дополнительно к главным элементам, идентифицированным выше для вектора на основе рекомбинантного AAV, вектор также включает в себя необходимые управляющие элементы, которые являются функционально связанными с трансгеном таким образом, который обеспечивает возможность его транскрипции, трансляции и/или экспрессии в клетке, трансфицированной плазмидным вектором или инфицированной вирусом, полученным в соответствии с настоящим раскрытием. В контексте данного документа «функционально связанные» последовательности включают в себя как управляющие экспрессией последовательности, которые являются смежными с геном, представляющим интерес, так и управляющие экспрессией последовательности, которые действуют удаленно или на расстоянии, управляя геном, представляющим интерес.

Управляющие экспрессией последовательности включают в себя соответствующие последовательности для инициации, терминации транскрипции, промоторные и энхансерные последовательности; сигналы для эффективного процессинга РНК, такие как сигналы сплайсинга и полиаденилирования (полиА); последовательности, которые стабилизируют цитоплазматическую мРНК; последовательности, которые повышают эффективность трансляции (*т.е.* консенсусную последовательность Козак); последовательности, которые повышают стабильность белка; и, если это желательно, последовательности, которые усиливают секрецию кодируемого продукта. В уровне техники являются известными и могут использоваться большое число управляющих экспрессией последовательностей, в том числе промоторы, которые являются нативными, конститутивными, индуцируемыми и/или тканеспецифическими.

В контексте данного документа последовательность нуклеиновой кислоты (*например*, кодирующая последовательность) и регуляторные последовательности считаются «функционально» связанными, когда они являются ковалентно связанными таким образом, чтобы поместить экспрессию или транскрипцию последовательности нуклеиновой кислоты под влияние или управление регуляторных последовательностей. Если желательно, чтобы последовательности нуклеиновой кислоты транслировались в функциональный белок, две последовательности ДНК считаются функционально связанными, если индукция промотора в 5' регуляторных последовательностях приводит в результате к транскрипции кодирующей последовательности, и если природа связи между двумя последовательностями ДНК (1) не приводит в результате к введению мутации со сдвигом рамки считывания, (2) не препятствует способности промоторного участка управлять транскрипцией кодирующих последовательностей, или (3) не препятствует способности соответствующего РНК транскрипта транслироваться в белок. Следовательно, промоторный участок будет являться функционально связанным с последовательностью нуклеиновой кислоты, если промоторный участок способен к осуществлению транскрипции этой последовательности ДНК таким образом, чтобы образующийся в результате транскрипт мог транслироваться в желаемый белок или полипептид. Аналогично, два или больше кодирующих участков являются функционально связанными, когда они связаны таким образом, чтобы их транскрипция с общего промотора приводила в результате к экспрессии двух или более белков, которые подверглись трансляции в одной рамке считывания. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления функционально связанные кодирующие последовательности дают на выходе гибридный белок. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления функционально связанные

кодирующие последовательности дают на выходе функциональную РНК (*например*, gRNA, miRNA).

В случае нуклеиновых кислот, кодирующих белок, последовательность полиаденилирования обычно вставляют после последовательностей трансгена и перед последовательностью 3' ITR AAV. Конструкция на основе гAAV, пригодная в настоящем раскрытии, также может содержать интрон, который желательно расположен между промоторной/энхансерной последовательностью и трансгеном. Одна возможная интронная последовательность получена из SV-40 и называется последовательностью Т интрона SV-40. Еще один элемент вектора, который можно применять, представляет собой участок внутренней посадки рибосомы (IRES). Последовательность IRES применяют для получения более чем одного полипептида из одного транскрипта гена. Последовательность IRES будут применять для получения белка, который содержит более чем одну полипептидную цепь. Выбор этих и/или других элементов вектора можно осуществлять в случае необходимости, и доступны многие такие последовательности [см., *например*, Sambrook et al, и источники, цитируемые там, например, на страницах 3.18 3.26 и 16.17 16.27, и Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, 1989]. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления последовательность 2А-пептида из вируса ящура включают в полипротеин; он представляет собой небольшой пептид (примерно 18 аминокислот в длину), который, как было показано, опосредует расщепление полипротеинов (Ryan, M D *et al.*, EMBO, 1994; 4: 928-933; Mattion, N M *et al.*, J Virology, November 1996; p. 8124-8127; Furler, S *et al.*, Gene Therapy, 2001; 8: 864-873; и Halpin, C *et al.*, The Plant Journal, 1999; 4: 453-459). Расщепляющая активность последовательности 2А-пептида была ранее продемонстрирована в искусственных системах, в том числе в плаزمиде и векторах для генной терапии (AAV и ретровирусы) (Ryan, M D *et al.*, EMBO, 1994; 4: 928-933; Mattion, N M *et al.*, J Virology, November 1996; p. 8124-8127; Furler, S *et al.*, Gene Therapy, 2001; 8: 864-873; и Halpin, C *et al.*, The Plant Journal, 1999; 4: 453-459; de Felipe, P *et al.*, Gene Therapy, 1999; 6: 198-208; de Felipe, P *et al.*, Human Gene Therapy, 2000; 11: 1921-1931.; и Klump, H *et al.*, Gene Therapy, 2001; 8: 811-817).

Точная природа регуляторных последовательностей, необходимых для экспрессии гена в клетках-хозяевах, может варьировать в зависимости от видов, тканей или типов клеток, но они обычно будут включать в себя, если необходимо, 5'-нетранскрибируемые и 5'-нетранслируемые последовательности, вовлеченные в инициацию транскрипции и трансляции, соответственно, такие как ТАТА-бокс, кэпирующая последовательность, последовательность СААТ, энхансерные элементы и т.п. В особенности, такие 5'-нетранскрибируемые регуляторные последовательности, будут включать в себя

промоторный участок, который включает в себя промоторную последовательность для управления транскрипцией функционально связанного гена. Регуляторные последовательности также могут включать в себя энхансерные последовательности или вышележащие активирующие последовательности, если необходимо. Векторы согласно настоящему раскрытию, необязательно, могут включать в себя 5' лидерные или сигнальные последовательности. Выбор и конструирование соответствующего вектора находится в рамках способностей и усмотрения квалифицированного специалиста в данной области техники.

Примеры конститутивных промоторов включают в себя, без ограничения, ретровирусный промотор LTR вируса саркомы Рауса (RSV) (необязательно, с энхансером RSV), промотор цитомегаловируса (CMV) (необязательно, с энхансером CMV) [см., *например*, Boshart et al, Cell, 41:521-530 (1985)], промотор SV40, промотор дигидрофолат-редуктазы, промотор β -актина, промотор фосфоглицерат-киназы (PGK) и промотор EF1 α [Invitrogen]. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления промотор представляет собой промотор куриного β -актина с энхансером.

Индукцируемые промоторы обеспечивают возможность регуляции экспрессии гена и могут регулироваться под действием поступающих извне соединений, факторов окружающей среды, таких как температура, или присутствия конкретного физиологического состояния, *например*, острой фазы, конкретного состояния дифференцировки клетки или активны только в делящихся клетках. Индуцируемые промоторы и индуцируемые системы доступны из ряда коммерческих источников, в том числе, без ограничения, Invitrogen, Clontech и Ariad. Было описано много других систем, и они могут быть легко выбраны специалистом в данной области техники. Примеры индуцируемых промоторов, регулируемых под действием поступающих извне соединений, включают в себя индуцируемый цинком промотор металлотионеина (MT) овцы, индуцируемый дексаметазоном (Dex) промотор вируса опухоли молочной железы мышей (MMTV), промоторную систему полимеразы T7 (международная заявка WO 98/10088); экдизоновый промотор насекомых (No et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:3346-3351 (1996)), репрессируемую тетрациклином систему (Gossen et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5547-5551 (1992)), индуцируемую тетрациклином систему (Gossen et al, Science, 268:1766-1769 (1995), см. также Harvey et al, Curr. Opin. Chem. Biol., 2:512-518 (1998)), индуцируемую RU486 систему (Wang et al, Nat. Biotech., 15:239-243 (1997) и Wang et al, Gene Ther., 4:432-441 (1997)) и индуцируемую рапамицином систему (Magari et al, J. Clin. Invest., 100:2865-2872 (1997)). Другие типы индуцируемых промоторов, которые могут быть пригодными в этом контексте, представляют собой промоторы, которые регулируются конкретным

физиологическим состоянием, *например*, температурой, острой фазой, конкретным состоянием дифференцировки клетки или активны только в делящихся клетках.

В соответствии с еще одним вариантом осуществления для трансгена будут применять нативный промотор. Нативный промотор может быть предпочтительным, когда желательно, чтобы экспрессия трансгена имитировала нативную экспрессию. Нативный промотор можно применять, когда экспрессия трансгена должна регулироваться в зависимости от времени или стадии развития, или тканеспецифическим образом, или в ответ на специфические транскрипционные стимулы. Например, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления нативный промотор представляет собой промотор MeCP2, такой как промотор мышинового MeCP2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления промотор мышинового MeCP2 представлен последовательностью, изложенной в SEQ ID NO: 3. В соответствии с дополнительным вариантом осуществления другие нативные элементы для управления экспрессией, такие как энхансерные элементы, сайты полиаденилирования или консенсусные последовательности Козак, также можно применять для того, чтобы имитировать нативную экспрессию.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления регуляторные последовательности придают свойства тканеспецифической экспрессии гена. В некоторых случаях тканеспецифические регуляторные последовательности связывают тканеспецифические транскрипционные факторы, которые индуцируют транскрипцию тканеспецифическим образом. Такие тканеспецифические регуляторные последовательности (*например*, промоторы, энхансеры и т.д.) являются хорошо известными в уровне техники. Иллюстративные тканеспецифические регуляторные последовательности включают в себя, без ограничения, следующие тканеспецифические промоторы: специфический для глаза промотор ретиношизина или промотор K12, специфический для печени промотор тироксин-связывающего глобулина (TBG), инсулиновый промотор, глюкагоновый промотор, соматостатиновый промотор, промотор панкреатического полипептида (PPY), промотор синапсина-1 (Syn), промотор креатинкиназы (MCK), промотор десмина млекопитающего (DES), промотор тяжелой цепи α -миозина (α -MHC) или промотор сердечного тропонина Т (cTnT). Другие иллюстративные промоторы включают в себя промотор бета-актина, коровый промотор вируса гепатита В, Sandig *et al.*, Gene Ther., 3:1002-9 (1996); промотор альфа-фетопротейна (AFP), Arbuthnot *et al.*, Hum. Gene Ther., 7:1503-14 (1996)), промотор костного остеокальцина (Stein *et al.*, Mol. Biol. Rep., 24:185-96 (1997)); промотор костного сиалопротеина (Chen *et al.*, J. Bone Miner. Res., 11:654-64 (1996)), промотор CD2 (Hansal *et al.*, J. Immunol., 161:1063-8 (1998); промотор тяжелой цепи иммуноглобулина; промотор α -цепи Т-клеточного рецептора,

специфический для нейронов промотор, такой как промотор нейрон-специфической енолазы (NSE) (Andersen *et al.*, Cell. Mol. Neurobiol., 13:503-15 (1993)), промотор гена легкой цепи нейрофиламента (Piccioli *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:5611-5 (1991)) и нейрон-специфический промотор гена vgf (Piccioli *et al.*, Neuron, 15:373-84 (1995)), среди прочих, которые будут известны квалифицированному специалисту.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления один или несколько сайтов связывания для одной или нескольких miRNA встроены в трансген в векторе на основе gAAV для того, чтобы ингибировать экспрессию трансгена в одной или нескольких тканях субъекта, несущего трансген. Квалифицированному специалисту будет понятно, что можно выбрать сайты связывания для управления экспрессией трансгена тканеспецифическим образом. Например, сайты связывания для специфической для печени miR-122 могут быть включены в трансген для ингибирования экспрессии этого трансгена в печени. Сайты-мишени в мРНК могут находиться в 5' UTR, 3' UTR или в кодирующем участке. Как правило, сайт-мишень находится в 3' UTR мРНК. Более того, трансген может быть сконструирован таким образом, чтобы несколько miRNA регулировали мРНК посредством распознавания одного и того же или нескольких сайтов. Наличие нескольких сайтов связывания miRNA может приводить в результате к согласованному действию нескольких RISC и обеспечивать высокоэффективное ингибирование экспрессии. Последовательность сайта-мишени может содержать в общей сложности 5-100, 10-60 или больше нуклеотидов. Последовательность сайта-мишени может содержать по меньшей мере 5 нуклеотидов последовательности сайта связывания в целевом гене.

Рекомбинантные аденоассоциированные вирусы (rAAV)

В соответствии с некоторыми аспектами настоящее раскрытие относится к выделенным AAV. В контексте данного документа применительно к AAV термин «выделенный» относится к AAV, который был искусственно продуцирован или получен. Выделенные AAV могут быть получены с применением способов на основе рекомбинации. Такие AAV называются в данном документе «рекомбинантными AAV». Рекомбинантные AAV (rAAV) предпочтительно обладают способностью к тканеспецифическому нацеливанию, в результате чего нуклеаза и/или трансген в gAAV будут доставляться специфически в одну или несколько предварительно определенных тканей. Капсид AAV является важным элементом в определении этих способностей к тканеспецифическому нацеливанию. Таким образом, можно выбрать gAAV, имеющий капсид, подходящий для ткани, которая является целевой.

Способы получения рекомбинантных AAV, имеющих желаемый белок капсида, являются хорошо известными в уровне техники. (См., например, заявку на патент США US 2003/0138772), содержание которой включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). Как правило, способы включают культивирование клетки-хозяина, которая содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок капсида AAV; функциональный ген *rep*; вектор на основе рекомбинантного AAV, состоящий из инвертированных концевых повторов AAV (ITR) и трансгена; а также достаточные функциональные элементы помощника, чтобы обеспечить возможность упаковки вектора на основе рекомбинантного AAV в белки капсида AAV. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления белки капсида представляют собой структурные белки, кодируемые геном *cap* в AAV. AAV содержат три белка капсида, вирионные белки 1-3 (называемые VP1, VP2 и VP3), все из которых транскрибируются с одного гена *cap* посредством альтернативного сплайсинга. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления молекулярные массы VP1, VP2 и VP3 составляют приблизительно 87 кДа, приблизительно 72 кДа и приблизительно 62 кДа, соответственно. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления после трансляции белки капсида образуют сферическую оболочку из 60 мономерных белковых единиц вокруг вирусного генома. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления функции белков капсида заключаются в защите вирусного генома, доставке генома и взаимодействии с хозяином. В соответствии с некоторыми аспектами белки капсида доставляют вирусный геном хозяину тканеспецифическим образом.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления гAAV, описанный в настоящем раскрытии, содержит один или несколько белков капсида, способных к пересечению гематоэнцефалического барьера. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления по меньшей мере один белок капсида имеет серотип, выбранный из группы, состоящей из AAV1, AAV2, AAV2i8, AAV2.5, AAV6, AAV8, AAVrh8, AAV9, AAVrh10, AAV-B1, AAV9.45A-String (например, AAV9.45-AS), AAV9.45Angiopep, AAV9.47-Angiopep и AAV9.47-AS. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления по меньшей мере один белок капсида имеет серотип AAV-PHP.B, например, как описано в патенте США № 9585971. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления белок капсида имеет серотип, который описан в международной заявке WO2015/127128, WO2016/054554, WO2016/054557 или WO2016/065001.

Компоненты, подлежащие культивированию в клетке-хозяине для упаковки вектора на основе гAAV в капсид AAV, могут быть обеспечены клетке-хозяину *in trans* (удаленно). В качестве альтернативы, любой один или несколько из требуемых компонентов

(например, вектор на основе рекомбинантного AAV, последовательности гер, последовательности сар и/или функциональные элементы помощника) могут быть обеспечены стабильной клеткой-хозяином, которая была подвергнута воздействию методов генной инженерии таким образом, чтобы она содержала один или несколько из требующихся компонентов, с применением способов, известных специалисту в данной области техники. В наиболее подходящем случае такая стабильная клетка-хозяин будет содержать требующийся(требующиеся) компонент(компоненты) под управлением индуцируемого промотора. Тем не менее, требующийся(требующиеся) компонент(компоненты) могут находиться под управлением конститутивного промотора. Примеры подходящих индуцируемых и конститутивных промоторов представлены в данном документе в обсуждении регуляторных элементов, подходящих для применения с трансеном. В качестве еще одной альтернативы, выбранная стабильная клетка-хозяин может содержать выбранный(выбранные) компонент(компоненты) под управлением конститутивного промотора и другой(другие) выбранный(выбранные) компонент(компоненты) под управлением одного или нескольких индуцируемых промоторов. Например, может быть создана стабильная клетка-хозяин, которая получена из клеток 293 (которые содержат функциональные элементы помощника E1 под управлением конститутивного промотора), но которая содержит белки гер и/или сар под управлением индуцируемых промоторов. Другие стабильные клетки-хозяева могут быть получены специалистом в данной области техники.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие относится к клетке-хозяину, содержащей нуклеиновую кислоту, которая содержит кодирующую последовательность, которая кодирует белок (например, белок MeCP2, такой как изоформа e1 MeCP2). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее раскрытие относится к композиции, содержащей клетку-хозяина, которая описана выше. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления композиция, содержащая описанную выше клетку-хозяина, дополнительно содержит криопротектор.

Вектор на основе рекомбинантного AAV, последовательности гер, последовательности сар и функциональные элементы помощника, требующиеся для продуцирования гAAV согласно настоящему раскрытию, могут быть доставлены в пакующую клетку-хозяин с применением любого подходящего генетического элемента (вектора). Выбранный генетический элемент можно доставлять можно доставлять с помощью любого подходящего способа, в том числе с помощью способов, описанных в данном документе. Способы, применяемые для конструирования любого варианта осуществления согласно настоящему раскрытию, являются известными специалистам,

обладающим навыками манипуляций с нуклеиновыми кислотами, и включают в себя методы генной инженерии, конструирование с использованием методик на основе рекомбинации и методики синтеза. См., *например*, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. Аналогично, способы получения вирионов гAAV являются хорошо известными, и выбор подходящего способа не является ограничением в отношении настоящего раскрытия. См., *например*, K. Fisher et al., *J. Virol.*, 70:520-532 (1993); и патент США № 5478745.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления рекомбинантные AAV можно получать с применением способа тройной трансфекции (подробно описанного в патенте США № 6001650). Как правило, рекомбинантные AAV получают посредством трансфекции клетки-хозяина вектором на основе рекомбинантного AAV (содержащим трансген), который должен быть упакован в частицы AAV, вектором, обеспечивающим функциональные элементы помощника AAV, и вектором, обеспечивающим вспомогательные функциональные элементы. Вектор, обеспечивающий функциональные элементы помощника AAV, кодирует последовательности «функциональных элементов помощника AAV» (*т.е.* гер и сар), которые функционируют *in trans* (удаленно) для продуктивной репликации AAV и заключения его в капсид. Предпочтительно, вектор, обеспечивающий функциональные элементы помощника AAV, поддерживает эффективное продуцирование вектора на основе AAV без образования каких-либо выявляемых вирионов AAV дикого типа (*т.е.* вирионов AAV, содержащих функциональные гены гер и сар). Неограничивающие примеры векторов, подходящих для применения с настоящим раскрытием, включают в себя pHLP19, описанный в патенте США № 6001650, и вектор pRepбсар6, описанный в патенте США № 6156303, при этом полное содержание обоих этих источников включено в данный документ посредством ссылки. Вектор, обеспечивающий вспомогательные функциональные элементы, кодирует нуклеотидные последовательности для вирусных и/или клеточных функциональных элементов, не происходящих из AAV, от которых зависит репликация AAV (*т.е.* «вспомогательные функциональные элементы»). Вспомогательные функциональные элементы включают в себя те функциональные элементы, которые требуются для репликации AAV, в том числе, без ограничения, те фрагменты, которые вовлечены в активацию транскрипции генов AAV, специфический для стадии развития AAV сплайсинг мРНК, репликацию ДНК AAV, синтез продуктов экспрессии гена сар и сборку капсида AAV. Вспомогательные функциональные элементы на основе вирусов могут быть получены из любого из известных вирусов-помощников, таких как аденовирус, вирус герпеса (отличный от вируса простого герпеса 1 типа) и вирус коревой оспы.

В соответствии с некоторыми аспектами настоящее раскрытие относится к трансфицированным клеткам-хозяевам. Термин «трансфекция» используют применительно к поглощению чужеродной ДНК клеткой, и клетка была «трансфицирована», если экзогенная ДНК была введена внутрь клеточной мембраны. В целом, в уровне техники известен ряд методик трансфекции. См., *например*, Graham et al. (1973) Virology, 52:456, Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning, a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratories, New York, Davis et al. (1986) Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier, и Chu et al. (1981) Gene 13:197. Такие методики можно применять для введения одной или нескольких экзогенных нуклеиновых кислот, таких как интегрирующий вектор и другие молекулы нуклеиновой кислоты, в подходящие клетки-хозяева.

«Клетка-хозяин» относится к любой клетке, которая вмещает или способна вмещать вещество, представляющее интерес. Часто клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего. Клетку-хозяин можно применять в качестве реципиента конструкции-помощника AAV, плазмиды с минигеном AAV, вектора, обеспечивающего вспомогательные функциональные элементы, или другой переносимой ДНК, ассоциированной с продуцированием рекомбинантных AAV. Термин включает в себя потомство исходной клетки, которая подверглась трансфекции. Таким образом, термин «клетка-хозяин» в контексте данного документа может относиться к клетке, которая подверглась трансфекции экзогенной последовательностью ДНК. Понятно, что потомство одной родительской клетки не обязательно может быть полностью идентичным по морфологии или соответствовать по геномной или общей ДНК исходной родительской клетке вследствие природной, случайной или преднамеренной мутации.

В контексте данного документа термин «клеточная линия» относится к популяции клеток, способных к непрерывному или длительному росту и делению *in vitro*. Клеточные линии часто представляют собой клональные популяции, полученные из одной клетки-предшественника. Кроме того, в уровне техники известно, что спонтанные или индуцированные изменения могут происходить в кариотипе во время хранения или переноса таких клональных популяций. Таким образом, клетки, полученные из упомянутой клеточной линии, не обязательно могут быть в точности идентичными предковым клеткам или культурам, и упомянутая клеточная линия включает в себя такие варианты.

В контексте данного документа термин «рекомбинантная клетка» относится к клетке, в которую был введен экзогенный сегмент ДНК, такой как сегмент ДНК, который приводит к транскрипции биологически активного полипептида или продуцированию биологически активной нуклеиновой кислоты, такой как РНК.

В контексте данного документа термин «вектор» включает в себя любой генетический элемент, такой как плазида, фаг, транспозон, космида, хромосома, искусственная хромосома, вирус, вирион *и т.д.*, который является способным к репликации, когда он ассоциирован с соответствующими управляющими элементами, и который может переносить последовательности генов между клетками. Таким образом, термин включает в себя средства для клонирования и экспрессии, а также вирусные векторы. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления предполагается, что пригодные векторы представляют собой те векторы, в которых сегмент нуклеиновой кислоты, подлежащий транскрипции, расположен под транскрипционным управлением промотора. Термин «промотор» относится к последовательности ДНК, которая распознается синтетическим аппаратом клетки или введенным синтетическим аппаратом и требуется для инициации специфической транскрипции гена. Фразы «расположенный в функциональной связи», «под управлением» или «под транскрипционным управлением» означают, что промотор находится в правильном положении и ориентации относительно нуклеиновой кислоты для управления запуском РНК-полимеразы и экспрессией гена. Термин «экспрессионный вектор или конструкция» означает любой тип генетической конструкции, которая содержит нуклеиновую кислоту, и в которой способна транскрибироваться часть кодирующей последовательности нуклеиновой кислоты или она вся. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления экспрессия включает в себя транскрипцию нуклеиновой кислоты, например, с образованием биологически активного полипептида-продукта или функциональной РНК (*например*, гидовой РНК), с транскрибируемого гена.

Не предполагается, что вышеуказанные способы упаковки рекомбинантных векторов в желаемые капсиды AAV с получением гAAV согласно настоящему раскрытию являются ограничивающими, и другие подходящие способы будут очевидны квалифицированному специалисту.

Способы введения

Композиции, описанные в настоящем раскрытии (*например*, рекомбинантные нуклеиновые кислоты, гAAV, фармацевтические композиции *и т.д.*) можно доставлять субъекту согласно любым подходящим способам, известным в уровне техники. Композиции (*например*, рекомбинантные нуклеиновые кислоты, гAAV, фармацевтические композиции *и т.д.*), предпочтительно, суспендированные в физиологически совместимом носителе (*т.е.* в композиции), можно вводить субъекту, *т.е.* животному-хозяину, такому как человек, мышь, крыса, кошка, собака, овца, кролик, лошадь, корова, коза, свинья,

морская свинка, хомяк, курица, индейка или отличный от человека примат (*например*, макак). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления животное-хозяин не включает в себя человека. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления субъект представляет собой человека. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления субъект имеет возраст менее года, например, имеет возраст 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или 11 месяцев.

Доставку композиций субъекту-млекопитающему можно осуществлять, например, с помощью системной инъекции (*например*, внутривенной инъекции) или интратекальной инъекции. Также можно применять дополнительные способы введения композиций в ЦНС субъекта, например, внутрочерепную инъекцию, инъекцию в полосатое тело *и т.д.* Также можно применять комбинации способов введения (*например*, местного введения и интрастромальной инъекции).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления композиции согласно настоящему раскрытию могут содержать гAAV отдельно или в комбинации с одним или несколькими другими вирусами (*например*, вторым гAAV, кодирующим один или несколько отличных трансгенов). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления композиция содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более отличающихся гAAV, каждый из которых имеет один или несколько отличающихся трансгенов.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель. Подходящие носители могут быть легко выбраны специалистом в данной области техники с учетом показаний, на которые направлена композиция. Например, один подходящий носитель включает в себя солевой раствор, который может быть составлен с рядом буферных растворов (*например*, фосфатно-буферный солевой раствор). Другие иллюстративные носители включают в себя стерильный солевой раствор, лактозу, сахарозу, фосфат кальция, желатин, декстран, агар, пектин, арахисовое масло, кунжутное масло и воду. Выбор носителя не является ограничением настоящего раскрытия.

Необязательно, композиции согласно настоящему раскрытию могут содержать дополнительно к рекомбинантной нуклеиновой кислоте или гAAV и носителю(носителям) другие фармацевтические ингредиенты, такие как консерванты или химические стабилизаторы. Подходящие иллюстративные консерванты включают в себя хлорбутанол, сорбат калия, сорбиновую кислоту, диоксид серы, пропилгаллат, парабены, этилванилин, глицерин, фенол и параклорфенол. Подходящие химические стабилизаторы включают в себя желатин и альбумин.

Композиции вводят в достаточных количествах для трансфекции клеток желаемой ткани (*например*, ткани ЦНС) и для обеспечения достаточных уровней переноса и экспрессии генов без неоправданных неблагоприятных эффектов. Примеры фармацевтически приемлемых путей введения включают в себя, без ограничения, непосредственную доставку в выбранный орган (*например*, интрастромальную доставку в глаз), пероральное, ингаляционное введение (в том числе интраназальную и интратрахеальную доставку), внутриглазное, внутривенное, внутримышечное, подкожное, интрадермальное, внутриопухолевое введение и другие парентеральные пути введения. Пути введения можно комбинировать, если это является желательным.

Доза вирионов гAAV, требующаяся для достижения конкретного «терапевтического эффекта», *например*, единицы дозы в копиях генома на килограмм массы тела (гс/кг) будут варьировать в зависимости от нескольких факторов, в том числе, без ограничения: пути введения вириона гAAV, уровня экспрессии гена или РНК, требующегося для достижения терапевтического эффекта, конкретного заболевания или нарушения, лечение которого осуществляют, и стабильности продукта гена или РНК-продукта. Специалист в данной области техники может легко определить диапазон дозы вириона гAAV для лечения пациента, имеющего конкретное заболевание или нарушение, с учетом вышеупомянутых факторов, а также других факторов.

Эффективное количество композиции (*например*, рекомбинантной нуклеиновой кислоты, гAAV, фармацевтической композиции *и т.д.*) представляет собой количество, достаточное для целенаправленного инфицирования животного, целенаправленного воздействия на желаемую ткань. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления эффективное количество гAAV представляет собой количество, достаточное для получения стабильной соматической трансгенной животной модели. Эффективное количество, преимущественно, будет зависеть от таких факторов, таких как вид, возраст, масса, состояние здоровья субъекта и ткань, подлежащая целенаправленному воздействию, и, следовательно, может варьировать между животными и тканями. Например, эффективное количество гAAV обычно находится в диапазоне от приблизительно 1 мл до приблизительно 100 мл раствора, содержащего от приблизительно 10^9 до 10^{16} копий генома. В некоторых случаях подходящей является дозировка от приблизительно 10^{11} до 10^{13} копий генома гAAV. В соответствии с определенными вариантами осуществления 10^{10} или 10^{11} копий генома гAAV являются эффективными для целенаправленного воздействия на ткань ЦНС (*например*, ткань роговицы). В некоторых случаях стабильных трансгенных животных получают под действием нескольких доз гAAV.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления дозу композиции вводят субъекту не более чем один раз в календарные сутки (*например*, 24-часовой период). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления дозу композиции вводят субъекту не более чем один раз в 2, 3, 4, 5, 6 или 7 календарных суток. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления дозу композиции вводят субъекту не более чем один раз в календарную неделю (*например*, 7 календарных суток). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления дозу композиции вводят субъекту не более чем один раз в две недели (*например*, один раз за период двух календарных недель). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления дозу композиции вводят субъекту не более чем один раз в календарный месяц (*например*, один раз в 30 календарных суток). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления дозу композиции вводят субъекту не более чем один раз в шесть календарных месяцев. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления дозу композиции вводят субъекту не более чем один раз в календарный год (*например*, 365 суток или 366 суток в високосный год).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления композиции составляют для снижения агрегации частиц AAV в композиции, в особенности, в случае, когда присутствуют высокие концентрации гAAV (*например*, $\sim 10^{13}$ гс/мл или более). Можно применять подходящие способы для снижения агрегации, в том числе, например, добавление поверхностно-активных веществ, регулирование pH, регулирование концентрации соли и т.д. (См., *например*, Wright FR, *et al.*, Molecular Therapy (2005) 12, 171–178, при этом содержание данного источника включено в данный документ посредством ссылки).

Получение составов с фармацевтически приемлемыми вспомогательными средствами и растворами-носителями является хорошо известным специалистам в данной области техники, как и разработка подходящих схем дозирования и лечения для применения конкретных композиций, описанных в данном документе, в ряде схем лечения. Как правило, эти составы могут содержать по меньшей мере приблизительно 0,1% активного соединения или большее количество, хотя процентное содержание активного(активных) ингредиента(ингредиентов) может, конечно, варьировать и может условно составлять от приблизительно 1 или 2% до приблизительно 70% или 80% массы или объема всего состава или больше. Естественно, количество активного соединения в каждой пригодной с терапевтической точки зрения композиции может быть приготовлено таким образом, что подходящая дозировка будет получена при любой заданной стандартной дозе соединения. Такие факторы, как растворимость, биологическая доступность, биологический период полувыведения, путь введения, срок хранения

продукта, а также другие фармакологические особенности, будут учитываться специалистом в области приготовления таких фармацевтических составов, и в связи с этим может быть желателен ряд дозировок и схем лечения.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления композиции (*например*, рекомбинантные нуклеиновые кислоты, гAAV, фармацевтические композиции *и т.д.*) в подходящим образом составленных фармацевтических композициях, раскрытых в данном документе, доставляют напрямую в целевую ткань, *например*, напрямую в ткань ЦНС (*например*, головной мозг, спинной мозг *и т.д.*). Тем не менее, в определенных обстоятельствах желательной может быть отдельная доставка или дополнительная доставка композиций посредством другого пути, *например*, подкожно, внутрь поджелудочной железы, интраназально, парентерально, внутривенно, внутримышечно, интратекально или перорально, внутрибрюшинно или посредством ингаляции. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления способы введения, которые описаны в патентах США №№ 5543158; 5641515 и 5399363 (каждый из которых специально включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте), можно применять для доставки гAAV. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления предпочтительным способом введения является внутривенная инъекция.

Фармацевтические формы, подходящие для применения в виде инъекционного раствора, включают в себя стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для приготовления стерильных инъекционных растворов или дисперсий непосредственно перед введением. Дисперсии также могут быть приготовлены в глицерине, жидких полиэтиленгликолях и их смесях, а также в маслах. При обычных условиях хранения и применения эти препараты содержат консервант для предотвращения роста микроорганизмов. Во многих случаях форма является стерильной и текучей настолько, насколько это обеспечивает возможность легкого введения с помощью шприца. Она должна быть стабильной при условиях производства и хранения и должна быть защищена от контаминирующего воздействия микроорганизмов, таких как бактерии и грибки. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, полиол (*например*, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т.п.), их подходящие смеси и/или растительные масла. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, за счет применения покрытия, такого как лецитин, за счет поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и за счет применения поверхностно-активных веществ. Предотвращение действия микроорганизмов можно обеспечивать за счет различных антибактериальных и противогрибковых средств, например, парабенов, хлорбутанола, фенола, сорбиновой

кислоты, тимеросала и т.п. Во многих случаях предпочтительным будет включение изотоничных средств, например, сахаров или хлорида натрия. Пролонгированная абсорбция инъекционных композиций может быть обусловлена применением в композициях средств, которые задерживают абсорбцию, например, моностеарата алюминия и желатина.

Например, в случае введения инъекционного водного раствора раствор может быть подходящим образом стабилизирован буфером, если необходимо, и жидкий разбавитель вначале делают изотоничным с использованием достаточного количества солевого раствора или глюкозы. Эти конкретные водные растворы являются особенно подходящими для внутривенного, внутримышечного, подкожного и внутрибрюшинного введения. В этом контексте можно использовать подходящую стерильную водную среду. Например, одну дозу можно растворить в 1 мл изотоничного раствора NaCl и либо добавить к 1000 мл жидкости для подкожной инфузии, либо вводить в предполагаемое место инфузии (см., например, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15th Edition, страницы 1035-1038 и 1570-1580). Некоторое изменение дозировки обязательно будет возникать в зависимости от состояния хозяина. В этом случае лицо, ответственное за введение, будет определять подходящую дозу для отдельного хозяина.

Стерильные инъекционные растворы готовят посредством включения композиций (*например*, рекомбинантных нуклеиновых кислот, гAAV, фармацевтических композиций *и т.д.*) в требуемом количестве в соответствующий растворитель с различными другими ингредиентами, перечисленными в данном документе, если это необходимо, с последующей стерилизацией фильтрованием. Обычно дисперсии готовят посредством включения различных стерилизованных активных ингредиентов в стерильную среду, которая содержит основную дисперсионную среду и необходимые другие ингредиенты из числа перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных инъекционных растворов предпочтительными способами получения являются методики вакуумной сушки и сублимационной сушки, которые дают на выходе порошок активного ингредиента, а также любого дополнительного желаемого ингредиента из их раствора, ранее подвергнутого стерилизации фильтрованием.

Композиции (*например*, рекомбинантные нуклеиновые кислоты, гAAV, фармацевтические композиции *и т.д.*), раскрытые в данном документе, также могут быть составлены в нейтральной или солевой форме. Фармацевтически приемлемые соли включают в себя соли присоединения кислоты (образованные со свободными аминогруппами в белке), которые образуются с неорганическими кислотами, такими как, например, соляная или фосфорная кислоты, или с такими органическими кислотами, как

уксусная, щавелевая, винная, миндальная и т.п. Соли, образованные со свободными карбоксильными группами, также могут быть получены с неорганическими основаниями, такими как, например, гидроксиды натрия, калия, аммония, кальция или трехвалентного железа, и такими органическими основаниями, как изопропиламин, триметиламин, гистидин, прокаин и т.п. После составления растворы будут вводить способом, совместимым с дозируемым составом, и в таком количестве, которое является терапевтически эффективным. Составы можно легко вводить в ряде лекарственных форм, таких как инъекционные растворы, капсулы для высвобождения лекарственного средства и т.п.

В контексте данного документа термин «носитель» включает в себя любые и все растворители, дисперсионные среды, среды, покрытия, разбавители, антибактериальные и противогрибковые средства, изотоничные средства и средства, задерживающие абсорбцию, буферы, растворы-носители, суспензии, коллоиды и т.п. Применение таких сред и средств для фармацевтически активных субстратов хорошо известно в уровне техники. В композиции также могут быть включены дополнительные активные ингредиенты. Фраза «фармацевтически приемлемый» относится к молекулам и композициям, которые не вызывают аллергическую или подобную нежелательную реакцию при введении хозяину.

Среды для доставки, такие как липосомы, нанокapsулы, микрочастицы, микросферы, липидные частицы, пузырьки и т.п., можно применять для введения композиций согласно настоящему изобретению в подходящие клетки-хозяева. В частности, доставляемые вектором на основе гAAV трансгены могут быть составлены для доставки инкапсулированными в любом из липидной частицы, липосомы, пузырька, наносферы или наночастицы или в подобном.

Такие составы могут быть предпочтительными для введения фармацевтически приемлемых составов нуклеиновых кислот или конструкций на основе гAAV, раскрытых в данном документе. Образование и применение липосом, в целом, является известным специалистам в данной области техники. Недавно были разработаны липосомы с улучшенной стабильностью в сыворотке крови и периодами полужизни в сыворотке крови (патент США № 5741516). Кроме того, были описаны различные способы получения липосом и липосомоподобных препаратов в качестве потенциальных носителей лекарственных средств (патенты США №№ 5567434; 5552157; 5565213; 5738868 и 5795587).

Липосомы успешно применялись с рядом типов клеток, которые в норме являются устойчивыми к трансфекции с помощью других процедур. Кроме того, липосомы свободны от ограничений по длине ДНК, которые являются типичными для систем доставки на

основе вирусов. Липосомы эффективно применялись для введения генов, лекарственных средств, радиотерапевтических средств, вирусов, транскрипционных факторов и аллостерических эффекторов в ряд культивируемых клеточных линий и животных. Кроме того, завершились несколько успешных клинических испытаний, оценивающих эффективность опосредуемой липосомами доставки лекарственного средства.

Липосомы образуются из фосфолипидов, которые диспергированы в водной среде и спонтанно образуют многослойные концентрические пузырьки из бислоев (также называемые многослойными пузырьками (MLV)). MLV обычно имеют диаметры от 25 нм до 4 мкм. Ультразвуковая обработка MLV приводит в результате к образованию небольших однослойных пузырьков (SUV) с диаметрами в диапазоне от 200 до 500 Ангстрем, содержащих водный раствор во внутренней части.

В качестве альтернативы можно применять составы нанокapsул с гAAV. Нанокapsулы обычно могут стабильно и воспроизводимо захватывать вещества. Во избежание побочных эффектов вследствие внутриклеточной перегрузки полимерами, такие ультратонкодисперсные частицы (с размером около 0,1 мкм) следует конструировать с применением полимеров, которые способны разлагаться *in vivo*. Для применения предусматриваются биоразлагаемые полиалкил-цианоакрилатные наночастицы, которые соответствуют этим требованиям.

Способы лечения синдрома Ретта

В соответствии с некоторыми аспектами настоящее раскрытие относится к композициям и способам для лечения синдрома Ретта. Синдром Ретта представляет собой генетическое неврологическое нарушение, вызванное одной или несколькими мутациями с потерей функции в гене *MeCP2*, например, как описано в Suter et al. J Autism Dev Disord. 2014 Mar; 44(3): 703-711. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления субъект, имеющий синдром Ретта, имеет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или больше мутаций с потерей функции в гене *MeCP2*.

В контексте данного документа термины «лечение», «осуществление лечения» и «терапия» относятся к терапевтическому лечению, а также к профилактическим или превентивным манипуляциям. Термины дополнительно включают в себя ослабление существующих симптомов, предупреждение дополнительных симптомов, ослабление или предупреждение первопричин симптомов, предупреждение или обращение развития причин симптомов, например, симптомов, ассоциированных с заболеванием, вызванным мутацией с потерей функции, например, синдрома Ретта. Таким образом, термины обозначают, что благоприятный результат был достигнут у субъекта с нарушением

(например, синдромом Ретта) или у субъекта с потенциалом к развитию такого нарушения. Более того, термин «лечение» определен как применение или введение средства (например, терапевтического средства или терапевтической композиции) субъекту или в выделенную ткань или клеточную линию от субъекта, который может иметь заболевание, симптом заболевания или предрасположенность к заболеванию, с целью излечения, заживления, облегчения, смягчения, изменения, устранения, ослабления, улучшения или воздействия на заболевание, симптомы заболевания или предрасположенность к заболеванию.

Терапевтические средства или терапевтические композиции могут включать в себя соединение в фармацевтически приемлемой форме, которая предупреждает и/или уменьшает симптомы конкретного заболевания (например, синдрома Ретта). Например, терапевтическая композиция может представлять собой фармацевтическую композицию, которая предупреждает и/или уменьшает симптомы синдрома Ретта. Предполагается, что терапевтическая композиция согласно настоящему изобретению будет обеспечена в любой подходящей форме. Форма терапевтической композиции будет зависеть от ряда факторов, в том числе от способа введения, как описано в данном документе. Терапевтическая композиция может содержать разбавители, вспомогательные вещества и вспомогательные средства в числе прочих ингредиентов, которые описаны в данном документе.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Анализ экспрессии гена изоформы e1 человеческого MeCP2 *in vitro*

Примерно 80% случаев синдрома Ретта вызваны мутациями в сцепленном с X-хромосомой гене, кодирующем метил-CpG-связывающий белок 2 (MeCP2), экспрессирующийся в широком спектре тканей эпигенетический регулятор, который экспрессируется на высоких уровнях в зрелых нейронах. Большинство пациентов с синдромом Ретта несут нормальный и мутантный аллель MeCP2. Заболевание является результатом случайной инактивации X-хромосомы, при которой ~50% нейронов имеют недостаточность MeCP2 вследствие инактивации нормального аллеля, в то время как в других ~50% нейронов мутантный аллель подвергается сайленсингу, и сохраняется нормальная экспрессия MeCP2 дикого типа. Неоднородность недостаточности MeCP2 в ЦНС имеет важные последствия для разработки подходов к генной терапии для синдрома Ретта. В моделях синдрома Ретта на мышах наблюдали возможность обращения развития неврологических фенотипов после восстановления нормальной экспрессии MeCP2 у взрослых. В этих экспериментах на трансгенных животных восстановленную экспрессию MeCP2 запускали с его нативного геномного локуса, и активация достигалась в

большинстве клеток в головном мозге. Тем не менее, перенос гена в соматические клетки еще не повторил ни одного из этих успехов.

Обычно MeCP2 характеризуется очень узким окном безопасных уровней экспрессии, поскольку у пациентов с дупликацией локуса MeCP2, как правило, присутствует задержка развития двигательных и когнитивных функций, а также тяжелое умственное расстройство. Эксперименты в моделях на трансгенных мышах подтверждают это утверждение, поскольку эктопическая экспрессия MeCP2 является токсичной у животных дикого типа, но безопасной и отчасти эффективной в ослаблении фенотипов заболевания у мышей с недостаточностью MeCP2, когда экспрессия трансгена начинается в ходе эмбрионального развития. Примечательно, что ген MeCP2 подвергается альтернативному сплайсингу с образованием двух белков с отличающимися N-концами, обозначенными как MeCP2-e1 и MeCP2-e2. У пациентов с дупликацией локуса MeCP2 сверхэкспрессируются обе изоформы MeCP2. Таким образом, симптомы у пациентов с дупликацией локуса MeCP2 и результаты на трансгенных мышах могут объясняться сверхэкспрессией изоформы MeCP2-e2 и временным паттерном экспрессии трансгена в ходе развития.

Предшествующие терапевтические эксперименты с AAV9-MeCP2-e1 сосредоточивались на внутрисосудистой (IV) или интрацеребровентрикулярной (ICV) доставке в неонатальный период, и в некоторых случаях они столкнулись с летальной печеночной токсичностью и поджатию задней конечности. Более того, возраст мышей, получавших обработку в таких экспериментах, не обязательно соответствует тому, в котором, вероятно, должно осуществляться лечение в случае большинства пациентов с синдромом Ретта, которые предположительно будут получать лечение после появления симптомов (6-18 месяцев). У людей начальная фаза синаптогенеза происходит в первые 2 года и совпадает с быстрым повышением не-CG-метилирования ДНК в нейронах, а также появлением симптомов у пациентов с синдромом Ретта. У мышей синаптогенез происходит в возрасте от 2 до 4 недель. Таким образом, критически важной является оценка эффективности и возможной токсичности доставки гена AAV-MeCP2 на соответствующих стадиях развития после 0-1 суток после рождения. Кроме того, важным ограничением для использования системной доставки гена AAV для лечения нарушений ЦНС является трансдукция органов, отличных от головного мозга, таких как печень, которая является органом с наиболее высоким тропизмом для AAV в организме.

Был сконструирован ряд новых векторов AAV-MeCP2, которые исключают экспрессию гена в периферических органах, а также обеспечивают саморегуляцию экспрессии MeCP2. Обычно мРНК MeCP2 несет либо короткий (1,8 кбаз), либо длинный

(~10 кбаз) 3'UTR, при этом последний является преимущественной изоформой, экспрессирующейся в головном мозге. Конструкции мРНК MeCP2, описанные в этом примере, содержат кодирующую последовательность белка изоформы MeCP2-e1 и несколько регуляторных элементов для miRNA (MRE). Наблюдали, что трансляция MeCP2 в ЦНС регулируется miR-132 посредством гомеостатического механизма, включающего изменения уровней нейротрофического фактора головного мозга (BDNF) в ответ на экспрессию MeCP2 (фиг. 1A). Исходя из этого механизма, в ряде векторов AAV-MeCP2 увеличенные количества MRE для miR-132 (*например*, сайтов связывания miR-132) сочетаются с фиксированным количеством MRE для miR-1 и miR-122 (*например*, сайтов связывания 3x-miR-1 и 3x-miR-122) для нарушения нацеливания экспрессии генов AAV на скелетные мышцы и печень (фиг. 1B).

Осуществляли серию экспериментов *in vitro*. Кратко, клетки HEK293T трансфицировали AAV2-MeCP2 в дозе 30000 гс/клетка в течение четырех суток. На фиг. 2A-2B представлена эффективная экспрессия AAV2-MeCP2 в клетках HEK293T, измеренная методом Вестерн-блоттинга (фиг. 2A) и с помощью нормализованного анализа экспрессии белка (фиг. 2B). На фиг. 2C представлен профиль токсичности у клеток 293T, трансдуцированных AAV2-MeCP2, в течение четырех суток при дозе 30000 гс(копий генома)/клетка.

Исследование зависимости доза-ответ в первичных нейронах коры головного мозга демонстрировало сравнимые эффекты в отношении выживаемости клеток в случае векторов AAV-GFP и AAV-MeCP2 (фиг. 3A), указывающие на то, что экспрессия меченого тус человеческого MeCP2 с короткого мышинового промотора MeCP2 (от -223 до +56) является нетоксичной для первичных нейронов в культуре. Кроме того, наблюдали, что уровни белка MeCP2-тус были обратно пропорциональными числу MRE для miR-132 (*например*, сайтов связывания miR-132), присутствующих в транскрипте MeCP2-тус (фиг. 3B). На фиг. 3C представлена экспрессия miR-132 в ответ на AAV2-MeCP2 через пять суток после инфицирования AAV.

Пример 2. Анализ экспрессии гена изоформы e1 человеческого MeCP2 у мышей дикого типа после системной доставки AAV-MeCP2

Чтобы расширить наблюдения *in vitro*, демонстрирующие возможность регулирования уровней MeCP2 посредством вставки последовательностей-мишеней miR-132, описанных в примере 1, мышам дикого типа в 1 сутки после рождения вводили инъекцией через лицевую вену (*например*, внутрочерепная инъекция) AAV, кодирующий изоформу e1 человеческого MeCP2 и содержащий 0, 1, 2 или 3 последовательности-мишени

miR-132. Анализ экспрессии гена в ткани головного мозга показал, что уровни MeCP2 являются обратно пропорциональными числу последовательностей-мишеней miR132 (фиг. 4А-4С).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления системное введение некоторых серотипов AAV может трансдуцировать ткани за пределами центральной нервной системы, и наблюдали, что повышенная экспрессия MeCP2 в тканях печени, сердца и скелета является ассоциированной с вредными физиологическими последствиями. Для сведения к минимуму трансдукции MeCP2 сердца и печени векторы AAV-MeCP2, описанные в настоящем раскрытии, содержат по меньшей мере одну последовательность-мишень miR-1 (*например*, 3х-miR-1) и по меньшей мере одну последовательность-мишень miR-122 (*например*, 3х-miR-122) (*например*, сайты связывания) для нарушения нацеливания экспрессии MeCP2 на сердце и печень, соответственно. Осуществляли анализ методом qRT-PCR с применением праймеров для изоформы e2 человеческого MeCP2 (которая не выявлялась) и для изоформ e1 и e2 мышинового MeCP2 (уровень экспрессии которых не изменялся). Анализ экспрессии гена в ткани сердца и печени от животных дикого типа указывал на то, что нацеливание экспрессии MeCP2 на сердце и печень эффективно нарушалось, о чем свидетельствует существенно сниженный уровень экспрессии по сравнению с головным мозгом (фиг. 4А и фиг. 5).

Пример 3. Терапевтическая эффективность и безопасность саморегулирующихся векторов AAV-MeCP2

Терапевтическую эффективность и безопасность векторов AAV-MeCP2-e1 оценивают у мышей. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления применяют белок капсида AAV-PHP.B, поскольку этот капсид характеризуется улучшенной эффективностью трансдукции нейронов. Нулевые по MeCP2 мыши (MeCP2^{tm1.1Bird/J}; самцы^{+/y} и самки^{+/-}) в возрасте 4 недели получают обработку посредством системного введения векторов AAV-PHP.B-MeCP2-e1, несущих различные кассеты с MRE (*например*, в дозах вектора, составляющих 1E11, 3E11, 1E12 vg/мышь), и массы тела и фенотипические оценки отслеживают каждые две недели. В качестве контролей используют MeCP2/MeCP2^{tm1.1Bird} мышей, которым вводят инъекцией среду, и мышей дикого типа. Подгруппу мышей в каждой когорте (n=8; 4 самца и 4 самки) умерщвляют через 8 недель после инъекции и экспрессию MeCP2 количественно определяют методом Вестерн-блоттинга и сравнивают в группах. Эффективность трансдукции в головном мозге оценивают посредством двойного иммунофлуоресцентного окрашивания в отношении MeCP2 и нейронов (с применением нейронного маркера NeuN) и осуществляют количественное определение

трансдуцированных нейронов (MeCP2⁺, NeuN⁺) в коре головного мозга, полосатом теле, таламусе, гиппокампе и мозжечке. Уровни PSD-95 оценивают с помощью анализа методом Вестерн-блоттинга и иммуноокрашивания срезов головного мозга; PSD-95 представляет собой ключевой каркасный белок в созревании синапсов, уровни которого являются пониженными в головном мозге от нулевых по MeCP2 мышей.

Для осуществления анализа биологического распределения вектора геномную ДНК выделяют из различных областей ЦНС и периферических органов и анализируют с помощью цифровой ПЦР. Другую подгруппу животных в каждой когorte (n=16; 8 самцов и 8 самок) используют для анализа выживаемости и продольного анализа поведенческих характеристик (*например*, тест «открытое поле»; социальное взаимодействие) и двигательной активности (*например*, тест способности удерживаться на вращающемся барабане, тест ходьбы по решетке), а также для плетизмографии всего тела для оценки характера дыхания и характеристик апноэ у нулевых по MeCP2 мышей. Исследования конечных показателей являются такими же, как и через 8 недель после обработки. Безопасность векторов также оценивают на мышах дикого типа в исследовании с увеличением дозы при использовании доз, идентичных указанным выше, с получением конечных результатов через 7, 30, 90 и 180 суток для оценки ЦНС и периферических тканей в отношении признаков токсичности. Также оценивают биологическое распределение вектора на основе AAV и экспрессию MeCP2.

Пример 4. Характеристика изменений в геноме/транскриптоме трансдуцированных нейронов после переноса AAV-MeCP2 гена на различных стадиях развития нервной системы

Ключевой аспект в разработке подхода для безопасной и эффективной генной терапии синдрома Ретта заключается в подробной характеристике воздействия *de novo* экспрессии MeCP2 на эпигенетический ландшафт и транскриптомный профиль трансдуцированных нейронов. Для этой цели получают векторы AAV-PHP.B-MeCP2-e1, которые несут кассету IRES-GFP и обеспечивают возможность выделения трансдуцированных GFP⁺ клеток из головного мозга, мозжечка и спинного мозга либо с помощью метода FACS, либо с помощью лазерной захватывающей микродиссекции с последующим бисульфитным секвенированием всего генома (Methyl-Seq), секвенированием малых РНК (микроРНК) и секвенированием РНК (мРНК и некодирующих РНК). Самцы MeCP2^{-y}, самки MeCP2^{-/+} и контроли дикого типа (самцы и самки) получают системную инъекцию AAV-PHP.B-MeCP2-e1-IRES-GFP, контрольного вектора (без кДНК MeCP2) и среды в День 1, 7, 14 и 28, а также в возрасте 12 недель в оптимальной дозе.

Мышей (n=8; 4 самца и 4 самки) умерщвляют через 1 или 3 месяца после инъекции для оценки параметров, указанных выше. Информацию о микроРНК, которые сверхэкспрессируются в ответ на экспрессию MeCP2, используют для установления дополнительных уровней регуляции экспрессии генов помимо тех, которые в основе которых лежит miR-132.

Пример 5. Вклад изоформ MeCP2 в успех терапии или появление неврологических симптомов в зависимости от вмешательства на разных стадиях развития

Наблюдали, что экспрессия MeCP2, которая 1,6-6-кратно превышает физиологически нормальные уровни, вызывает неврологические симптомы как у пациентов с дупликацией локуса MeCP2 (~2-кратно выше нормального уровня), так и в моделях на трансгенных мышах. Другим сходством между пациентами и моделями на трансгенных мышах является то, что и у тех, и у других сверхэкспрессируется изоформа MeCP2-e2, которая, в отличие от изоформы e1, оказывается токсичной для первичных нейронов в культуре. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления этот токсический эффект устраняется при коэкспрессии FoxG1, который представляет собой другой ген, мутации в котором ассоциированы с синдромом Ретта. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления коэкспрессия FoxG1 с MeCP2 представляет собой дополнительный механизм для контроля побочных эффектов, ассоциированных со сверхэкспрессией MeCP2. Эксперименты по изучению терапевтических свойств, безопасности и эпигеномных/транскриптовых характеристик с использованием векторов на основе AAV-PHP.B, кодирующих MeCP-e1, MeCP2-e2, MeCP2-e2 и FoxG1 или FoxG1 отдельно, проводят на самцах MeCP2^{-/-}, самках MeCP2^{+/-} и контролях дикого типа, соответствующих по возрасту.

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

>SEQ ID NO: 1; аминокислотная последовательность изоформы e1 человеческого MeCP2 (NM_001110792)

MAAAAAAAPSGGGGGGEEERLEEKSEDQDLQGLKDKPLKFKKVKKDKKEEKEGKHEP
VQPSAHHSAEPAEAGKAETSESGSAPAVPEASASPKQRRSIIRDRGPMYDDPTLPEGWT
RKLKQRKSGRSAGKYDVYLINPQGKAFRSKVELIAYFEKVGDTSLDPNDFDFTVTGRGS
PSRREQKPPKKPKSPKAPGTGRGRGRPKGSGTTRPKAATSEGVQVKRVLEKSPGKLLVK
MPFQTSPGGKAEGGGATTSTQVMVIKRPGRKRKAEADPQAIPKKRGRKPGSVVAAAAA
EAKKKAVKESSIRSVQETVLPIKKRKTRETVSIEVKEVVKPLLVSTLGEKSGKGLKTCKS
PGRKSKESSPKGRSSSASSPPKKEHHHHHHHSESPKAPVPLLPLPPPPPEPESEDPTSPP
EPQDLSSSVCKEEKMPRGGSLSDGCPKEPAKTQPAVATAATAAEKYKHRGEGGERKDI
VSSSMRPNREEPVDSRTPVTERVS

> SEQ ID NO: 2; аминокислотная последовательность изоформы e2 человеческого MeCP2 (NM_004992)

MVAGMLGLREEKSEDQDLQGLKDKPLKFKKVKKDKKEEKEGKHEPVQPSAHHSAEPA
EAGKAETSESGSAPAVPEASASPKQRRSIIRDRGPMYDDPTLPEGWTRKLKQRKSGRS
AGKYDVYLINPQGKAFRSKVELIAYFEKVGDTSLDPNDFDFTVTGRGSPSRREQKPPKK
PKSPKAPGTGRGRGRPKGSGTTRPKAATSEGVQVKRVLEKSPGKLLVKMPFQTSPGGK
AEGGGATTSTQVMVIKRPGRKRKAEADPQAIPKKRGRKPGSVVAAAAAEAKKKAVKE
SSIRSVQETVLPIKKRKTRETVSIEVKEVVKPLLVSTLGEKSGKGLKTCKSPGRKSKESSP
KGRSSSASSPPKKEHHHHHHHSESPKAPVPLLPLPPPPPEPESEDPTSPPEPQDLSSSVCK
EEKMPRGGSLSDGCPKEPAKTQPAVATAATAAEKYKHRGEGGERKDIVSSSMRPNRE
EPPVDSRTPVTERVS

>SEQ ID NO: 3; последовательность ДНК промотора мышиногo MeCP2

AATTGAGGGCGTCACCGCTAAGGCTCCGCCCCAGCCTGGGCTCCACAACCAATGAA
GGGTAATCTCGACAAAGAGCAAGGGGTGGGGCGCGGGCGCGCAGGTGCAGCAGCA
CACAGGCTGGTCGGGAGGGCGGGGCGCGACGTCTGCCGTGCGGGGTCCCGGCATCG
GTT

>SEQ ID NO: 4; последовательность ДНК сайта связывания miR-122

ACAAACACCATTGTCACACTCCA

>SEQ ID NO: 5; последовательность ДНК сайта связывания miR-1

ATACATACTTCTTTACATTCCA

>SEQ ID NO: 6; последовательность ДНК сайта связывания miR-132

CGACCATGGCTGTAGACTGTТА

>SEQ ID NO: 7; последовательность нуклеиновой кислоты конструкции с MeCP2 для экспрессии *in vitro* (плазмида scAAV-Mec229-hMeCP2-miR132(1x)miR122-1(3x))

CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGGCGAC
CTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGTAGCCAT
GCTCTAGGAAGATCAATTTCGGTACAATTCACGCGTCGACAATTGAGGGGCGTCACCG
CTAAGGCTCCGCCCCAGCCTGGGCTCCACAACCAATGAAGGGTAATCTCGACAAAG
AGCAAGGGGTGGGGCGCGGGCGCGCAGGTGCAGCAGCACACAGGCTGGTCGGGAG
GGCGGGGCGCGACGTCTGCCGTGCGGGGTCCCGGCATCGGTTGCGCGCGCGCTCCC
TCCTCTCGGAGAGAGGGCTGTGGTAAAACCCGTCCGAAAATGGCTGCAGCCGCTG
CCGCAGCGCCGAGCGGCGGAGGTGGCGGTGGCGAGGAGGAGAGACTGGAAGAAAA
GTCAGAAGACCAGGACCTCCAGGGCCTCAAGGACAAACCCCTCAAGTTTAAAAAGG
TGAAGAAAGATAAGAAAGAAGAGAAAGAGGGCAAGCATGAGCCCGTGCAGCCATC
AGCCCACCACTCTGCTGAGCCCGCAGAGGCAGGCAAAGCAGAGACATCAGAAGGGT
CAGGCTCCGCCCCGGCTGTGCCGGAAGCTTCTGCCTCCCCCAAACAGCGGCGCTCCA
TCATCCGTGACCGGGGACCCATGTATGATGACCCACCCCTGCCTGAAGGCTGGACAC
GGAAGCTTAAGCAAAGGAAATCTGGACGCTCTGCTGGGAAGTATGATGTGTATTG
ATCAATCCCCAGGGAAAAGCCTTTCGCTCTAAAGTGGAGTTGATTGCGTACTTCGAA
AAGGTAGGCGACACATCCCTGGACCCTAATGATTTTGA CTTCACGGTAACTGGGAG
AGGGAGCCCCTCCCGGCGAGAGCAGAAACCACCTAAGAAGCCCAAATCTCCCAAAG
CTCCAGGA ACTGGCAGAGGTGCGGGGACGCCCCAAAGGGAGCGGCACCACGAGACC
CAAGGCAGCTACGTCAGAGGGTGTGCAGGTGAAAAGGGTCCTGGAGAAAAGTCCTG
GGAAGCTCCTTGTC AAGATGCCTTTTCAA ACTTCGCCAGGGGGCAAGGCTGAGGGG
GGTGGGGGCCACCACATCCACCCAGGTCATGGTGATCAAACGCCCCGGCAGGAAGCG
AAAAGCTGAGGCAGACCCTCAGGCCATTCCCAAGAAACGGGGTCGAAAGCCGGGG
AGTGTGGTGGCAGCCGCTGCCGCCGAGGCCAAAAAGAAAGCCGTGAAGGAGTCTTC
TATCCGATCTGTGCAGGAGACCGTACTCCCCATCAAGAAGCGCAAGACCCGGGAGA
CGGTCAGCATCGAGGTCAAGGAAGTGGTGAAGCCCCTGCTGGTGTCCACCCTCGGT
GAGAAGAGCGGGAAAGGACTGAAGACCTGTAAGAGCCCTGGGCGGAAAAGCAAGG
AGAGCAGCCCCAAGGGGCGCAGCAGCAGCGCCTCCTCACCCCCCAAGAAGGAGCAC

CACCACCATCACCACCACTCAGAGTCCCCAAAGGCCCCCGTGCCACTGCTCCCACCC
CTGCCCCCACCTCCACCTGAGCCCGAGAGCTCCGAGGACCCACCAGCCCCCTGAG
CCCCAGGACTTGAGCAGCAGCGTCTGCAAAGAGGAGAAGATGCCCAGAGGAGGCTC
ACTGGAGAGCGACGGCTGCCCCAAGGAGCCAGCTAAGACTCAGCCCGCGGTTGCCA
CCGCCGCCACGGCCGCAGAAAAGTACAAACACCGAGGGGAGGGAGAGCGCAAAGA
CATTGTTTCATCCTCCATGCCAAGGCCAAACAGAGAGGAGCCTGTGGACAGCCGGA
CGCCCGTGACCGAGAGAGTTAGCGAGCAGAAGCTGATCTCAGAGGAGGACCTGTGA
CGACCATGGCTGTAGACTGTTACTCGAGATACATACTTCTTTACATTCCAATACATA
CTTCTTTACATTCCAATACATACTTCTTTACATTCCACCATGGACTAGTACAAACACC
ATTGTCACACTCCAACAAACACCATTGTCACACTCCAACAAACACCATTGTCACACT
CCAGCGGCCGCTTCGATCCGATCTTTTTCCCTCTGCCAAAATTATGGGGACATCAT
GAAGCCCCTTGAGCATCTGACTTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAAT
AGTGTGTTGGAATTTTTTGTGTCTCTCACTCGGCCTAGGTAGATAAGTAGCATGGCG
GGTTAATCATTAACACTACAAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGC
GCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTT
GCCCCGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCCTTAATTAACCTAATTCACT
GGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACTTAATCG
CCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGA
TCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCG
GCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCC
AGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTGCGCG
GCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTT
ACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCAT
CGCCCTGATAGACGGTTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGG
ACTCTTGTTCCAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTA
TAAGGGATTTTGCCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAA
TTTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGCTTACAATTTAGGTGGCACTTTTCGGG
GAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCC
GCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTA
TGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTGTGCCTTCCT
GTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGG
TGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTT
TCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGC
GGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTC
TCAGAATGACTTGGTTGAGTACTACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCAT

GACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAACACTGCGGCCA
ACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACA
TGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATA
CCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAA
ACTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGAT
GGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTT
TATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACT
GGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGG
CAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAG
CATTGGTAACCTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACTTC
ATTTTAAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTTGATAATCTCATGACCAAAA
TCCCTTAACGTGAGTTTTCTGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAG
GATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACC
ACCGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAA
GGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTA
GTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAAT
CCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTC
AAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGGGTTCTGTGA
CACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAG
CTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAG
CGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGG
TATCTTTATAGTCCTGTGCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGAT
GCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGG
TTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTC
TGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAAC
GACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAA
CCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCC
GACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATT
GGCACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAG
CGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAGATTTAATTA
AGGCCTTAATTAGG

>SEQ ID NO: 8; последовательность нуклеиновой кислоты конструкции с MeCP2 для экспрессии *in vitro* (плазмиды scAAV-Mec229-hMeCP2-miR132(2x)miR122-1(3x))

CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGGCGAC
CTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGTAAGCCAT
GCTCTAGGAAGATCAATTCGGTACAATTCACGCGTCGACAATTGAGGGCGTCACCG
CTAAGGCTCCGCCCCAGCCTGGGCTCCACAACCAATGAAGGGTAATCTCGACAAAG
AGCAAGGGGTGGGGCGCGGGCGCGCAGGTGCAGCAGCACACAGGCTGGTTCGGGAG
GGCGGGGCGCGACGTCTGCCGTGCGGGGTCCCGGCATCGGTTGCGCGCGCGCTCCC
TCCTCTCGGAGAGAGGGCTGTGGTAAAACCCGTCCGGAATGGCTGCAGCCGCTG
CCGCAGCGCCGAGCGGGCGGAGGTGGCGGTGGCGAGGAGGAGAGACTGGAAGAAAA
GTCAGAAGACCAGGACCTCCAGGGCCTCAAGGACAAACCCCTCAAGTTTAAAAAGG
TGAAGAAAGATAAGAAAGAAGAGAAAGAGGGCAAGCATGAGCCCGTGCAGCCATC
AGCCCACCACTCTGCTGAGCCCGCAGAGGCAGGCAAAGCAGAGACATCAGAAGGGT
CAGGCTCCGCCCCGGCTGTGCCGGAAGCTTCTGCCTCCCCCAAACAGCGGGCGCTCCA
TCATCCGTGACCGGGGACCCATGTATGATGACCCACCCCTGCCTGAAGGCTGGACAC
GGAAGCTTAAGCAAAGGAAATCTGGACGCTCTGCTGGGAAGTATGATGTGTATTTG
ATCAATCCCCAGGGAAAAGCCTTTTCGCTCTAAAGTGGAGTTGATTGCGTACTTCGAA
AAGGTAGGCGACACATCCCTGGACCCTAATGATTTTGACTTCACGGTAACTGGGAG
AGGGAGCCCCCTCCCGGCGAGAGCAGAAACCACCTAAGAAGCCCAAATCTCCCAAAG
CTCCAGGAAGTGGCAGAGGTCGGGGACGCCCCAAAGGGAGCGGCACCACGAGACC
CAAGGCAGCTACGTCAGAGGGTGTGCAGGTGAAAAGGGTCCTGGAGAAAAGTCCTG
GGAAGCTCCTTGTCAAGATGCCTTTTCAAACCTTCGCCAGGGGGGCAAGGCTGAGGGG
GGTGGGGCCACCACATCCACCCAGGTCATGGTGATCAAACGCCCCGGCAGGAAGCG
AAAAGCTGAGGCAGACCCTCAGGCCATTCCCAAGAAACGGGGTCGAAAGCCGGGG
AGTGTGGTGGCAGCCGCTGCCGCCGAGGCCAAAAAGAAAGCCGTGAAGGAGTCTTC
TATCCGATCTGTGCAGGAGACCGTACTCCCCATCAAGAAGCGCAAGACCCGGGAGA
CGGTCAGCATCGAGGTCAAGGAAGTGGTGAAGCCCCTGCTGGTGTCCACCCTCGGT
GAGAAGAGCGGGAAAGGACTGAAGACCTGTAAGAGCCCTGGGGCGGAAAAGCAAGG
AGAGCAGCCCCAAGGGGCGCAGCAGCAGCGCCTCCTACCCCCCAAGAAGGAGCAC
CACCACCATCACCACCACTCAGAGTCCCCAAAGGCCCCCGTGCCACTGCTCCCACCC
CTGCCCCCACCTCCACCTGAGCCCGAGAGCTCCGAGGACCCACAGCCCCCCTGAG
CCCCAGGACTTGAGCAGCAGCGTCTGCAAAGAGGAGAAGATGCCCAGAGGAGGCTC
ACTGGAGAGCGACGGCTGCCCCAAGGAGCCAGCTAAGACTCAGCCCGCGGTTGCCA
CCGCCGCCACGGCCGCAGAAAAGTACAAACACCGAGGGGAGGGAGAGCGCAAAGA
CATTGTTTCATCCTCCATGCCAAGGCCAAACAGAGAGGAGCCTGTGGACAGCCGGA

CGCCCGTGACCGAGAGAGTTAGCGAGCAGAAGCTGATCTCAGAGGAGGACCTGTGA
CGACCATGGCTGTAGACTGTTACGACCATGGCTGTAGACTGTTACTCGAGATACATA
CTTCTTTACATTCCAATACATACTTCTTTACATTCCAATACATACTTCTTTACATTCCA
CCATGGACTAGTACAAACACCATTGTCACACTCCAACAAACACCATTGTCACACTCC
AACAAACACCATTGTCACACTCCAGCGGCCGCTTCGATCCGATCTTTTTTCCCTCTGCC
AAAAATTATGGGGACATCATGAAGCCCCTTGAGCATCTGACTTCTGGCTAATAAAG
GAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTTGGAATTTTTTGTGTCTCTCACTCGGCCTA
GGTAGATAAGTAGCATGGCGGGTTAATCATTAACACTACAAGGAACCCCTAGTGATGG
AGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGG
TCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGC
CTTAATTAACCTAATTCCTACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCT
GGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAAT
AGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGA
ATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCA
GCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTC
CTTTCTCGCCACGTTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTA
GGGTTCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGAT
GGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAG
TCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCT
CGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAA
TGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGCTTACAAT
TTAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAA
TACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAAT
ATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTT
TGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGTCTACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGA
TGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCG
GTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTA
AAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCG
GTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGTTGAGTACTACCAGTCACAGAAA
AGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATG
AGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCT
AACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACC
GGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAA
TGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGC
AACAAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCG

GCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCT
 CGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATC
 TACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGAT
 AGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACT
 TTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTT
 GATAATCTCATGACCAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGAC
 CCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCT
 GCTTGCAAACAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTGCCGGATCAAGAG
 CTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACT
 GTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCT
 ACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCG
 TGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGG
 CTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAAC
 TGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAG
 GCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGC
 TTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTGCGGGTTTCGCCACCTCTGAC
 TTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCC
 AGCAACGCGGCCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCT
 TTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGA
 TACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCG
 GAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGC
 AGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTA
 TGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGT
 ATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCA
 TGATTACGCCAGATTTAATTAAGGCCTTAATTAGG

>SEQ ID NO: 9; последовательность нуклеиновой кислоты конструкции с MeCP2 для
 экспрессии *in vitro* (плазмида scAAV-Mec229-hMeCP2-miR132(3x) miR122-1(3x))

CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGAC
 CTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGTAGCCAT
 GCTCTAGGAAGATCAATTCGGTACAATTCACGCGTCGACAATTGAGGGCGTCACCG
 CTAAGGCTCCGCCCCAGCCTGGGCTCCACAACCAATGAAGGGTAATCTCGACAAAG
 AGCAAGGGGTGGGGCGCGGGCGCGCAGGTGCAGCAGCACACAGGCTGGTTCGGGAG
 GGCGGGGCGCGACGTCTGCCGTGCGGGGTCCCGGCATCGGTTGCGCGCGCGCTCCC
 TCCTCTCGGAGAGAGGGCTGTGGTAAAACCCGTCCGGAAAATGGCTGCAGCCGCTG

CCGCAGCGCCGAGCGGCGGAGGTGGCGGTGGCGAGGAGGAGAGACTGGAAGAAAA
GTCAGAAGACCAGGACCTCCAGGGCCTCAAGGACAAACCCCTCAAGTTTAAAAAGG
TGAAGAAAGATAAGAAAGAAGAGAAAGAGGGCAAGCATGAGCCCGTGCAGCCATC
AGCCCACCACTCTGCTGAGCCCGCAGAGGCAGGCAAAGCAGAGACATCAGAAGGGT
CAGGCTCCGCCCCGGCTGTGCCGGAAGCTTCTGCCTCCCCCAAACAGCGGCGCTCCA
TCATCCGTGACCGGGGACCCATGTATGATGACCCACCCCTGCCTGAAGGCTGGACAC
GGAAGCTTAAGCAAAGGAAATCTGGACGCTCTGCTGGGAAGTATGATGTGTATTTG
ATCAATCCCCAGGGAAAAGCCTTTCGCTCTAAAGTGGAGTTGATTGCGTACTTCGAA
AAGGTAGGCGACACATCCCTGGACCCTAATGATTTTGA CTTCACGGTAACTGGGAG
AGGGAGCCCCTCCCGGCGAGAGCAGAAACCACCTAAGAAGCCCAAATCTCCCAAAG
CTCCAGGA ACTGGCAGAGGTCGGGGACGCCCCAAAGGGAGCGGCACCACGAGACC
CAAGGCAGCTACGTCAGAGGGTGTGCAGGTGAAAAGGGTCCTGGAGAAAAGTCCTG
GGAAGCTCCTTGTCAAGATGCCTTTTCAA ACTTCGCCAGGGGGCAAGGCTGAGGGG
GGTGGGGCCACCACATCCACCCAGGTCATGGTGATCAAACGCCCCGGCAGGAAGCG
AAAAGCTGAGGCAGACCCTCAGGCCATTCCCAAGAAACGGGGTCGAAAGCCGGGG
AGTGTGGTGGCAGCCGCTGCCGCCGAGGCCAAAAAGAAAGCCGTGAAGGAGTCTTC
TATCCGATCTGTGCAGGAGACCGTACTCCCCATCAAGAAGCGCAAGACCCGGGAGA
CGGTCAGCATCGAGGTCAAGGAAGTGGTGAAGCCCCTGCTGGTGTCCACCCTCGGT
GAGAAGAGCGGGAAAGGACTGAAGACCTGTAAGAGCCCTGGGGCGGAAAAGCAAGG
AGAGCAGCCCCAAGGGGCGCAGCAGCAGCGCCTCCTCACCCCCCAAGAAGGAGCAC
CACCACCATCACCACTCAGAGTCCCCAAAGGCCCCCGTGCCACTGCTCCCACCC
CTGCCCCCACCTCCACCTGAGCCCGAGAGCTCCGAGGACCCACAGCCCCCTGAG
CCCCAGGACTTGAGCAGCAGCGTCTGCAAAGAGGAGAAGATGCCCAGAGGAGGCTC
ACTGGAGAGCGACGGCTGCCCCAAGGAGCCAGCTAAGACTCAGCCCGCGGTTGCCA
CCGCCGCCACGGCCGCAGAAAAGTACAAACACCGAGGGGAGGGAGAGCGCAAAGA
CATTGTTTCATCCTCCATGCCAAGGCCAAACAGAGAGGAGCCTGTGGACAGCCGGA
CGCCCGTGACCGAGAGAGTTAGCGAGCAGAAGCTGATCTCAGAGGAGGACCTGTGA
CGACCATGGCTGTAGACTGTTACGACCATGGCTGTAGACTGTTACGACCATGGCTGT
AGACTGTTACTCGAGATACATACTTCTTTACATTCCAATACATACTTCTTTACATTCC
AATACATACTTCTTTACATTCCACCATGGACTAGTACAAACACCATTGTCACTCC
AACAAACACCATTGTCACTCCAACAAACACCATTGTCACTCCAGCGGCCGCTT
CGATCCGATCTTTTTCCCTCTGCCAAAAATTATGGGGACATCATGAAGCCCCTTGAG
CATCTGACTTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTTGGAATT
TTTTGTGTCTCTCACTCGGCCTAGGTAGATAAGTAGCATGGCGGGTTAATCATTAAAC
TACAAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTC

ACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCCGACGCCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTC
AGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCCTTAATTAACCTAATTCCTGGCCGTCGTTTTACA
ACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCACATCC
CCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACA
GTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGG
CGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCCG
CTCCTTTCGCTTTCTTCCCTTCCCTTCTCGCCACGTTGCGCGGCTTTCCCCGTCAAGCT
CTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCC
AAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTT
TTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAACTG
GAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGAT
TTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAA
CAAAATATTAACGCTTACAATTTAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACC
CCTATTTGTTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAAC
CCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCC
GTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTCCTTCTGTTTTTGTCTACCCAGAA
ACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACAT
CGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAACGTTT
TCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGA
CGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGA
GTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTAT
GCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGA
TCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAAC
CGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGA
CACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAAGTGGCGAAC
TACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTG
CAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTG
GAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAG
CCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACG
AAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAG
ACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTTCATTTTAAATTTAAAAG
GATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTT
TTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCC
TTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGT
GGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAG

CAGAGCGCAGATACCAAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTT
 CAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGC
 TGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACC
 GGATAAGGCGCAGCGGTCTGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGG
 AGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCC
 ACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAA
 CAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCT
 GTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGG
 CGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGC
 TGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTA
 TTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGC
 GAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGC
 GCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGG
 GCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTT
 TACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTC
 ACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAGATTTAATTAAGGCCTTAATTAG
 G

>SEQ ID NO: 10; последовательность нуклеиновой кислоты конструкции с MeCP2 для
 экспрессии *in vivo* (геном вектора scAAV-Mec229-hMeCP2-miR132(1x)miR122-1(3x))

CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGAC
 CTTTGGTCGCCCGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGTAGCCAT
 GCTCTAGGAAGATCAATTCGGTACAATTCACGCGTCGACAATTGAGGGCGTCACCG
 CTAAGGCTCCGCCCCAGCCTGGGCTCCACAACCAATGAAGGGTAATCTCGACAAAG
 AGCAAGGGGTGGGGCGCGGGCGCGCAGGTGCAGCAGCACACAGGCTGGTCGGGAG
 GGCGGGGCGCGACGTCTGCCGTGCGGGGTCCCGGCATCGGTTGCGCGCGCGCTCCC
 TCCTCTCGGAGAGAGGGCTGTGGTAAAACCCGTCCGGAAAATGGCTGCAGCCGCTG
 CCGCAGCGCCGAGCGGGCGGAGGTGGCGGTGGCGAGGAGGAGAGACTGGAAGAAAA
 GTCAGAAGACCAGGACCTCCAGGGCCTCAAGGACAAACCCCTCAAGTTTAAAAAGG
 TGAAGAAAGATAAGAAAGAAGAGAAAGAGGGCAAGCATGAGCCCGTGCAGCCATC
 AGCCCACCACTCTGCTGAGCCCGCAGAGGCAGGCAAAGCAGAGACATCAGAAGGGT
 CAGGCTCCGCCCCGGCTGTGCCGGAAGCTTCTGCCTCCCCCAAACAGCGGCGCTCCA
 TCATCCGTGACCGGGGACCCATGTATGATGACCCACCCCTGCCTGAAGGCTGGACAC
 GGAAGCTTAAGCAAAGGAAATCTGGACGCTCTGCTGGGAAGTATGATGTGTATTTG
 ATCAATCCCCAGGGAAAAGCCTTTCGCTCTAAAGTGGAGTTGATTGCGTACTTCGAA

AAGGTAGGCGACACATCCCTGGACCCTAATGATTTTACTTCACGGTAACTGGGAG
 AGGGAGCCCCTCCCGGCGAGAGCAGAAACCACCTAAGAAGCCCAAATCTCCCAAAG
 CTCCAGGAACTGGCAGAGGTCGGGGACGCCCCAAAGGGAGCGGCACCACGAGACC
 CAAGGCAGCTACGTCAGAGGGTGTGCAGGTGAAAAGGGTCCTGGAGAAAAGTCCTG
 GGAAGCTCCTTGTCAAGATGCCTTTTCAAACCTTCGCCAGGGGGCAAGGCTGAGGGG
 GGTGGGGCCACCACATCCACCCAGGTCATGGTGATCAAACGCCCCGGCAGGAAGCG
 AAAAGCTGAGGCAGACCCTCAGGCCATTCCCAAGAAACGGGGTCGAAAGCCGGGG
 AGTGTGGTGGCAGCCGCTGCCGCCGAGGCCAAAAAGAAAGCCGTGAAGGAGTCTTC
 TATCCGATCTGTGCAGGAGACCGTACTCCCCATCAAGAAGCGCAAGACCCGGGAGA
 CGGTCAGCATCGAGGTCAAGGAAGTGGTGAAGCCCCTGCTGGTGTCCACCCTCGGT
 GAGAAGAGCGGGAAAGGACTGAAGACCTGTAAGAGCCCTGGGCGGAAAAGCAAGG
 AGAGCAGCCCCAAGGGGCGCAGCAGCAGCGCCTCCTCACCCCCCAAGAAGGAGCAC
 CACCACCATCACCACCACTCAGAGTCCCCAAAGGCCCCCGTGCCACTGCTCCCACCC
 CTGCCCCCACCTCCACCTGAGCCCGAGAGCTCCGAGGACCCACACGCCCCCTGAG
 CCCCAGGACTTGAGCAGCAGCGTCTGCAAAGAGGAGAAGATGCCCAGAGGAGGCTC
 ACTGGAGAGCGACGGCTGCCCCAAGGAGCCAGCTAAGACTCAGCCCGCGGTTGCCA
 CCGCCGCCACGGCCGCAGAAAAGTACAAACACCGAGGGGAGGGAGAGCGCAAAGA
 CATTGTTTCATCCTCCATGCCAAGGCCAAACAGAGAGGAGCCTGTGGACAGCCGGA
 CGCCCGTGACCGAGAGAGTTAGCGAGCAGAAGCTGATCTCAGAGGAGGACCTGTGA
 CGACCATGGCTGTAGACTGTTACTCGAGATACATACTTCTTTACATTCCAATACATA
 CTTCTTTACATTCCAATACATACTTCTTTACATTCCACCATGGACTAGTACAAACACC
 ATTGTCACACTCCAACAAACACCATTGTCACACTCCAACAAACACCATTGTCACACT
 CCAGCGGCCGCTTCGATCCGATCTTTTTCCCTCTGCCAAAAATTATGGGGACATCAT
 GAAGCCCCTTGAGCATCTGACTTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAAT
 AGTGTGTTGGAATTTTTTGTGTCTCTCACTCGGCCTAGGTAGATAAGTAGCATGGCG
 GGTTAATCATTAACACTACAAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGC
 GCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCCGGGCTTT
 GCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG

>SEQ ID NO: 11; последовательность нуклеиновой кислоты конструкции с MeCP2 для
 экспрессии *in vivo* (геном вектора scAAV-Mec229-hMeCP2-miR132(2x)miR122-1(3x))

CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGAC
 CTTTGGTCCGCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGTAGCCAT
 GCTCTAGGAAGATCAATTCGGTACAATTCACGCGTCGACAATTGAGGGCGTCACCG
 CTAAGGCTCCGCCCCAGCCTGGGCTCCACAACCAATGAAGGGTAATCTCGACAAAG

AGCAAGGGGTGGGGCGCGGGGCGCGCAGGTGCAGCAGCACACAGGCTGGTCGGGAG
GGCGGGGCGCGACGTCTGCCGTGCGGGGTCCCGGCATCGGTTGCGCGCGCGCTCCC
TCCTCTCGGAGAGAGGGCTGTGGTAAAACCCGTCCGAAAATGGCTGCAGCCGCTG
CCGCAGCGCCGAGCGGCGGAGGTGGCGGTGGCGAGGAGGAGAGACTGGAAGAAAA
GTCAGAAGACCAGGACCTCCAGGGCCTCAAGGACAAACCCCTCAAGTTTAAAAAGG
TGAAGAAAGATAAGAAAGAAGAGAAAGAGGGCAAGCATGAGCCCGTGCAGCCATC
AGCCCACCACTCTGCTGAGCCCGCAGAGGCAGGCAAAGCAGAGACATCAGAAGGGT
CAGGCTCCGCCCCGGCTGTGCCGGAAGCTTCTGCCTCCCCCAAACAGCGGCGCTCCA
TCATCCGTGACCGGGGACCCATGTATGATGACCCACCCCTGCCTGAAGGCTGGACAC
GGAAGCTTAAGCAAAGGAAATCTGGACGCTCTGCTGGGAAGTATGATGTGTATTG
ATCAATCCCCAGGGAAAAGCCTTTCGCTCTAAAGTGAGTTGATTGCGTACTTCGAA
AAGGTAGGCGACACATCCCTGGACCCTAATGATTTTGA CTTCACGGTAACTGGGAG
AGGGAGCCCCTCCCGGCGAGAGCAGAAACCACCTAAGAAGCCCAAATCTCCCAAAG
CTCCAGGA ACTGGCAGAGGTGCGGGGACGCCCCAAAGGGAGCGGCACCACGAGACC
CAAGGCAGCTACGTCAGAGGGTGTGCAGGTGAAAAGGGTCCTGGAGAAAAGTCCTG
GGAAGCTCCTTGTCAAGATGCCTTTTCAA ACTTCGCCAGGGGGCAAGGCTGAGGGG
GGTGGGGCCACCACATCCACCCAGGTCATGGTGATCAAACGCCCCGGCAGGAAGCG
AAAAGCTGAGGCAGACCCTCAGGCCATTCCCAAGAAACGGGGTCGAAAGCCGGGG
AGTGTGGTGGCAGCCGCTGCCGCCGAGGCCAAAAAGAAAGCCGTGAAGGAGTCTTC
TATCCGATCTGTGCAGGAGACCGTACTCCCCATCAAGAAGCGCAAGACCCGGGAGA
CGGTCAGCATCGAGGTCAAGGAAGTGGTGAAGCCCCTGCTGGTGTCCACCCTCGGT
GAGAAGAGCGGGAAAGGACTGAAGACCTGTAAGAGCCCTGGGCGGAAAAGCAAGG
AGAGCAGCCCCAAGGGGCGCAGCAGCAGCGCCTCCTCACCCCCCAAGAAGGAGCAC
CACCACCATCACCACCACTCAGAGTCCCCAAAGGCCCCCGTGCCACTGCTCCCACCC
CTGCCCCCACCTCCACCTGAGCCCGAGAGCTCCGAGGACCCACCAAGCCCCCTGAG
CCCCAGGACTTGAGCAGCAGCGTCTGCAAAGAGGAGAAGATGCCAGAGGAGGCTC
ACTGGAGAGCGACGGCTGCCCCAAGGAGCCAGCTAAGACTCAGCCCGCGGTTGCCA
CCGCCGCCACGGCCGCAGAAAAGTACAAACACCGAGGGGAGGGAGAGCGCAAAGA
CATTGTTTCATCCTCCATGCCAAGGCCAAACAGAGAGGAGCCTGTGGACAGCCGGA
CGCCCGTGACCGAGAGAGTTAGCGAGCAGAAGCTGATCTCAGAGGAGGACCTGTGA
CGACCATGGCTGTAGACTGTTACGACCATGGCTGTAGACTGTTACTCGAGATACATA
CTTCTTTACATTCCAATACATACTTCTTTACATTCCAATACATACTTCTTTACATTCCA
CCATGGACTAGTACAAACACCATTGTCACACTCCAACAAACACCATTGTCACACTCC
AACAAACACCATTGTCACACTCCAGCGGCCGCTTCGATCCGATCTTTTTCCCTCTGCC
AAAAATTATGGGGACATCATGAAGCCCCTTGAGCATCTGACTTCTGGCTAATAAAG

GAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTTGGAATTTTTTGTGTCTCTCACTCGGCCTA
GGTAGATAAGTAGCATGGCGGGTTAATCATTAACCTACAAGGAACCCCTAGTGATGG
AGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGG
TCGCCCCGACGCCCCGGGCTTTGCCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG

>SEQ ID NO: 12; последовательность нуклеиновой кислоты конструкции с MeCP2 для
экспрессии *in vivo* (геном вектора scAAV-Mec229-hMeCP2-miR132(3x) miR122-1(3x))

CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGAC
CTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGAGCCAT
GCTCTAGGAAGATCAATTCGGTACAATTCACGCGTCGACAATTGAGGGCGTCACCG
CTAAGGCTCCGCCCCAGCCTGGGCTCCACAACCAATGAAGGGTAATCTCGACAAAG
AGCAAGGGGTGGGGCGCGGGGCGCGCAGGTGCAGCAGCACACAGGCTGGTCGGGAG
GGCGGGGCGCGACGTCTGCCGTGCGGGGTCCCGGCATCGGTTGCGCGCGCGCTCCC
TCCTCTCGGAGAGAGGGCTGTGGTAAAACCCGTCCGGAAAATGGCTGCAGCCGCTG
CCGCAGCGCCGAGCGGGCGGAGGTGGCGGTGGCGAGGAGGAGAGACTGGAAGAAAA
GTCAGAAGACCAGGACCTCCAGGGCCTCAAGGACAAACCCCTCAAGTTTAAAAAGG
TGAAGAAAGATAAGAAAGAAGAGAAAGAGGGCAAGCATGAGCCCGTGCAGCCATC
AGCCCACCACTCTGCTGAGCCCGCAGAGGCAGGCAAAGCAGAGACATCAGAAGGGT
CAGGCTCCGCCCCGGCTGTGCCGGAAGCTTCTGCCTCCCCCAAACAGCGGCGCTCCA
TCATCCGTGACCGGGGACCCATGTATGATGACCCACCCCTGCCTGAAGGCTGGACAC
GGAAGCTTAAGCAAAGGAAATCTGGACGCTCTGCTGGGAAGTATGATGTGTATTTG
ATCAATCCCCAGGGAAAAGCCTTTCGCTCTAAAGTGGAGTTGATTGCGTACTTCGAA
AAGGTAGGCGACACATCCCTGGACCCTAATGATTTTGACTTCACGGTAACTGGGAG
AGGGAGCCCCTCCCGGCGAGAGCAGAAACCACCTAAGAAGCCCAAATCTCCCAAAG
CTCCAGGAAGTGGCAGAGGTCGGGGACGCCCCAAAGGGAGCGGCACCACGAGACC
CAAGGCAGCTACGTCAGAGGGTGTGCAGGTGAAAAGGGTCCTGGAGAAAAGTCCTG
GGAAGCTCCTTGTCAGATGCCTTTTCAAACCTTCGCCAGGGGGCAAGGCTGAGGGG
GGTGGGGCCACCACATCCACCCAGGTCATGGTGATCAAACGCCCCGGCAGGAAGCG
AAAAGCTGAGGCAGACCCTCAGGCCATTCCCAAGAAACGGGGTCGAAAGCCGGGG
AGTGTGGTGGCAGCCGCTGCCGCCGAGGCCAAAAAGAAAGCCGTGAAGGAGTCTTC
TATCCGATCTGTGCAGGAGACCGTACTCCCCATCAAGAAGCGCAAGACCCGGGAGA
CGGTCAGCATCGAGGTCAAGGAAGTGGTGAAGCCCCTGCTGGTGTCCACCCTCGGT
GAGAAGAGCGGGAAAGGACTGAAGACCTGTAAGAGCCCTGGGCGGAAAAGCAAGG
AGAGCAGCCCCAAGGGGCGCAGCAGCAGCGCCTCCTACCCCCCAAGAAGGAGCAC
CACCACCATCACCACCACTCAGAGTCCCCAAAGGCCCCCGTGCCACTGCTCCCACCC

CTGCCCCCACCTCCACCTGAGCCCGAGAGCTCCGAGGACCCACCAGCCCCCTGAG
 CCCCAGGACTTGAGCAGCAGCGTCTGCAAAGAGGAGAAGATGCCAGAGGAGGCTC
 ACTGGAGAGCGACGGCTGCCCCAAGGAGCCAGCTAAGACTCAGCCCGCGGTTGCCA
 CCGCCGCCACGGCCGCAGAAAAGTACAAACACCGAGGGGAGGGAGAGCGCAAAGA
 CATTGTTTCATCCTCCATGCCAAGGCCAAACAGAGAGGAGCCTGTGGACAGCCGGA
 CGCCCGTGACCGAGAGAGTTAGCGAGCAGAAGCTGATCTCAGAGGAGGACCTGTGA
 CGACCATGGCTGTAGACTGTTACGACCATGGCTGTAGACTGTTACGACCATGGCTGT
 AGACTGTTACTCGAGATACATACTTCTTTACATTCCAATACATACTTCTTTACATTCC
 AATACATACTTCTTTACATTCCACCATGGACTAGTACAAACACCATTGTCACACTCC
 AACAAACACCATTGTCACACTCCAACAAACACCATTGTCACACTCCAGCGGCCGCTT
 CGATCCGATCTTTTTCCCTCTGCCAAAAATTATGGGGACATCATGAAGCCCCTTGAG
 CATCTGACTTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTTGGAATT
 TTTTGTGTCTCTCACTCGGCCTAGGTAGATAAGTAGCATGGCGGGTTAATCATTAAAC
 TACAAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTC
 ACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCCGACGCCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTC
 AGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG

>SEQ ID NO: 13; аминокислотная последовательность капсида AAV2

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPFG
 LDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLG
 RAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFG
 QTGDADSVDPDPQPLGQPPAAPSGLGTNTMATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCD
 STWMGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHC
 HFSPRDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEY
 QLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTG
 NNFTFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTNTPSGTTTQSRLQFSQAG
 ASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSLVPNGPAM
 ASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEEEIRTTPVATEQYGSVSTNL
 QRGNRQAATADVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGPWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLK
 HPPPQILIKNTPVPANPSTTFSAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTS
 NYNKSVMVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL

> SEQ ID NO:14; аминокислотная последовательность капсида AAV9

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLGPFG
 NGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGG

NLGRAVFQAKKRLLLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSAGIGKSGAQPAAKKRL
 NFGQTGDTEVPDPQPIGEPPAAPSGVGSLTMASGGGAPVADNNEGADGVGSSSGNWH
 CDSQWLGDREVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYFDEN
 RFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTDNNGVKTIANNLTSTVQVFT
 DSDYQLPYVLGSAHEGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNDGSQAVGRSSFYCLEYFPSQML
 RTGNNFQFSYEFENVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSKTINGSGQNQQTLKFSV
 AGPSNMAVQGRNYIPGPSYRQQRVSTTVTQNNNSEFAWPGASSWALNGRNSLMNPGP
 AMASHKEGEDRFFPLSGSLIFGKQGTGRDNVDADKVMITNEEEIKTTNPVATESYGQVA
 TNHQSAQAQAQTGWVQNQGILPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGF
 GMKHPPPQILIKNTPVPADPPTAFNKDKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPE
 IQYTSNYYKSNNVEFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL

> SEQ ID NO: 15; аминокислотная последовательность капсида AAV-PHP.B

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLPGP
 NGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGG
 NLGRAVFQAKKRLLLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSAGIGKSGAQPAAKKRL
 NFGQTGDTEVPDPQPIGEPPAAPSGVGSLTMASGGGAPVADNNEGADGVGSSSGNWH
 CDSQWLGDREVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYFDEN
 RFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTDNNGVKTIANNLTSTVQVFT
 DSDYQLPYVLGSAHEGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNDGSQAVGRSSFYCLEYFPSQML
 RTGNNFQFSYEFENVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSRTINGSGQNQQTLKFSV
 AGPSNMAVQGRNYIPGPSYRQQRVSTTVTQNNNSEFAWPGASSWALNGRNSLMNPGP
 AMASHKEGEDRFFPLSGSLIFGKQGTGRDNVDADKVMITNEEEIKTTNPVATESYGQVA
 TNHQSAQTLAVPFKAQAQTGWVQNQGILPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGNFHP
 SPLMGGFGMKHPPPQILIKNTPVPADPPTAFNKDKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKEN
 SKRWNPEIQYTSNYYKSNNVEFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ конструирования трансгена, причем способ предусматривает:
 - (a) выбор первого гена, кодирующего первый продукт в клетке;
 - (b) выбор miRNA, экспрессия которой положительно регулируется первым продуктом в клетке; и
 - (c) конструирование трансгена, который экспрессирует транскрипт, имеющий кодирующий участок, который кодирует первый продукт, и 3'-некодирующий участок, содержащий один или несколько сайтов связывания для miRNA.
2. Способ конструирования трансгена, причем способ предусматривает:
 - (a) выбор первого гена, кодирующего первый продукт в клетке;
 - (b) выбор второго гена, кодирующего второй продукт в клетке;
 - (c) определение того, что экспрессия второго продукта положительно регулируется первым продуктом в клетке;
 - (d) выбор miRNA;
 - (e) определение того, что экспрессия miRNA положительно регулируется вторым продуктом в клетке; и
 - (f) конструирование трансгена для экспрессии в клетке транскрипта, имеющего кодирующий участок, который кодирует первый продукт, и 3'-некодирующий участок, содержащий один или несколько сайтов связывания для miRNA.
3. Способ по п. 1 или п. 2, причем первый продукт представляет собой белок.
4. Способ по п. 3, причем белок представляет собой MeCP2, необязательно, изоформу e1 MeCP2 или изоформу e2 MeCP.
5. Способ по любому из пп. 2-4, причем второй продукт представляет собой белок или нуклеиновую кислоту, необязательно, при этом нуклеиновая кислота представляет собой miRNA.
6. Способ по любому из пп. 1-5, причем miRNA представляет собой miR-132.
7. Способ по любому из пп. 1-6, причем способ дополнительно предусматривает конструирование 3'-некодирующего участка транскрипта, чтобы он содержал один или несколько сайтов связывания для одной или нескольких нарушающих нацеливание miRNA.
8. Способ по п. 7, причем одна или несколько нарушающих нацеливание miRNA ингибируют экспрессию трансгена в печени, сердце, легком, мышце, поджелудочной железе или антиген-презентирующих клетках.

9. Способ по п. 7 или п. 8, причем одна или несколько нарушающих нацеливание miRNA представляют собой miR-122, miR-1 или miR-122 и miR-1.

10. Способ по любому из пп. 1-9, в котором стадия конструирования трансгена предусматривает вставку трансгена в вектор.

11. Способ по п. 10, причем вектор представляет собой клонирующий вектор, экспрессионный вектор, плазмидный или вирусный вектор.

12. Способ конструирования трансгена, причем способ предусматривает:

(a) выбор первого гена, кодирующего первый продукт в клетке;

(b) выбор miRNA, экспрессия которой положительно регулируется первым продуктом в клетке; и

(c) конструирование трансгена, который экспрессирует транскрипт, имеющий кодирующий участок, который кодирует первый продукт, и имеющий один или несколько сайтов связывания для miRNA.

13. Способ конструирования трансгена, причем способ предусматривает:

(a) выбор первого гена, кодирующего первый продукт в клетке;

(b) выбор второго гена, кодирующего второй продукт в клетке;

(c) определение того, что экспрессия второго продукта положительно регулируется первым продуктом в клетке;

(d) выбор miRNA;

(e) определение того, что экспрессия miRNA положительно регулируется вторым продуктом в клетке; и

(f) конструирование трансгена для экспрессии в клетке транскрипта, имеющего кодирующий участок, который кодирует первый продукт, и имеющего один или несколько сайтов связывания для miRNA.

14. Вектор на основе рекомбинантного AAV (rAAV) для саморегулируемой экспрессии белка, причем вектор на основе rAAV содержит нуклеиновую кислоту, сконструированную для экспрессии в клетке целевой ткани транскрипта, кодирующего белок, при этом транскрипт содержит по меньшей мере один первый сайт связывания miRNA, специфический в отношении первой miRNA, при этом экспрессия первой miRNA положительно регулируется экспрессией белка в клетке.

15. Рекомбинантный AAV, содержащий капсид, вмещающий вектор на основе rAAV по п. 14, причем капсид содержит белок капсида, который способствует селективной трансдукции клетки целевой ткани.

16. Рекомбинантная нуклеиновая кислота, кодирующая транскрипт, имеющий i) кодирующий участок, который кодирует белок, и ii) два или больше сайтов связывания miRNA, причем два или больше сайтов связывания miRNA содержат:

(a) по меньшей мере один первый сайт связывания miRNA, специфический в отношении первой miRNA, которая положительно регулируется экспрессией белка в клетке целевой ткани; и

(b) по меньшей мере один второй сайт связывания miRNA, специфический в отношении второй miRNA, которая экспрессируется независимо от экспрессии белка в клетках нецелевой ткани.

17. Рекомбинантная нуклеиновая кислота, кодирующая транскрипт, имеющий кодирующий участок, который кодирует белок человеческого MeCP2 или его функциональный фрагмент, и 3'-некодирующий участок, содержащий два или больше сайтов связывания miRNA, причем два или больше сайтов связывания miRNA содержат:

(a) по меньшей мере один сайт связывания miRNA, специфический в отношении miRNA, которая отрицательно регулирует экспрессию транскрипта; и

(b) по меньшей мере один сайт связывания miRNA, специфический в отношении miRNA, которая ингибирует экспрессию транскрипта в клетке нецелевой ткани.

18. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по п. 17, причем кодирующий участок кодирует изоформу e1 MeCP2.

19. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по п. 17 или п. 18, причем человеческий MeCP2 содержит последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 1.

20. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по любому из пп. 17-19, причем по меньшей мере один сайт связывания miRNA, специфический в отношении miRNA, которая отрицательно регулирует экспрессию транскрипта, содержит сайт связывания miR-132, необязательно, при этом по меньшей мере один сайт связывания miRNA представляет собой два или три сайта связывания miR-132.

21. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по любому из пп. 17-20, причем по меньшей мере один сайт связывания miRNA, специфический в отношении miRNA, которая ингибирует экспрессию транскрипта в нецелевой ткани, содержит сайт связывания miR-1, сайт связывания miR-122 или сайт связывания miR-1 и miR-122.

22. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по любому из пп. 17-21, причем каждый из одного или нескольких сайтов связывания miRNA расположен между последним кодоном кодирующего участка и поли-А-хвостом транскрипта.

23. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по любому из пп. 17-22, дополнительно содержащая промотор, необязательно, промотор мышиногo MeCP2.

24. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по п. 23, причем промотор мышиногo MeCP2 содержит последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 3.

25. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по любому из пп. 17-24, причем рекомбинантная нуклеиновая кислота расположена на плазмиде.

26. Вирусный вектор, содержащий рекомбинантную нуклеиновую кислоту по любому из пп. 17-24, необязательно, причем вирусный вектор представляет собой вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV), аденовирусный вектор, лентивирусный вектор, вектор на основе вируса герпеса или вектор на основе бакуловируса.

27. Рекомбинантная нуклеиновая кислота, кодирующая транскрипт, имеющий

(a) кодирующий участок, который кодирует человеческий MeCP2 или его функциональный фрагмент; и

(b) 3'-некодирующий участок, содержащий один или несколько сайтов связывания miRNA,

причем транскрипт фланкирован инвертированными концевыми повторами (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV).

28. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по п. 27, причем кодирующий участок кодирует изоформу e1 MeCP2.

29. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по п. 27 или п. 28, причем человеческий MeCP2 содержит последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 1.

30. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по любому из пп. 27-29, причем один или несколько сайтов связывания miRNA представляют собой сайты связывания miR-1, miR-122 или miR-132 или любую их комбинацию.

31. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по п. 30, причем транскрипт содержит сайт связывания miR-1, сайт связывания miR-122 и по меньшей мере один сайт связывания miR-132.

32. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по п. 31, причем по меньшей мере один сайт связывания miR-132 представляет собой два или три сайта связывания miR-132.

33. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по любому из пп. 27-32, причем один или несколько сайтов связывания miRNA расположены между последним кодоном кодирующего участка и поли-A-хвостом транскрипта.

34. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по любому из пп. 27-33, дополнительно содержащая промотор, необязательно, промотор мышиногo MeCP2.

35. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по п. 34, причем промотор мышинового MeCP2 содержит последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 3.

36. Рекомбинантная нуклеиновая кислота по любому из пп. 27-35, причем ITR представляют собой ITR AAV2.

37. Рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV), содержащий:
капсид, вмещающий рекомбинантную нуклеиновую кислоту по любому из пп. 17-24 или пп. 27-36.

38. rAAV по п. 37, причем нуклеиновая кислота содержит по меньшей мере один ITR, выбранный из ITR AAV2, AAV3, AAV4, AAV5 или AAV6.

39. rAAV по п. 37 или п. 38, причем капсид содержит белок капсида, который способствует прохождению rAAV через гематоэнцефалический барьер.

40. rAAV по п. 39, причем белок капсида имеет серотип, выбранный из группы, состоящей из AAV-PHP.B, AAV1, AAV2, AAV2i8, AAV2.5, AAV5, AAV6, AAV8, AAVrh8, AAV9, AAVrh10, AAV-B1, AAV9.45A-String (*например*, AAV9.45-AS), AAV9.45Angiopep, AAV9.47-Angiopep, AAV9.47-AS, AAV-CAM130 и AAV9HR.

41. rAAV по любому из пп. 37-40, причем белок капсида содержит или состоит из последовательности, изложенной в SEQ ID NO: 14 или 15 (AAV-PHP.B, AAV9).

42. Композиция, содержащая рекомбинантную нуклеиновую кислоту по любому из пп. 17-24 или пп. 27-36 или rAAV по любому из пп. 37-41 и фармацевтически приемлемое вспомогательное средство.

43. Композиция по п. 42, причем композиция составлена для инъекции, необязательно, при этом инъекция представляет собой системную инъекцию (*например*, внутривенную инъекцию) или интратекальную инъекцию.

44. Способ лечения синдрома Ретта у субъекта, причем способ предусматривает введение субъекту с синдромом Ретта или с подозрением на синдром Ретта эффективного количества:

(a) рекомбинантной нуклеиновой кислоты по любому из пп. 17-24 или пп. 27-36;

(b) rAAV по любому из пп. 37-41 или

(c) композиции по п. 42 или п. 43.

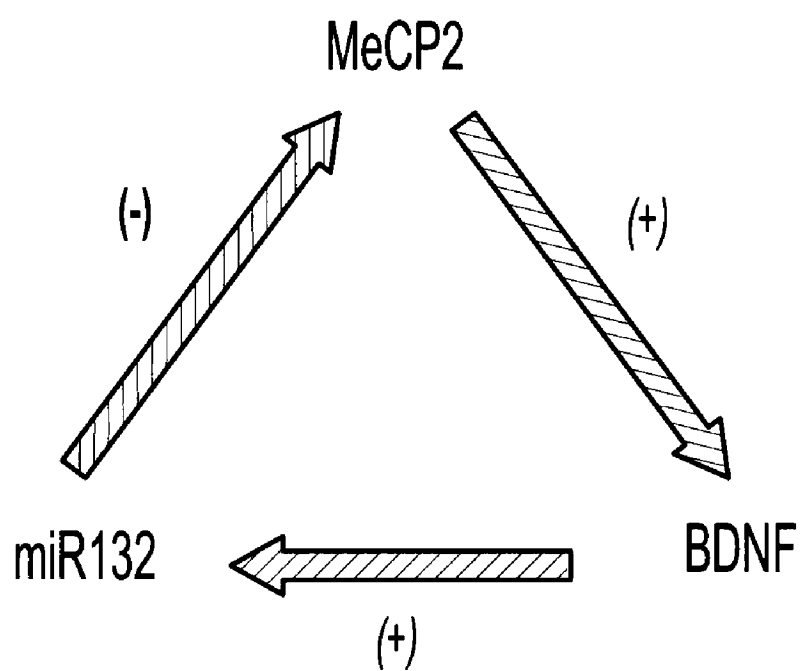
45. Способ по п. 44, причем субъект представляет собой субъекта-человека, необязательно, при этом субъект имеет возраст менее одного года.

46. Способ по п. 44 или п. 45, причем субъект характеризуется мутацией по меньшей мере в одной копии гена MeCP2, необязательно, при этом мутация представляет собой мутацию с потерей функции.

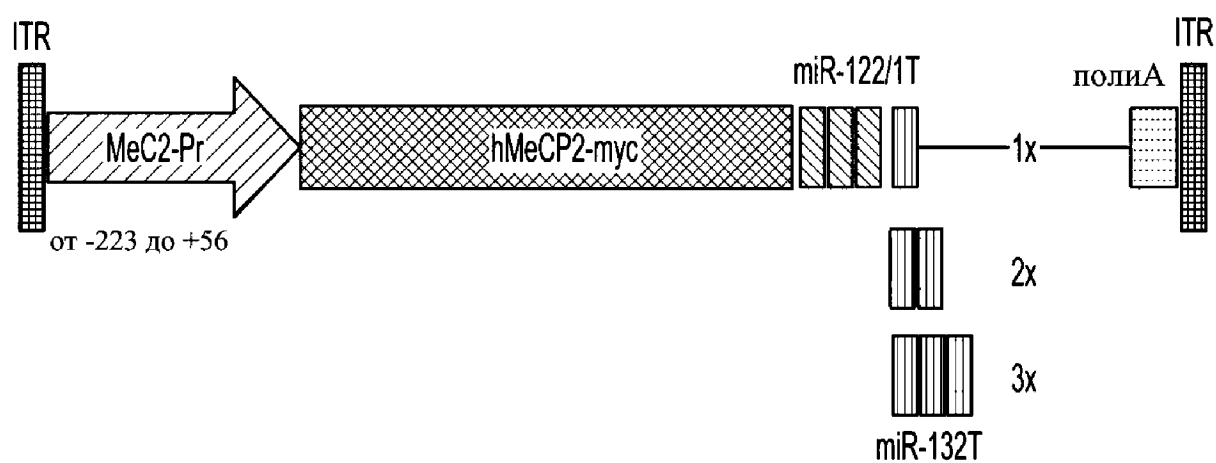
47. Способ по любому из пп. 44-46, причем введение представляет собой инъекцию, необязательно, системную инъекцию (*например*, внутривенную инъекцию) или интратекальную инъекцию.

48. Способ по любому из пп. 44-47, причем введение приводит в результате к пересечению эффективным количеством (a), (b) или (c) гематоэнцефалического барьера субъекта.

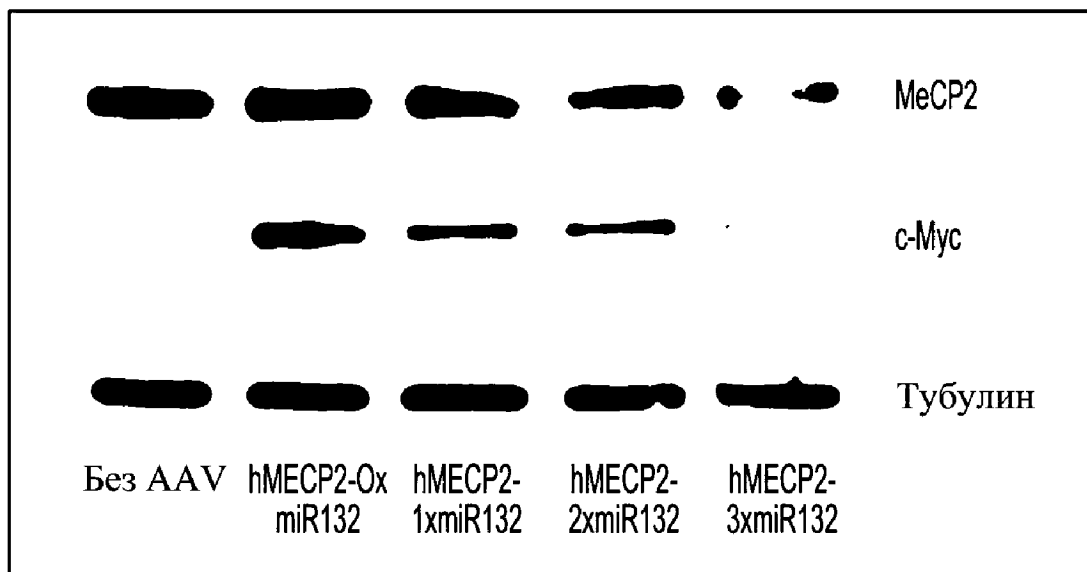
49. Способ по любому из пп. 44-48, причем введение приводит в результате к нетоксичному уровню экспрессии MeCP2 в головном мозге субъекта.



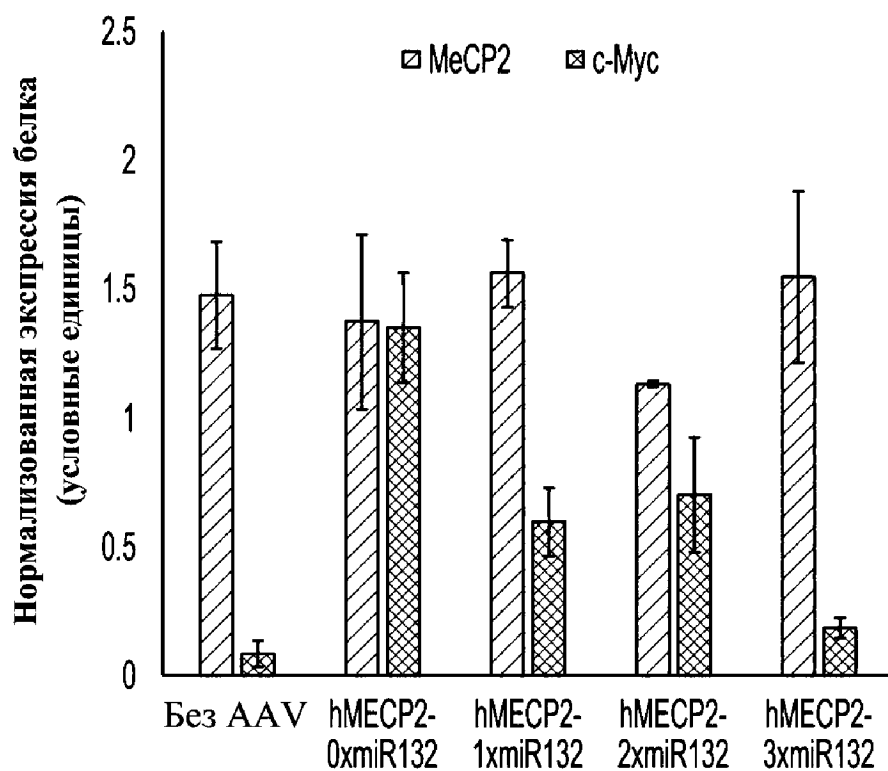
Фиг. 1А



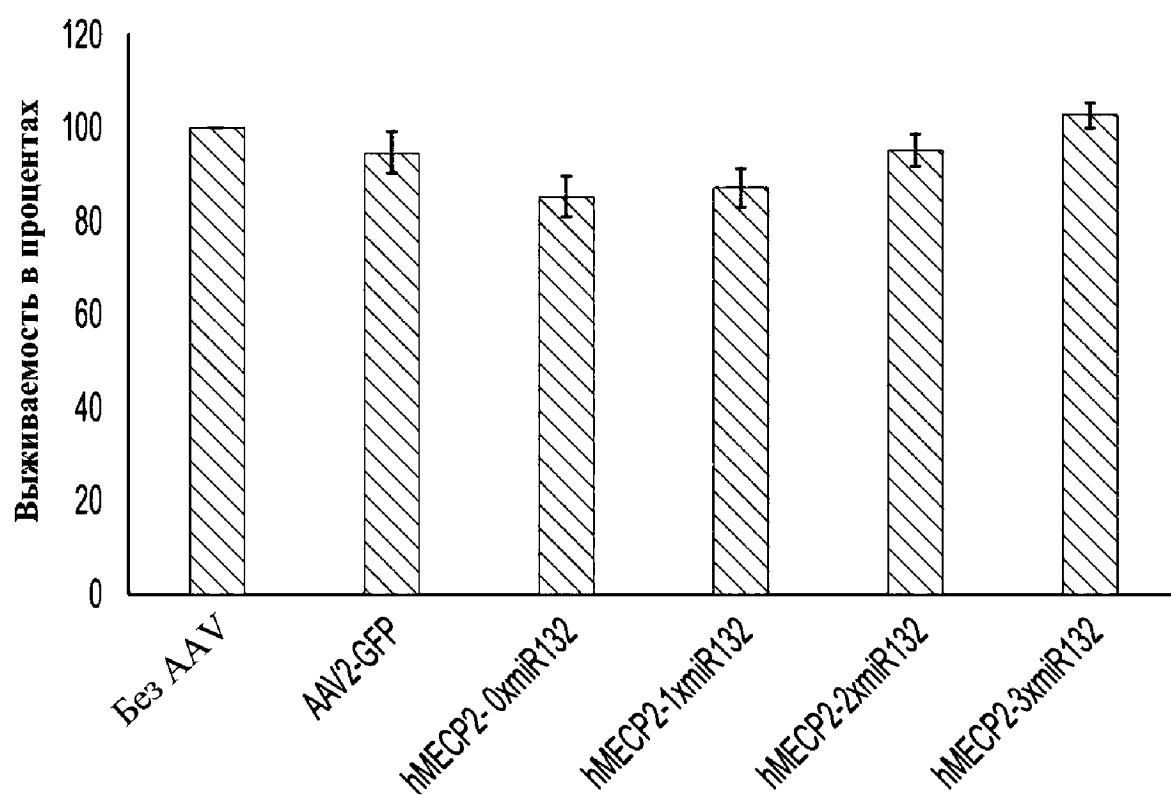
Фиг. 1В

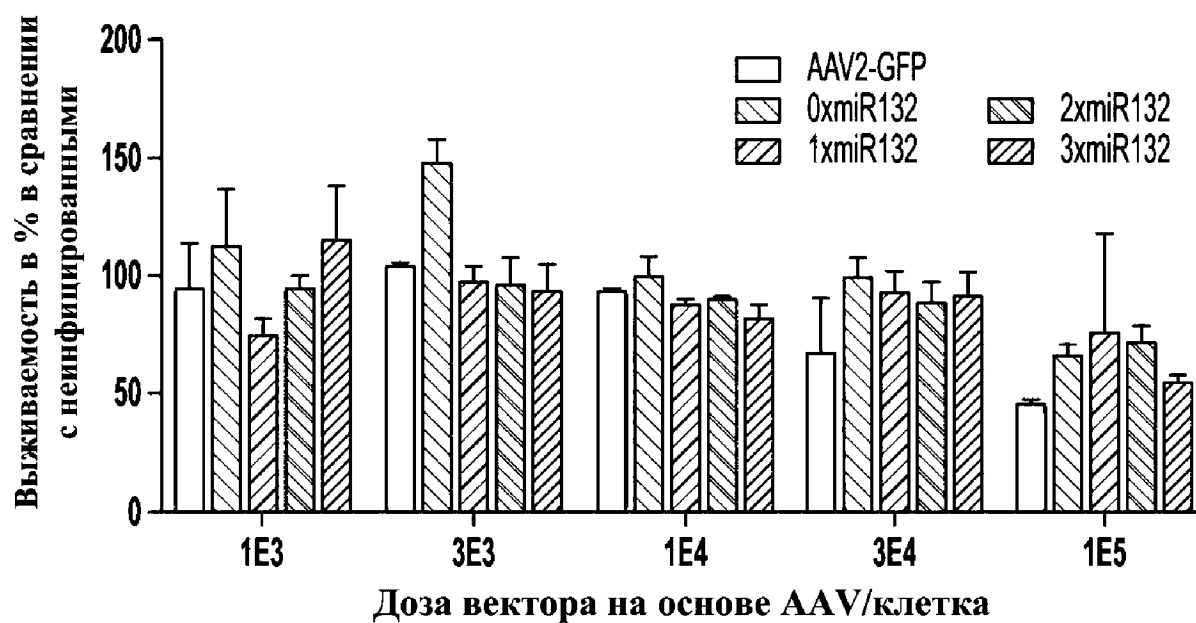


Фиг. 2А

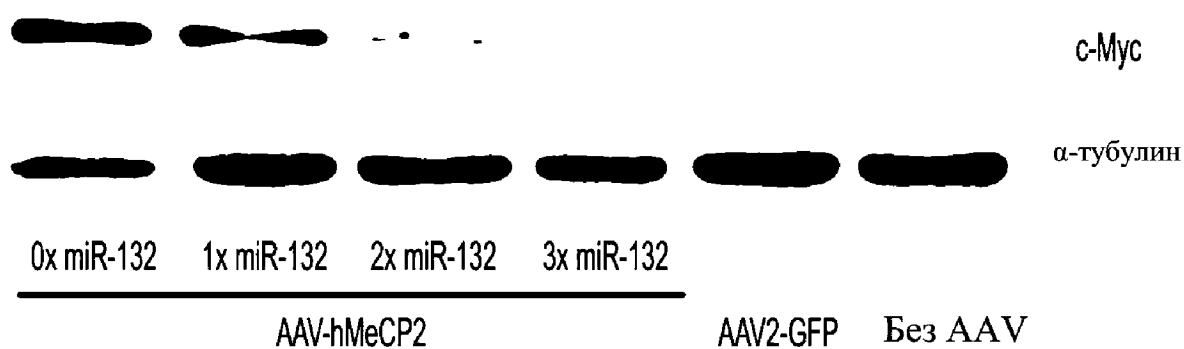


Фиг. 2В

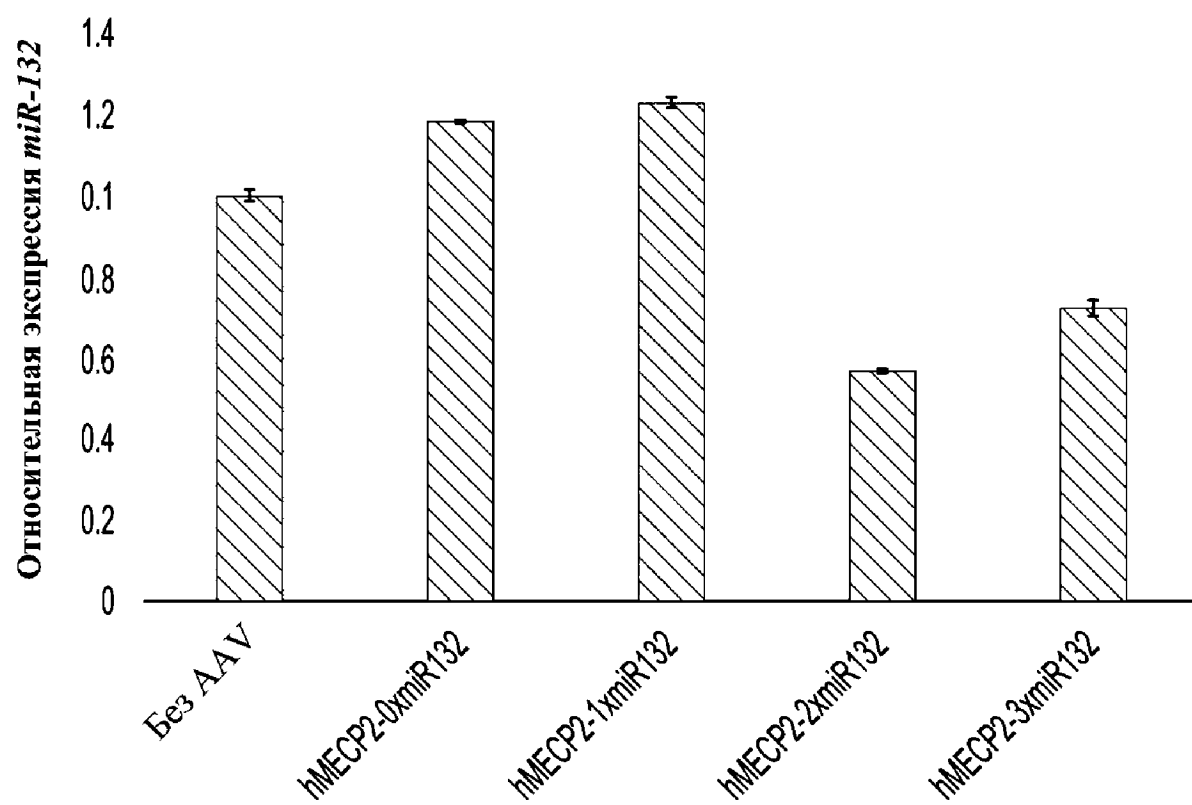
**Фиг. 2С**

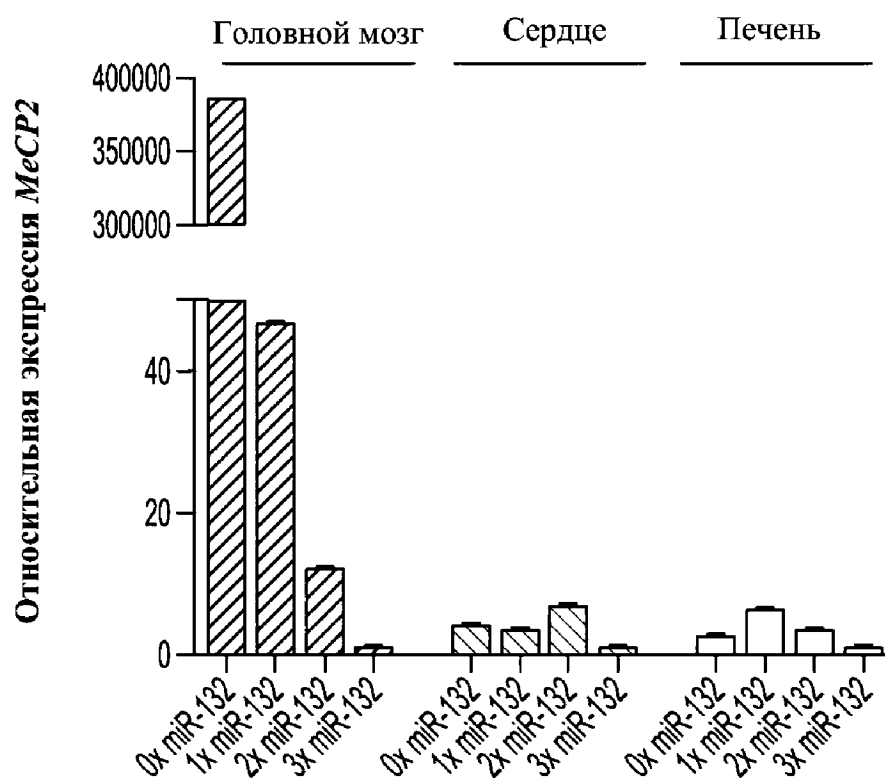


Фиг. 3А

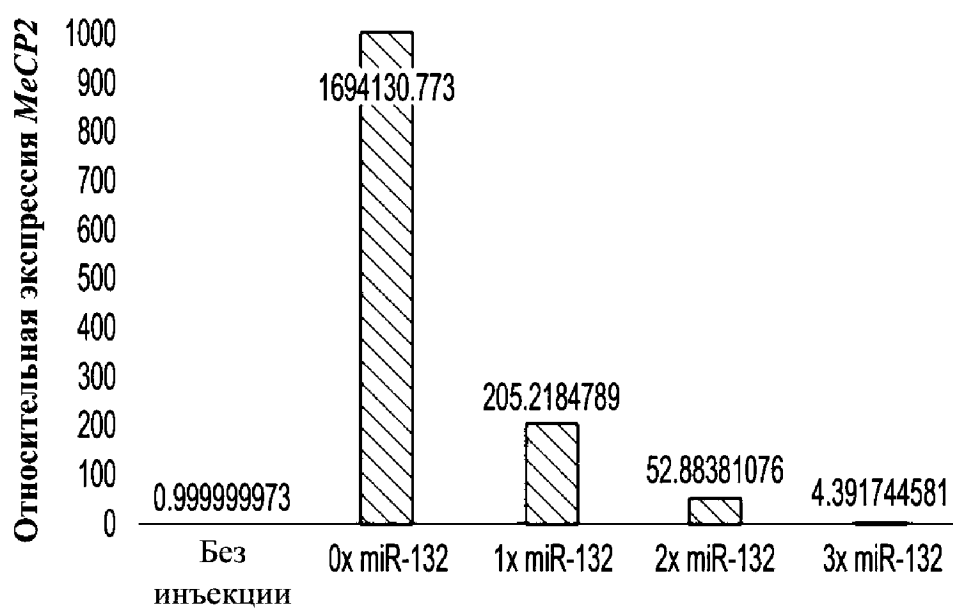


Фиг. 3В

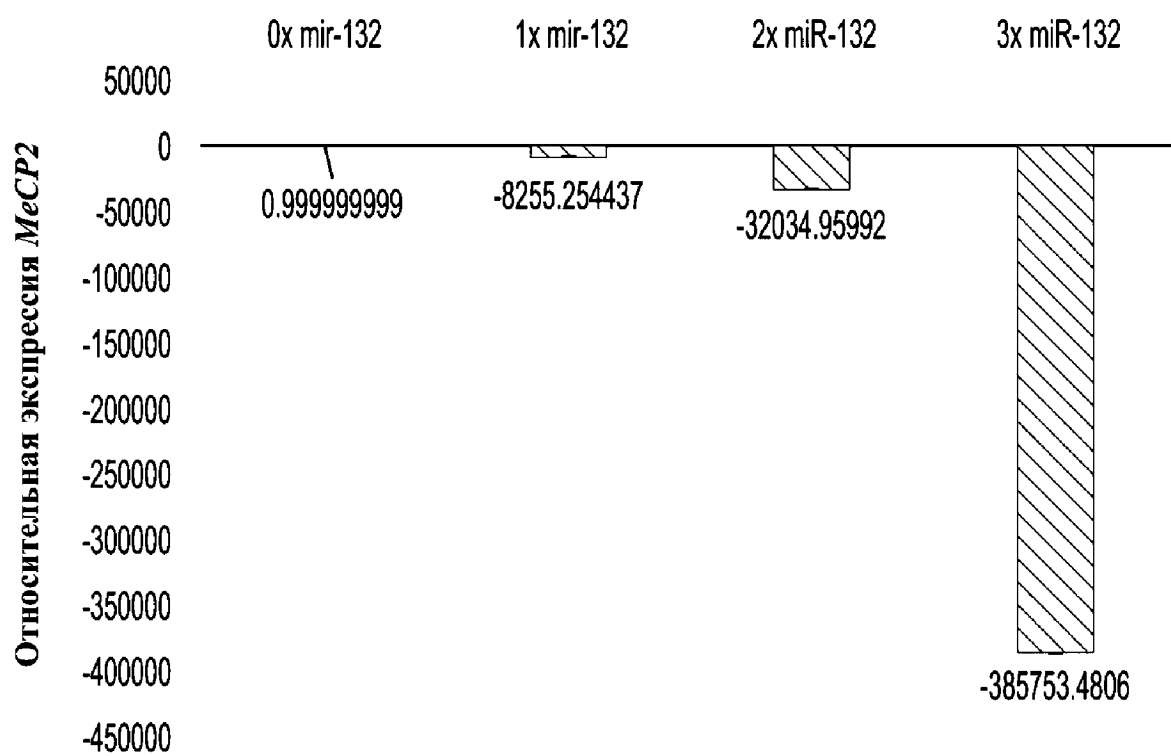
**Фиг. 3С**

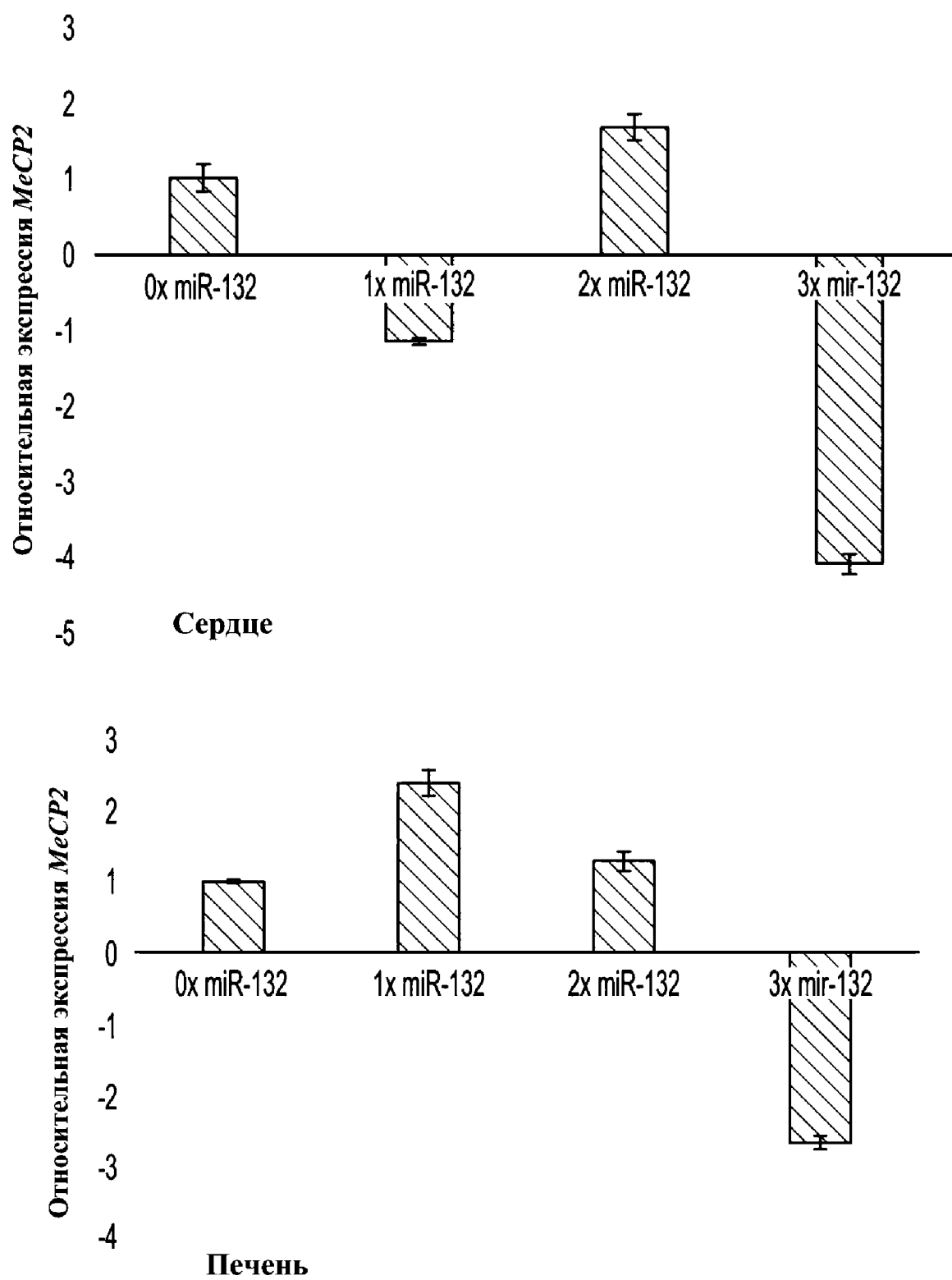


Фиг. 4А



Фиг. 4В

**Фиг. 4С**

**Фиг. 5**