

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202091348** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.09.22

(51) Int. Cl. *C07K 14/00* (2006.01)
C12Q 1/68 (2018.01)
A61K 38/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.11.30

(54) СКОНСТРУИРОВАННЫЕ ДНК-СВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ

(31) 62/593,824; 62/610,014; 62/618,966;
62/641,806; 62/646,198; 62/664,814;
62/664,817

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

(32) 2017.12.01; 2017.12.22; 2018.01.18;
2018.03.12; 2018.03.21; 2018.04.30;
2018.04.30

(72) Изобретатель:
**Тальятелла Стефани, Тененхос Энн,
Рамамурти Картик, Янг Эндрю,
Оберкофлер Дэвид (US)**

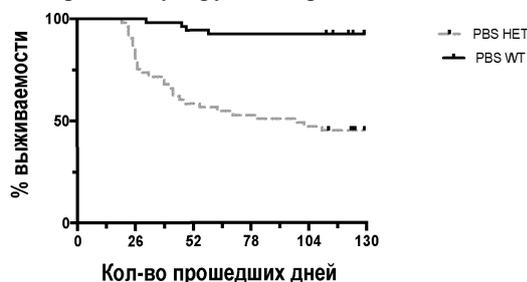
(33) US

(86) PCT/US2018/063498

(87) WO 2019/109051 2019.06.06

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

(57) Предоставлены композиции и способы их применения, содержащие не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок, который модулирует экспрессию эндогенного гена.



A1

202091348

202091348

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-562068EA/042

СКОНСТРУИРОВАННЫЕ ДНК-СВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА

[0001] По настоящей заявке испрашивается приоритет по предварительной заявке на патент США №. 62/593 824, поданной 1 декабря 2017 г.; предварительной заявке на патент США №. 62/610 014, поданной 22 декабря 2017 г.; предварительной заявке на патент США №. 62/646198, поданной 21 марта 2018 г.; предварительной заявке на патент США №. 62/618966, поданной 18 января 2018 г.; предварительной заявке на патент США №. 62/641806, поданной 12 марта 2018 г.; предварительной заявке на патент США №. 62/664 814, поданной 30 апреля 2018 г.; и предварительной заявке на патент США №. 62/664817, поданной 30 апреля 2018 г., каждая из которых включена в настоящее описание во всей своей полноте путем ссылки.

СПИСКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0002] Настоящая заявка содержит список последовательностей, который представлен в электронном виде в формате ASCII и настоящим полностью включен путем ссылки. Указанная копия ASCII, созданная 30 ноября 2018 года, имеет имя 46482-711_601_SL.txt и размер 864453 байт.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[0003] Широкий спектр заболеваний человека связан с аномальной экспрессией генов. В некоторых случаях генетическая мутация в гене является причиной его дисрегуляции, пониженной экспрессии или отсутствия экспрессии, что приводит к гаплонедостаточности. В некоторых случаях генетическая мутация в гене является причиной усиления его экспрессии, что приводит к сверхэкспрессии гена. Лечение генетических расстройств или заболеваний связано с многочисленными проблемами. Одним из подходов является генная терапия, которая включает терапевтическую доставку нуклеиновой кислоты в клетку пациента. Однако различные проблемы, связанные с генной терапией, остаются нерешенными, такие как нежелательный иммунный ответ, вызванный генной терапией, нецелевые эффекты, ограниченная эффективность клонирования носителей терапевтических генов (например, вирусов), поддержание терапевтического эффекта на протяжении более длительного времени и т.д. С центральной нервной системой (ЦНС) связано множество уникальных задач по разработке терапевтических средств, направленных на устранение основного нарушения экспрессии гена и/или белка. Несмотря на наличие лекарств, которые помогают справиться с симптомами заболеваний/расстройств ЦНС, для многих заболеваний/расстройств ЦНС, например синдрома Драве или лобно-височной деменции, отсутствует специализированное лечение или терапия. Таким образом, существует потребность в новых композициях и способах, способных ровать экспрессию любого эндогенного гена, позволяющих купировать эффекты заболевания или расстройства, в частности, в терапевтических агентах с пониженной иммуногенностью, сниженными

нецелевыми эффектами, повышенной специфичностью к целевому гену и/или повышенной терапевтической эффективностью.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0004] В одном из аспектов изобретение относится к экспрессионной кассете, содержащей последовательность, кодирующую не встречающийся в природе фактор транскрипции, который увеличивает экспрессию гена SCN1A в клетке. В некоторых вариантах осуществления фактор транскрипции, который увеличивает экспрессию SCN1A, связывается с целевым участком, который способен увеличивать экспрессию SCN1A по меньшей мере на 20% в анализе активации транскрипции. В некоторых вариантах осуществления фактор транскрипции, который увеличивает экспрессию SCN1A, способен уменьшать частоту судорог в мышинной модели синдрома Драве по меньшей мере на 20% в анализе судорог на фоне гипертермии. В некоторых вариантах осуществления фактор транскрипции, который увеличивает экспрессию SCN1A, связывается с целевым участком, способным увеличивать экспрессию SCN1A по меньшей мере на 20% в анализе активации транскрипции, и фактор транскрипции обеспечивает уменьшение частоты судорог в мышинной модели синдрома Драве по меньшей мере на 20% в анализе судорог на фоне гипертермии.

[0005] В некоторых вариантах осуществления фактор транскрипции, который увеличивает экспрессию SCN1A, связывается с местоположением в геноме на хромосоме 2. В некоторых вариантах осуществления фактор транскрипции, который увеличивает экспрессию SCN1A, связывается с местоположением в геноме на хромосоме 2, который находится в пределах 110 т.п.о. выше или ниже от участка начала транскрипции гена SCN1A. В некоторых вариантах осуществления фактор транскрипции, который увеличивает экспрессию SCN1A, связывается с участком генома на хромосоме 2, который находится в положениях 166179652-165989571 (со ссылкой на GRCh38.p12). В некоторых вариантах осуществления фактор транскрипции, который увеличивает экспрессию SCN1A, связывается с местоположением в геноме на хромосоме 2, который находится в положениях 166128050-166127958 (со ссылкой на GRCh38.p12). В некоторых вариантах осуществления фактор транскрипции, который увеличивает экспрессию SCN1A, связывается с местоположением в геноме на хромосоме 2, который находится в положениях 166155414-166140590 (со ссылкой на GRCh38.p12). В некоторых вариантах осуществления фактор транскрипции, который увеличивает экспрессию SCN1A, связывается с местоположением в геноме на хромосоме 2, который находится в положениях 166179652-1661777272 (со ссылкой на GRCh38.p12). В некоторых вариантах осуществления фактор транскрипции, который увеличивает экспрессию SCN1A, связывается с местоположением в геноме на хромосоме 2, который находится в положениях 1659990246-165989592 (со ссылкой на GRCh38.p12). В некоторых вариантах осуществления фактор транскрипции, который увеличивает экспрессию SCN1A, связывается с местоположением в геноме, расположенным в пределах 200 п.о. от участка генома, имеющего последовательность любой из SEQ ID NO: 35-37, 105-111, 136, 195-211,

224-238, 240-267. В некоторых вариантах осуществления фактор транскрипции, который увеличивает экспрессию SCN1A, связывается с областью генома, которая, по меньшей мере, частично перекрывается участком генома, имеющим последовательность любой из SEQ ID NO: 35-37, 105-111, 136, 195-211, 224-238, 240-267. В некоторых вариантах осуществления фактор транскрипции, который увеличивает экспрессию SCN1A, связывается с местоположением в геноме, имеющим последовательность любой из SEQ ID NO: 35-37, 105-111, 136, 195-211, 224-238, 240-267. В некоторых вариантах осуществления фактор транскрипции, который увеличивает экспрессию SCN1A, связывается с областью генома, имеющей 18-27 нуклеотидов (например, по меньшей мере 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 нуклеотидов).

[0006] В некоторых вариантах осуществления фактор транскрипции, который увеличивает экспрессию SCN1A, содержит ДНК-связывающий домен. В некоторых вариантах осуществления фактор транскрипции, который увеличивает экспрессию SCN1A, содержит ДНК-связывающий домен и домен активации транскрипции. В некоторых вариантах осуществления ДНК-связывающий домен имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательности с ближайшим человеческим аналогом. В определенных вариантах осуществления ДНК-связывающий домен имеет по меньшей мере 90% идентичности последовательности с ближайшим человеческим аналогом. В определенных вариантах осуществления ДНК-связывающий домен и домен активации транскрипции имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности со своими ближайшими человеческими аналогами. В некоторых вариантах осуществления ДНК-связывающий домен и домен активации транскрипции имеют по меньшей мере 90% идентичности последовательности со своими ближайшими человеческими аналогами. В некоторых вариантах осуществления ДНК-связывающий домен содержит гидовую РНК и инактивированный нуклеазой белок Cas. В некоторых вариантах осуществления инактивированный нуклеазой белок Cas представляет собой инактивированный нуклеазой Cas9. В определенных вариантах осуществления ДНК-связывающий домен содержит домен цинкового пальца. В некоторых вариантах осуществления ДНК-связывающий домен содержит от шести до девяти доменов цинкового пальца. В определенных вариантах осуществления ДНК-связывающий домен содержит шесть цинковых пальцев. В некоторых вариантах осуществления ДНК-связывающий домен, содержащий шесть пальцев, связывается с областью генома, имеющей 18 нуклеотидов. В определенных вариантах осуществления ДНК-связывающий домен содержит девять цинковых пальцев. В некоторых вариантах осуществления ДНК-связывающий домен, содержащий девять цинковых пальцев, связывается с областью генома, имеющей 27 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления ДНК-связывающий домен содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 135, 371, 372 или 376. В некоторых вариантах осуществления ДНК-связывающий домен содержит последовательность, имеющую любую из SEQ ID NO: 135, 371, 372 или 376. В некоторых вариантах осуществления ДНК-связывающий домен

получен из человеческого EGR1 или человеческого EGR3. В некоторых вариантах осуществления домен активации транскрипции содержит последовательность VPR, VP64, CITED2 или CITED4 или их функциональный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления домен активации транскрипции содержит последовательность человеческого CITED2 или CITED4 или их функциональный фрагмент.

[0007] В некоторых вариантах осуществления экспрессионная кассета, кодирующая фактор транскрипции, который увеличивает экспрессию SCN1A, дополнительно содержит регуляторный элемент, который управляет экспрессией фактора транскрипции в PV-нейронах на более высоком уровне, чем в клетках других типов. В определенных вариантах осуществления регуляторный элемент содержит последовательность, имеющую любую из SEQ ID NO: 183, 184, 185 или 417. В определенных вариантах осуществления регуляторный элемент содержит последовательность, имеющую SEQ ID NO: 183 или 185.

[0008] В некоторых вариантах осуществления экспрессионная кассета, кодирующая фактор транскрипции, который увеличивает экспрессию SCN1A, является частью вирусного вектора. В определенных вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вирус AAV. В некоторых вариантах осуществления вирус AAV представляет собой вирус AAV9 или вирус scAAV9.

[0009] В другом аспекте изобретение относится к способу увеличения экспрессии SCN1A в клетке путем введения любой раскрытой в настоящем описании экспрессионной кассеты, которая кодирует фактор транскрипции, увеличивающий экспрессию SCN1A. В определенных вариантах осуществления клетка представляет собой PV-нейрон. В определенных вариантах осуществления клетка находится в организме субъекта. В определенных вариантах осуществления субъект является млекопитающим. В определенных вариантах осуществления субъект является человеком. В определенных вариантах осуществления повышенная экспрессия SCN1A способствует лечению заболевания, расстройства или симптома. В определенных вариантах осуществления расстройство представляет собой расстройство центральной нервной системы. В определенных вариантах осуществления расстройство представляет собой синдром Драве. В некоторых вариантах осуществления расстройство центральной нервной системы представляет собой гиперактивность нейронов. В определенных вариантах осуществления лечение расстройства центральной нервной системы включает снижение нейрональной гиперактивности. В некоторых вариантах осуществления симптом расстройства центральной нервной системы представляет собой судороги. В определенных вариантах осуществления лечение расстройства центральной нервной системы включает снижение частоты судорог. В определенных вариантах осуществления лечение расстройства центральной нервной системы включает уменьшение тяжести судорог. В определенных вариантах осуществления лечение расстройства центральной нервной системы включает уменьшение тяжести и частоты судорог.

[0010] В другом аспекте изобретение относится к экспрессионной кассете,

содержащей последовательность, кодирующую не встречающийся в природе фактор транскрипции, который увеличивает экспрессию гена GRN в клетке.

[0011] В некоторых вариантах осуществления фактор транскрипции, который увеличивает экспрессию GRN, связывается с областью генома, имеющей 18-27 нуклеотидов.

[0012] В некоторых вариантах осуществления фактор транскрипции, который увеличивает экспрессию GRN, содержит ДНК-связывающий домен. В некоторых вариантах осуществления фактор транскрипции, который увеличивает экспрессию GRN, содержит ДНК-связывающий домен и домен активации транскрипции. В некоторых вариантах осуществления ДНК-связывающий домен содержит гидовую РНК и инактивированный нуклеазой белок Cas. В некоторых вариантах осуществления инактивированный нуклеазой белок Cas представляет собой инактивированный нуклеазой Cas9. В определенных вариантах осуществления ДНК-связывающий домен содержит домен цинкового пальца. В некоторых вариантах осуществления ДНК-связывающий домен содержит от шести до девяти доменов цинкового пальца. В определенных вариантах осуществления ДНК-связывающий домен содержит шесть цинковых пальцев. В некоторых вариантах осуществления ДНК-связывающий домен, содержащий шесть цинковых пальцев, связывается с областью генома, имеющей 18 нуклеотидов. В определенных вариантах осуществления ДНК-связывающий домен содержит девять цинковых пальцев. В некоторых вариантах осуществления ДНК-связывающий домен, содержащий девять цинковых пальцев, связывается с геномной областью, имеющей 27 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления ДНК-связывающий домен содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 171 или 412-416. В некоторых вариантах осуществления ДНК-связывающий домен содержит последовательность, имеющую любую из SEQ ID NO: 171 или 412-416. В некоторых вариантах осуществления ДНК-связывающий домен получен из человеческого EGR1 или человеческого EGR3. В некоторых вариантах осуществления домен активации транскрипции содержит последовательность VPR, VP64, CITED2 или CITED4 или их функциональный фрагмент.

[0013] В некоторых вариантах осуществления экспрессионная кассета, кодирующая фактор транскрипции, который увеличивает экспрессию GRN, дополнительно содержит регуляторный элемент, который управляет экспрессией не встречающегося в природе модулятора транскрипции. В определенных вариантах осуществления регуляторный элемент представляет собой регуляторный элемент, селективный по отношению к типу клеток.

[0014] В некоторых вариантах осуществления экспрессионная кассета, кодирующая фактор транскрипции, который увеличивает экспрессию GRN, является частью вирусного вектора. В определенных вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вирус AAV. В некоторых вариантах осуществления вирус AAV представляет собой вирус AAV9 или вирус scAAV9.

[0015] В другом аспекте изобретение относится к способу увеличения экспрессии GRN в клетке путем введения любой экспрессионной кассеты, раскрытой в настоящем описании, которая кодирует фактор транскрипции, увеличивающий экспрессию GRN. В определенных вариантах осуществления повышенная экспрессия GRN способствует лечению заболевания, расстройства или симптома. В определенных вариантах осуществления клетка находится в организме субъекта. В определенных вариантах осуществления субъект является млекопитающим. В определенных вариантах осуществления субъект является человеком. В определенных вариантах осуществления клетку выбирают из группы, состоящей из клеток центральной нервной системы, клеток лобной коры, глиальных клеток, клеток микроглии и клеток стриатума. В определенных вариантах осуществления модуляция экспрессия GRN способствует лечению заболевания или расстройства. В определенных вариантах осуществления расстройство представляет собой расстройство центральной нервной системы. В некоторых вариантах осуществления расстройство представляет собой лобно-височную дегенерацию (FTD), болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера или атеросклероз. В некоторых вариантах осуществления симптом расстройства центральной нервной системы представляет собой наличие телец Леви, гаплоиндуцированность програнулина (GRN), социальный дефицит, лизосомную аномалию, потерю памяти, потерю координации движений или мышечный тремор. В определенных вариантах осуществления лечение расстройства центральной нервной системы включает уменьшение частоты мышечного тремора и/или уменьшение тяжести мышечного тремора.

[0016] В другом аспекте изобретение относится к экспрессионной кассете, кодирующей не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок, содержащий ДНК-связывающий домен или содержащий три или более ДНК-связывающих домена, причем ДНК-связывающий белок по меньшей мере 5-кратно увеличивает или подавляет экспрессию эндогенного гена, и причем ДНК-связывающий белок имеет 90% или более идентичности последовательности с ближайшим человеческим аналогом. В иллюстративных вариантах осуществления ДНК-связывающий домен содержит три или более доменов цинкового пальца.

[0017] В некоторых вариантах осуществления ДНК-связывающий белок, имеющий 90% или более идентичности последовательности со своим ближайшим человеческим аналогом, связывается с целевым участком генома человека, с которым человеческий белок-аналог не связывается в естественных условиях. В определенных вариантах осуществления человеческим аналогом является EGR1. В некоторых вариантах осуществления человеческим аналогом является EGR3. В некоторых вариантах осуществления ДНК-связывающий белок, имеющий 90% или более высокую идентичность последовательности со своим ближайшим человеческим аналогом, содержит по меньшей мере 6 доменов цинкового пальца. В некоторых вариантах осуществления ДНК-связывающий белок, имеющий 90% или более идентичности последовательности с ближайшим человеческим аналогом, содержит 9 доменов цинкового

пальца. В некоторых вариантах осуществления ДНК-связывающий домен, имеющий 90% или более идентичности последовательности со своим ближайшим человеческим аналогом, содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену в положении -1, 2, 3 или 6 спирали распознавания одного или более доменов цинкового пальца. В некоторых вариантах осуществления ДНК-связывающий белок, имеющий 90% или более идентичности последовательности со своим ближайшим человеческим аналогом, содержит один или более доменов цинкового пальца, полученных из EGR1 или EGR3.

[0018] В некоторых вариантах осуществления ДНК-связывающий белок, имеющий 90% или более идентичности последовательности со своим ближайшим человеческим аналогом, дополнительно содержит домен эффектора транскрипции. В некоторых вариантах осуществления домен эффектора транскрипции происходит от CITED2 или CITED4. В некоторых вариантах осуществления домен эффектора транскрипции расположен на С-конце ДНК-связывающего домена в ДНК-связывающем белке. В некоторых вариантах осуществления эффектора домен расположен на N-конце ДНК-связывающего домена в ДНК-связывающем белке. В некоторых вариантах осуществления ДНК-связывающий белок, имеющий 90% или более высокую идентичность последовательности со своим ближайшим человеческим аналогом, содержит домен эффектора, расположенный на N-конце ДНК-связывающего домена в ДНК-связывающем белке, и домен эффектора, расположенный на С-конце ДНК-связывающий домен в ДНК-связывающем белке.

[0019] В некоторых вариантах осуществления ДНК-связывающий белок, имеющий 90% или более идентичности последовательности со своим ближайшим человеческим аналогом, распознает целевой участок связывания размером 18 п.о. или более. В некоторых вариантах осуществления ДНК-связывающий белок, имеющий 90% или более идентичности последовательности с ближайшим человеческим аналогом, распознает целевой участок связывания размером 27 п.о.

[0020] В некоторых вариантах осуществления экспрессионная кассета, кодирующая ДНК-связывающий белок, имеющий 90% или более идентичности последовательности с ближайшим человеческим аналогом, дополнительно содержит регуляторный элемент, селективный по отношению к типу клеток. В некоторых вариантах осуществления экспрессионная кассета, кодирующая ДНК-связывающий белок, имеющий 90% или более идентичности последовательности с ближайшим человеческим аналогом, дополнительно содержит регуляторный элемент, который управляет экспрессией ДНК-связывающего белка в PV-нейронах на более высоком уровне, чем в клетках других типов. В определенных вариантах осуществления регуляторный элемент содержит последовательность, имеющую любую из SEQ ID NO: 183, 184, 185 или 417. В определенных вариантах осуществления регуляторный элемент содержит последовательность, имеющую SEQ ID NO: 183 или 185.

[0021] В некоторых вариантах осуществления экспрессионная кассета, кодирующая ДНК-связывающий белок, имеющий 90% или более идентичности

последовательности с ближайшим человеческим аналогом, находится в вирусном векторе. В определенных вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой AAV. В определенных вариантах осуществления AAV представляет собой AAV9 или scAAV9.

[0022] В другом аспекте изобретение относится к способу лечения заболевания или состояния, причем способ включает предоставление генной терапии, содержащей любую экспрессионную кассету, представленную в настоящем описании, кодирующую ДНК-связывающий белок, имеющий 90% или более идентичности последовательности со своим ближайшим человеческим аналогом. В некоторых вариантах осуществления ДНК-связывающий белок, имеющий 90% или более высокую идентичность последовательности со своим ближайшим человеческим аналогом, вызывает пониженный или минимальный иммунный ответ при экспрессии в клетке или *in vivo*. В определенных вариантах осуществления клетка находится в организме субъекта. В определенных вариантах осуществления субъект является млекопитающим. В определенных вариантах осуществления субъект является человеком. В некоторых вариантах осуществления ДНК-связывающий белок, имеющий 90% или более высокую идентичность последовательности со своим ближайшим человеческим аналогом, увеличивает экспрессию эндогенного SCN1A. В определенных вариантах осуществления клетка представляет собой PV-нейрон. В определенных вариантах осуществления повышенная экспрессия SCN1A способствует лечению заболевания, расстройства или симптома. В определенных вариантах осуществления расстройство представляет собой расстройство центральной нервной системы. В определенных вариантах осуществления расстройство представляет собой синдром Драве. В некоторых вариантах осуществления расстройство центральной нервной системы представляет собой гиперактивность нейронов. В определенных вариантах осуществления лечение расстройства центральной нервной системы включает снижение нейрональной гиперактивности. В некоторых вариантах осуществления симптом расстройства центральной нервной системы представляет собой судороги. В определенных вариантах осуществления лечение расстройства центральной нервной системы включает уменьшение частоты судорог. В определенных вариантах осуществления лечение расстройства центральной нервной системы включает уменьшение тяжести судорог. В определенных вариантах осуществления лечение расстройства центральной нервной системы включает уменьшение тяжести и частоты судорог. В некоторых вариантах осуществления ДНК-связывающий белок, имеющий 90% или более идентичности последовательности со своим ближайшим человеческим аналогом, увеличивает экспрессию эндогенного GRN. В определенных вариантах осуществления клетку выбирают из группы, состоящей из клеток центральной нервной системы, клеток лобной коры, глиальных клеток, клеток микроглии и клеток стриатума. В определенных вариантах осуществления модуляция экспрессия GRN способствует лечению заболевания или расстройства. В определенных вариантах осуществления расстройство представляет собой расстройство центральной нервной системы. В некоторых вариантах осуществления расстройство представляет собой лобно-височную

дегенерацию (FTD), болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера или атеросклероз. В некоторых вариантах осуществления симптом расстройства центральной нервной системы представляет собой наличие телец Леви, гаплоиндуцированность програнулина (ГРН), социальный дефицит, лизосомную аномалию, потерю памяти, потерю координации движений или мышечный тремор. В некоторых вариантах осуществления лечение расстройства центральной нервной системы включает снижение частоты мышечного тремора и/или снижение тяжести мышечного тремора.

ВКЛЮЧЕНИЕ ПУТЕМ ССЫЛКИ

[0023] Все публикации, патенты и патентные заявки, упомянутые в настоящем описании, включены в настоящее описание посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент или патентная заявка была специально и индивидуально указана как включенная посредством ссылки.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0024] Новые признаки изобретения более подробно изложены в прилагаемой формуле изобретения. Суть признаков и преимуществ, обеспечиваемых настоящим изобретением, более полно раскрыта в приведенном ниже подробном описании, в котором даны иллюстративные варианты осуществления изобретения, в которых используются принципы изобретения, с ссылкой на прилагаемые чертежи, на которых:

[0025] На фиг. 1 показано влияние различных регуляторных элементов на экспрессию люциферазы в 293Т-клетках, измеренную по нормализованной активности люциферазы. Например, комбинация с минимальным промотором CMV (minCMV) обеспечивала уровень экспрессии люциферазы примерно 1,4 раза выше, чем уровень экспрессии, обеспечиваемый только minCMV промотором, и примерно в 60 раз выше, чем уровень экспрессии, обеспечиваемый промотором SCP. В том же эксперименте, SEQ ID NO: 178, связанная с промотором minCMV обеспечивала уровень экспрессии люциферазы примерно в 3,5 раза выше, чем в случае только одного промотора minCMV и примерно в 140 раз выше, чем в случае промотора SCP.

[0026] На фиг. 2 показана нормализованная активность (вычисленная путем деления нормализованной активности люциферазы, показанной на фиг. 1, на длину регуляторного элемента в парах оснований) каждого регуляторного элемента.

[0027] На фиг. 3 показана селективная экспрессия eGFP под контролем ГАМК-селективных регуляторных элементов (RE), таких как RE, которые являются селективными по отношению к клеткам, содержащим парвальбумин (PV). Векторы AAVDJ, содержащие eGFP, под контролем либо промотора EF1 α , либо ГАМК/PV-селективного RE, такого как SEQ ID NO: 183, который включает SEQ ID NO: 185, или SEQ ID NO: 184, вводили мыши, экспрессирующей tdTomato (красный флуоресцентный белок (RFP)) в ГАМК/PV-клетках. Изображения в верхнем ряду показывают профили eGFP, экспрессированного из конструкции, содержащей промотор EF1 α (SEQ ID NO: 186), SEQ ID NO: 183, или SEQ ID NO: 184 ГАМК/PV-селективного RE. Изображения в нижнем ряду показывают ГАМК/PV-нейроны, которые являются GAD2-положительными.

Клетки, которые экспрессируют как eGFP, так и tdTomato, могут быть идентифицированы либо путем наложения изображений верхнего ряда на изображения нижнего ряда, либо путем определения флуоресценции из одного и того же места на изображениях верхнего и нижнего рядов. Примеры клеток, которые экспрессируют как eGFP, так и tdTomato, отмечены стрелками.

[0028] На фиг. 4 показана количественная оценка эффективности экспрессии eGFP ГАМК/PV-нейронами, показанными на в фиг. 3 (измеренная, например, в виде процента клеток, экспрессирующих tdTomato, которые также экспрессируют eGFP).

[0029] На фиг. 5 показана количественная оценка специфичности экспрессии eGFP ГАМК/PV-нейронами, показанными на фиг. 3 (измеренная, например, в процентах клеток, экспрессирующих eGFP, которые также экспрессируют tdTomato (или RFP)).

[0030] На фиг. 6 показана увеличенная экспрессия эндогенного SCN1A с помощью сконструированных факторов транскрипции, которые связываются с различными областями на хромосоме 2 (со ссылкой на GRCh38.p12). Данные представлены в виде кратного изменения экспрессии SCN1A относительно контрольного (EGFP-KASH) состояния.

[0031] На фиг. 7 показана относительная экспрессия SCN1A, представленная в виде кратного изменения относительно контроля eGFP в масштабе Log_{10} .

[0032] На фиг. 8 показана относительная экспрессия эндогенных транскриптов SCN1A, TTC21B, SCN9A, SNCA, GRN, UTRN и TTN, представленная в виде кратного изменения относительно контроля.

[0033] На фиг. 9A показан один из вариантов осуществления раскрытого в настоящем описании eTF, в котором ДНК-связывающий домен (DBD) природного человеческого фактора транскрипции (TF) изменен, перепрограммирован или модифицирован для узнавания целевого участка связывания в представляющем интерес целевом гене или около него. На верхнем чертеже показан встречающийся в природе (природный) фактор транскрипции, который не имеет сродства связывания с целевым участком (показан черной полосой), связанным с представляющим интерес эндогенным геном или целевым геном. На нижнем чертеже показан eTF, у которого DBD, содержащий несколько цинковых пальцев (показанных в виде цилиндров), модифицирован, сконструирован или перепрограммирован для связывания с целевым участком представляющего интерес гена, например, путем введения двух копий или трех копий цинковых пальцев природного DBD и/или путем замены аминокислот в цинковых пальцах.

[0034] На фиг. 9B показан другой вариант осуществления раскрытого в настоящем описании eTF, или гибридного eTF, содержащего DBD, полученный из природного человеческого TF, слитого с доменом трансактивации (TAD) человеческого корегуляторного белка или кофактора транскрипции, например, TAD белка-трансактиватора Cbp/p300 взаимодействия, такого как CITED2 или CITED4. На верхнем чертеже показан DBD, полученный из человеческого белка и сконструированный для

специфического связывания с требуемым целевым участком генома (черная полоса). На нижнем чертеже показан DBD, слитый с TAD, например TAD CITED2, с образованием гибридного eTF. Такой гибридный eTF управляет экспрессией целевого гена, связываясь с последовательностью целевого участка генома и рюя (например, активируя) транскрипцию целевого гена через TAD в eTF.

[0035] На фиг. 10 показан процент консервативности (или идентичность последовательности) между различными белками, рующими транскрипцию, и природным человеческим белком, и их размеры в парах оснований (п.о., bp). В различных вариантах осуществления eTF по изобретению могут кодироваться последовательностью нуклеиновой кислоты, имеющей 1000-1800 п.о., и содержать >90% глобальной идентичности последовательности (т.е. идентичности последовательности относительно полноразмерной аминокислотной последовательности eTF) с природным человеческим белком, которые могут снижать иммунный ответ или иммуногенность, если доставлены в клетку или *in vivo*, например, с помощью генной терапии. Для сравнения, факторы транскрипции dCas9, содержащие деактивированный домен Cas9 (dCas9), не имеют глобальной идентичности последовательностей с эндогенными человеческими белками и имеют больший размер. Сконструированные традиционными методами белки с цинковыми пальцами (ZFP) или искусственные или синтетические ДНК-связывающие белки, содержащие цинковые пальцы, созданные *in silico*, могут быть меньшего размера, но иметь более низкую идентичность последовательности (примерно 55%) с эндогенными человеческими белками.

[0036] На фиг. 11 показаны различные подходы для модуляции эндогенного гена. На верхнем чертеже белок-модулятор транскрипции содержит DBD, содержащий несколько синтетических цинковых пальцев (ZF), таких как ZF, созданные *in silico*, слитые с доменом трансаактивации (TAD) VP64. На втором чертеже TF дикого типа является природным TF, но не связывается с целевым участком представляющего интерес гена. На третьем чертеже eTF содержит природный TF, у которого DBD модифицирован или перепрограммирован для связывания с целевым участком размером 18 нуклеотидов, расположенным в представляющем интерес гене или рядом с ним, например, TF дикого типа, у которого DBD заменен синтетическим цинковым пальцем. На четвертом чертеже eTF получен из TF дикого типа, у которого DBD сконструирован таким образом, чтобы он распознавал целевой участок связывания длиной 9 нуклеотидов, расположенный в представляющем интерес гене или рядом с ним. На нижнем чертеже eTF получен из TF дикого типа, при этом DBD TF дикого типа продублирован и перепрограммирован (например, с помощью аминокислотных замен в ZF) с образованием DBD, содержащим 6 цинковых пальцев, который распознает целевой участок связывания длиной 18 нуклеотидов, расположенный в представляющем интерес гене или рядом с ним. Эти различные варианты осуществления eTF могут быть проанализированы с помощью анализа активации репортерного гена, в котором целевым геном является репортерный ген (например, EGFP). eTF на верхнем, третьем, четвертом и пятом чертежах

обеспечивают экспрессию репортерного гена.

[0037] На фиг. 12А показана схема анализа активации SCN1A, на которой экспрессия SCN1A в клетках HEK293 указывает на связывание с целевым специфическим для SCN1A участком связывания и активацию экспрессии гена SCN1A посредством eTF. На верхнем чертеже показан eTF, сконструированный для распознавания участка связывания TRE для репортерного гена EGFP, который не связывается с целевым SCN1A-связывающим участком и, следовательно, не может экспрессировать SCN1A. На нижнем чертеже показан eTF, полученный из природного человеческого белка, имеющего по меньшей мере 98% идентичности последовательности с человеческим белком, и DBD, сконструированного для связывания целевого участка связывания SCN1A длиной 18 нуклеотидов, обеспечивающий активацию гена SCN1A и, таким образом, экспрессию SCN1A.

[0038] На фиг. 12В приведена количественная оценка результатов анализа активации SCN1A приведенным в качестве примера eTF, который показан на фиг. 12А. ETF, содержащий шесть цинковых пальцев (SEQ ID NO: 6), имеющий высокую глобальную или общую идентичность последовательности с EGR1, и DBD которого сконструирован для распознавания специфического участка связывания, расположенного вблизи или в эндогенном гене SCN1A, обеспечивает 2,5-кратную экспрессию SCN1A в трансфицированных клетках HEK293 по сравнению с SEQ ID NO: 4, в которой DBD сконструирован для распознавания связывающего участка TRE, а не целевого связывающего участка SCN1A.

[0039] На фиг. 13А показаны схемы активации SCN1A двумя приведенными в качестве примера eTF, каждый из которых получен из природного человеческого белка. На верхнем чертеже показан eTF, в котором DBD природного человеческого белка (например, EGR1 или EGR3) дублирован образованием DBD, имеющего 6 цинковых пальцев, и модифицирован или перепрограммирован для связывания с целевым участком связывания, находящимся рядом или на эндогенном гене SCN1A. На нижнем чертеже показан eTF, который содержит три копии DBD встречающегося в природе человеческого белка с образованием DBD, имеющего 9 цинковых пальцев, и модифицирован или перепрограммирован для связывания с целевым участком связывания, находящимся рядом или на эндогенном гене SCN1A.

[0040] На фиг. 13В приведена количественная оценка относительной экспрессии SCN1A, активированной каждым из eTF, показанных на фиг. 13А. В трансфицированных клетках HEK293 eTF (SEQ ID NO: 7), который имеет высокую идентичность последовательности с EGR1 и содержит DBD с 6 цинковыми пальцами, получен из EGR1 и сконструирован для распознавания целевого связывающего участка SCN1A, что обеспечило примерно 7-кратное увеличение экспрессии SCN1A относительно пустого контрольного вектора. eTF (SEQ ID NO: 9), имеющий высокую идентичность последовательности с EGR1 и содержащий DBD с 9 цинковыми пальцами, получен из EGR1 и сконструирован для распознавания целевого связывающего участка SCN1A, что

обеспечило примерно 20-кратное увеличение экспрессии SCN1A относительно контроля.

[0041] На фиг. 14 показаны различные варианты гибридных eTF, содержащих человеческий DBD, имеющий высокую идентичность последовательности с природным человеческим белком, слитый с TAD другого белка, такого как вирусный домен активации, или TAD другого человеческого белка, такого как CITED2. В различных вариантах осуществления локальная идентичность последовательности между DBD eTF и DBD природного человеческого белка составляет по меньшей мере 85%. Такой DBD может быть слит с различными доменами активации, например вирусным доменом активации, таким как VP64, который имеет 0% идентичности последовательности с последовательностью человеческого белка; или доменом активации CITED2. Замена домена VP64 человеческой последовательностью человеческого CITED увеличивает общую идентичность последовательности гибридного eTF, приведенного в третьем ряду, по сравнению с природным человеческим белком.

[0042] На фиг. 15 показана относительная экспрессия эндогенного SCN1A в клетках HERK293, обусловленная SCN1A-специфическим активатором транскрипции (см. таблицы 33-34 в Примере 6). Данные представлены в виде кратного изменения относительно контрольных условий и показаны в масштабе Log_{10} .

[0043] На фиг. 16A показана относительная экспрессия эндогенного SCN1A в ГАМК нейронах, обусловленная SCN1A-специфическим активатором транскрипции (SEQ ID NO: 366). Данные представлены в виде кратного изменения относительно контрольных условий (CBA-EGFP).

[0044] На фиг. 16B показана относительная экспрессия эндогенного SCN1A в ГАМК-нейронах, обусловленная SCN1A-специфическим активатором транскрипции (SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 15). Данные представлены в виде кратного изменения относительно контрольных условий (CBA-EGFP) в масштабе Log_{10} .

[0045] На фиг. 17 показана относительная экспрессия эндогенного SCN1A и 40 ближайших соседних генов, обусловленная SCN1A-специфическим фактором транскрипции SEQ ID NO: 366). Данные представлены в виде кратного изменения относительно контрольных условий (CBA-EGFP-KASH) в масштабе Log_{10} .

[0046] На фиг. 18A и 18B показана экспрессия SCN1A-специфического активатора транскрипции *in vivo* по сравнению с контрольной экспрессионной кассетой, которая экспрессирует eGFP. На фиг. 18A показана относительная экспрессия гена SCN1A у мышей, которым инъецировали либо контрольную экспрессионную кассету eGFP, либо экспрессионную кассету A, содержащую активатор транскрипции, который связывается с целевым участком, что приводит к усилению экспрессии из эндогенного гена SCN1A. На фиг. 18B показано изменение экспрессии SCN1A в процентах от среднего значения eGFP. Эти эксперименты показали, что активатор транскрипции экспрессионной кассеты A приводит к примерно 20-30%-ному увеличению экспрессии SCN1A.

[0047] На фиг. 19A, 19B и 19C показана положительная регуляция эндогенного SCN1A в гиппокампе мышей дикого типа с использованием нескольких SCN1A-

специфичных факторов транскрипции. Фиг. 19А: Экспрессионная кассета А; Фиг. 19В: Экспрессионная кассета В; и фиг. 19С: Последовательности SEQ ID NO: 365 или 366. Факторы транскрипции SCN1A сравнивали с контрольным вектором (EGFP-KASH) и СВА-EGFP-KASH. Данные представлены в виде кратного изменения относительно условия EGFP-KASH.

[0048] На фиг. 20А, 20В, 20С, 20D и 20Е показано влияние на гипертермические судороги в мышинной модели синдрома Драве с использованием различных SCN1A-специфических факторов транскрипции по сравнению с контролем. P1 Scn1a +/- мышам вводили либо AAV9-EGFP, либо вектор AAV9, экспрессирующий SCN1A-специфический фактор транскрипции (SEQ ID NO: 305-309). P26-P28 мышей, которым вводили инфузию, анализировали на наличие вызванных гипертермией судорог, и регистрировали внутреннюю температуру, при которой у них возникали тоникоклонические судороги.

[0049] На фиг. 21А, 21В, 21С, 21D и 21Е показана выживаемость на мышинной модели синдрома Драве при различных условиях. На фиг. 21А показано сравнение между мышами дикого типа и Scn1a +/- мышами в анализе выживаемости. P1 Scn1a +/- мышам (N=53) и Scn1a ++ мышам (N=54) вводили PBS. Мышей ежедневно наблюдали в клетке, и регистрировали дату любого летального случая. Существовала значительная разница в выживаемости между Scn1a +/- и Scn1a ++ животными (P < 0,0001). На фиг. 21В-Е на мышинной модели синдрома Драве показано влияние на выживаемость среди мышей, получавших различные SCN1A-специфические факторы транскрипции, по сравнению с контролем. P1 Scn1a +/- мышам вводили либо PBS, либо вектор AAV9, экспрессирующий SCN1A-специфический фактор транскрипции (SEQ ID NO: 305-307 или 309). Мышей ежедневно наблюдали в клетках, и регистрировали дату любого летального случая.

[0050] На фиг. 22 показана относительная экспрессия мРНК Scn1A в различных тканях головного мозга после внутриваренхимной доставки вектора AAV9, кодирующего SCN1A-специфический фактор транскрипции (SEQ ID NO: 305), введенный двум яванским макакам в дозе $1,2 \times 10^{12}$ мкг/животное, причем уровень экспрессии нормализовали относительно двух необработанных контрольных животных. Всех животных умерщвляли через 28 дней после инъекции, и, используя образцы ткани, выполняли количественное определение мРНК Scn1A методом ПЦР Taqman. Данные представлены в виде нормализованного уровня экспрессии целевой мРНК в различных срезах ткани мозга. Аналогичные результаты зарегистрированы с другим набором праймеров/зондов, полученных из гена Scn1a.

[0051] На фиг. 23 показано увеличение транскрипции эндогенного GRN, обусловленное сконструированными факторами транскрипции, которые связываются с различными участками генома.

[0052] На фиг. 24А и 24В показаны эксперименты *in vitro* с различными экспрессионными кассетами, каждая из которых содержит активатор транскрипции GRN. На фиг. 24А показана относительная экспрессия програнулина, представленная в виде кратного изменения относительно контроля. На фиг. 24В показаны результаты анализа

ELISA различных активаторов транскрипции програнулина, представленного в виде hPGRN в супернатанте (нг/мл).

[0053] На фиг. 25 показана нормализованная люциферазная активность различных регуляторных элементов (RE) в отношении экспрессии люциферазы в клетках 293T. Например, регуляторный элемент SEQ ID NO: 178, функционально связанный с промотором minCMV, приводил к увеличению уровня экспрессии люциферазы примерно в 3,5 раза по сравнению с уповнем, обусловленным только промотором minCMV, и примерно в 140 раз по сравнению с уровнем, обусловленным промотором SCP.

[0054] На фиг. 26 показан уровень транскрипта PGRN, измеренный методом кПЦР (qPCR) в клетках HEK293, которые были трансфицированы плазмидами, экспрессирующими EGFP или GRN-специфический активатор (SEQ ID NO: 10, 16, 59, 60, 63, 64, 72, 73, 77, L или 342). Данные представлены в виде кратного изменения относительно контрольного условия.

[0055] На фиг. 27 показан уровень белка PGRN, измеренный с помощью ELISA, секретизируемого из клеток HEK293, которые были трансфицированы плазмидами, экспрессирующими либо EGFP, либо GRN-специфический активатор (SEQ ID NO: 10 или 16). Данные представлены в виде кратного изменения относительно контрольного условия.

[0056] На фиг. 28 показан уровень транскрипта PGRN, измеренный методом кПЦР, в ГАМК-нейронах, которые были трансфицированы вектором AAV (серотип AAV-DJ), экспрессирующим EGFP или GRN-специфический активатор (SEQ ID NO: 342) под управлением промотора CBA. Данные представлены в виде кратного изменения относительно контрольного условия.

[0057] На фиг. 29 показан уровень белка PGRN, измеренный с помощью ELISA, секретизируемого ГАМК-нейронами, которые были инфицированы низкими (0,5E11 копий на лунку) и высокими (2E11 копиями генома/лунка) дозами AAV вектора (серотип AAV-DJ), экспрессирующего либо EGFP, либо GRN-специфический активатор (SEQ ID NO: 342) под управлением промотора CBA. Данные представлены в виде кратного изменения относительно контрольного условия.

[0058] На фиг. 30 показаны уровни белка PGRN в плазме, измеренные в мкг/мл, у мышей, получивших различные дозы AAV9, содержащий экспрессионную кассету J или G, каждая из которых содержала активатор транскрипции GRN, по сравнению с PBS контролем.

[0059] На фиг. 31A приведена количественная оценка результатов анализа активации репортера (EGFP) с помощью различных eTF, выраженных в виде относительной экспрессии EGFP по сравнению с пустым контрольным вектором. Искусственный фактор транскрипции (SEQ ID NO: 51), содержащий сильный вирусный домен активации, обеспечивал 70-кратное увеличение относительной экспрессии EGFP. Немодифицированный человеческий фактор транскрипции EGR1 (SEQ ID NO: 1) не активировал репортерный ген относительно контроля (пустой вектор). ETF, полученный

из EGR1 (SEQ ID NO: 2), содержащий шесть сконструированных цинковых пальцев, обеспечивал 10-кратное увеличение экспрессии EGFP. eTF, полученный из EGR1 (SEQ ID NO: 3), содержащий три цинковых пальца с по меньшей мере одной или более аминокислотными заменами в цинковых пальцах, обеспечивал 3-кратное увеличение относительной экспрессии EGFP. Дублирование цинковых пальцев в пальцах EGR1 (SEQ ID NO: 4) приводит к 15-кратному увеличению относительной экспрессии EGFP.

[0060] На фиг. 31B показаны флуоресцентные микрофотографии (EGFP) анализа активации репортерного гена, количественно оцененные на фиг. 31A. Клетки, которые экспрессируют EGFP, имеют светло-серый цвет.

[0061] На фиг. 32 показаны различные варианты осуществления eTF, полученных из EGR3 и сконструированных для распознавания целевого участка связывания, которые обеспечивают экспрессию репортерного гена EGFP. eTF (SEQ ID NO: 12), содержащий шесть цинковых пальцев, полученных из белка EGR3 и созданных для распознавания участка связывания TRE, в анализе репортерного гена обеспечивал экспрессию EGFP аналогично eTF, полученному из EGR1 (SEQ ID NO: 51), содержащему TAD, полученный из VP64. Оба eTF приводили к высокому уровню экспрессии EGFP по сравнению с контролем, содержащим модифицированный человеческий DBD без домена активации (кодируемого SEQ ID NO: 187).

[0062] На фиг. 33A показаны схемы различных eTF, сконструированных для распознавания последовательности связывания TRE в анализе активации репортерного гена EGFP. На первом чертеже показан модифицированный человеческий DBD, сконструированный для распознавания участка связывания TRE, но в котором отсутствует домен активации (SEQ ID NO: 50), который не обеспечивает активацию экспрессии EGFP. На втором чертеже модифицированный человеческий DBD слит с вирусным доменом сильной активации VP64 (SEQ ID NO: 95), что обеспечило активацию экспрессии EGFP. На третьем и четвертом чертежах модифицированный человеческий DBD слит с человеческим доменом активации, либо CITED2 (SEQ ID NO: 96), либо CITED4 (SEQ ID NO: 97), оба из которых активируют экспрессию EGFP.

[0063] На фиг. 33B приведена количественная оценка относительной экспрессии EGFP для каждого eTF, показанного на фиг. 33A. SEQ ID NO: 50 обеспечивала такой же уровень экспрессии EGFP, что и контроль, содержащий только репортерный ген. eTF, имеющие последовательности SEQ ID NO: 51-53, каждый обеспечивал примерно 40, 15 и 10-кратное увеличение относительной экспрессии EGFP по сравнению с контролем, содержащим только репортерный ген, соответственно.

[0064] На фиг. 33C показаны флуоресцентные микрофотографии каждого eTF в анализе активации репортерного гена EGFP, проиллюстрированного на фиг. 33A, и количественном анализе на фиг. 33B.

[0065] На фиг. 34 суммированы различные варианты осуществления eTF с широким диапазоном транскрипционной активности (или относительной экспрессии, обеспечиваемой репортерным геном) и различной степенью идентичности

последовательности (или консервативности) с природными человеческими белками.

[0066] На фиг. 35А показана схема анализа Elispot для тестирования иммуногенности eTF, раскрытого в настоящем описании. Анализ Elispot используется для проверки способности Т-клеток, полученных от нормальных здоровых доноров, распознавать и реагировать на пептиды, предсказанные как иммуногенные. Т-клетки смешивают с антиген-презентирующими клетками (например, дендритными клетками или DC) с пулами пептидов, которые далее тестируют в лунках elispot. Если Т-клетки распознают пептиды как чужеродные, Т-клетки становятся активированными, пролиферируют и секретируют цитокины (такие как гамма-интерферон). После обработки окрашивающими реагентами можно подсчитать положительные пятна интерферона-гамма (IFN γ). Более высокое количество пятен относительно контроля (например, известного неиммуногенного пептида или только буфера) коррелирует с более высокой иммуногенностью.

[0067] На фиг. 35В показан пример результата elispot в увеличенном масштабе, демонстрирующий повышенную иммуногенность (правый круг) по сравнению с контролем (левый круг). IFN-гамма-положительные пятна показаны в виде черных пятен.

[0068] На фиг. 36 показан вектор, который содержит экспрессионную кассету, содержащую не встречающийся в природе модулятор транскрипции, который содержит ДНК-связывающий домен фактора транскрипции, функционально связанный с доменом активации VP64, для увеличения экспрессии гена SCN1A.

[0069] На фиг. 37 показан вектор AAV, содержащий экспрессионную кассету, которая содержит не встречающийся в природе модулятор транскрипции, такой как инактивированный нуклеазой домен dSaCa9, функционально связанный с доменом активации транскрипции VP64. Такая экспрессионная кассета также содержит гидовую РНК, которая экспрессируется трансгеном dSaCas9. Другие проиллюстрированные элементы включают сигнал ядерной локализации (NLS), промотор, ITR AAV, сигнал полиА и селективный маркер.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0070] В настоящем описании представлены сконструированные факторы транскрипции или eTF, которые не встречаются в природе и которые предназначены для связывания с целевым участком генома и для модуляции экспрессии представляющего интерес эндогенного гена. Такие eTF могут быть сконструированы с целью усиления или подавления экспрессии (экспрессии РНК и/или белка) представляющего интерес гена.

[0071] В одном из аспектов изобретение относится к eTF, которые способны усиливать экспрессию гена альфа-субъединицы потенциалзависимого натриевого канала типа I (SCN1A) и увеличивать экспрессию его соответствующего белкового продукта Nav1.1, и к способам их применения для лечения заболеваний или расстройств, связанных с недостатком Nav1.1, таких как, например, синдром Драве.

[0072] В другом аспекте изобретение относится к eTF, которые способны увеличивать экспрессию гена програнулина (GRN) и увеличивать экспрессию белка GRN,

и к способам их применения для лечения заболеваний или расстройств, связанных с дефицитом GRN, таких как, например, лобно-височная деменция (FTD).

[0073] В другом аспекте изобретение относится к eTF, имеющим высокий процент идентичности последовательности с человеческими белками, которые могут быть сконструированы для связывания с целевым участком генома и для модуляции экспрессии (увеличения или уменьшения) любого представляющего интерес гена, включая, например, SCN1A или GRN. Такие eTF обладают незначительной или вообще не имеют иммуногенности при введении субъекту или имеют пониженную иммуногенность по сравнению с eTF, имеющими более низкий процент идентичности с человеческими белками.

Определения

[0074] Используемые в настоящем описании формы единственного числа также подразумевают форму множественного числа, если из контекста в явном виде не следует иное. Кроме того, в той мере, в которой термины «включающий», «включает», «имеющий», «имеет», «с» или их варианты используются в подробном описании и/или формуле изобретения, такие термины следует понимать как относящиеся к открытому перечню, аналогично термину «содержащий».

[0075] Термин «примерно» или «приблизительно» означает, что конкретное значение, определенное специалистом в данной области техники, находится в пределах допустимого диапазона ошибок, который отчасти будет зависеть от способа измерения или определения этого значения, т.е. ограничений измерительной системы. Например, «примерно» может означать в пределах одного или нескольких стандартных отклонений в соответствии с практикой в данной области техники. Альтернативно, «примерно» может означать диапазон до 20%, до 15%, до 10%, до 5% или до 1% от заданного значения.

[0076] Термины «определение», «измерение», «оценка», «тестирование», «анализ» и их грамматические эквиваленты могут использоваться в настоящем описании взаимозаменяемо для обозначения любой формы измерения и включают определение, присутствует ли элемент или отсутствует (например, обнаружение). Эти термины могут включать как количественные, так и/или качественные определения. Оценка может быть относительной или абсолютной.

[0077] Термин «экспрессия» относится к процессу, посредством которого последовательность нуклеиновой кислоты или полинуклеотид транскрибируется с ДНК-матрицы (например, в мРНК или другой РНК-транскрипт), и/или процессу, посредством которого транскрибированная мРНК затем транслируется в пептиды, полипептиды или белки. Транскрипты и кодированные полипептиды могут в совокупности называться «генным продуктом». Если полинуклеотид получен из геномной ДНК, экспрессия может включать сплайсинг мРНК в эукариотической клетке.

[0078] Используемый в настоящем описании термин «функционально связанный», «функциональная связь» или его грамматические эквиваленты относятся к смежному расположению генетических элементов, например, промотора, энхансера,

последовательности полиаденилирования и т.д., при котором элементы находятся во взаимосвязи, позволяющей им действовать ожидаемым образом. Например, регуляторный элемент, который может содержать промоторную и/или энхансерную последовательности, функционально связан с кодирующей областью, если регуляторный элемент способствует инициации транскрипцию кодирующей последовательности. Между регуляторным элементом и кодирующей областью могут присутствовать промежуточные остатки, при условии сохранения этой функциональной взаимосвязи.

[0079] Используемый в настоящем описании термин «вектор» относится к макромолекуле или ассоциации макромолекул, которая включает или связана с полинуклеотидом и которая может использоваться для обеспечения доставки полинуклеотида в клетку. Примеры векторов включают плазмиды, вирусные векторы, липосомы и другие носители для доставки генов. Вектор обычно содержит генетические элементы, например регуляторные элементы, функционально связанные с геном для облегчения экспрессии гена в мишени.

[0080] Используемые в настоящем описании термины «экспрессионная кассета» и «кассета нуклеиновой кислоты» используются взаимозаменяемо для обозначения комбинации последовательностей или элементов нуклеиновой кислоты, которые экспрессируются вместе или функционально связаны для обеспечения экспрессии. В некоторых случаях экспрессионная кассета относится к комбинации регуляторных элементов и гена или генов, с которыми они функционально связаны для обеспечения экспрессии.

[0081] Термин «AAV» является аббревиатурой аденоассоциированного вируса и может использоваться для обозначения самого вируса или его производного. Термин охватывает все серотипы, подтипы, а также природные и рекомбинантные формы, если не указано иное. Аббревиатура «rAAV» относится к рекомбинантному аденоассоциированному вирусу, также называемому вектором рекомбинантного AAV (или «вектором rAAV»). Термин «AAV» включает AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, rh10 и их гибриды, птичий AAV, бычий AAV, псовый AAV, лошадиный AAV, AAV приматов, AAV неприматов и овечий AAV. Геномные последовательности различных серотипов AAV, а также последовательности нативных концевых повторов (TR), белков Rep и субъединиц капсида известны в данной области. Такие последовательности можно найти в литературе или в открытых базах данных, таких как GenBank. Используемый в настоящем описании термин «вектор rAAV» относится к вектору AAV, содержащему полинуклеотидную последовательность, источником которой не является AAV (т.е. полинуклеотид, гетерологичный AAV), обычно к представляющей интерес последовательности, предназначенной для генетической трансформации клетки. Как правило, гетерологичный полинуклеотид фланкирован по меньшей мере одной и, обычно, двумя последовательностями инвертированных концевых повторов AAV (ITR). Вектор rAAV может быть одноцепочечным (ssAAV) или самокомплементарным (scAAV). «Вирус

AAV» или «вирусная частица AAV» относится к вирусной частице, состоящей из по меньшей мере одного капсидного белка AAV и инкапсулированного полинуклеотидного вектора гAAV. Если частица содержит гетерологичный полинуклеотид (т.е. полинуклеотид, отличный от генома AAV дикого типа, такой как трансген, который должен быть доставлен в клетку млекопитающего), его обычно называют «векторной частицей гAAV» или просто «частицей гAAV». Таким образом, получение частицы гAAV обязательно включает получение вектора гAAV, поскольку такой вектор содержится в частице гAAV.

[0082] Используемые в настоящем описании термины «лечить», «лечение», «терапия» и т.п. относятся к облегчению, задержке или замедлению прогрессирующего, к профилактике, ослаблению, уменьшению эффектов или симптомов, к предотвращению проявления, подавлению или ослаблению проявления заболевания или расстройства. Способы по настоящему изобретению могут применяться к любому млекопитающему. Типичные млекопитающие включают, без ограничения, крыс, кошек, собак, лошадей, коров, овец, свиней и более предпочтительно людей. Терапевтическая польза включает ликвидацию или ослабление основного заболевания, подвергнутого лечению. Кроме того, терапевтическая польза достигается путем устранения или ослабления одного или более физиологических симптомов, связанных с основным расстройством, в результате чего у субъекта наблюдается улучшение несмотря на то, что субъект все еще может быть поражен основным расстройством. В некоторых случаях с целью профилактики субъекту, подверженному риску развития конкретного заболевания, или субъекту, сообщившему об одном или более физиологических симптомах заболевания, даже если это заболевание может быть не диагностировано, может быть назначено терапевтическое средство. Способы по настоящему изобретению могут применяться к любому млекопитающему. В некоторых случаях лечение может привести к ослаблению или купированию симптомов (например, уменьшению частоты, продолжительности и/или тяжести судорог). Профилактический эффект включает задержку или устранение проявления заболевания или состояния, задержку или устранение появления симптомов заболевания или состояния, замедление, остановку или купирование прогрессирующего заболевания или состояния или любую их комбинацию.

[0083] Термин «эффективное количество» или «терапевтически эффективное количество» относится к такому количеству композиции, раскрытой в настоящем описании, которое является достаточным для оказания воздействия на предполагаемое применение, включая, без ограничения, лечение заболевания, как определено ниже. Терапевтически эффективное количество может меняться в зависимости от предполагаемого применения лечения (*in vivo*) или субъекта и болезненного состояния, подвергнутого лечению, например, от веса и возраста субъекта, тяжести болезненного состояния, способа введения и т.п., и может быть легко определено специалистом в данной области. Термин также применяется к дозе, которая должна вызывать определенный ответ в клетке-мишени. Конкретная доза будет меняться в зависимости от

конкретной выбранной композиции, режима дозирования, которому необходимо следовать, независимо от того, вводится ли она в комбинации с другими соединениями, от времени введения, ткани, в которую она вводится, и физической системы доставки, спомощью которой она переносится.

[0084] «Фрагмент» нуклеотидной или пептидной последовательности относится к последовательности, которая является более короткой, чем эталонная или «полноразмерная» последовательность.

[0085] «Вариант» молекулы относится к аллельным вариантам таких последовательностей, т.е. к последовательности, которая по существу имеет структуру и биологическую активность, аналогичную либо всей молекуле, либо ее фрагменту.

[0086] «Функциональный фрагмент» последовательности ДНК или белка относится к фрагменту, который сохраняет биологическую активность (функциональную или структурную), по существу аналогичную биологической активности полноразмерной последовательности ДНК или белка. Биологическая активность последовательности ДНК может заключаться в ее способности влиять на экспрессию способом, который, как известно, присущ полноразмерной последовательности.

[0087] Термины «субъект» и «индивидуум» используются в настоящем описании взаимозаменяемо для обозначения позвоночного животного, предпочтительно млекопитающего, более предпочтительно человека. Способы, раскрытые в настоящем описании, могут быть полезны для применения в терапии человека, применения в ветеринарии и/или доклинических исследованиях на животных моделях заболевания или состояния.

[0088] Термин «*in vivo*» относится к событию, которое происходит в организме субъекта.

[0089] Термин «*in vitro*» относится к событию, которое происходит вне организма субъекта. Например, анализ *in vitro* охватывает любой анализ, проводимый вне организма субъекта. Анализы *in vitro* охватывают клеточные анализы, в которых используются живые или мертвые клетки. Анализы *in vitro* также охватывают бесклеточный анализ, в котором не используются интактные клетки.

[0090] Как правило, «идентичность последовательности» или «гомология последовательности», которые могут использоваться взаимозаменяемо, относится к точному соответствию нуклеотидов или аминокислот между двумя полинуклеотидными или полипептидными последовательностями, соответственно. Как правило, способы определения идентичности последовательности включают сравнение двух нуклеотидных или аминокислотных последовательностей и определение процента их идентичности. Сравнения последовательностей, например для оценки идентичности, могут выполняться с помощью любого подходящего алгоритма выравнивания, включая, без ограничения, алгоритм Нидлмана-Вунша (см., например, алгоритм выравнивание Нидлмана EMBOSS, доступный по адресу: www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/, необязательно с настройками по умолчанию), алгоритм BLAST (см., например, инструмент выравнивания

BLAST, доступный по адресу: blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi, необязательно с настройками по умолчанию) и алгоритм Смита-Ватермана (см., например, алгоритм выравнивания EMBOSS Water, доступный по адресу: www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_water/, необязательно с настройками по умолчанию). Оптимальное выравнивание может быть оценено с помощью любых подходящих параметров выбранного алгоритма, включая параметры по умолчанию. «Процент идентичности», также называемый «процент гомологии», между двумя последовательностями может быть рассчитан в виде количества точных совпадений между двумя оптимально выровненными последовательностями, деленного на длину эталонной последовательности и умноженного на 100. Процент идентичности также может быть определен, например, путем сравнения информации о последовательности с помощью усовершенствованной компьютерной программы BLAST, включая версию 2.2.9, доступную в Национальных институтах здравоохранения. Программа BLAST основана на методе выравнивания Karlin и Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268 (1990) и обсуждается Altschul, et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990); Karlin and Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877 (1993); и Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 (1997). Вкратце, программа BLAST определяет идентичность в виде количества идентичных выровненных символов (т.е. нуклеотидов или аминокислот), деленного на общее количество символов в более короткой из двух последовательностей. Программа может использоваться для определения процента идентичности по всей длине сравниваемых последовательностей. Параметры по умолчанию даны для оптимизации поиска с короткими запрашиваемыми (искомыми) последовательностями, например, с помощью программы blastp. Программа также позволяет использовать фильтр SEG для маскировки сегментов запрашиваемых последовательностей, определенных программой SEG Wootton and Federhen, Computers and Chemistry 17:149-163 (1993). Высокая идентичность последовательности обычно включает диапазоны идентичности последовательности, составляющие приблизительно от 80% до 100% и целочисленные значения между ними.

[0091] Используемый в настоящем описании термин «сконструированный» в отношении белка относится к не встречающемуся в природе белку, включая, без ограничения, белок, полученный из природного белка, или к природному белку, который был модифицирован или перепрограммирован с целью придания ему определенного свойства.

[0092] В контексте настоящего описания, «синтетический» и «искусственный» используются взаимозаменяемо для обозначения белка или его домена, который имеет низкую идентичность последовательности (например, менее 50% идентичности последовательности) с последовательностью природного человеческого белка. Например, домены VPR и VP64 являются синтетическими доменами транскрипции.

[0093] Используемый в настоящем описании термин «сконструированный фактор транскрипции» или «eTF» относится к не встречающемуся в природе ДНК-

связывающему белку или не встречающемуся в природе модулятору транскрипции, который был модифицирован или перепрограммирован таким образом, чтобы он связывался с конкретным целевым участком связывания и/или включал модифицированный или замененный домен эффектора транскрипции.

[0094] Используемый в настоящем описании термин «ДНК-связывающий домен» может использоваться для обозначения одного или более ДНК-связывающих мотивов, таких как цинковый палец или основной мотив спираль-петля-спираль (bHLH), отдельно или в комбинации, в виде части ДНК-связывающего белка.

[0095] Термины «домен активации транскрипции», «домен транскрипционной активации», «домен трансаktivации», «трансаktivирующий домен» и «TAD» используются в настоящем описании взаимозаменяемо и относятся к домену белка, который в сочетании с ДНК-связывающим доменом может активировать транскрипцию, начиная с промотора, через взаимодействие с механизмом транскрипции (например, общими факторами транскрипции и/или РНК-полимеразой) либо непосредственно, либо опосредованно через другие белки, известные как ко-активаторы.

[0096] Термины «домен транскрипционного репрессора», «домен репрессора транскрипции» и «TRD» используются в настоящем описании взаимозаменяемо и относятся к домену белка, который в сочетании с ДНК-связывающим доменом может репрессировать транскрипцию, начиная с промотора, через взаимодействие с механизмом транскрипции (например, общими факторами транскрипции и/или РНК-полимеразой) либо непосредственно, либо опосредованно через другие белки, известные как корепрессоры.

[0097] Термин «GRCh38.p12» относится к эталонному консорциуму Genome Reference Human Build 38 версии 12 (GRCh38.p12), имеющему номер доступа в GenBank GCA_000001405.27 от 21.12.2017.

[0098] Если не указано иное, все используемые в настоящем описании термины имеют то же значение, в каком их обычно понимают специалисты в данной области техники, и в случае практической реализации настоящего изобретения как правило используются обычные методы молекулярной биологии, микробиологии и технологии рекомбинантных ДНК, которые известны специалистам в данной области.

Сконструированные факторы транскрипции (eTF)

[0099] Факторы транскрипции (TF) представляют собой белки, которые связываются с определенными последовательностями генома и контролируют экспрессию генов. Сконструированные факторы транскрипции или eTF, представленные в настоящем описании, представляют собой не встречающиеся в природе белки, которые содержат ДНК-связывающий домен (DBD) и по меньшей мере один домен, который является модулятором транскрипции, например, либо домен активации транскрипции (TAD), либо домен репрессора транскрипции (TRD). В одном из вариантов осуществления eTF может содержать DBD и TAD (например, TAD-DBD или DBD-TAD), причем DBD и TAD могут быть получены из одного и того же белка или из разных белков. В другом

варианте осуществления eTF может содержать DBD и два TAD, где DBD и TAD получены из одного и того же белка; DBD получен из первого белка, а оба TAD получены из второго белка; DBD и один TAD получены из первого белка, а второй TAD получен из второго белка; или DBD получен из первого белка, один TAD получен из второго белка, а второй TAD получен из третьего белка (например, TAD1-DBD-TAD1 или TAD1-DBD-TAD2). В одном из вариантов осуществления eTF может содержать DBD и TRD (например, TRD-DBD или DBD-TRD), где DBD и TRD могут быть получены из одного и того же белка или из разных белков. В другом варианте осуществления eTF может содержать DBD и два TRD, где DBD и TRD получены из одного и того же белка; DBD получен из первого белка, а оба TRD получены из второго белка; DBD и один TRD получены из первого белка, а второй TRD получен из второго белка; или DBD получен из первого белка, один TRD получен из второго белка, а второй TRD получен из третьего белка (например, TRD1-DBD-TRD1 или TRD1-DBD-TRD2). В определенных вариантах осуществления DBD может представлять собой синтетическую конструкцию, которая содержит домены из нескольких белков.

[0100] В некоторых вариантах осуществления DBD и TAD могут быть конъюгированы непосредственно, например, без промежуточной аминокислотной последовательности. В других вариантах осуществления DBD и TAD могут быть конъюгированы через пептидный линкер. В некоторых вариантах осуществления DBD конъюгирован с TAD через линкер, имеющий 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 90 или 100 аминокислот, или 1-5, 1-10, 1-20, 1-30, 1-40, 1-50, 1-75, 1-100, 5-10, 5-20, 5-30, 5-40, 5-50, 5-75, 5-100, 10-20, 10-30, 10-40, 10-50, 10-75, 10-100, 20-30, 20-40, 20-50, 20-75 или 20-100 аминокислот. В некоторых случаях DBD и TAD конъюгированы через природные промежуточные остатки, присутствующие в природных белках, из которых получены домены. В других вариантах осуществления DBD и TAD конъюгированы через синтетическую или экзогенную линкерную последовательность. Подходящие линкеры могут быть гибкими, расщепляемыми, нерасщепляемыми, гидрофильными и/или гидрофобными. В некоторых вариантах осуществления DBD и TAD могут быть слиты вместе через линкер, содержащий несколько остатков глицина и/или серина. Примеры глицин/сериновых пептидных линкеров включают $[GS]_n$, $[GGGS]_n$ (SEQ ID NO: 436), $[GGGGS]_n$ (SEQ ID NO: 437), $[GGSG]_n$ (SEQ ID NO: 438), где n представляет собой целое число, равное 1 или более. В некоторых вариантах осуществления линкер, используемый для конъюгации DBD и TAD, представляет собой GGSGGGSG (SEQ ID NO: 410). В некоторых вариантах осуществления, когда DBD конъюгирован с двумя TAD, первый и второй TAD могут быть конъюгированы с DBD через одинаковые или разные линкеры, или один TAD может быть конъюгирован с DBD через линкер, а другой TAD может быть конъюгирован непосредственно с DBD (например, без промежуточной линкерной последовательности), или оба TAD могут быть конъюгированы непосредственно с DBD (например, без промежуточных

линкерных последовательностей).

[0101] Представленные в настоящем описании eTF обладают свойствами, отличными от свойств встречающихся в природе факторов транскрипции. В некоторых вариантах осуществления eTF, представленный в настоящем описании, содержит DBD, полученный из природного белка, который был модифицирован таким образом, чтобы DBD связывался с другим целевым участком по сравнению с природным белком, из которого он был получен, причем eTF, содержащий такой модифицированный DBD, рует экспрессию из другого гена по сравнению с природным белком, из которого был получен DBD, и/или eTF, содержащий такой модифицированный DBD, по-другому рует экспрессию целевого гена (например, увеличивает или уменьшает) по сравнению с природным белком, из которого был получен DBD. В других вариантах осуществления eTF, представленный в настоящем описании, содержит TAD, полученный из природного белка, который был модифицирован таким образом, чтобы eTF, содержащий такой модифицированный TAD, модулировал экспрессию из другого гена по сравнению с природным белком, из которого был получен TAD, и/или eTF, содержащий такой модифицированный TAD, по-другому модулировал экспрессию целевого гена (например, увеличивал или уменьшал) по сравнению с природным белком, из которого получен TAD. В определенных вариантах осуществления eTF, представленный в настоящем описании, содержит DBD, полученный из природного белка, и TAD, полученный из природного белка (из одного и того же или разных белков), причем оба DBD и TAD были модифицированы. В таких вариантах осуществления DBD может связываться с другим целевым участком по сравнению с природным белком, из которого он был получен, и eTF, содержащий такие модифицированные DBD и TAD, модулирует экспрессию из другого гена по сравнению с природными белками, из которых были получены эти домены, и/или eTF, содержащий такие модифицированные DBD и TAD, по-другому модулирует экспрессию целевого гена (например, повышает или уменьшает) по сравнению с природными белками, из которых были получены домены DBD и TAD.

ДНК-связывающие домены (DBD)

[0102] Представленные в настоящем описании eTF могут содержать любой подходящий DBD, который связывается с представляющим интерес целевым участком. В некоторых вариантах осуществления DBD может быть синтетически созданным DBD. В других вариантах осуществления DBD может быть получен из природного белка. Семейства DBD включают базовую спираль-петля-спираль (bHLH) (например, c-Myc), базовую лейциновую молнию (например, C/EBP), спираль-поворот-спираль (например, Oct-1) и цинковые пальцы (например, EGR3). Эти семейства обладают широким спектром ДНК-связывающих специфичностей и целевых генов. Предполагается, что любой из известных человеческих белков, факторов транскрипции, может служить в качестве исходного белка для конструирования и/или перепрограммирования DBD для обеспечения возможности распознавания им специфического целевого участка, приводя к модуляции

экспрессии представляющего интерес эндогенного гена. В иллюстративных вариантах осуществления DBD, представленный в настоящем описании, содержит домен цинкового пальца, TALEN-связывающий домен или комплекс гРНК/Cas.

[0103] DBD, представленный в настоящем описании, может быть предназначен для распознавания любого представляющего интерес целевого участка. В иллюстративных вариантах осуществления DBD сконструирован таким образом, чтобы он мог распознавать целевой участок, который способен модулировать (например, повышать или уменьшать) экспрессию представляющего интерес гена, когда связан с eTF. В иллюстративных вариантах осуществления DBD предназначен для распознавания местоположения в геноме и модуляции экспрессии эндогенного гена, когда связан с eTF. Участки связывания, способные модулировать экспрессию представляющего интерес эндогенного гена, когда связаны с eTF, могут быть расположены в любом месте генома, обеспечивая модуляцию экспрессии целевого гена. В различных вариантах осуществления участок связывания может быть расположен на другой хромосоме, отличной от той, на которой расположен представляющий интерес ген, либо на той же хромосоме, что и представляющий интерес ген, перед участком начала транскрипции (TSS) представляющего интерес гена, ниже TSS представляющего интерес гена, вблизи от TSS представляющего интерес гена, удаленно от представляющего интерес гена, внутри кодирующей области представляющего интерес гена, внутри интрона представляющего интерес гена, ниже хвоста полиА представляющего интерес гена, в промоторной последовательности, которая регулирует представляющий интерес ген, в энхансерной последовательности, которая регулирует представляющий интерес ген, или в последовательности репрессора, которая регулирует представляющий интерес ген.

[0104] DBD может быть сконструирован с возможностью связываться с целевым участком связывания любой длины, при условии, что он обеспечивает специфическое распознавание последовательности целевого участка связывания DBD, например, с минимальным уровнем связывания или отсутствия связывания с нецелевым участком. В некоторых вариантах осуществления целевой участок связывания может модулировать экспрессию представляющего интерес эндогенного гена при связывании с eTF на уровне, который по меньшей мере в 2 раза, 5 раз, 10 раз, 20 раз, 50 раз, 75 раз, 100 раз, 150 раз, 200 раз, 250 раз, 500 раз или более выше по сравнению со всеми другими генами. В некоторых вариантах осуществления целевой участок связывания может модулировать экспрессию представляющего интерес эндогенного гена при связывании с eTF на уровне, превышающем по меньшей мере в 2 раза, 5 раз, 10 раз, 20 раз, 50 раз, 75 раз, 100 раз, 150 раз, 200 раз, 250 раз, 500 раз или более уровень связывания с 40 ближайшими соседними генами (например, 40 генами, расположенными ближе всего на хромосоме, выше или ниже, кодирующей последовательности представляющего интерес гена). В определенных вариантах осуществления целевой участок связывания может составлять, по меньшей мере, 5

п.о., 10 п.о., 15 п.о., 20 п.о., 25 п.о., 35 п.о., 40 п.о., 45 п.о. или 50 п.о. или более. Конкретная длина участка связывания будет зависеть от типа DBD в eTF. Как правило, чем длиннее участок связывания, тем выше специфичность связывания и модуляция экспрессии генов (например, более длинные участки связывания имеют меньше нецелевых эффектов). В некоторых вариантах осуществления eTF, имеющий DBD, распознающий более длинный целевой участок связывания, имеет меньше нецелевых эффектов, связанных с неспецифическим связыванием (таких как, например, модуляция экспрессии нецелевого гена или гена, отличного от представляющего интерес гена) относительно нецелевых эффектов, наблюдаемых с eTF, имеющим DBD, который связывается с более коротким целевым участком. В некоторых случаях уровень нецелевого связывания уменьшается по меньшей мере в 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 раз по сравнению со сравнимым eTF, имеющим DBD, распознающим более короткий целевой участок связывания.

[0105] В некоторых вариантах осуществления изобретения DBD, представленный в настоящем описании, может быть модифицирован таким образом, чтобы он имел увеличенное сродство связывания с тем, чтобы он находился связанным с целевым участком связывания более длительное время, чтобы TAD, конъюгированный с DBD, был способен рекрутировать больше факторов транскрипции и/или рекрутировать такой фактор транскрипции на более длительный промежуток времени для оказания более сильного влияния на уровень экспрессии представляющего интерес эндогенного гена. В некоторых вариантах осуществления eTF может быть сконструирован так, чтобы DBD стабильно связывался с целевым участком связывания и блокировал транскрипцию или механизм транскрипции, необходимый для экспрессии эндогенного гена. В некоторых вариантах осуществления DBD может быть модифицирован с целью увеличения его специфического связывания (или связывания с мишенью) с требуемым целевым участком и/или модифицирован с целью уменьшения его неспецифического или нецелевого связывания.

[0106] В различных вариантах осуществления связывание между DBD или eTF и целевым участком связывания может быть определено различными способами. В некоторых вариантах осуществления специфическое связывание между DBD или eTF и целевым участком связывания может быть определено с помощью анализа сдвига подвижности, анализа защиты ДНКазы или любого другого метода *in vitro*, известного в данной области для анализа связывания белок-ДНК. В других вариантах осуществления специфическое связывание между eTF и целевым участком связывания может быть определено с помощью функционального анализа, например, путем измерения экспрессии (РНК или белка) гена, когда целевой участок связывания связан с eTF. Например, целевой участок связывания может быть расположен в векторе, содержащемся в клетке или интегрированном в геном клетки, которая экспрессирует eTF, выше репортерного гена (такого как, например, eGFP) или

представляющего интерес целевого гена. Более высокие уровни экспрессии репортерного гена (или представляющего интерес целевого гена) в присутствии eTF по сравнению с контролем (например, без eTF или с eTF, который распознает другой целевой участок) указывают на то, что DBD eTF связывается с целевым участком. Подходящие *in vitro* (например, не основанные на клетках) системы транскрипции и трансляции также могут быть использованы аналогичным образом. В некоторых вариантах осуществления eTF, который связывается с целевым участком, может обеспечивать уровень экспрессии представляющего интерес репортерного гена или целевого гена, который по меньшей мере в 2 раза, 3 раза, 5 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 30 раз, 50 раз, 75 раз, 100 раз, 150 раз или более выше по сравнению с контролем (например, без eTF или с eTF, которое распознает другой целевой участок).

[0107] В других вариантах осуществления eTF, представленный в настоящем документе, может содержать DBD белка с цинковыми пальцами, полученный из белка с цинковыми пальцами, или который представляет собой инактивированный нуклеазой белок с цинковыми пальцами. Цинковый палец - это небольшой структурный мотив белка, который характеризуется координацией одного или более ионов цинка (Zn^{2+}) для стабилизации складки. Домены цинкового пальца (Znf) представляют собой относительно небольшие белковые мотивы, которые содержат множество пальцеобразных выступов, создающих тандемные контакты с целевым участком ДНК. Модульная природа мотива цинкового пальца позволяет связывать большое количество комбинаций последовательностей ДНК с высокой степенью сродства и специфичности и поэтому идеально подходит для конструирования белка, который может быть нацелен на специфические последовательности ДНК и связываться с ними. Многие сконструированные массивы цинковых пальцев основаны на домене цинкового пальца фактора транскрипции мыши *Zif268*. *Zif268* имеет три отдельных мотива цинковых пальцев, которые в совокупности связывают последовательность из 9 п.о. с высоким сродством. Было идентифицировано большое разнообразие белков с цинковыми пальцами, которые характеризуются различными структурными типами, как описано ниже. Любой такой белок с цинковыми пальцами полезен в контексте представленного в настоящем описании DBD.

[0108] Существуют различные методы конструирования белков с цинковыми пальцами. Например, описаны способы конструирования белков с цинковыми пальцами для связывания с представляющей интерес целевой ДНК последовательностью, см., например, Liu Q, et al., Design of polydactyl zinc-finger proteins for unique addressing within complex genome, *Proc Natl Acad Sci USA*, 94(11):5525-30 (1997); Wright DA et al., Standardized reagents and protocols for engineering zinc finger nucleases by modular assembly, *Nat Protoc*. *Nat Protoc*. 2006; 1(3):1637-52; и CA Gersbach и T Gaj, Synthetic Zinc Finger Proteins: The advance of Targeted Gene Regulation and Genome Modification Technologies, *Am Chem Soc* 47:2309-2318 (2014). Кроме того, доступны различные веб-инструменты для конструирования белков с цинковыми пальцами для связывания с представляющей

интерес целевой ДНК последовательностью, см., например, веб-сайт OmicX, посвященный программным средствам по разработке цинкового пальца нуклеаз и анализу данных сконструированного генома, который доступен по интернет-адресу: omictools.com/zfns-category; и веб-сайт Zinc Finger Tools от Scripps, доступный по интернет-адресу scripps.edu/barbas/zfdesign/zfdesignhome.php. Также имеются различные коммерчески доступные услуги по разработке белков с цинковыми пальцами для связывания с представляющей интерес целевой ДНК последовательностью, см., например, коммерчески доступные услуги или наборы, предлагаемые Creative Biolabs (интернет-адресу: creative-biolabs.com/Design-and-Synthesis-of-Artificial-Zinc-Finger-Proteins.html), набор Zinc Finger Consortium Modular Assembly Kit компании Addgene (интернет-адрес: addgene.org/kits/zfc-modular-assembly/) или пакет услуг CompoZr Custom ZFN от компании Sigma Aldrich (интернет-адрес: sigmaaldrich.com/life-science/zinc-finger-nuclease-technology/custom-zfn.html).

[0109] В определенных вариантах осуществления eTF, представленные в настоящем описании, содержат DBD, содержащий один или более цинковых пальцев, или полученный из DBD белка с цинковыми пальцами. В некоторых случаях DBD содержит несколько цинковых пальцев, причем каждый цинковый палец связан с другим цинковым пальцем или другим доменом либо на N-конце, либо на C-конце, либо на обоих концах через аминокислотный линкер. В некоторых случаях DBD, представленный в настоящем описании, содержит один или более цинковых пальцев одного или более типов цинковых пальцев, представленных в таблице 5. В некоторых случаях DBD, представленный в настоящем описании, содержит несколько структур или мотивов цинковых пальцев или несколько цинковых пальцев, имеющих одну или более из SEQ ID NO: 115-130 или 141-164, или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления DBD содержит X-[ZF-X]_n и/или [X-ZF]_n-X, где ZF представляет собой домен цинкового пальца, имеющий любой из мотивов, перечисленных в таблице 5 (например, любой из SEQ ID NO: 39-49), X представляет собой аминокислотный линкер, содержащий 1-50 аминокислот, и n представляет собой целое число от 1 до 15, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15, где каждый ZF может независимо иметь одну и ту же последовательность или последовательность, отличную от последовательностей других ZF в DBD, и где каждый линкер X может независимо иметь одну и ту же последовательность или последовательность, отличную от последовательностей других X в DBD. Каждый цинковый палец может быть связан с другой последовательностью, цинковым пальцем или доменом на C-конце, N-конце или обоих концах. Все линкеры X в DBD могут иметь идентичные последовательности, длину и/или свойства (например, гибкость или заряд) или могут отличаться последовательностью, длиной и/или свойствами. В некоторых случаях два или более линкера могут быть идентичными, тогда как другие линкеры могут отличаться. В иллюстративных вариантах осуществления линкер может быть получен или выделен из последовательностей,

соединяющих цинковые пальцы, находящиеся в одном или более природных белках с цинковыми пальцами, представленных в таблице 5. В других вариантах осуществления подходящие линкерные последовательности включают, например, линкеры из 5 или более аминокислот в длину. Примеры линкерных последовательностей длиной 6 или более аминокислот, см. также в патентах США №№ 6,479,626; 6903185; и 7,153,949, каждый из которых включен в настоящее описание во всей своей полноте в виде ссылки. Белки DBD, представленные в настоящем описании, могут включать любую комбинацию подходящих линкеров между отдельными цинковыми пальцами белка. Белки DBD, раскрытые в настоящем описании, могут включать любую комбинацию подходящих линкеров между отдельными цинковыми пальцами белка.

[0110] В определенных вариантах осуществления изобретения DBD, представленный в настоящем описании, содержит один или более классических цинковых пальцев. Классический C2H2 цинковый палец имеет два цистеина в одной цепи и два остатка гистидина в другой цепи, координированные ионом цинка. Классический домен «цинковый палец» имеет два β -листа и одну α -спираль, причем α -спираль взаимодействует с молекулой ДНК и образует основу связывания DBD с целевым участком и может называться «спиралью распознавания». В иллюстративных вариантах осуществления спираль распознавания цинковых пальцев содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену в положении -1, 2, 3 или 6, тем самым изменяя специфичность связывания домена цинкового пальца. В других вариантах осуществления DBD, представленный в настоящем описании, содержит один или более неклассических цинковых пальцев, например, C2-H2, C2-CN и C2-C2.

[0111] В другом варианте осуществления домен DBD, представленный в настоящем описании, содержит мотив цинкового пальца, имеющий следующую структуру: LEPGEKP-[YKSPCEGKSFS X HQRTH TGEKP]_n-YKSPCEGKSFS X HQRTH-TGKKTS (SEQ ID NO: 421), где n представляет собой целое число от 1 до 15, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15, и каждый X независимо представляет собой последовательность распознавания (например, спираль распознавания), способную связываться с 3 п.о. целевой последовательности. В иллюстративных вариантах осуществления n равно 3, 6 или 9. В особенно предпочтительном варианте осуществления n равно 6. В различных вариантах осуществления каждый X может независимо иметь такую же аминокислотную последовательность или другую аминокислотную последовательность по сравнению с другими последовательностями X в DBD. В иллюстративном варианте осуществления каждый X представляет собой последовательность, содержащую 7 аминокислот, созданную для взаимодействия с 3 п.о. представляющего интерес целевого участка связывания с помощью инструмента для разработки цинкового пальца от компании Scripps, который можно найти по интернет-адресу: scripps.edu/barbas/zfdesign/zfdesignhome.php.

[0112] Поскольку каждый цинковый палец в DBD распознает 3 п.о., количество

цинковых пальцев, включенных в DBD, указывает на длину участка связывания, распознаваемого DBD, например, DBD с 1 цинковым пальцем распознает целевой участок связывания, имеющий 3 п.о., DBD с двумя цинковыми пальцами распознает целевой участок связывания, имеющий 6 п.о., DBD с тремя цинковыми пальцами распознает целевой участок связывания, имеющий 9 п.о., DBD с 4 цинковыми пальцами распознают целевой участок связывания, имеющий 12 п.о., DBD с 5 цинковыми пальцами распознают целевой участок связывания, имеющий 15 п.о., DBD с 6 цинковыми пальцами распознают целевой участок связывания, имеющий 18 п.о., DBD с 9 цинковыми пальцами распознают целевой участок связывания, имеющий 27 п.о. В целом, DBD, которые распознают более длинные участки связывания с мишенью, будут демонстрировать более высокую специфичность связывания (например, более низкий уровень нецелевого или неспецифического связывания).

[0113] В других вариантах осуществления изобретения DBD, представленный в настоящем описании, получен из природного белка с цинковыми пальцами путем введения одной или более аминокислотных замен в одну или более спиралей распознавания в доменах цинкового пальца для изменения специфичности связывания DBD (например, изменения целевого участка, распознаваемого DBD). DBD, представленный в настоящем описании, может быть получен из любого природного белка с цинковыми пальцами. В различных вариантах осуществления такой DBD может быть получен из белка с цинковыми пальцами любого вида, например мыши, крысы, человека и т.д. В иллюстративном варианте осуществления изобретения DBD, представленный в настоящем описании, получают из человеческого белка с цинковыми пальцами. В определенных вариантах осуществления, DBD, представленный в настоящем описании, получают из природного белка, приведенного в таблице 5. В иллюстративном варианте осуществления белок DBD, представленный в настоящем описании, получают из человеческого белка с цинковыми пальцами EGR, например, EGR1, EGR2, EGR3 или EGR4.

[0114] В некоторых вариантах осуществления изобретения DBD, представленный в настоящем описании, получают из природного белка путем модификации DBD для увеличения количества доменов цинковых пальцев в белке DBD путем повторения одного или более цинковых пальцев в DBD природного белка. В определенных вариантах осуществления такие модификации включают дублирование, утроение, учетверение или увеличение в большее число раз цинковых пальцев в DBD природного белка. В некоторых случаях создают несколько копий одного цинкового пальца из DBD человеческого белка, например, в DBD eTF присутствуют 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или более копий одного и того же мотива цинкового пальца. В некоторых случаях создают несколько копий набора цинковых пальцев из DBD природного белка, например, набор из 3 цинковых пальцев из DBD природного белка дублируют с получением eTF, имеющим DBD с 6 цинковыми

пальцами, утраивают с получением DBD eTF с 9 цинковыми пальцами, или учетверяют с получением DBD eTF с 12 цинковыми пальцами и т.д. В некоторых случаях набор цинковых пальцев из DBD природного белка частично дублируют с получением DBD eTF, имеющим большее количество цинковых пальцев, например, DBD eTF содержит четыре цинковых пальца, при этом цинковые пальцы представляют одну копию первого цинкового пальца, одну копию второго цинкового пальца и две копии третьего цинкового пальца из природного белка, образуя в общей сложности четыре цинковых пальца в DBD eTF. Такие DBD затем дополнительно модифицируют путем внесения одной или более аминокислотных замен в одну или более спиралей распознавания в доменах цинкового пальца для изменения специфичности связывания DBD (например, путем изменения целевого участка, распознаваемого DBD). В иллюстративных вариантах осуществления DBD получают из природного человеческого белка, такого как человеческий белок с цинковыми пальцами EGR, например, EGR1, EGR2, EGR3 или EGR4.

[0115] Человеческие EGR1 и EGR3 характеризуются DBD C₂H₂ цинкового пальца с тремя пальцами. Общие правила связывания для цинковых пальцев предусматривают, что все три пальца взаимодействуют со своей родственной ДНК последовательностью со схожей геометрией, используя одни и те же аминокислоты в альфа-спирали каждого цинкового пальца для определения специфичности или распознавания последовательности целевого участка связывания. Такие правила связывания позволяют модифицировать DBD EGR1 или EGR3 для создания DBD, который распознает требуемый целевой участок связывания. В некоторых случаях спираль распознавания ДНК из 7 аминокислот в мотиве цинкового пальца EGR1 или EGR3 модифицируют в соответствии с опубликованными правилами создания цинкового пальца. В некоторых вариантах осуществления каждый цинковый палец в DBD с тремя пальцами белка EGR1 или EGR3 модифицируют, например, путем изменения последовательности одной или более спиралей распознавания и/или путем увеличения количества цинковых пальцев в DBD. В некоторых вариантах осуществления EGR1 или EGR3 перепрограммируют для распознавания целевого участка связывания, состоящего из по меньшей мере 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36 или более пар оснований, в требуемом целевом участке. В определенных вариантах осуществления такой DBD, полученный из EGR1 или EGR3, содержит по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или более цинковых пальцев. В иллюстративном варианте осуществления один или более цинковых пальцев в DBD содержат по меньшей мере одну аминокислотную замену в положении -1, 2, 3 или 6 спирали распознавания.

[0116] В различных вариантах осуществления eTF, содержащий DBD, полученный из EGR1 или EGR3, имеет специфичность связывания ДНК, которая отличается от специфичности связывания, присущей природным EGR1 или EGR3, например, DBD распознает целевой участок связывания, имеющий последовательность, отличную от последовательности участка связывания,

распознаваемого немодифицированным EGR1 или EGR3: (GCG(T/G)GGGCG) (SEQ ID NO: 373).

[0117] В других вариантах осуществления eTF, представленный в настоящем описании, содержит DBD, который представляет собой комплекс гРНК/Cas. CRISPR (короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами)/Cas9 являются инструментами редактирования генома, которые позволяют нацеливать геном на определенный участок. Система CRISPR/Cas типа II представляет собой прокариотическую адаптивную систему иммунного ответа, в которой используются некодирующие РНК для направления нуклеазы Cas9 на индукцию сайт-специфического расщепления ДНК. Система CRISPR/Cas9 была использована для создания простого, РНК-программируемого метода, обеспечивающего редактирование генома в клетках млекопитающих. Может быть создана единичная гидовая РНК (eРНК, sgРНК) для направления нуклеазы Cas9 в конкретное местоположение в геноме, которая затем связывается с комплексом гРНК/Cas9. гРНК может быть разработана для связывания с представляющим интерес целевым участком с помощью различных методов и инструментов. Например, способы конструирования гРНК для связывания с представляющей интерес целевой ДНК последовательностью описаны в Aach et al. Flexible algorithm for identifying specific Cas9 targets in genomes. *BioRxiv*, Cold Spring Harbor Labs. doi: <http://dx.doi.org/10.1101/005074> (2014); Bae, et al. Cas-OFFinder: a fast and versatile algorithm that searches for potential off-target sites of Cas9 RNA-guided endonucleases. *Bioinformatics*. 30(10):1473-1475 (2014); Doench, J. G. et al. Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. *Nat Biotech* 34, 184-191 (2016); Gratz, et al. Highly specific and efficient CRISPR/Cas9-catalyzed homology-directed repair in *Drosophila*. *Genetics*. 196(4):961-971 (2014); Heigwer, et al. E-CRISP: fast CRISPR target site identification. *Nat Methods*. 11(2):122-123 (2014); Ma, et al. A guide RNA sequence design platform for the CRISPR/Cas9 system for model organism genomes. *Biomed Res Int*. doi:<http://doi.org/10.1155/2013/270805> (2013); Montague, et al. CHOPCHOP: a CRISPR/Cas9 and TALEN web tool for genome editing. *Nucleic Acids Res*. 42(W1):W401-W407 (2014); Liu, et al. CRISPR-ERA: a comprehensive design tool for CRISPR-mediated gene editing, repression and activation. *Bioinformatics*. 31(22):3676-3678 (2015); Ran, et al. In vivo genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature*. 520(7546):186-191 (2015); Wu, et al. Target specificity of the CRISPR-Cas9 system. *Quant Biol*. 2(2):59-70 (2015); Xiao, et al. CasOT: a genome-wide Cas9/gRNA off-target searching tool. *Bioinformatics*. 30(8):1180-1182 (2014); Zetsche, et al. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System. *Cell*. 163(3):759-771 (2015). Кроме того, доступны различные веб-инструменты для конструирования рРНК для связывания с представляющей интерес целевой ДНК последовательностью, см., например, инструмент для конструирования гРНК CRISPR компании AUTM, доступный по адресу: atum.bio/eCommerce/cas9/input?multipleContacts=false; инструмент проектирования CRISPRa/i gRNA, разработанный Broad Institute, доступный по адресу:

portals.broadinstitute.org/gpp/public/analysis-tools/sgrna-design-crisprai; инструмент проектирования E-CRISP, разработанный в Центре исследования рака DKFZ в Германии, доступный по адресу: e-crisp.org/E-CRISP/; и инструмент Knockout Guide Design компании Synthego, доступный по адресу: design.synthego.com/#/. Помимо этого, также доступны различные коммерческие услуги по конструированию гРНК для связывания с представляющей интерес целевой ДНК последовательностью, см., например, коммерчески доступные услуги, предлагаемые IDT (по адресу: idtdna.com/site/order/designtool/index/CRISPR_SEQUENCE), ThermoFisher (по адресу: thermofisher.com/order/custom-oligo/crispr), и GenScript (по адресу: genscript.com/gRNA-design-tool.html).

[0118] В иллюстративных вариантах осуществления DBD, который представляет собой комплекс гРНК/Cas, содержит дезактивированный нуклеазой белок Cas или dCas, такой как, например, dCas9, такой как дезактивированный нуклеазой *Staphylococcus aureus* Cas9 (dSaCas9) или дезактивированный нуклеазой *Streptococcus pyogenes* Cas9 (dSpCas9). гРНК предоставляется в виде последовательности, содержащей нацеливающую область, которая нацеливает комплекс гРНК/Cas на требуемый целевой участок, и каркасную область, которая облегчает взаимодействие с белком Cas. Применительно к представленным в настоящем описании гРНК может быть использован любой подходящий каркас гРНК. В иллюстративном варианте осуществления гРНК представляет собой одну гРНК или егРНК и содержит следующую последовательность: 5'-

GTTTTAGTACTCTGGAAACAGAATCTACTAAAACAAGGCAAAATGCCGTGTTTATCTCGTCAACTTGTGGCGAGA-3' (SEQ ID NO: 102). Нацеливающая область гидовой РНК присоединена к 5'-концу каркасной последовательности с образованием полной егРНК. В определенных вариантах осуществления гРНК и белок dCas могут экспрессироваться из одной и той же экспрессионной кассеты. В определенных вариантах осуществления для экспрессии гРНК используется промотор U6. В других вариантах осуществления гРНК может экспрессироваться в клетке, которая была сконструирована для стабильной экспрессии белка dCas-TAD, например, путем стабильной интеграции dCas либо в геном, либо в плазмиду, которая стабильно поддерживается вне хромосомы.

[0119] В других вариантах осуществления еTF, представленный в настоящем описании, может содержать DBD TALEN, может быть получен из TALEN, или представлять собой нуклеазу, представляющую собой инактивированный TALEN. Эффекторные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции (TALEN), представляют собой рестрикционные ферменты, которые содержат DBD и домен нуклеазы, которые могут быть сконструированы для вырезания специфических ДНК последовательностей. TALEN создают путем конъюгации ДНК-связывающего домена TAL-эффектора с доменом расщепления ДНК (например, нуклеазой). Эффекторы, подобные активатору транскрипции (TALE), могут быть сконструированы таким образом, чтобы они связывались с требуемой целевой последовательностью ДНК, тем самым направляя домен

нуклеазы в определенное местоположение.

[0120] TAL-эффекторы представляют собой бактериальные белки бактерий *Xanthomonas*. ДНК-связывающий домен содержит повторяющуюся высококонсервативную 33-34 аминокислотную последовательность с изменяющимися 12-й и 13-й аминокислотами. Эти два положения, называемые двумя повторяющимися переменными остатками (RVD), сильно изменчивы и демонстрируют сильную корреляцию с распознаванием специфических нуклеотидов. Эта прямая связь между аминокислотной последовательностью и распознаванием ДНК позволяет конструировать DBD, которые специфически нацеливаются на требуемую последовательность путем подбора комбинации повторяющихся сегментов, содержащих соответствующие RVD.

[0121] Доступны различные методы конструирования TALE. Например, способы конструирования TALE для связывания с представляющей интерес целевой последовательностью ДНК описаны в T. Cermak et al., *Nucleic Acids Research*. 39 (12):e82 (2011); F. Zhang F et al., *Nature Biotechnology*. 29(2):149-53 (2011); R. Morbitzer et al., *Nucleic Acids Research*. 39(13):5790-9 (2011); T. Li et al., *Nucleic Acids Research*. 39(14):6315-25 (2011); R. Geissler et al., *PLOS One*. 6(5):e19509 (2011); и E. Weber et al., *PLOS One*. 6(5):e19722 (2011). Кроме того, доступны различные веб-инструменты для разработки TALE для связывания с представляющей интерес целевой последовательностью ДНК, см., например, E-Talen, доступный по адресу: e-talen.org/E-TALEN/TAL, и инструмент Effector Nucleotide Targeter 2.0, доступный по адресу: tale-nt.cac.cornell.edu/node/add/single-tale. Кроме того, доступны различные коммерческие услуги по разработке TALE для связывания с представляющей интерес целевой последовательностью ДНК, см., например, коммерчески доступные услуги, предлагаемые OmicX (по адресу: omictools.com/), Addgene (по адресу: addgene.org/talen/guide/) или ThermoFisher (по адресу: thermofisher.com/us/en/home/life-science/genome-editing/genartals/tal-design-tool.html). Помимо этого, для разработки олигонуклеотидов, подходящих для сборки TALE можно использовать общедоступную программу (DNAWorks), см., например, D. Hoover *D Methods in Molecular Biology*. 852:215-23 (2012).

Домены модуляции транскрипции

[0122] Представленные в настоящем описании eTF могут содержать любой подходящий домен, который способен рекрутировать один или более белковых факторов, которые могут модулировать транскрипцию (например, РНК-полимераза II, СВР/p300, CREB или KRAB) или уровень экспрессии представляющего интерес гена, когда eTF связывается с целевым участком через DBD (например, DBD цинкового пальца, гРНК/Cas DBD или TALE DBD). В определенных вариантах осуществления такой домен рекрутирует белковые факторы, которые увеличивают уровень транскрипции или экспрессии представляющего интерес гена, и представляет собой домен активации транскрипции (TAD). В других вариантах осуществления такой домен рекрутирует белковые факторы, которые снижают уровень транскрипции или экспрессии представляющего интерес гена, и представляет собой домен репрессора

транскрипции (TRD). В некоторых вариантах осуществления домен модуляции транскрипции (TAD или TRD) может представлять собой синтетически разработанный домен. В других вариантах осуществления домен модуляции транскрипции (TAD или TRD) может быть получен из природного белка, например, фактора транскрипции, коактиватора транскрипции, корепрессора транскрипции или белка сайленсера. В различных вариантах осуществления домен модуляции транскрипции (TAD или TRD) может быть получен из белка любого вида, например мыши, крысы, обезьяны, вируса или человека.

[0123] В одном из иллюстративных вариантов осуществления TAD, пригодный для использования в eTF, представленных в настоящем описании, получают из вирусного белка. Типичные TAD, полученные из вирусных белков, включают, например, домен TAD VP64 (SEQ ID NO: 95), VPR (SEQ ID NO: 114), VP16, VP128, p65, p300 или любой их функциональный фрагмент или вариант, или последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности.

[0124] В другом иллюстративном варианте осуществления TAD, пригодный для использования в eTF, представленных в настоящем описании, получают из человеческого белка. Типичные TAD, полученные из человеческих белков, включают, например, домен TAD трансаактиватора 2, взаимодействующего с CBP/p300 (CITED2) (SEQ ID NO: 96 или 98), трансаактиватора 4, взаимодействующего с CBP/p300 (CITED4) (SEQ ID NO: 97 или 100), EGR1 (SEQ ID NO: 1) или EGR3 (SEQ ID NO: 422), или любого их функционального фрагмента или варианта, или последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности.

[0125] В другом варианте осуществления TRD, пригодный для использования в eTF, представленных в настоящем описании, содержит домен KRAB, который может рекрутировать белки, которые ингибируют транскрипцию, или любой его функциональный фрагмент или вариант, или последовательность, имеющую по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности.

[0126] В некоторых вариантах осуществления DBD цинкового пальца конъюгирован с доменом модуляции транскрипции, таким как TAD или TRD, как дополнительно описано ниже. В различных вариантах осуществления DBD цинкового пальца может быть конъюгирован с TAD из вирусного белка, такого как VP64 или VPR, или TAD из человеческого белка, такого как CITED2 или CITED4. В некоторых вариантах осуществления DBD цинкового пальца, полученный из человеческого белка, например EGR1 или EGR3, конъюгирован с TAD, полученным из человеческого белка, например CITED2 или CITED4. В некоторых вариантах осуществления DBD цинкового пальца, полученный из человеческого белка, например, EGR1 или EGR3, конъюгирован с VP64 или VPR TAD. В некоторых вариантах осуществления синтетический DBD цинкового

пальца или DBD цинкового пальца, имеющий менее 75% идентичности последовательности с человеческим белком, например EGR1 или EGR3, конъюгирован с TAD, полученным из человеческого белка, например, CITED2 или CITED4. В некоторых вариантах осуществления синтетический DBD цинкового пальца или DBD цинкового пальца, имеющий менее 75% идентичности последовательности с человеческим белком, например EGR1 или EGR3, конъюгирован с VP64 или VPR TAD.

[0127] В некоторых вариантах осуществления белок dCas конъюгирован с доменом модуляции транскрипции, таким как TAD или TRD, как дополнительно описано ниже. В различных вариантах осуществления dCas9 может быть конъюгирован с TAD из вирусного белка, такого как VP64 или VPR, или TAD из человеческого белка, такого как CITED2 или CITED4. В иллюстративных вариантах осуществления dCas9 конъюгирован с VP64 или VPR TAD.

[0128] В некоторых вариантах осуществления белок TALE конъюгирован с доменом модуляции транскрипции, таким как TAD или TRD, как дополнительно описано ниже. В различных вариантах осуществления TALE может быть конъюгирован с TAD из вирусного белка, такого как VP64 или VPR, или TAD из человеческого белка, такого как CITED2 или CITED4. В иллюстративных вариантах осуществления TALE конъюгирован с TAD VP64 или VPR.

eTF, которые усиливают SCN1A

[0129] В одном из аспектов изобретение относится к eTF, которые способны повышать экспрессию гена альфа-субъединицы потенциалзависимого натриевого канала типа I (SCN1A) и увеличивать экспрессию соответствующего ему белкового продукта Nav1.1. Ген SCN1A принадлежит к семейству генов, которые кодируют субъединицы, используемые для сборки натриевых каналов. Эти каналы, которые транспортируют положительно заряженные ионы натрия в клетки, играют ключевую роль в способности клетки генерировать и передавать электрические сигналы. Ген SCN1A кодирует одну часть (альфа-субъединицу) натриевого канала под названием Nav1.1. Эти каналы в основном находятся в мозге, где они контролируют поток ионов натрия в клетки. Каналы Nav1.1 участвуют в передаче сигналов от одной нервной клетки (или нейрона) в другую клетку. Было обнаружено, что несколько мутаций в гене SCN1A вызывают генетическую (наследственную) форму эпилепсии с фебрильными судорогами плюс (GEFS+), которые представляют собой спектр судорожных расстройств различной степени тяжести. Эти условия включают простые фебрильные (связанные с лихорадкой) судороги, которые начинаются в младенчестве и обычно заканчиваются к 5 годам, и фебрильные судороги плюс (FS+). FS+ включает фебрильные и другие виды судорог, в том числе те, которые не связаны с лихорадкой (афебрильные судороги), которые продолжаются после детства. Спектр GEFS+ также включает другие состояния, такие как синдром Драве (также известный как тяжелая миоклоническая эпилепсия младенчества или SMEI), который является причиной более серьезных более длительных судорог и которые могут быть трудно контролируемы. Эти периодические судороги (эпилепсия) могут ухудшаться со

временем и часто сопровождаются снижением функции мозга. Многие другие мутации связаны с семейной гемиплегической мигренью, формой головной боли при мигрени, которая встречается в семьях, и по меньшей мере одна мутация связана с эффективностью некоторых противосудорожных препаратов. Таким образом, eTF, представленный в настоящем описании, который увеличивает экспрессию SCN1A, можно использовать для лечения различных заболеваний или нарушений, связанных с мутациями в канале Nav1.1.

[0130] В определенных вариантах осуществления раскрытый в настоящем описании eTF, который увеличивает экспрессию SCN1A, распознает целевой участок связывания, размер которого составляет по меньшей мере 9 п.о., 12 п.о., 15 п.о., 18 п.о., 21 п.о., 24 п.о., 27 п.о., 30 п.о., 33 п.о. или 36 п.о.; более 9 п.о., 12 п.о., 15 п.о., 18 п.о., 21 п.о., 24 п.о., 27 п.о. или п.о.; или от п.о., 9-30 п.о., 9-27 п.о., 9-24 п.о., 9-21 п.о., 9-18 п.о., 9-15 п.о., 9-12 п.о., 12-33 п.о., 12-30 п.о., 12-27 п.о., 12-24 п.о., 12-21 п.о., 12-18 п.о., 12-15 п.о., 15-33 п.о., 15-30 п.о., 15-27 п.о., 15-24 п.о., 15-21 п.о., 15-18 п.о., 18-33 п.о., 18-30 п.о., 18-27 п.о., 18-24 п.о., 18-21 п.о., 21-33 п.о., 21-30 п.о., 21-27 п.о., 21-24 п.о., 24-33 п.о., 24-30 п.о., 24-27 п.о., 27-33 п.о., 27-30 п.о. или 30-33 п.о. В иллюстративных вариантах осуществления раскрытый в настоящем описании eTF, который увеличивает экспрессию SCN1A, распознает целевой участок связывания, который составляет 18-27 п.о., 18 п.о. или 27 п.о.

[0131] В определенных вариантах осуществления раскрытый в настоящем описании eTF, который увеличивает экспрессию SCN1A, распознает целевой участок связывания, который расположен на хромосоме 2. В определенных вариантах осуществления раскрытый в настоящем описании eTF, который увеличивает экспрессию SCN1A, распознает целевой участок связывания, который расположен на хромосоме 2 выше или ниже TSS SCN1A в пределах 110 т.п.о., 100 т.п.о., 90 т.п.о., 80 т.п.о., 70 т.п.о., 60 т.п.о., 50 т.п.о., 40 т.п.о., 30 т.п.о., 20 т.п.о., 10 т.п.о., 5 т.п.о., 4 т.п.о., 3 т.п.о., 2 т.п.о. или 1 т.п.о. В определенных вариантах осуществления раскрытый в настоящем описании eTF, который увеличивает экспрессию SCN1A, распознает целевой участок связывания, который расположен на хромосоме 2 выше TSS SCN1A в пределах 110 т.п.о. В определенных вариантах осуществления раскрытый в настоящем описании eTF, который увеличивает экспрессию SCN1A, распознает целевой участок связывания, который расположен на хромосоме 2 ниже TSS SCN1A в пределах 110 т.п.о. В иллюстративных вариантах осуществления такие целевые участки связывания составляют 18-27 п.о., 18 п.о. или 27 п.о.

[0132] В определенных вариантах осуществления раскрытый в настоящем описании eTF, который увеличивает экспрессию SCN1A, распознает целевой участок связывания, который расположен на хромосоме 2 в положениях 166179652-165989571, в положениях 166128050-166127958, в положениях 166155414-166140590, в положениях 166179652-1661777272 или в положениях 1659990246-165989592 (все со ссылкой на GRCh38.p12). В иллюстративных вариантах осуществления такие целевые участки связывания составляют 18-27 п.о., 18 п.о. или 27 п.о.

[0133] В определенных вариантах осуществления раскрытый в настоящем описании eTF, который увеличивает экспрессию SCN1A, распознает целевой участок связывания, который (i) составляет 18-27 п.о., 18 п.о. или 27 п.о., (ii) перекрывается с положением на хромосоме 2, выбранным из 166178880, 166178871, 166177369, 166177362, 166177299, 166177299, 166155393, 166155264, 166149373, 166149176, 166149165, 166149118, 166148953, 166148565, 166142396, 166142391, 166142344, 166142239, 166141162, 166140928, 166140590, 165990076, 165989684, 165989571, 166155255, 166155099, 166148843, 166148361, 166142219, 166141090, 165990246, 165990193, 166149168, 166127991, 166128002, 166128037 или 166128025 (все со ссылкой на GRCh38.p12), и (iii) способен по меньшей мере в 1,2 раза увеличить экспрессию SCN1A при связывании с раскрытым в настоящем описании eTF.

[0134] В определенных вариантах осуществления раскрытый в настоящем описании eTF, который увеличивает экспрессию SCN1A (i), связывается с целевым участком, включающим или состоящим из любой из SEQ ID NO: 35-37, 101, 105-111, 136, 195-211, 224-238 или 240-267 и (ii) способен вызывать по меньшей мере 1,2-кратное увеличение экспрессии SCN1A при связывании с eTF, раскрытым в настоящем описании.

[0135] В определенных вариантах осуществления раскрытый в настоящем описании eTF, который увеличивает экспрессию SCN1A, распознает целевой участок связывания, который (i) составляет 18-27 п.о., 18 п.о. или 27 п.о., (ii) перекрывается с положением на хромосоме 2, выбранным из 166155255, 166155099, 166148843, 166148361, 166142219, 166141090, 165990246, 165990193, 166149168, 166127991, 166128002, 166128037 или 166128025 (все со ссылкой на GRCh38.p12), и (iii) способен обеспечивать по меньшей мере 2-кратное увеличение экспрессии SCN1A, когда связывается с eTF, раскрытым в настоящем описании.

[0136] В определенных вариантах осуществления раскрытый в настоящем описании eTF, который увеличивает экспрессию SCN1A (i), связывается с целевым участком, содержащим или состоящим из любой из SEQ ID NO: 35-36, 108-109, 136, 209-210, 226, 228, 233, 236 или 247-248, и (ii) способен вызывать по меньшей мере 2-кратное увеличение экспрессии SCN1A при связывании с eTF, раскрытым в настоящем описании здесь.

[0137] В определенных вариантах осуществления раскрытый в настоящем описании eTF, который увеличивает экспрессию SCN1A, распознает целевой участок связывания, который (i) составляет 18-27 п.о., 18 п.о. или 27 п.о. и (ii) перекрывается с положением на хромосоме 2, выбранным из 166149168, 166127991, 166128002, 166128037 или 166128025 (все со ссылкой на GRCh38.p12), и (iii) способен вызывать по меньшей мере 5-кратное увеличение экспрессии SCN1A при связывании с eTF, раскрытым в настоящем описании.

[0138] В определенных вариантах осуществления раскрытый в настоящем описании eTF, который увеличивает экспрессию SCN1A (i), связывается с целевым участком, содержащим или состоящим из любой из SEQ ID NO: 35, 36, 108, 109 или

136, и (ii) способен вызывать по меньшей мере 5-кратное увеличение экспрессии SCN1A при связывании с eTF, раскрытым в настоящем описании.

[0139] В определенных вариантах осуществления раскрытый в настоящем описании eTF, который увеличивает экспрессию SCN1A, распознает целевой участок связывания, который (i) составляет 18-27 п.о., 18 п.о. или 27 п.о., (ii) перекрывается с положением на хромосоме 2, выбранным из 166128002, 166128037 или 166128025 (все со ссылкой на GRCh38.p12), и (iii) способен вызывать по меньшей мере 15-кратное увеличение экспрессии SCN1A при связывании с eTF, раскрытым в настоящем описании.

[0140] В определенных вариантах осуществления раскрытый в настоящем описании eTF, который увеличивает экспрессию SCN1A (i), связывается с целевым участком, содержащим или состоящим из любой из SEQ ID NO: 36, 108 или 109, и (ii) способен вызывать по меньшей мере 15-кратное увеличение экспрессии SCN1A при связывании с eTF, раскрытым в настоящем описании.

[0141] В определенных вариантах осуществления раскрытый в настоящем описании eTF, который увеличивает экспрессию SCN1A, распознает целевой участок связывания, который (i) составляет 18-27 п.о., 18 п.о. или 27 п.о., (ii) перекрывается с положением на хромосоме 2, выбранным из 166128037 или 166128025 (все со ссылкой GRCh38.p12) и (iii) способен вызывать по меньшей мере 20-кратное увеличение экспрессии SCN1A при связывании с eTF, раскрытым в настоящем описании.

[0142] В определенных вариантах осуществления раскрытый в настоящем описании eTF, который увеличивает экспрессию SCN1A (i), связывается с целевым участком, содержащим или состоящим из любой из SEQ ID NO: 36 или 109, и (ii) способен вызывать по меньшей мере 20-кратное увеличение экспрессии SCN1A при связывании с eTF, раскрытым в настоящем описании.

[0143] В определенных вариантах осуществления раскрытый в настоящем описании eTF, который увеличивает экспрессию SCN1A, распознает целевой участок связывания, который (i) составляет 18-27 п.о., 18 п.о. или 27 п.о., (ii) перекрывается с положением на хромосоме 2 в положении 166128025, и (iii) способен вызывать по меньшей мере 25-кратное увеличение экспрессии SCN1A при связывании с eTF, раскрытым в настоящем описании.

[0144] В определенных вариантах осуществления раскрытый в настоящем описании eTF, который увеличивает экспрессию SCN1A (i), связывается с целевым участком, содержащим или состоящим из SEQ ID NO: 36, и (ii) способен вызывать по меньшей мере 25-кратное увеличение экспрессии SCN1A при связывании с eTF, раскрытым в настоящем описании.

[0145] В определенных вариантах осуществления раскрытый в настоящем описании eTF, который увеличивает экспрессию SCN1A, распознает целевой участок связывания, который (i) составляет 18-27 п.о., 18 п.о. или 27 п.о. и (ii) связывается с геномной областью, которая находится в пределах по меньшей мере 1 т.п.о., 750 п.о., 500 п.о., 400 п.о., 300 п.о., 200 п.о., 100 п.о. или 50 п.о. от местоположения в геноме,

имеющего последовательность любой из SEQ ID NO: 35-37, 101, 105-111, 136, 195-211, 224-238 или 240-267. В некоторых вариантах осуществления целевой участок связывания способен вызывать по меньшей мере 1,2, 2, 5, 15, 20 или 25-кратное увеличение экспрессии SCN1A при связывании с eTF, раскрытым в настоящем описании.

[0146] В определенных вариантах осуществления раскрытый в настоящем описании eTF, который увеличивает экспрессию SCN1A, распознает целевой участок связывания, который (i) составляет 18-27 п.о., 18 п.о. или 27 п.о. и (ii) связывается с областью генома, которая по меньшей мере частично перекрывается с местоположением в геноме, имеющим последовательность любой из SEQ ID NO: 35-37, 101, 105-111, 136, 195-211, 224-238 или 240-267. В некоторых вариантах осуществления целевой участок связывания способен вызывать по меньшей мере 1,2, 2, 5, 15, 20 или 25-кратное увеличение экспрессии SCN1A при связывании с eTF, раскрытым в настоящем описании.

[0147] В определенных вариантах осуществления раскрытый в настоящем описании eTF, который увеличивает экспрессию SCN1A, распознает целевой участок связывания, имеющий любую из следующих последовательностей: SEQ ID NO: 35-37, 101, 105-111, 136, 195-211, 224-238 или 240-267. В некоторых вариантах осуществления целевой участок связывания способен вызывать по меньшей мере 1,2, 2, 5, 15, 20 или 25-кратное увеличение экспрессии SCN1A при связывании с eTF, раскрытым в настоящем описании.

[0148] В определенных вариантах осуществления раскрытый в настоящем описании eTF, который увеличивает экспрессию SCN1A, вызывает по меньшей мере 1,5-кратное, 2-кратное, 3-кратное, 4-кратное, 5-кратное, 6-кратное, 7-кратное, 8-кратное, 9-кратное, 10-кратное, 15-кратное, 20-кратное, 25-кратное, 50-кратное, 100-кратное или более или по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 200%, 250% 300%, 400% или 500% или более увеличение уровня экспрессии SCN1A (PHK SCN1A и/или белка Nav1.1) в клетке или *in vivo* по сравнению с контролем (например, без eTF или с eTF, который не распознают целевой участок). В различных вариантах осуществления увеличение экспрессии SCN1A можно обнаружить с помощью методов ПЦР, вестерн-блот анализа или иммуноанализа.

[0149] В определенных вариантах осуществления раскрытый в настоящем описании eTF, который усиливает связывание SCN1A, связывается с целевым участком, который способен увеличивать экспрессию SCN1A по меньшей мере в 1,2 раза, 1,3 раза, 1,4 раза, 1,5 раза, 1,6 раза, 1,7 раза, 1,8 раза, 1,9 раза, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 8 раз, 10 раз, 12 раз, 15 раз, 18 раз, 20 раз, 25 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 75 раз, 100 раз или более или на по меньшей мере 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 200%, 250%, 300%, 400% или 500% или более относительно контроля в анализе активации транскрипции. Пример анализа активации транскрипции SCN1A представлен в настоящем описании в примере 3. Вкратце, НЕК293 трансфицируют плазмидой, несущей eTF или контрольной репортерной

конструкцией eGFP. Через 48 часов после трансфекции клетки собирают, выделяют РНК и подвергают обратной транскрипции, и полученные образцы кДНК анализируют методом кПЦР (например, с использованием праймеров, имеющих SEQ ID NO: 190 и 191) для количественного определения уровней эндогенного транскрипта SCN1A. GAPDH может использоваться в качестве контрольного гена для определения относительных уровней экспрессии SCN1A.

[0150] В определенных вариантах осуществления раскрытый в настоящем описании eTF, который увеличивает экспрессию SCN1A, имеет минимальные нецелевые эффекты, например, нецелевые эффекты, связанные с неспецифическим связыванием, такие как, например, модуляция экспрессии нецелевого гена или гена, отличного от SCN1A. В одном из вариантов осуществления раскрытый в настоящем описании eTF, который обеспечивает увеличение экспрессии SCN1A, обеспечивает увеличение экспрессии конкретно SCN1A по сравнению с контролем по меньшей мере 5-кратно, 10-кратно, 15-кратно, 20-кратно, 25-кратно, 30-кратно, 40-кратно или 50-кратно относительно экспрессии, обеспечиваемой eTF для одного или более нецелевых генов, по сравнению с контролем. В иллюстративном варианте осуществления раскрытый в настоящем описании eTF, который обеспечивает увеличение экспрессии SCN1A, обеспечивает усиление транскрипции конкретно гена SCN1A по сравнению с контролем, по меньшей мере в 15 раз по сравнению с транскрипцией 40 наиболее близко расположенных генов (например, 40 ближайших генов, расположенных в кодирующей последовательности SCN1A на хромосоме 2), обеспечиваемой eTF, относительно контроля, например, PLA2R1, ITGB6, RBMS1, TANK, PSMD14, TBR1, SLC4A10, DPP4, FAP, IFIH1, GCA, FIGN, GRB14, COBLL1, SLC38A11, SCN3A, SCN2A, CSRNP3, GALNT3, TTC21B, SCN9A, SCN7A, B3GALT1, STK39, CERS6, NOSTRIN, SPC25, ABCB11, DHRS9, BBS5, KLHL41, FASTKD1, PPIG, CCDC173, PHOSPHO2, KLHL23, SSB, METTL5, UBR3 и MYO3B (см. таблица 33). В различных вариантах осуществления усиление транскрипции гена SCN1A может быть обнаружена методом ПЦР.

[0151] В определенных вариантах осуществления раскрытый в настоящем описании eTF, который увеличивает экспрессию SCN1A, способен снижать частоту судорог в анализе гипертермических судорог (HTS) в модели *Scn1a^{tm1kea}* на мышью модели синдрома Драве. В некоторых вариантах осуществления раскрытый в настоящем описании eTF способен снижать частоту судорог при 42,6°C в анализе HTS по меньшей мере в 1,2 раза, 1,3 раза, 1,4 раза, 1,5 раза, 1,6 раз, 1,7 раз, 1,8 раз, 1,9 раз, 2,0 раза или более или по меньшей мере на 20%, 30%, 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100% или более по сравнению с контролем (например, введением PBS или вектора AAV, содержащего последовательность, кодирующую eGFP). В некоторых вариантах осуществления раскрытый в настоящем описании eTF способен снижать частоту судорог при 42,6°C в анализе HTS настолько, что по меньшей мере у 60%, 62%, 65%, 70%, 75%, 76%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%,

96%, 97%, 98% или 99% мышей, участвующих в анализе, не возникают судороги при 42,6°C. Пример анализа HTS описан в настоящем описании в примере 11. Вкратце, детенышам пометов, полученным от самцов мышей *Scn1a*^{+/-}, скрещенных с самками мышей C57Bl/6J, можно вводить вектор AAV9, кодирующий представленный в настоящем описании eTF, который увеличивает экспрессию SCN1A, или контрольный вектор, кодирующий eGFP, билатерально через ICV в P1. Мышам можно дозировать ~1,0E10-5,0E12 копий генома/мышь. Анализ HTS проводят на гетерозиготных мышах SCN1A P26-P28 и мышах дикого типа SCN1A на фоне смешанных 129Stac X C57BL/6 путем повышения температуры тела мышей (в контролируемых условиях и с контролем температуры тела) на ~0,5°C каждые 2 минуты до начала первых тонико-клонических судорог, сопровождающихся неестественным положением тела, или до достижения температуры тела 43°C. Мыши считаются не подверженными судорогам, если в течение всего эксперимента не наблюдались судороги с неестественным положением тела.

[0152] В определенных вариантах осуществления раскрытый в настоящем описании eTF, который увеличивает экспрессию SCN1A, способен увеличивать выживаемость мыши, которая является гетерозиготной по SCN1A, например, мыши линии *Scn1a*^{tm1^{kea}}. В определенных вариантах осуществления раскрытый в настоящем описании eTF способен увеличивать выживаемость SCN1A гетерозиготных мышей при P100 по меньшей мере в 1,2 раза, 1,3 раза, 1,4 раза, 1,5 раза, 1,6 раз, 1,7 раз, 1,8 раз, 1,9 раз, 2,0 раза или более или по меньшей мере на 20%, 30%, 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100% или более по сравнению с контролем (например, получившим PBS или вектор AAV, содержащий последовательность, кодирующую eGFP). В определенных вариантах осуществления раскрытый в настоящем описании eTF способен увеличивать выживаемость SCN1A гетерозиготных мышей при P100 настолько, что по меньшей мере 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% мышей, участвовавших в анализе, все еще остаются живыми при P100. Пример анализа выживаемости описан в настоящем описании в примере 12. Вкратце, детенышам пометов, полученным от самцов мышей *Scn1a* +/-, скрещенных с самками мышей C57Bl/6J, можно вводить вектор AAV9 билатерально через ICV в P1. Мышам можно дозировать ~1,0E10-5,0E12 копий генома/мышь. Определяют количество мышей, доживших до P100.

[0153] В определенных вариантах осуществления раскрытый в настоящем описании eTF, который увеличивает экспрессию SCN1A, имеет высокий процент идентичности с одним или более человеческими белками (как дополнительно описано ниже). В некоторых вариантах осуществления такие eTF имеют по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% общей идентичности последовательности с одним или более человеческими белками. В определенных вариантах осуществления такие eTF проявляют пониженную иммуногенность по сравнению с eTF, имеющим более низкий общий процент идентичности последовательности с одним или более человеческими белками. В

различных вариантах осуществления снижение иммуногенности может быть измерено с помощью анализа elispot, иммуноанализа или метода *in silico*. В некоторых вариантах осуществления такие eTF могут содержать DBD, полученный из человеческого EGR1 или EGR3, и TAD, полученный из человеческого EGR1, EGR3, CITED2 или CITED4.

[0154] В определенных вариантах осуществления раскрытый в настоящем описании eTF, который увеличивает экспрессию SCN1A, содержит ДНК-связывающий домен, имеющий один или более доменов цинкового пальца, содержащих спираль распознавания, содержащую любую из SEQ ID NO: 115-130. В определенных вариантах осуществления раскрытый в настоящем описании eTF, который увеличивает экспрессию SCN1A, содержит ДНК-связывающий домен, имеющий по меньшей мере один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать или двенадцать доменов цинкового пальца, причем каждый домен цинкового пальца независимо содержит спираль распознавания, содержащую любую из SEQ ID NO: 115-130. В определенных вариантах осуществления раскрытый в настоящем описании eTF, который увеличивает экспрессию SCN1A, содержит ДНК-связывающий домен, имеющий шесть доменов цинкового пальца, причем каждый домен цинкового пальца независимо содержит спираль распознавания, содержащую любую из SEQ ID NO: 115-130. В определенных вариантах осуществления раскрытый в настоящем описании eTF, который увеличивает экспрессию SCN1A, содержит ДНК-связывающий домен, имеющий девять доменов цинкового пальца, причем каждый домен цинкового пальца независимо содержит спираль распознавания, содержащую любую из SEQ ID NO: 115-130. В иллюстративных вариантах осуществления такие eTF содержат ДНК-связывающий домен, имеющий SEQ ID NO: 421, где каждый X независимо выбирают из любой из SEQ ID NO: 115-130, а n равно 6 или 9.

[0155] В определенных вариантах осуществления раскрытый в настоящем описании eTF, который увеличивает экспрессию SCN1A, содержит ДНК-связывающий домен, имеющий любое из: (i) последовательности, содержащей RSDNLVR x REDNLHT x RSEDLVR x QSGNLTE x TSGHLVR x QNSTLTE (SEQ ID NO: 135), где x может представлять собой линкер из 1-50 аминокислот, (ii) последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 135 или (ii) функционального фрагмента (i) или (ii). В определенных вариантах осуществления такой eTF дополнительно содержит один или более TAD, выбранных из VP64, VPR, CITED2 или CITED4. В одном из вариантов осуществления такой eTF содержит домен VPR TAD, конъюгированный с С-концом DBD. В некоторых вариантах осуществления такой eTF содержит TAD CITED2, конъюгированный с N-концом, С-концом или N-концом и С-концом DBD. В некоторых вариантах осуществления такой eTF содержит CITED4 TAD, конъюгированный с N-концом, С-концом или N-концом и С-концом DBD. В определенных вариантах осуществления такой eTF способен связываться с целевым участком, имеющим SEQ ID NO: 256 и увеличивающим экспрессию SCN1A по меньшей

мере в 2 раза, 5 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 25 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз или более по сравнению с контролем или на по меньшей мере 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 200%, 250%, 300%, 400% или 500% или более по сравнению с контролем.

[0156] В определенных вариантах осуществления раскрытый в настоящем описании eTF, который увеличивает экспрессию SCN1A, содержит ДНК-связывающий домен, имеющий любое из: (i) последовательности, содержащей RSDNLVR x HRTTLTN x REDNLHT x TSHSLTE x QSSSLVR x REDNLHT (SEQ ID NO: 371), где x может быть линкером из 1-50 аминокислот, (ii) последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 371, или (ii) функционального фрагмента (i) или (ii). В определенных вариантах осуществления такой eTF дополнительно содержит один или более TAD, выбранных из VP64, VPR, CITED2 или CITED4. В одном из вариантов осуществления такой eTF содержит домен VPR TAD, конъюгированный с С-концом DBD. В некоторых вариантах осуществления такой eTF содержит TAD CITED2, конъюгированный с N-концом, С-концом или N-концом и С-концом DBD. В некоторых вариантах осуществления такой eTF содержит CITED4 TAD, конъюгированный с N-концом, С-концом или N-концом и С-концом DBD. В некоторых вариантах осуществления такой eTF способен связываться с целевым участком, имеющим SEQ ID NO: 264 и увеличивающим экспрессию SCN1A по меньшей мере в 2 раза, 5 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 25 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз или более по сравнению с контролем или на по меньшей мере 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 200%, 20%, 250%, 30%, 40%, 40% или 50% более по сравнению с контролем.

[0157] В некоторых вариантах осуществления eTF, раскрытый в настоящем описании, который увеличивает экспрессию SCN1A содержит ДНК-связывающей домен, имеющий любое из: (i) последовательности, содержащей RRDELNV x RSDHLTN x RSDDLVR x RSDNLVR x HRTTLTN x REDNLHT x TSHSLTE x QSSSLVR x REDNLHT (SEQ ID NO: 372), (ii) последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 372, или (ii) функционального фрагмента (i) или (ii). В некоторых вариантах осуществления такой eTF дополнительно содержит один или более TAD, выбранных из VP64, VPR, CITED2 или CITED4. В одном из вариантов осуществления такой eTF содержит домен VPR TAD, конъюгированный с С-концом DBD. В некоторых вариантах осуществления такой eTF содержит CITED2 TAD, конъюгированный с N-концом, С-концом или N-концом и С-концом DBD. В некоторых вариантах осуществления такой eTF содержит CITED4 TAD, конъюгированный с N-концом, С-концом или N-концом и С-концом DBD. В некоторых вариантах осуществления такой eTF способен связываться с целевым участком, имеющим SEQ ID NO: 37 и увеличивающим экспрессию SCN1A по меньшей мере в 2 раза, 5 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 25 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, или более по сравнению с контролем или на по меньшей мере, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%,

75%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 200%, 20%, 250%, 30%, 40%, 40% или 50% более по сравнению с контролем.

[0158] В некоторых вариантах осуществления eTF, раскрытый в настоящем описании, который увеличивает экспрессию SCN1A, содержит ДНК-связывающей домен, имеющий любое из: (i) последовательности, состоящей из DPGALVR x RSDNLVR x QSGDLRR x THLDLIR x TSGNLVR x RSDNLVR (SEQ ID NO: 376), (ii) последовательности, имеющая по меньшей мере 89%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 376, или (ii) функционального фрагмента (i) или (ii). В некоторых вариантах осуществления такой eTF дополнительно содержит один или более TAD, выбранных из VP64, VPR, CITED2 или CITED4. В одном из вариантов осуществления такой eTF содержит домен VPR TAD, конъюгированный с С-концом DBD. В некоторых вариантах осуществления такой eTF содержит CITED2 TAD, конъюгированный с N-концом, С-концом или N-концом и С-концом DBD. В некоторых вариантах осуществления такой eTF содержит CITED4 TAD, конъюгированный с N-концом, С-концом или N-концом и С-концом DBD. В некоторых вариантах осуществления такой eTF способен связываться с целевым участком, имеющим SEQ ID NO: 136 и увеличивающим экспрессию SCN1A по меньшей мере 2 раза, 5 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 25 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз или более по сравнению с контролем или на по меньшей мере 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 200%, 20%, 250%, 30%, 40%, 40% или 50% более по сравнению с контролем.

[0159] В некоторых вариантах осуществления eTF, раскрытый в настоящем описании, который увеличивает экспрессию SCN1A содержит любое из: (i) последовательности, содержащей любую из SEQ ID NO: 6-9, 13-15, 57-58, 61-62, 67-71, 74-75, 268-282, 295-299, 305-325 или 364-366; ii) последовательности, содержащей любую из SEQ ID NO: 22-25, 29-31, 84-85, 88, 90-92, 131-135, 371-372, 376, 391-409 или 423-435; iii) последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с любой из последовательностей (i) или (ii); или (iv) функционального фрагмента или варианта любой из последовательностей (i), (ii) или (iii). В иллюстративных вариантах осуществления такие eTF способны увеличивать экспрессию SCN1A по меньшей мере в 2 раза, 5 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 25 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз или более по сравнению с контролем или на по меньшей мере 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 200%, 20%, 250%, 300%, 400%, 500% или более по сравнению с контролем.

[0160] В некоторых вариантах осуществления eTF, раскрытый в настоящем описании, который увеличивает экспрессию SCN1A содержит любое из: i) последовательности, содержащей любую из SEQ ID NO: 268-282, 305-312 или 365-366; ii) последовательности, содержащей любую из SEQ ID NO: 131-135, 371-372, 376, 391-409 или 423-426; iii) последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%

идентичности последовательности с любой из последовательностей (i) или (ii); или (iv) функционального фрагмента или варианта любой из последовательностей (i), (ii) или (iii). В иллюстративных вариантах осуществления такие eTF способны увеличивать экспрессию SCN1A по меньшей мере в 2 раза, 5 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 25 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз или более по сравнению с контролем или на по меньшей мере 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 200%, 250%, 300%, 400%, 500% или более по сравнению с контролем.

[0161] В некоторых вариантах осуществления eTF, раскрытый в настоящем описании, который увеличивает экспрессию SCN1A содержит любое из: (i) последовательности, содержащей любую из SEQ ID NO: 6-9, 13-15, 57-58, 61-62, 67-71, 74-75, 295-299, 313-325 или 364; (ii) последовательности, содержащей любую из SEQ ID NO: 22-25, 29-31, 84-85, 88, 90-92 или 427-435; (iii) последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с любой из последовательностей (i) или (ii); или (iv) функционального фрагмента или варианта любой из последовательностей (i), (ii) или (iii). В иллюстративных вариантах осуществления такие eTF способны увеличивать экспрессию SCN1A по меньшей мере в 2 раза, 5 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 25 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз или более по сравнению с контролем или на по меньшей мере 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 200%, 250%, 300%, 400%, 500% или более по сравнению с контролем. В иллюстративных вариантах осуществления такие eTF имеют по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 97%, 98% или 99% общей идентичности последовательности с одним или более человеческими белками. В некоторых вариантах осуществления такие eTF демонстрируют снижение иммуногенности по сравнению с eTF, имеющим более низкую общую идентичность последовательности с одним или более человеческими белками. В различных вариантах осуществления снижение иммуногенности может быть измерено с помощью анализа elispot, иммуноанализа или методом *in silico*.

[0162] В некоторых вариантах осуществления eTF, раскрытый в настоящем описании, который увеличивает экспрессию SCN1A, содержит любое из: (i) последовательности, содержащей SEQ ID NO: 305; (ii) последовательности, содержащей SEQ ID NO: 423; (iii) последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с последовательностями (i) или (ii); или (iv) функционального фрагмента или варианта любой из последовательностей (i), (ii) или (iii). В иллюстративных вариантах осуществления такие eTF содержат SEQ ID NO: 135 и связываются с целевым участком, имеющим SEQ ID NO: 256. В иллюстративных вариантах осуществления такие eTF способны увеличивать экспрессию SCN1A по меньшей мере в 2 раза, 5 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 25 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз или более по сравнению с контролем или на по меньшей мере 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%,

75%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 200%, 250%, 300%, 400%, 500% или более по сравнению с контролем.

[0163] В некоторых вариантах осуществления eTF, раскрытый в настоящем описании, который увеличивает экспрессию SCN1A содержит любое из: (i) последовательности, содержащей SEQ ID NO: 306; (ii) последовательности, содержащей SEQ ID NO: 424; (iii) последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с последовательностями (i) или (ii); или (iv) функционального фрагмента или варианта любой из последовательностей (i), (ii) или (iii). В иллюстративных вариантах осуществления такие eTF содержат SEQ ID NO: 135 и связываются с целевым участком, имеющим SEQ ID NO: 256. В иллюстративных вариантах осуществления такие eTF способны увеличивать экспрессию SCN1A по меньшей мере в 2 раза, 5 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 25 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз или более по сравнению с контролем или на по меньшей мере 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 200%, 250%, 300%, 400%, 500% или более по сравнению с контролем.

[0164] В некоторых вариантах осуществления eTF, раскрытый в настоящем описании, который увеличивает экспрессию SCN1A содержит любое из: (i) последовательности, содержащей SEQ ID NO: 308; (ii) последовательности, содержащей SEQ NO: 425; (iii) последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 96%, 97%, 97%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с последовательностями (i) или (ii); или (iv) функционального фрагмента или варианта любой из последовательностей (i), (ii) или (iii). В иллюстративных вариантах осуществления такие eTF содержат SEQ ID NO: 135 и связываются с целевым участком, имеющим SEQ ID NO: 256. В иллюстративных вариантах осуществления такие eTF способны увеличивать экспрессию SCN1A по меньшей мере в 2 раза, 5 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 25 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз или более по сравнению с контролем или на по меньшей мере 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 200%, 250%, 300%, 400%, 500% или более по сравнению с контролем.

[0165] В некоторых вариантах осуществления eTF, раскрытый в настоящем описании, который увеличивает экспрессию SCN1A содержит любое из: (i) последовательности, содержащей SEQ ID NO: 313; (ii) последовательности, содержащей SEQ NO: 427; (iii) последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 96%, 97%, 97%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с последовательностями (i) или (ii); или (iv) функционального фрагмента или варианта любой из последовательностей (i), (ii) или (iii). В иллюстративных вариантах осуществления такие eTF содержат SEQ ID NO: 135 и связываются с целевым участком, имеющим SEQ ID NO: 256. В иллюстративных вариантах осуществления такие eTF способны увеличивать экспрессию SCN1A по

меньшей мере в 2 раза, 5 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 25 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз или более по сравнению с контролем или на по меньшей мере 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 200%, 250%, 300%, 400%, 500% или более по сравнению с контролем. В иллюстративных вариантах осуществления такие eTF имеют по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 89%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 97%, 98% или 99% общей идентичности последовательности с одним или более человеческими белками. В некоторых вариантах осуществления такие eTF демонстрируют снижение иммуногенности по сравнению с eTF, имеющим более низкую общую идентичность последовательности с одним или более человеческими белками. В различных вариантах осуществления снижение иммуногенности может быть измерено с помощью анализа elispot, иммуноанализа или метода *in silico*.

[0166] В некоторых вариантах осуществления eTF, раскрытый в настоящем описании, который увеличивает экспрессию SCN1A содержит любое из: (i) последовательности, содержащей SEQ ID NO: 316; (ii) последовательности, содержащей SEQ NO: 430; (iii) последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 96%, 97%, 97%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с последовательностями (i) или (ii); или (iv) функционального фрагмента или варианта любой из последовательностей (i), (ii) или (iii). В иллюстративных вариантах осуществления такие eTF содержат SEQ ID NO: 135 и связываются с целевым участком, имеющим SEQ ID NO: 256. В иллюстративных вариантах осуществления такие eTF способны увеличивать экспрессию SCN1A по меньшей мере в 2 раза, 5 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 25 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз или более по сравнению с контролем или на по меньшей мере 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 200%, 250%, 300%, 400%, 500% или более по сравнению с контролем. В иллюстративных вариантах осуществления такие eTF имеют по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 89%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 97%, 98% или 99% общей идентичности последовательности с одним или более человеческими белками. В некоторых вариантах осуществления такие eTF демонстрируют снижение иммуногенности по сравнению с eTF, имеющим более низкую общую идентичность последовательности с одним или более человеческими белками. В различных вариантах осуществления снижение иммуногенности может быть измерено с помощью анализа elispot, иммуноанализа или метода *in silico*.

[0167] В некоторых вариантах осуществления eTF, раскрытый в настоящем описании, который увеличивает экспрессию SCN1A содержит любое из: (i) последовательности, содержащей SEQ ID NO: 317; (ii) последовательности, содержащей SEQ NO: 431; (iii) последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 96%, 97%, 97%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с последовательностями (i) или (ii); или (iv) функционального фрагмента или варианта любой из последовательностей (i), (ii) или (iii). В иллюстративных вариантах осуществления такие eTF содержат SEQ ID NO: 371 и

связываются с целевым участком, имеющим SEQ ID NO: 264. В иллюстративных вариантах осуществления такие eTF способны увеличивать экспрессию SCN1A по меньшей мере в 2 раза, 5 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 25 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз или более по сравнению с контролем или на по меньшей мере 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 200%, 250%, 300%, 400%, 500% или более по сравнению с контролем. В иллюстративных вариантах осуществления такие eTF имеют по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 89%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 97%, 98% или 99% общей идентичности последовательности с одним или более человеческими белками. В некоторых вариантах осуществления такие eTF демонстрируют снижение иммуногенности по сравнению с eTF, имеющим более низкую общую идентичность последовательности с одним или более человеческими белками. В различных вариантах осуществления снижение иммуногенности может быть измерено с помощью анализа elispot, иммуноанализа или метода *in silico*.

[0168] В некоторых вариантах осуществления eTF, раскрытый в настоящем описании, который увеличивает экспрессию SCN1A содержит любое из: (i) последовательности, содержащей SEQ ID NO: 315; (ii) последовательности, содержащей SEQ NO: 429; (iii) последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 96%, 97%, 97%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с последовательностями (i) или (ii); или (iv) функционального фрагмента или варианта любой из последовательностей (i), (ii) или (iii). В иллюстративных вариантах осуществления такие eTF содержат SEQ ID NO: 135 и связываются с целевым участком, имеющим SEQ ID NO: 256. В иллюстративных вариантах осуществления такие eTF способны увеличивать экспрессию SCN1A по меньшей мере в 2 раза, 5 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 25 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз или более по сравнению с контролем или на по меньшей мере 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 200%, 250%, 300%, 400%, 500% или более по сравнению с контролем. В иллюстративных вариантах осуществления такие eTF имеют по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 89%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 97%, 98% или 99% общей идентичности последовательности с одним или более человеческими белками. В некоторых вариантах осуществления такие eTF демонстрируют снижение иммуногенности по сравнению с eTF, имеющим более низкую общую идентичность последовательности с одним или более человеческими белками. В различных вариантах осуществления снижение иммуногенности может быть измерено с помощью анализа elispot, иммуноанализа или метода *in silico*.

[0169] В некоторых вариантах осуществления eTF, раскрытый в настоящем описании, который увеличивает экспрессию SCN1A содержит любое из: (i) последовательности, содержащей SEQ ID NO: 319; (ii) последовательности, содержащей SEQ NO: 433; (iii) последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 96%, 97%, 97%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с последовательностями (i) или (ii); или (iv)

функционального фрагмента или варианта любой из последовательностей (i), (ii) или (iii). В иллюстративных вариантах осуществления такие eTF содержат SEQ ID NO: 371 и связываются с целевым участком, имеющим SEQ ID NO: 264. В иллюстративных вариантах осуществления такие eTF способны увеличивать экспрессию SCN1A по меньшей мере в 2 раза, 5 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 25 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз или более по сравнению с контролем или на по меньшей мере 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 200%, 250%, 300%, 400%, 500% или более по сравнению с контролем. В иллюстративных вариантах осуществления такие eTF имеют по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 89%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 97%, 98% или 99% общей идентичности последовательности с одним или более человеческими белками. В некоторых вариантах осуществления такие eTF демонстрируют снижение иммуногенности по сравнению с eTF, имеющим более низкую общую идентичность последовательности с одним или более человеческими белками. В различных вариантах осуществления снижение иммуногенности может быть измерено с помощью анализа elispot, иммуноанализа или метода *in silico*.

[0170] В некоторых вариантах осуществления eTF, раскрытый в настоящем описании, который увеличивает экспрессию SCN1A содержит любое из: (i) последовательности, содержащей SEQ ID NO: 318; (ii) последовательности, содержащей SEQ NO: 432; (iii) последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 96%, 97%, 97%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с последовательностями (i) или (ii); или (iv) функционального фрагмента или варианта любой из последовательностей (i), (ii) или (iii). В иллюстративных вариантах осуществления такие eTF содержат SEQ ID NO: 371 и связываются с целевым участком, имеющим SEQ ID NO: 264. В иллюстративных вариантах осуществления такие eTF способны увеличивать экспрессию SCN1A по меньшей мере в 2 раза, 5 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 25 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз или более по сравнению с контролем или на по меньшей мере 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 200%, 250%, 300%, 400%, 500% или более по сравнению с контролем. В иллюстративных вариантах осуществления такие eTF имеют по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 89%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 97%, 98% или 99% общей идентичности последовательности с одним или более человеческими белками. В некоторых вариантах осуществления такие eTF демонстрируют снижение иммуногенности по сравнению с eTF, имеющим более низкую общую идентичность последовательности с одним или более человеческими белками. В различных вариантах осуществления снижение иммуногенности может быть измерено с помощью анализа elispot, иммуноанализа или метода *in silico*.

[0171] В некоторых вариантах осуществления eTF, раскрытый в настоящем описании, который увеличивает экспрессию SCN1A содержит любое из: (i) последовательности, содержащей SEQ ID NO: 314; (ii) последовательности, содержащей SEQ NO: 428; (iii) последовательности, имеющей по меньшей мере 80%,

85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 96%, 97%, 97%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с последовательностями (i) или (ii); или (iv) функционального фрагмента или варианта любой из последовательностей (i), (ii) или (iii). В иллюстративных вариантах осуществления такие eTF содержат SEQ ID NO: 135 и связываются с целевым участком, имеющим SEQ ID NO: 256. В иллюстративных вариантах осуществления такие eTF способны увеличивать экспрессию SCN1A по меньшей мере в 2 раза, 5 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 25 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз или более по сравнению с контролем или на по меньшей мере 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 200%, 250%, 300%, 400%, 500% или более по сравнению с контролем. В иллюстративных вариантах осуществления такие eTF имеют по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 89%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 97%, 98% или 99% общей идентичности последовательности с одним или более человеческими белками. В некоторых вариантах осуществления такие eTF демонстрируют снижение иммуногенности по сравнению с eTF, имеющим более низкую общую идентичность последовательности с одним или более человеческими белками. В различных вариантах осуществления снижение иммуногенности может быть измерено с помощью анализа elispot, иммуноанализа или метода *in silico*.

[0172] В некоторых вариантах осуществления eTF, раскрытый в настоящем описании, который увеличивает экспрессию SCN1A содержит любое из: (i) последовательности, содержащей SEQ ID NO: 440; (ii) последовательности, содержащей SEQ NO: 441; (iii) последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 96%, 97%, 97%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с последовательностями (i) или (ii); или (iv) функционального фрагмента или варианта любой из последовательностей (i), (ii) или (iii). В иллюстративных вариантах осуществления такие eTF содержат SEQ ID NO: 135 и связываются с целевым участком, имеющим SEQ ID NO: 256. В иллюстративных вариантах осуществления такие eTF способны увеличивать экспрессию SCN1A по меньшей мере в 2 раза, 5 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 25 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз или более по сравнению с контролем или на по меньшей мере 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 200%, 250%, 300%, 400%, 500% или более по сравнению с контролем. В иллюстративных вариантах осуществления такие eTF имеют по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 89%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 97%, 98% или 99% общей идентичности последовательности с одним или более человеческими белками. В некоторых вариантах осуществления такие eTF демонстрируют снижение иммуногенности по сравнению с eTF, имеющим более низкую общую идентичность последовательности с одним или более человеческими белками. В различных вариантах осуществления снижение иммуногенности может быть измерено с помощью анализа elispot, иммуноанализа или метода *in silico*.

[0173] В некоторых вариантах осуществления eTF, раскрытый в настоящем описании, который увеличивает экспрессию SCN1A содержит любое из: (i)

последовательности, содержащей SEQ ID NO: 325; ii) последовательности, содержащей SEQ NO: 435; (iii) последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 96%, 97%, 97%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с последовательностями (i) или (ii); или (iv) функционального фрагмента или варианта любой из последовательностей (i), (ii) или (iii). В иллюстративных вариантах осуществления такие eTF содержат SEQ ID NO: 371 и связываются с целевым участком, имеющим SEQ ID NO: 264. В иллюстративных вариантах осуществления такие eTF способны увеличивать экспрессию SCN1A по меньшей мере в 2 раза, 5 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 25 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз или более по сравнению с контролем или на по меньшей мере 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 200%, 250%, 300%, 400%, 500% или более по сравнению с контролем. В иллюстративных вариантах осуществления такие eTF имеют по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 89%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 97%, 98% или 99% общей идентичности последовательности с одним или более человеческими белками. В некоторых вариантах осуществления такие eTF демонстрируют снижение иммуногенности по сравнению с eTF, имеющим более низкую общую идентичность последовательности с одним или более человеческими белками. В различных вариантах осуществления снижение иммуногенности может быть измерено с помощью анализа elispot, иммуноанализа или метода *in silico*.

[0174] В некоторых вариантах осуществления eTF, раскрытый в настоящем описании, который увеличивает экспрессию SCN1A, содержит DBD, содержащий комплекс гРНК/Cas, в котором гРНК содержит нацеливающую последовательность, содержащую любую из SEQ ID NO: 105-111, 113, 195-211, 224-238 или 240-251. Нацеливающая последовательность гРНК прикреплена к 5'-концу каркасной последовательности, имеющей последовательность: 5'-GTTTTAGTACTCTGGAAACAGAATCTACTAAAACAAGGCAAAATGCCGTGTTTATCTCGTCAACTTGTGGCGAGA-3' (SEQ ID NO: 102). В иллюстративных вариантах осуществления белок Cas является деактивированным нуклеазой белком Cas9. В некоторых вариантах осуществления такой eTF дополнительно содержит один или более TAD, конъюгированных с белком Cas, причем TAD выбирают из VPR, CITED2 или CITED4. В одном из вариантов осуществления такой eTF содержит домен VPR TAD, конъюгированный с C-концом белка Cas. В некоторых вариантах осуществления такой eTF содержит CITED2 TAD, конъюгированный с N-концом, C-концом или N-концом и C-концом белка Cas. В некоторых вариантах осуществления такой eTF содержит CITED4 TAD, конъюгированный с N-концом, C-концом или N-концом и C-концом белка Cas. В иллюстративных вариантах осуществления такие eTF способны увеличивать экспрессию SCN1A по меньшей мере в 2 раза, 5 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 25 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз или более по сравнению с контролем.

eTF, которые увеличивают экспрессию програнулина (GRN)

[0175] В другом аспекте заявка относится к eTF, которые способны увеличивать

экспрессию гена програнулина (GRN) и увеличивать экспрессию белка GRN. Програнулин (GRN или PGRN), также известный как предшественник гранулина, является богатым цистеином, секретлируемым гликопротеином со свойствами, подобными факторам роста. GRN расположен на хромосоме 17q21.31 (NCBI номер последовательности: NC_000017,11). Гранулины играют роль в ангиогенезе, заживлении ран, пролиферации клеток и воспалении. Мутации в гене програнулина и/или дефицит секретлируемого програнулина связаны с различными нейродегенеративными заболеваниями и метаболическими нарушениями, такими как лобно-височная лобарная дегенерация; лобно-височная дегенерация или лобно-височная деменция, нейродегенеративное заболевание с ранним началом, ассоциированное с частичным дефицитом програнулина; прогрессирующая афазия со снижением беглости речи; семантическое слабоумие; болезнь Паркинсона; болезнь Альцгеймера; и нейрональный цероидный липофуциноз с тотальным дефицитом програнулина. Мутация и/или дефицит програнулина также связаны с атеросклерозом, прогрессирующим заболеванием, характеризующимся воспалением и утолщением стенок артерий из-за накопления липидов и пролиферации клеток. Таким образом, eTF, представленный в настоящем описании, который увеличивает экспрессию GRN, может быть использован для лечения различных заболеваний или расстройств, связанных с мутациями в GRN.

[0176] В определенных вариантах осуществления раскрытый в настоящем описании eTF, который увеличивает экспрессию GRN, распознает целевой участок связывания размером по меньшей мере 9 п.о., 12 п.о., 15 п.о., 18 п.о., 21 п.о., 24 п.о., 30 п.о., 33 п.о. или 36 п.о.; более чем 9 п.о., 12 п.о., 15 п.о., 18 п.о., 21 п.о., 24 п.о., 27 п.о. или 30 п.о.; или от 9-33 п.о., 9-30 п.о., 9-27 п.о., 9-24 п.о., 9-21 п.о., 9-18 п.о., 9-15 п.о., 9-12 п.о., 12-33 п.о., 12-30 п.о., 12-27 п.о., 12-24 п.о., 12-21 п.о., 12-18 п.о., 12-15 п.о., 15-33 п.о., 15-30 п.о., 15-27 п.о., 15-24 п.о., 15-21 п.о., 15-18 п.о., 18-33 п.о., 18-30 п.о., 18-27 п.о., 18-24 п.о., 18-21 п.о., 21-33 п.о., 21-30 п.о., 21-27 п.о., 21-24 п.о., 24-33 п.о., 24-30 п.о., 24-27 п.о., 27-33 п.о., 27-30 п.о., или 30-33 п.о. В иллюстративных вариантах осуществления раскрытый в настоящем описании eTF, который увеличивает экспрессию GRN, распознает целевой участок связывания, который составляет 18-27 п.о., 18 п.о. или 27 п.о.

[0177] В определенных вариантах осуществления раскрытый в настоящем описании eTF, который увеличивает экспрессию GRN, распознает целевой участок связывания, который расположен на хромосоме 17. В определенных вариантах осуществления раскрытый в настоящем описании eTF, который увеличивает экспрессию GRN, распознает целевой участок связывания, расположенный на хромосоме 17 выше или ниже TSS GRN в пределах 110 т.п.о., 100 т.п.о., 90 т.п.о., 80 т.п.о., 70 т.п.о., 60 т.п.о., 50 т.п.о., 40 т.п.о., 30 т.п.о., 20 т.п.о., 10 т.п.о., 5 т.п.о., 4 т.п.о., 3 т.п.о., 2 т.п.о. или 1 т.п.о. В иллюстративных вариантах осуществления такие целевые участки связывания составляют 18-27 п.о., 18 п.о. или 27 п.о.

[0178] В определенных вариантах осуществления раскрытый в настоящем

описании eTF, который увеличивает экспрессию GRN, распознает целевой участок связывания, который находится на хромосоме 17 в положениях 44, 344, 963-44, 345, 178 (со ссылкой на GRCh38.p12). В иллюстративных вариантах осуществления такие целевые участки связывания составляют 18-27 п.о., 18 п.о. или 27 п.о.

[0179] В определенных вариантах осуществления раскрытый в настоящем описании eTF, который увеличивает экспрессию GRN, распознает целевой участок связывания, который (i) составляет 18-27 п.о., 18 п.о. или 27 п.о. и (ii) связывается с областью генома, которая находится в пределах по меньшей мере 1 т.п.о., 750 п.о., 500 п.о., 400 п.о., 300 п.о., 200 п.о., 100 п.о. или 50 п.о. от местоположения в геноме, имеющего последовательность любой из SEQ ID NO: 38, 113 или 330-336. В некоторых вариантах осуществления целевой участок связывания способен вызывать по меньшей мере 1,2-кратное, 2-кратное, 5-кратное, 15-кратное, 20-кратное или 25-кратное увеличение экспрессии GRN при связывании с eTF, раскрытым в настоящем описании.

[0180] В определенных вариантах осуществления раскрытый в настоящем описании eTF, который увеличивает экспрессию GRN, распознает целевой участок связывания, который (i) составляет 18-27 п.о., 18 п.о. или 27 п.о. и (ii) связывается с геномной областью, которая по меньшей мере частично перекрывается с местоположением в геноме, имеющим последовательность любую из SEQ ID NO: 38, 113 или 330-336. В некоторых вариантах осуществления целевой участок связывания способен вызывать по меньшей мере 1,2-кратное, 2-кратное, 5-кратное, 15-кратное, 20-кратное или 25-кратное увеличение экспрессии SCN1A при связывании с eTF, раскрытым в данном документе.

[0181] В определенных вариантах осуществления раскрытый в настоящем описании eTF, который увеличивает экспрессию GRN, распознает целевой участок связывания, имеющий любую из следующих последовательностей: SEQ ID NO: 38, 113, 330-336. В некоторых вариантах осуществления целевой участок связывания способен вызывать по меньшей мере 1,2-кратное, 2-кратное, 5-кратное, 15-кратное, 20-кратное или 25-кратное увеличение экспрессии SCN1A при связывании с eTF, раскрытым в настоящем описании.

[0182] В определенных вариантах осуществления раскрытый в настоящем описании eTF, который увеличивает экспрессию GRN, обеспечивает по меньшей мере 1,5-кратное, 2-кратное, 3-кратное, 4-кратное, 5-кратное, 6-кратное, 7-кратное, 8-кратное, 9-кратное, 10-кратное, 15-кратное, 20-кратное, 25-кратное, 50-кратное, 100-кратное или более или 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 200%, 250%, 300%, 400% или 500% или более увеличение экспрессии GRN (РНК и/или белка GRN) в клетке или *in vivo* по сравнению с контролем (например, без eTF или с eTF который не распознает целевой участок). В различных вариантах осуществления увеличение экспрессии GRN можно обнаружить с помощью методов ПЦР, вестерн-блот анализа или иммуноанализа.

[0183] В определенных вариантах осуществления раскрытый в настоящем

описании eTF, который увеличивает экспрессию GRN, имеет минимальные нецелевые эффекты, например, нецелевые эффекты, связанные с неспецифическим связыванием, такие как, например, модуляция экспрессии нецелевого гена или гена, отличного от GRN. В одном из вариантов осуществления раскрытый в настоящем описании eTF, который увеличивает экспрессию GRN, специфически увеличивает экспрессию GRN по сравнению с контролем по меньшей мере в 5 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 25 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз или более по сравнению с экспрессией одного или более нецелевых генов, обеспечиваемой eTF, по сравнению с контролем. В иллюстративном варианте осуществления раскрытый в настоящем описании eTF, который увеличивает экспрессию GRN, специфически увеличивает транскрипцию гена GRN по сравнению с контролем по меньшей мере в 5 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз или более по сравнению с транскрипцией, обеспечиваемой eTF, 10, 20, 30, 40 или 50 ближайших генов (например, 10, 20, 30, 40 или 50 ближайших генов, расположенных в кодирующей последовательности GRN на хромосоме 17) относительно контроля. В различных вариантах осуществления увеличение транскрипции гена GRN может быть обнаружено методом ПЦР.

[0184] В определенных вариантах осуществления раскрытый в настоящем описании eTF, который увеличивает экспрессию GRN, имеет высокий процент идентичности с одним или более человеческими белками (как дополнительно описано ниже). В некоторых вариантах осуществления такие eTF имеют по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% общей идентичности последовательности с одним или более человеческими белками. В определенных вариантах осуществления такие eTF проявляют пониженную иммуногенность по сравнению с eTF, имеющим более низкий общий процент идентичности последовательности с одним или более человеческими белками. В различных вариантах осуществления снижение иммуногенности может быть измерено с помощью анализа elispot, иммуноанализа или метода *in silico*. В некоторых вариантах осуществления такие eTF могут содержать DBD, полученный из человеческого EGR1 или EGR3, и TAD, полученный из человеческого EGR1, EGR3, CITED2 или CITED4.

[0185] В определенных вариантах осуществления раскрытый в настоящем описании eTF, который увеличивает экспрессию GRN, содержит ДНК-связывающий домен, имеющий один или более доменов цинкового пальца, содержащего спираль распознавания, содержащую любую из SEQ ID NO: 141-164. В определенных вариантах осуществления раскрытый в настоящем описании eTF, который увеличивает экспрессию GRN, содержит ДНК-связывающий домен, имеющий по меньшей мере один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать или двенадцать доменов цинкового пальца, причем каждый домен цинкового пальца независимо содержит спираль распознавания, содержащую любую из SEQ ID NO: 141-164. В определенных вариантах осуществления раскрытый в настоящем описании eTF, который увеличивает экспрессию GRN, содержит ДНК-

связывающий домен, имеющий шесть доменов цинкового пальца, причем каждый домен цинкового пальца независимо содержит спираль распознавания, содержащую любую из SEQ ID NO: 141-164. В определенных вариантах осуществления раскрытый в настоящем описании eTF, который увеличивает экспрессию GRN, содержит ДНК-связывающий домен, имеющий девять доменов цинкового пальца, причем каждый домен цинкового пальца независимо содержит спираль распознавания, содержащую любую из SEQ ID NO: 141-164. В иллюстративных вариантах осуществления такие eTF содержат ДНК-связывающий домен, имеющий SEQ ID NO: 421, где каждый X независимо выбирают из любой из SEQ ID NO: 141-164, а n равно 6 или 9.

[0186] В определенных вариантах осуществления раскрытый в настоящем документе eTF, который увеличивает экспрессию GRN, содержит ДНК-связывающий домен, имеющий любое из: (i) последовательности, содержащей RNDTLTE x DPGALVR x TSGELVR x RSDNLVR x TSGELVR x TKNSLTE (SEQ ID NO: 171), (ii) последовательности, имеющей по меньшей мере 89%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 171, или (ii) функционального фрагмента (i) или (ii). В определенных вариантах осуществления такой eTF дополнительно содержит один или более TAD, выбранных из VP64, VPR, CITED2 или CITED4. В одном из вариантов осуществления такой eTF содержит домен VPR TAD, конъюгированный с С-концом DBD. В некоторых вариантах осуществления такой eTF содержит TAD CITED2, конъюгированный с N-концом, С-концом или N-концом и С-концом DBD. В некоторых вариантах осуществления такой eTF содержит CITED4 TAD, конъюгированный с N-концом, С-концом или N-концом и С-концом DBD. В определенных вариантах осуществления такой eTF способен связываться с целевым участком, имеющим SEQ ID NO: 331 и повышающим экспрессию GRN по меньшей мере в 2 раза, 5 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 25 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз или более по сравнению с контролем или на по меньшей мере 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 200%, 250%, 300%, 400% или 500% или более по сравнению с контролем.

[0187] В определенных вариантах осуществления раскрытый в настоящем документе eTF, который увеличивает экспрессию GRN, содержит ДНК-связывающий домен, имеющий любое из: (i) последовательности, содержащей RSDNLVR x DPGHLVR x RSDHLTT x RSDLVLR x RSDKLVLR x TTGNLTV (SEQ ID NO: 412), (ii) последовательности, имеющей по меньшей мере 89%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 412, или (ii) функционального фрагмента (i) или (ii). В определенных вариантах осуществления такой eTF дополнительно содержит один или более TAD, выбранных из VP64, VPR, CITED2 или CITED4. В одном из вариантов осуществления такой eTF содержит домен VPR TAD, конъюгированный с С-концом DBD. В некоторых вариантах осуществления такой eTF содержит TAD CITED2, конъюгированный с N-концом, С-концом или N-концом и С-концом DBD. В некоторых вариантах осуществления такой eTF содержит CITED4 TAD,

конъюгированный с N-концом, C-концом или N-концом и C-концом DBD. В определенных вариантах осуществления такой eTF способен связываться с целевым участком, имеющим SEQ ID NO: 332 и повышающим экспрессию GRN по меньшей мере в 2 раза, 5 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 25 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз или более по сравнению с контролем или на по меньшей мере 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 200%, 250%, 300%, 400% или 500% или более по сравнению с контролем.

[0188] В определенных вариантах осуществления раскрытый в настоящем документе eTF, который увеличивает экспрессию GRN, содержит ДНК-связывающий домен, имеющий любое из: (i) последовательности, содержащей RSDHLTT x RSDELVR x RSDKLVR x TTGNLTV x QLAHLRA x TKNSLTE (SEQ ID NO: 413), (ii) последовательности, имеющей по меньшей мере 89%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 413, или (ii) функционального фрагмента (i) или (ii). В определенных вариантах осуществления такой eTF дополнительно содержит один или более TAD, выбранных из VP64, VPR, CITED2 или CITED4. В одном из вариантов осуществления такой eTF содержит домен VPR TAD, конъюгированный с C-концом DBD. В некоторых вариантах осуществления такой eTF содержит TAD CITED2, конъюгированный с N-концом, C-концом или N-концом и C-концом DBD. В некоторых вариантах осуществления такой eTF содержит CITED4 TAD, конъюгированный с N-концом, C-концом или N-концом и C-концом DBD. В определенных вариантах осуществления такой eTF способен связываться с целевым участком, имеющим SEQ ID NO: 333 и повышающим экспрессию GRN по меньшей мере в 2 раза, 5 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 25 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз или более по сравнению с контролем или на по меньшей мере 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 200%, 250%, 300%, 400% или 500% или более по сравнению с контролем.

[0189] В определенных вариантах осуществления раскрытый в настоящем документе eTF, который увеличивает экспрессию GRN, содержит ДНК-связывающий домен, имеющий любое из: (i) последовательности, содержащей SPADLTR x DSGNLRV x QLAHLRA x QRANLRA x REDNLHT x RSDNLVR (SEQ ID NO: 414), (ii) последовательности, имеющей по меньшей мере 89%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 414, или (ii) функционального фрагмента (i) или (ii). В определенных вариантах осуществления такой eTF дополнительно содержит один или более TAD, выбранных из VP64, VPR, CITED2 или CITED4. В одном из вариантов осуществления такой eTF содержит домен VPR TAD, конъюгированный с C-концом DBD. В некоторых вариантах осуществления такой eTF содержит TAD CITED2, конъюгированный с N-концом, C-концом или N-концом и C-концом DBD. В некоторых вариантах осуществления такой eTF содержит CITED4 TAD, конъюгированный с N-концом, C-концом или N-концом и C-концом DBD. В определенных вариантах осуществления такой eTF способен связываться с целевым

участком, имеющим SEQ ID NO: 38 и повышающим экспрессию GRN по меньшей мере в 2 раза, 5 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 25 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз или более по сравнению с контролем или на по меньшей мере 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 200%, 250%, 300%, 400% или 500% или более по сравнению с контролем.

[0190] В определенных вариантах осуществления раскрытый в настоящем документе eTF, который увеличивает экспрессию GRN, содержит ДНК-связывающий домен, имеющий любое из: (i) последовательности, содержащей TSHSLTE x HKNALQN x ERSHLRE x SKKALTE x QRANLRA x RKDNLKN x QSSNLVR x QSSSLVR x QAGHLAS (SEQ ID NO: 415), (ii) последовательности, имеющей по меньшей мере 89%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 415, или (ii) функционального фрагмента (i) или (ii). В определенных вариантах осуществления такой eTF дополнительно содержит один или более TAD, выбранных из VP64, VPR, CITED2 или CITED4. В одном из вариантов осуществления такой eTF содержит домен VPR TAD, конъюгированный с С-концом DBD. В некоторых вариантах осуществления такой eTF содержит TAD CITED2, конъюгированный с N-концом, С-концом или N-концом и С-концом DBD. В некоторых вариантах осуществления такой eTF содержит CITED4 TAD, конъюгированный с N-концом, С-концом или N-концом и С-концом DBD. В определенных вариантах осуществления такой eTF способен связываться с целевым участком, имеющим SEQ ID NO: 334 и повышающим экспрессию GRN по меньшей мере в 2 раза, 5 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 25 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз или более по сравнению с контролем или на по меньшей мере 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 200%, 250%, 300%, 400% или 500% или более по сравнению с контролем.

[0191] В определенных вариантах осуществления раскрытый в настоящем документе eTF, который увеличивает экспрессию GRN, содержит ДНК-связывающий домен, имеющий любое из: (i) последовательности, содержащей QSGDLRR x SPADLTR x DSGNLRV x QLAHLRA x QRANLRA x REDNLHT x RSDNLVR (SEQ ID NO: 416), (ii) последовательности, имеющей по меньшей мере 89%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 416, или (ii) функционального фрагмента (i) или (ii). В определенных вариантах осуществления такой eTF дополнительно содержит один или более TAD, выбранных из VP64, VPR, CITED2 или CITED4. В одном из вариантов осуществления такой eTF содержит домен VPR TAD, конъюгированный с С-концом DBD. В некоторых вариантах осуществления такой eTF содержит TAD CITED2, конъюгированный с N-концом, С-концом или N-концом и С-концом DBD. В некоторых вариантах осуществления такой eTF содержит CITED4 TAD, конъюгированный с N-концом, С-концом или N-концом и С-концом DBD. В определенных вариантах осуществления такой eTF способен связываться с целевым участком, имеющим SEQ ID NO: 335 и повышающим экспрессию GRN по меньшей мере в 2 раза, 5 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 25 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз или более по сравнению с

контролем или на по меньшей мере 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 200%, 250%, 300%, 400% или 500% или более по сравнению с контролем.

[0192] В определенных вариантах осуществления раскрытый в настоящем документе eTF, который увеличивает экспрессию GRN, содержит любое из: (i) последовательности, содержащей любую из SEQ ID NO: 10, 16, 59-60, 63-64, 72-73, 76-77 или 337-350; ii) последовательности, содержащей любую из SEQ ID NO: 26, 32, 86-89, 93, 165-171, 377-390 или 412-416; iii) последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с любой из последовательностей (i) или (ii); или (iv) функционального фрагмента или варианта любой из последовательностей (i), (ii) или (iii). В иллюстративных вариантах осуществления такие eTF способны увеличивать экспрессию GRN по меньшей мере в 2 раза, 5 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 25 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз или более по сравнению с контролем или на по меньшей мере 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 200%, 250%, 300%, 400%, 500% или более по сравнению с контролем.

[0193] В некоторых вариантах осуществления eTF, раскрытый в настоящем описании, который увеличивает экспрессию GRN, содержит DBD, содержащий комплекс гРНК/Cas, причем гРНК содержит нацеливающую последовательность, содержащую SEQ ID NO: 113. Целевая последовательность гРНК присоединена к 5'-концу каркасной последовательности, имеющей последовательность: 5'-GTTTTAGTACTCTGGAAACAGAATCTACTAAAACAAGGCAAAATGCCGTGTTTATCTCGTCAACTTGTGGCGAGA-3' (SEQ ID NO: 102). В иллюстративных вариантах осуществления белок Cas является деактивированным нуклеазой белком Cas9. В некоторых вариантах осуществления такой eTF дополнительно содержит один или более TAD, конъюгированных с белком Cas, причем TAD выбирают из VP64, VPR, CITED2 или CITED4. В одном из вариантов осуществления такой eTF содержит домен VPR TAD, конъюгированный с C-концом белка Cas. В некоторых вариантах осуществления такой eTF содержит CITED2 TAD, конъюгированный с N-концом, C-концом или N-концом и C-концом белка Cas. В некоторых вариантах осуществления такой eTF содержит CITED4 TAD, конъюгированный с N-концом, C-концом или N-концом и C-концом белка Cas. В иллюстративных вариантах осуществления такие eTF способны увеличивать экспрессию GRN по меньшей мере 2 раза, 5 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 25 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз или более по сравнению с контролем или на по меньшей мере 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 200%, 250%, 300%, 400%, 500% или более по сравнению с контролем.

eTF, которые являются высоко гомологичными человеческими белками

[0194] В другом аспекте изобретение относится к eTF, имеющим высокий процент идентичности последовательности с одним или более человеческими белками, которые могут быть сконструированы таким образом, чтобы они связывались с целевым участком

в геноме и модулировали экспрессию (увеличивали или уменьшали) любого представляющего интерес гена, в том числе, например, SCN1A или GRN. Такие eTF не имеют практически никакой иммуногенности при введении в организм субъекта или имеют сниженную иммуногенность по сравнению с eTF, имеющими более низкий процент идентичности последовательности с человеческими белками.

[0195] В некоторых вариантах осуществления eTF, представленный в настоящем описании, имеет по меньшей мере 75%, 76%, 77%, 78%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентичности последовательности с одним или более человеческими белками. Если eTF, представленный в настоящем описании, состоит из DBD и TAD, полученных из одного и того же белка, процент идентичности с человеческим белком может быть определен путем вычисления общего количества аминокислотных остатков в eTF, которые совпадают с таковыми человеческого белка, из которого он был получен (например, EGR1 или EGR3), деленного на общее количество остатков аминокислот в eTF. Если представленный eTF содержит DBD из одного человеческого белка и TAD, полученный из другого человеческого белка, процент идентичности с человеческим белком может быть определен путем вычисления процента идентичности с человеческим белком отдельно по каждому домену и суммирования результатов, например, путем (i) вычисления общего количества аминокислотных остатков в DBD, которые совпадают с таковыми человеческого белка, из которого он был получен (например, EGR1 или EGR3), деленного на общее количество остатков аминокислот в eTF; ii) вычисления общего количества аминокислотных остатков в TAD, которые совпадают с таковыми человеческого белка, из которого он был получен (например, CITED2 или CITED4), деленного на общее количество аминокислотных остатков в eTF; и (iii) суммирования общего количества (i) и (ii). В таком варианте осуществления домены распределены следующим образом: первый домен простирается от N-конца eTF до начала последовательности, кодирующей второй домен, а второй домен простирается от начала последовательности, кодирующей второй домен, до C-конца eTF (например, для eTF, имеющего конфигурацию NLS-DBD-линкер-NLS-TAD, первым доменом будет NLS-DBD-линкер, а вторым доменом будет NLS-TAD). Если eTF, представленный в настоящем описании, состоит из DBD из одного человеческого белка и двух TAD, полученных из одного или более разных человеческих белков, процент идентичности с человеческим белком может быть определен путем вычисления процента идентичности с человеческим белком отдельно для каждого домена и суммирования всех трех результатов, например, путем (i) вычисления общего количества аминокислотных остатков в DBD, которые совпадают с таковыми человеческого белка, из которого он был получен (например, EGR1 или EGR3), деленного на общее количество аминокислотных остатков в eTF; ii) вычисления общего количества аминокислотных остатков в первом TAD, которые совпадают с таковыми человеческого белка, из которого он был получен (например, CITED2 или CITED4), деленного на общее количество аминокислотных остатков в eTF; iii) вычисления общего количества

аминокислотных остатков во втором TAD, которые совпадают с таковыми человеческого белка, из которого он был получен (например, CITED2 или CITED4), деленного на общее количество аминокислотных остатков в eTF; и (iv) суммирования общих количеств (i), (ii) и (iii). В таком варианте осуществления домены распределены следующим образом: первый домен простирается от N-конца eTF до начала последовательности, кодирующей второй домен, второй домен простирается от начала последовательности, кодирующей второй домен, до начала последовательности, кодирующей третий домен, а третий домен простирается от начала последовательности, кодирующей третий домен, до C-конца eTF (например, для eTF, имеющего конфигурацию NLS-TAD1-линкер-NLS-DBD-линкер-NLS-TAD2, первым доменом будет NLS-TAD1-линкер, вторым доменом будет NLS-DBD-линкер, а третьим доменом будет NLS-TAD2). Процент идентичности с одним или более человеческими белками, как описано в этом разделе, может быть определен с помощью результата процента идентичности, полученного путем использования стандартного инструмента BLAST для белков, доступного от NCBI (например, инструмента выравнивания blastp suite, в котором используется алгоритм blastp (белок -> белок) с параметрами по умолчанию) на веб-сайте NCBI по адресу: blast.ncbi.nlm.nih.gov/.

[0196] В определенных вариантах осуществления eTF, представленный в настоящем описании, имеет преимущество, заключающееся в том, что он вызывает слабый, минимальный или вообще не вызывает побочного иммунного ответа у человека из-за высокой степени идентичности последовательности с природными человеческими белками. В определенных вариантах осуществления eTF, представленный в настоящем описании, вызывает пониженную иммуногенность, например иммуногенность, уменьшенную по меньшей мере 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 раз или более по сравнению с иммуногенностью, наблюдаемой у eTF, имеющего более низкий процент идентичности с одним или более человеческими белками, например eTF, имеющим менее 50%, 55%, 65% или 70% идентичности последовательности с одним или более человеческими белками. В некоторых случаях уменьшение иммуногенности может быть измерено с помощью анализа elispot, иммуноанализа или метода *in silico*. Генная терапия с низкой или минимальной иммуногенностью имеет несколько преимуществ, включая улучшенную переносимость пациентами, более низкую дозу, необходимую для достижения терапевтического эффекта, пролонгированные терапевтические эффекты после одного введения, возможность вводить несколько раз или в нескольких дозах, при необходимости, устойчивую терапевтическую эффективность в течение более длительного периода времени на введение, повышенную безопасность и/или повышенную эффективность генной терапии.

[0197] В определенных вариантах осуществления eTF, представленные в настоящем описании, имеющие высокий процент идентичности последовательности с одним или более человеческими белками, содержат DBD и TAD, полученные из одного или более природных человеческих белков. В определенных вариантах

осуществления такой eTF может содержать DBD, полученный из любого природного человеческого белка, содержащего DBD. В иллюстративных вариантах осуществления eTF, представленный в настоящем описании, имеющий высокий процент идентичности последовательности с одним или более человеческими белками, содержит DBD, полученный из природного белка с цинковыми пальцами, такого как, например любой из белков с цинковыми пальцами, перечисленных в таблице 7. В определенных вариантах осуществления eTF, представленный в настоящем описании, имеющий высокий процент идентичности последовательности с одним или более человеческими белками, содержит DBD, полученный из человеческого белка EGR, такого как EGR1, EGR2, EGR3 или EGR4. В иллюстративных вариантах осуществления eTF, представленный в настоящем описании, имеющий высокий процент идентичности последовательности с одним или более человеческими белками, содержит DBD, полученный из человеческого EGR1 или EGR3. В различных вариантах осуществления eTF, представленный в настоящем описании, имеющий высокий процент идентичности последовательности с одним или более человеческими белками, содержит DBD, полученный из человеческого белка с цинковыми пальцами, причем в один или более доменов цинкового пальца DBD было введено минимальное количество аминокислотных замен (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 2-3, 2-4, 2-5, 2-6, 2-7, 3-4 3-5, 36 или 3-7 аминокислотных замен) с целью изменения специфичности связывания DBD для распознавания представляющего интерес целевого участка связывания. Такие модификации последовательности предпочтительно выполняют в спирали распознавания доменов DBD цинкового пальца, тогда как остальная часть DBD или человеческого белка с цинковыми пальцами (включая TAD) остается неизменной для сохранения как можно большей идентичности последовательности с природным человеческим белком.

[0198] В определенных вариантах осуществления eTF, представленные в настоящем описании, имеющие высокий процент идентичности последовательности с одним или более человеческими белками, содержат один или более доменов модуляции транскрипции (например, TAD или TRD), полученные из человеческого белка, конъюгированного с DBD, который получен из человеческого белка. В различных вариантах осуществления домен модуляции транскрипции может быть получен из любого природного человеческого белка, имеющего домен, способный рекрутировать один или более белковых факторов, которые могут модулировать транскрипцию (например, РНК-полимеразу II, белок-коактиватор или белок корепрессор) или уровень экспрессии представляющего интерес гена, когда eTF связывается с целевым участком через DBD. В иллюстративных вариантах осуществления TAD получают из человеческого белка EGR, такого как, например, человеческий EGR1, EGR2, EGR3 или EGR4, или человеческого белка CITED, такого как, например, человеческий белок CITED2 или CITED4. В иллюстративном варианте осуществления eTF, представленный в настоящем описании, имеющий высокий процент

идентичности последовательности с одним или более человеческими белками, содержит TAD, полученный из человеческого белка EGR1 или EGR3. В другом иллюстративном варианте осуществления eTF, представленный в настоящем описании, имеющий высокий процент идентичности последовательности с одним или более человеческими белками, содержит TAD, полученный из человеческого белка CITED2 или CITED4.

[0199] В одном из вариантов осуществления eTF, представленный в настоящем описании, имеющий высокий процент идентичности последовательности с одним или более человеческими белками, может содержать человеческий DBD (hDBD) и человеческий TAD (hTAD) (например, hTAD-hDBD или hDBD-hTAD), где hDBD и hTAD могут быть получены из одного и того же человеческого белка или из разных человеческих белков. В другом варианте осуществления eTF, представленный в настоящем описании, имеющий высокий процент идентичности последовательности с одним или более человеческими белками, может содержать hDBD и два hTAD, где hDBD и hTAD получены из одного и того же человеческого белка; hDBD получен из первого человеческого белка, и оба hTAD получены из второго человеческого белка; hDBD и один hTAD получены из первого человеческого белка, и второй hTAD получен из второго человеческого белка; или hDBD получен из первого человеческого белка, один hTAD получен из второго человеческого белка, а второй hTAD получен из третьего человеческого белка (например, hTAD1-hDBD-hTAD1 или hTAD1-hDBD-hTAD2).

[0200] В иллюстративных вариантах осуществления eTF, представленный в настоящем описании, имеющий высокий процент идентичности последовательности с одним или более человеческими белками, содержит любую одну из следующих конфигураций: (i) hDBD и hTAD, оба полученные из человеческого EGR1; (ii) hDBD и hTAD, оба полученные из человеческого EGR3; (iii) hDBD, полученный из человеческого EGR1, и hTAD, полученный из CITED2 (например, hEGR1 DBD-hCITED2 TAD или hCITED2 TAD-hEGR1 DBD); (iv) hDBD, полученный из человеческого EGR1, и hTAD, полученный из человеческого CITED4 (например, hEGR1 DBD-hCITED4 TAD или hCITED4 TAD-hEGR1 DBD); (v) hDBD, полученный из человеческого EGR3, и hTAD, полученный из CITED2 (например, hEGR3 DBD-hCITED2 TAD или hCITED2 TAD-hEGR3 DBD); (vi) hDBD, полученный из человеческого EGR3, и hTAD, полученный из человеческого CITED4 (например, hEGR3 DBD-hCITED4 TAD или hCITED4 TAD-hEGR3 DBD); (vii) hDBD, полученный из человеческого EGR1, и два hTAD, полученные из CITED2 (например, hCITED2 TAD-hEGR1 DBD-hCITED2 TAD); (viii) hDBD, полученный из человеческого EGR1, и два hTAD, полученные из человеческого CITED4 (например, hCITED4 TAD-hEGR1 DBD-hCITED4 TAD); (ix) hDBD, полученный из человеческого EGR3, и два hTAD, полученные из человеческого CITED2 (например, hCITED2 TAD-hEGR3 DBD-hCITED2 TAD); (x) hDBD, полученный из человеческого EGR3, и два hTAD, полученные из человеческого CITED4 (например, hCITED4 TAD-hEGR3 DBD-

hCITED4 TAD); (xi) hDBD, полученный из человеческого EGR1, первый hTAD, полученный из человеческого CITED2, второй hTAD, полученный из человеческого CITED4 (например, hCITED2 TAD-hEGR1 DBD-hCITED4 TAD или hCITED4 TAD-hEGR1 DBD-hCITED2 TAD); или (xii) hDBD, полученный из человеческого EGR3, первый hTAD, полученный из человеческого CITED2, второй hTAD, полученный из человеческого CITED4 (например, hCITED2 TAD-hEGR3 DBD-hCITED4 TAD или hCITED4 TAD-hEGR3 DBD-hCITED2 TAD).

[0201] В другом варианте осуществления eTF, представленный в настоящем описании, имеющий высокий процент идентичности последовательности с одним или более человеческими белками, может содержать hDBD и hTRD (например, hTRD-hDBD или hDBD-hTRD), где hDBD и hTRD могут быть получены из одного и того же белка или из разных белков. В другом варианте осуществления eTF, представленный в настоящем описании, имеющий высокий процент идентичности последовательности с одним или более человеческими белками, может содержать hDBD и два hTRD, где hDBD и hTRD получены из одного и того же человеческого белка; hDBD получен из первого человеческого белка, и оба hTRD получены из второго человеческого белка; hDBD и один hTRD получены из первого человеческого белка, а второй hTRD получен из второго человеческого белка; или hDBD получен из первого человеческого белка, один hTRD получен из второго человеческого белка, и второй hTRD получен из третьего человеческого белка (например, hTRD1-hDBD-hTRD1 или hTRD1-hDBD-hTRD2).

[0202] В определенных вариантах осуществления eTF, представленный в настоящем описании, имеющий высокий процент идентичности последовательности с одним или более человеческими белками, содержит любое из следующего: (i) последовательности, содержащей любую из SEQ ID NO: 6-10, 13-16, 57-64, 67-77, 295-299, 313-325, 345-350, 364, 436; (ii) последовательности, содержащей любую из SEQ ID NO: 22-26, 29-32, 84-93, 385-390, 406-409, 427-435 или 437; (iii) последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с любой из последовательностей (i) или (ii); или (iv) функциональный фрагмент или вариант любой из последовательностей (i), (ii) или (iii). В иллюстративных вариантах осуществления такие eTF способны повышать экспрессию SCN1A или GRN по меньшей мере в 2 раза, 5 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 25 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз или более по сравнению с контролем или на по меньшей мере 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 200%, 250%, 300%, 400% или 500% или более по сравнению с контролем. В иллюстративных вариантах осуществления такие eTF имеют по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% общей идентичности последовательности с одним или более человеческими белками. В определенных вариантах осуществления такие eTF проявляют пониженную иммуногенность по сравнению с eTF, имеющим более низкий общий процент идентичности последовательности с одним или более человеческими белками. В

различных вариантах осуществления снижение иммуногенности может быть измерено с помощью анализа eIspot, иммуноанализа или метода *in silico*.

[0203] В некоторых вариантах осуществления eTF, представленный в настоящем описании, имеющий высокий процент идентичности последовательности с одним или более человеческими белками, может дополнительно содержать одну или более аминокислотных последовательностей или доменов в дополнение к доменам DBD и TAD, таких как сигнал ядерной локализации или линкер, и т.п. Кроме того, полинуклеотид, кодирующий eTF, представленный в настоящем описании, имеющий высокий процент идентичности последовательности с одним или более человеческими белками, может дополнительно содержать одну или более последовательностей нуклеиновых кислот в дополнение к последовательности, кодирующей eTF, такие как промотор, энхансер, полиА-хвост и т.п. В таких вариантах осуществления одна или более дополнительных аминокислотных последовательностей и/или последовательностей нуклеиновых кислот предпочтительно представляют собой человеческие последовательности, полученные из человеческих последовательностей, или имеют по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88% , 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с человеческим белком.

Полинуклеотиды

[0204] В другом аспекте изобретение относится к полинуклеотидам, кодирующим любой из eTF, раскрытых в настоящем описании.

[0205] В определенных вариантах осуществления изобретение относится к полинуклеотидам, содержащим любое из следующего: (i) последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей eTF, содержащий любую из SEQ ID NO: 6-10, 13-16, 57-64, 67-77, 268-282, 305-325, 337-350, 364, 295-299 или 365-366 или их вариант или функциональный фрагмент; (ii) нуклеиновой кислоты, кодирующей функциональный фрагмент eTF, имеющий любую из SEQ ID NO: 6-10, 13-16, 57-64, 67-77, 268-282, 305-325, 337-350, 364, 295-299 или 365-366; или (iii) нуклеиновой кислоты, кодирующей eTF, имеющий по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с eTF, имеющим любую из SEQ ID NO: 6-10, 13-16, 57-64, 67-77, 112, 268-282, 305-325, 337-350, 364, 295-299, 365-366 или их вариант или функциональный фрагмент, где eTF способен активировать SCN1A или GRN.

[0206] В определенных вариантах осуществления изобретение относится к полинуклеотиду, содержащему любое из следующего: (i) последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей DBD, содержащий любую из SEQ ID NO: 22-26, 29-32, 84-93, 131-135, 165-171, 377-409 или 423-435 или их вариант или функциональный фрагмент; (ii) нуклеиновой кислоты, кодирующей функциональный фрагмент DBD, имеющий любую из SEQ ID NO: 22-26, 29-32, 84-93, 131-135, 165-171, 377-409, 423-435; или (iii) нуклеиновой кислоты, кодирующей DBD, имеющий по меньшей мере 70%, 75%,

80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с DBD, имеющим любую из SEQ ID NO: 22-26, 29-32, 84-93, 112, 131-135, 165-171, 377-409 или 432-435, или их вариант или функциональный фрагмент, где eTF способен связываться с целевым участком, связанным с любой из SEQ ID NO: 22-26, 29-32, 84-93, 112, 131-135, 165-171, 377-409, 423-435.

[0207] В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к полинуклеотиду, кодирующему eTF, который увеличивает экспрессию эндогенного SCN1A, причем полинуклеотид содержит любое из следующего: (i) последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей eTF, содержащий любую из SEQ ID NO: 6-9, 13-15, 57-58, 61-62, 67-71, 74-75, 268-282, 295-299, 305-325 или 364-366; (ii) нуклеиновой кислоты, кодирующей функциональный фрагмент eTF, имеющий любую из SEQ ID NO: 6-9, 13-15, 57-58, 61-62, 67-71, 74-75, 268-282, 295-299, 305-325 или 364-366; или (iii) нуклеиновой кислоты, кодирующей eTF, имеющий по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с eTF, имеющим любую из SEQ ID NO: 6-9, 13-15, 57-58, 61-62, 67-71, 74-75, 268-282, 295-299, 305-325 или 364-366, где eTF способен активировать SCN1A.

[0208] В определенных вариантах осуществления изобретение относится к полинуклеотиду, кодирующему DBD, который связывается с целевым участком в геноме, способным активировать эндогенный SCN1A, когда связывается с eTF, раскрытым в настоящем описании, причем полинуклеотид содержит любое из следующего: (i) последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей DBD, содержащий любую из SEQ ID NO: 22-25, 29-31, 84-85, 88, 90-92, 131-135, 371-372, 376, 391-409 или 423-435; (ii) нуклеиновой кислоты, кодирующей функциональный фрагмент DBD, имеющий любую из SEQ ID NO: 22-25, 29-31, 84-85, 88, 90-92, 131-135, 371-372, 376, 391-409 или 423-435; или (iii) нуклеиновой кислоты, кодирующей eTF, имеющий по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с DBD, имеющим любую из SEQ ID NO: 22-25, 29-31, 84-85, 88, 90-92, 131-135, 371-372, 376, 391-409 или 423-435, где DBD способен связываться с целевым участком, связанным с любой из SEQ ID NO: 22-25, 29-31, 84-85, 88, 90-92, 131-135, 371-372, 376, 391-409 или 423-435.

[0209] В определенных вариантах осуществления изобретение относится к полинуклеотиду, кодирующему DBD, который связывается с целевым участком в геноме, способным активировать эндогенный SCN1A, когда связывается с eTF, раскрытым в настоящем описании, причем полинуклеотид содержит любое из следующего: (i) последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей DBD, содержащий любую из SEQ ID NO: 135, 371, 372 или 376; (ii) нуклеиновой кислоты, кодирующей функциональный фрагмент DBD, имеющий любую из SEQ ID NO: 135, 371, 372 или 376; или (iii) нуклеиновой кислоты, кодирующей eTF, имеющий по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или

более идентичности последовательности с DBD, имеющим любую из SEQ ID NO: 135, 371, 372 или 376, где DBD способен связываться с целевым участком, связанным с любой из SEQ ID NO: 22-25, 29-31, 84-85, 88, 90-92, 131-135, 371-372, 376 или 391-409.

[0210] В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к полинуклеотиду, кодирующему eTF, который увеличивает экспрессию эндогенного GRN, причем полинуклеотид содержит любое из следующего: (i) последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей eTF, содержащий любую из SEQ ID NO: 10, 16, 59-60, 63, 64, 72-73, 76, 77 или 337-350; (ii) нуклеиновой кислоты, кодирующей функциональный фрагмент eTF, имеющий любую из SEQ ID NO: 10, 16, 59-60, 63, 64, 72-73, 76, 77 или 337-350; или (iii) нуклеиновой кислоты, кодирующей eTF, имеющий по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с eTF, имеющим любую из SEQ ID NO: 10, 16, 59-60, 63, 64, 72-73, 76, 77 или 337-350, где eTF способен увеличивать экспрессию GRN.

[0211] В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к полинуклеотиду, кодирующему DBD, который связывается с целевым участком в геноме, способным активировать эндогенный GRN, когда связывается с eTF, раскрытым в настоящем описании, причем полинуклеотид содержит любое из следующего: (i) последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей DBD, содержащий любую из SEQ ID NO: 26, 32, 86-89, 93, 165-171 или 377-390; (ii) нуклеиновой кислоты, кодирующей функциональный фрагмент DBD, имеющий любую из SEQ ID NO: 26, 32, 86-89, 93, 165-171 или 377-390; или (iii) нуклеиновой кислоты, кодирующей eTF, имеющий по меньшей мере, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с DBD, имеющим любую из SEQ ID NO: 26, 32, 86-89, 93, 165-171 или 377-390, где DBD способен связываться с целевым участком, связанным с любой из SEQ ID NO: 26, 32, 86-89, 93, 165-171 или 377-390.

[0212] В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к полинуклеотиду, кодирующему eTF, способный регулировать эндогенный SCN1A, причем полинуклеотид содержит любое из следующего: (i) последовательности нуклеиновой кислоты, имеющей любую из SEQ ID NO: 353-363 или 454; (ii) последовательности нуклеиновой кислоты, имеющей любую из SEQ ID NO: 442-453; (iii) нуклеиновой кислоты, имеющей функциональный фрагмент любой из последовательностей (i) или (ii); или (iv) нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с любой из последовательностей (i), (ii) или (iii), где полинуклеотид кодирует eTF, который способен увеличивать экспрессию SCN1A.

[0213] В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к полинуклеотиду, кодирующему eTF, способный регулировать эндогенный SCN1A,

причем полинуклеотид содержит любое из следующего: (i) последовательности нуклеиновой кислоты, имеющей SEQ ID NO: 353; (ii) последовательности нуклеиновой кислоты, имеющей SEQ ID NO: 442; (iii) нуклеиновой кислоты, имеющей функциональный фрагмент любой из последовательностей (i) или (ii); или (iv) нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с любой из последовательностей (i), (ii) или (iii). В иллюстративных вариантах осуществления такие полинуклеотиды кодируют eTF, имеющий SEQ ID NO: 305, или его функциональный фрагмент или вариант, который способен увеличивать экспрессию SCN1A.

[0214] В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к полинуклеотиду, кодирующему eTF, способный регулировать эндогенный SCN1A, причем полинуклеотид содержит любое из следующего: (i) последовательности нуклеиновой кислоты, имеющей SEQ ID NO: 354; (ii) последовательности нуклеиновой кислоты, имеющей SEQ ID NO: 443; (iii) нуклеиновой кислоты, имеющей функциональный фрагмент любой из последовательностей (i) или (ii); или (iv) нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с любой из последовательностей (i), (ii) или (iii). В иллюстративных вариантах осуществления такие полинуклеотиды кодируют eTF, имеющий SEQ ID NO: 306, или его функциональный фрагмент или вариант, который способен увеличивать экспрессию SCN1A.

[0215] В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к полинуклеотиду, кодирующему eTF, способный регулировать эндогенный SCN1A, причем полинуклеотид содержит любое из следующего: (i) последовательности нуклеиновой кислоты, имеющей SEQ ID NO: 355; (ii) последовательности нуклеиновой кислоты, имеющей SEQ ID NO: 444; (iii) нуклеиновой кислоты, имеющей функциональный фрагмент любой из последовательностей (i) или (ii); или (iv) нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с любой из последовательностей (i), (ii) или (iii). В иллюстративных вариантах осуществления такие полинуклеотиды кодируют eTF, имеющий SEQ ID NO: 308, или его функциональный фрагмент или вариант, который способен увеличивать экспрессию SCN1A.

[0216] В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к полинуклеотиду, кодирующему eTF, способный регулировать эндогенный SCN1A, причем полинуклеотид содержит любое из следующего: (i) последовательности нуклеиновой кислоты, имеющей SEQ ID NO: 356; (ii) последовательности нуклеиновой кислоты, имеющей SEQ ID NO: 445; (iii) нуклеиновой кислоты, имеющей функциональный фрагмент любой из последовательностей (i) или (ii); или (iv)

нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с любой из последовательностей (i), (ii) или (iii). В иллюстративных вариантах осуществления такие полинуклеотиды кодируют eTF, имеющий SEQ ID NO: 313, или его функциональный фрагмент или вариант, который способен увеличивать экспрессию SCN1A.

[0217] В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к полинуклеотиду, кодирующему eTF, способный регулировать эндогенный SCN1A, причем полинуклеотид содержит любое из следующего: (i) последовательности нуклеиновой кислоты, имеющей SEQ ID NO: 357; (ii) последовательности нуклеиновой кислоты, имеющей SEQ ID NO: 451; (iii) нуклеиновой кислоты, имеющей функциональный фрагмент любой из последовательностей (i) или (ii); или (iv) нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с любой из последовательностей (i), (ii) или (iii). В иллюстративных вариантах осуществления такие полинуклеотиды кодируют eTF, имеющий SEQ ID NO: 314, или его функциональный фрагмент или вариант, способный увеличивать экспрессию SCN1A.

[0218] В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к полинуклеотиду, кодирующему eTF, способный регулировать эндогенный SCN1A, причем полинуклеотид содержит любое из следующего: (i) последовательности нуклеиновой кислоты, имеющей SEQ ID NO: 358; (ii) последовательности нуклеиновой кислоты, имеющей SEQ ID NO: 448; (iii) нуклеиновой кислоты, имеющей функциональный фрагмент любой из последовательностей (i) или (ii); или (iv) нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с любой из последовательностей (i), (ii) или (iii). В иллюстративных вариантах осуществления такие полинуклеотиды кодируют eTF, имеющий SEQ ID NO: 315, или его функциональный фрагмент или вариант, способный увеличивать экспрессию SCN1A.

[0219] В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к полинуклеотиду, кодирующему eTF, способный регулировать эндогенные SCN1A, причем полинуклеотид содержит любое из следующего: (i) последовательности нуклеиновой кислоты, имеющей SEQ ID NO: 359; (ii) последовательности нуклеиновой кислоты, имеющей SEQ ID NO: 446; (iii) нуклеиновой кислоты, имеющей функциональный фрагмент любой из последовательностей (i) или (ii); или (iv) нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с любой из последовательностей (i), (ii) или (iii). В иллюстративных вариантах осуществления такие полинуклеотиды кодируют eTF, имеющий SEQ ID NO: 316, или его

функциональный фрагмент или вариант, способный увеличивать экспрессию SCN1A.

[0220] В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к полинуклеотиду, кодирующему eTF, способный регулировать эндогенный SCN1A, причем полинуклеотид содержит любое из следующего: (i) последовательности нуклеиновой кислоты, имеющей SEQ ID NO: 360; (ii) последовательности нуклеиновой кислоты, имеющей SEQ ID NO: 447; (iii) нуклеиновой кислоты, имеющей функциональный фрагмент любой из последовательностей (i) или (ii); или (iv) нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с любой из последовательностей (i), (ii) или (iii). В иллюстративных вариантах осуществления такие полинуклеотиды кодируют eTF, имеющий SEQ ID NO: 317, или его функциональный фрагмент или вариант, способный увеличивать экспрессию SCN1A.

[0221] В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к полинуклеотиду, кодирующему eTF, способный регулировать эндогенный SCN1A, причем полинуклеотид содержит любое из следующего: (i) последовательности нуклеиновой кислоты, имеющей SEQ ID NO: 361; (ii) последовательности нуклеиновой кислоты, имеющей SEQ ID NO: 450; (iii) нуклеиновой кислоты, имеющей функциональный фрагмент любой из последовательностей (i) или (ii); или (iv) нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с любой из последовательностей (i), (ii) или (iii). В иллюстративных вариантах осуществления такие полинуклеотиды кодируют eTF, имеющий SEQ ID NO: 318, или его функциональный фрагмент или вариант, способный увеличивать экспрессию SCN1A.

[0222] В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к полинуклеотиду, кодирующему eTF, способный регулировать эндогенные SCN1A, причем полинуклеотид состоит из любого из следующего: (i) последовательности нуклеиновой кислоты, имеющей SEQ ID NO: 362; (ii) последовательности нуклеиновой кислоты, имеющей SEQ ID NO: 449; (iii) нуклеиновой кислоты, имеющей функциональный фрагмент любой из последовательностей (i) или (ii); или (iv) нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с любой из последовательностей (i), (ii) или (iii). В иллюстративных вариантах осуществления такие полинуклеотиды кодируют eTF, имеющий SEQ ID NO: 319, или его функциональный фрагмент или вариант, способный увеличивать экспрессию SCN1A.

[0223] В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к полинуклеотиду, кодирующему eTF, способный регулировать эндогенный SCN1A, причем полинуклеотид содержит любое из следующего: (i) последовательности нуклеиновой кислоты, имеющей SEQ ID NO: 454; (ii) последовательности нуклеиновой

кислоты, имеющей SEQ ID NO: 452; (iii) нуклеиновой кислоты, имеющей функциональный фрагмент любой из последовательностей (i) или (ii); или (iv) нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с любой из последовательностей (i), (ii) или (iii). В иллюстративных вариантах осуществления такие полинуклеотиды кодируют eTF, имеющий SEQ ID NO: 440, или его функциональный фрагмент или вариант, способный увеличивать экспрессию SCN1A.

[0224] В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к полинуклеотиду, кодирующему eTF, способный регулировать эндогенные SCN1A, причем полинуклеотид состоит из любого из следующего: (i) последовательности нуклеиновой кислоты, имеющей SEQ ID NO: 363; (ii) последовательности нуклеиновой кислоты, имеющей SEQ ID NO: 453; (iii) нуклеиновой кислоты, имеющей функциональный фрагмент любой из последовательностей (i) или (ii); или (iv) нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичности последовательности с любой из последовательностей (i), (ii) или (iii). В иллюстративных вариантах осуществления такие полинуклеотиды кодируют eTF, имеющий SEQ ID NO: 325, или его функциональный фрагмент или вариант, который способен увеличивать экспрессию SCN1A

Экспрессионные кассеты

[0225] В другом аспекте изобретение относится к экспрессионным кассетам, содержащим полинуклеотид, кодирующий eTF, представленный в настоящем описании, и один или более регуляторный элемент.

[0226] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий eTF, раскрытый в настоящем описании, является частью экспрессионной кассеты, содержащей один или более регуляторных элементов дополнительно к последовательности, кодирующей eTF. В иллюстративных вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий eTF, раскрытый в настоящем описании, является частью экспрессионной кассеты, содержащей промотер, расположенный выше последовательности, кодирующей eTF, обеспечивая экспрессию eTF в клетке.

[0227] В некоторых вариантах осуществления раскрытая в настоящем описании экспрессионная кассета содержит полинуклеотид, кодирующий eTF, и конститутивный промотер, расположенный выше последовательности, кодирующей eTF, обеспечивая экспрессию eTF в клетке. Примеры конститутивных промоторов включают, промотер GAD2, промотер человеческого синапсина, промотер СВА, промотер CMV, промотер minCMV, ТАТА-боксы, промотер super-core или промотер EF1, или комбинация его.

[0228] В некоторых вариантах осуществления раскрытая в настоящем описании экспрессионная кассета содержит полинуклеотид, кодирующий eTF, и короткий промотер, способный управлять экспрессией eTF в клетке. В некоторых вариантах

осуществления короткий промотор, подходящий для применения в соответствии с раскрытыми в настоящем описании молекулами нуклеиновой кислоты, составляет менее 500 п.о., 450 п.о., 400 п.о., 350 п.о., 300 п.о., 250 п.о., 225 п.о., 200 п.о., 175 п.о., 150 п.о., 145 п.о., 140 п.о., 135 п.о., 130 п.о., 125 п.о., 120 п.о., 115 п.о., 110 п.о., 105 п.о., 100 п.о., 95 п.о., 90 п.о., 85 п.о., 80 п.о., или 75 п.о., или примерно 80-300 п.о., 80-275 п.о., 80-250 п.о., 80-200 п.о., 80-150 п.о., 80-125 п.о., 80-120 п.о., 80-115 п.о., 80-110 п.о., 80-105 п.о., 80-100 п.о., 85-300 п.о., 85-275 п.о., 85-250 п.о., 85-200 п.о., 85-150 п.о., 85-125 п.о., 85-120 п.о., 85-115 п.о., 85-110 п.о., 85-105 п.о., 85-100 п.о., 90-300 п.о., 90-275 п.о., 90-250 п.о., 90-200 п.о., 90-150 п.о., 90-125 п.о., 90-120 п.о., 90-115 п.о., 90-110 п.о., 90-105 п.о., 90-100 п.о., 95-300 п.о., 95-275 п.о., 95-250 п.о., 95-200 п.о., 95-150 п.о., 95-125 п.о., 95-120 п.о., 95-115 п.о., 95-110 п.о., 95-100 п.о., 100-300 п.о., 100-275 п.о., 100-250 п.о., 100-200 п.о., 100-150 п.о., 100-125 п.о., 100-120 п.о., 100-115 п.о., 100-110 п.о. или 100-105 п.о. В иллюстративных вариантах осуществления короткий промотор, подходящий для применения в соответствии с экспрессионной кассетой, раскрытой в настоящем описании, состоит из примерно 100-120 п.о., примерно 117 п.о. или примерно 100 п.о.

[0229] В некоторых вариантах осуществления экспрессионная кассета, раскрытая в настоящем описании, содержит короткий промотор, содержащий или состоящий из любого из: (i) SEQ ID NO: 178; (ii) его варианта или функционального фрагмента; или (iii) последовательности нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с любой из (i) или (ii), функционально связанной с полинуклеотидом, кодирующим любой из eTF, раскрытых в настоящем описании. Другие примеры короткой промоторной последовательности можно найти в публикации РСТ №. WO 2018/213786.

[0230] В некоторых вариантах осуществления раскрытая в настоящем описании экспрессионная кассета содержит полинуклеотид, кодирующий eTF, и промотор, селективный к определенному типу клеток, расположенный перед последовательностью, кодирующей eTF, обеспечивая селективное управление экспрессией eTF в представляющей интерес клетке. В некоторых вариантах осуществления промотор, селективный к определенному типу клеток, может быть селективным (например, селективно стимулировать экспрессию в) по отношению к любому представляющему интерес типу клеток, например, клеткам сердца, клеткам печени, мышечным клеткам, клеткам кости, нейронам или их подпопуляциям. В иллюстративном варианте осуществления раскрытая в настоящем описании экспрессионная кассета содержит полинуклеотид, кодирующий eTF и селективный регуляторный элемент PV (например, промотор, энхансер и/или промотор и энхансер), расположенный выше последовательности, кодирующей eTF, обеспечивая управление экспрессии eTF селективно в PV клетках. PV-селективный регуляторный элемент относится к регуляторному элементу, который специфически модулирует экспрессию генов в PV-нейроне. В некоторых вариантах осуществления PV-селективные регуляторные элементы

усиливают экспрессию в PV-нейроне относительно одного или более других типов клеток ЦНС. В некоторых вариантах осуществления PV-селективный регуляторный элемент подавляет процессы транскрипции и/или трансляции в клетках нецелевого типа.

[0231] В некоторых вариантах осуществления PV-селективный регуляторный элемент, представленный в настоящем описании, приводит к селективной экспрессии гена в PV-клетке по сравнению с клетками нецелевого типа. В некоторых случаях нецелевые типы клеток включают, без ограничения, возбуждающие нейроны, не-PV типы клеток ЦНС и не относящиеся к нейронам типы клеток ЦНС. В некоторых вариантах осуществления PV-селективные регуляторные элементы обеспечивают селективную экспрессию генов в PV-нейронах по меньшей мере в одном, двух, трех, четырех, пяти или более не-PV типах клеток ЦНС. В некоторых случаях не-PV клетка ЦНС представляет собой возбуждающий нейрон, дофаминергический нейрон, астроцит, микроглию, двигательный нейрон, сосудистую клетку или не являющийся GABA-эргическим нейрон (например, клетка, которая не экспрессирует один или более из: GAD2, GAD1, NKX2.1, DLX1, DLX5, SST и VIP), не-PV нейрон (например, GABA-эргический нейрон, который не экспрессирует парвальбумин) или другие клетки ЦНС (например, типы клеток ЦНС, которые никогда не экспрессировали любой из: PV, GAD2, GAD1, NKX2.1, DLX1, DLX5, SST и VIP). В некоторых случаях представленный в настоящем описании PV-селективный регуляторный элемент обеспечивает повышенную селективность экспрессии генов в PV-нейронах по сравнению с GABA-эргическими не-PV-клетками. В некоторых случаях типы клеток различаются по наличию другого маркера клеток, морфологии, фенотипа, генотипа, функции и/или любых других средств, позволяющих классифицировать типы клеток.

[0232] Селективность экспрессии, обусловленная PV-селективным регуляторным элементом, может быть измерена несколькими способами. В одном из вариантов осуществления селективность экспрессии гена в PV-клетке по сравнению с не-PV-клетками может быть измерена путем сравнения количества PV-клеток, которые экспрессируют детектируемый уровень транскрипта гена, функционально связанного с PV-селективным регуляторным элементом, с общим количеством клеток, которые экспрессируют ген (например, по отношению PV-клеток к общему количеству клеток (PV+не-PV клетки), экспрессирующих ген). Например, селективность для PV-нейронов может быть определена с помощью анализа колокализации на основе иммуногистохимии с использованием гена, кодирующего флуоресцентный белок (например, eGFP), функционально связанный с PV-селективным регуляторным элементом, для измерения экспрессии гена, и антитела, которое идентифицирует PV-клетки (например, анти-PV антитела, которое специфически взаимодействует с PV-нейронами), связанного со второй флуоресцентной меткой (например, красным флуоресцентным белком). Селективность экспрессии в PV-клетках можно вычислить путем деления количества клеток, которые экспрессируют как PV, так и eGFP (например, PV-клетки), на общее количество клеток, которые экспрессируют eGFP (например, PV-клетки и не-PV-клетки), и умножения на 100

для преобразования в проценты. Чем выше процент PV-клеток, которые экспрессируют трансген, тем более избирательным является регуляторный элемент по отношению к PV-клеткам. В некоторых вариантах осуществления изобретения PV-селективный регуляторный элемент, представленный в настоящем описании, может быть высокоселективным в отношении экспрессии в PV-клетках. Например, PV-селективный регуляторный элемент, представленный в настоящем описании, может демонстрировать примерно 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более селективность в отношении PV-нейронов (например, PV-нейронов/общее количество клеток x 100).

[0233] В некоторых случаях представленный в настоящем описании PV-селективный регуляторный элемент является коротким. В некоторых случаях размер PV-селективного регуляторного элемента совместим со способностью клонирования вектора, например вирусного вектора или гAAV, так что объединенный размер трансгена и одного или более PV-селективных регуляторных элементов не превышает клонирующая способность вектора. В некоторых случаях PV-селективный регуляторный элемент имеет длину примерно до 2050 п.о., 2000 п.о., 1900 п.о., 1800 п.о., 1700 п.о., 1600 п.о., 1500 п.о., 1400 п.о., 1300 п.о., 1200 п.о., 1100 п.о., 1000 п.о., 900 п.о., 800 п.о., 700 п.о., 600 п.о., 400 п.о., 300 п.о., 200 п.о. или 100 п.о. В некоторых случаях PV-селективный регуляторный элемент составляет от 500 до 600 п.о., от 500 до 700 п.о., от 500 до 800 п.о., от 500 до 900 п.о., от 500 до 1000 п.о. или от 500 до 1500 п.о.

[0234] В определенных вариантах осуществления изобретения PV-селективный регуляторный элемент, представленный в настоящем описании, содержит или состоит из любого из (i) SEQ ID NO: 183-185, 417 формулы изобретения; (ii) варианта, функционального фрагмента или их комбинации; или (iii) последовательности нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательностей с любым из (i) или (ii). В некоторых случаях регуляторный элемент содержит любую из SEQ ID NO: 183-185, 417. Другие примеры PV-селективных регуляторных элементов можно найти в публикации РСТ №. WO 2018/187363.

[0235] В иллюстративных вариантах осуществления изобретение относится к экспрессионным кассетам, содержащим последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую eTF SCN1A, под контролем PV-селективного регуляторного элемента. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к экспрессионным кассетам, содержащим последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую eTF SCN1A, содержащий DBD, имеющий любую из следующих последовательностей: SEQ ID NO: 135, 371-372 или 376 под контролем PV-селективного регуляторного элемента, имеющего любую из SEQ ID NO: 183-185 или 417. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к экспрессионным кассетам, содержащим последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую eTF SCN1A, содержащий любую из следующих последовательностей: SEQ ID NO: 6-9, 13-15, 57-58, 61-62, 67-71, 74-75, 268-282, 295-299,

305-325 или 364-366 под контролем PV-селективного регулирующего элемента, имеющего любую из SEQ ID NO: 183-185 или 417. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к экспрессионным кассетам, содержащим последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую любую из следующих последовательностей: SEQ ID NO: 353-363 под контролем PV-селективного регуляторного элемента, имеющего любую из SEQ ID NO: 183-185 или 417. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к экспрессионным кассетам, содержащим последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую eTF SCN1A, содержащий DBD, имеющий любую из следующих последовательностей: SEQ ID NO: 135, 371, 372 или 376 под контролем PV-селективного регуляторного элемента, имеющего любую из SEQ ID NO: 183 или 185. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к экспрессионным кассетам, содержащим последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую eTF SCN1A, содержащий любую из следующих последовательностей: SEQ ID NO: 6-9, 13-15, 57-58, 61-62, 67-71, 74-75, 268-282, 295-299, 305-325 или 364-366 под контролем PV-селективного регулирующего элемента, имеющего любую из SEQ ID NO: 183 или 185. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к экспрессионным кассетам, содержащим последовательность нуклеиновой кислоты, содержащую любую из следующих последовательностей: SEQ ID NO: 353-363 под контролем PV-селективного регуляторного элемента, имеющего любую из SEQ ID NO: 183 или 185.

[0236] В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к экспрессионным кассетам, содержащим последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую eTF GRN под контролем регуляторного элемента, селективного по отношению к типу клеток. В некоторых вариантах осуществления регуляторный элемент, селективный по отношению к типу клеток, может управлять экспрессией eTF, который увеличивает экспрессию GRN до более высокого уровня в клетках, выбранных из группы, состоящей из: клеток центральной нервной системы, клеток лобной коры, глиальных клеток, клеток микроглии, клеток Пуркинье, пирамидальных клеток (например, клетки Беца), двигательных нейронов, нейронов коры головного мозга и клеток стриатума по сравнению с клетками других типов (например, клеток, не относящихся к ЦНС).

[0237] В определенных вариантах осуществления представленная в настоящем описании экспрессионная кассета может содержать еще один дополнительный регуляторный элемент дополнительно к промотору, такой как, например, последовательности, связанные с инициацией или терминацией транскрипции, энхансерные последовательности и эффективные сигналы процессинга РНК. Типичные регуляторные элементы включают, например, интрон, энхансер, UTR, элемент стабильности, последовательность WPRE, консенсусную последовательность Козака, элемент посттрансляционного ответа, участок связывания микроРНК или последовательность полиаденилирования (полиА) или их комбинацию. Регуляторные элементы могут функционировать для модуляции экспрессии гена на фазе транскрипции, фазе посттранскрипции или на фазе трансляции экспрессии генов. На уровне РНК

регуляция может происходить на уровне трансляции (например, элементов стабильности, которые стабилизируют мРНК для трансляции), расщепления РНК, сплайсинга РНК и/или терминации транскрипции. В различных вариантах осуществления регуляторные элементы могут рекрутировать факторы транскрипции в кодирующую область, которые повышают селективность экспрессии генов в представляющем интерес типе клеток, увеличивают скорость, с которой продуцируются РНК-транскрипты, увеличивают стабильность продуцируемой РНК и/или увеличивают скорость синтез белка из РНК-транскриптов.

[0238] В определенных вариантах осуществления раскрытые в настоящем описании экспрессионные кассеты дополнительно содержат последовательность полиА. Подходящие последовательности полиА включают, например, искусственную полиА длиной примерно 75 п.о. (РА75) (см., например, WO 2018/126116), полиА бычьего гормона роста, полиА раннего сигнала SV40, полиА позднего сигнала SV40, полиА бета-глобина кролика, полиА тимидинкиназы HSV, полиА гена протамина, полиА аденовируса 5 Е1Ь, полиА гормона роста или полиА PBGD. В иллюстративных вариантах осуществления последовательность полиА, подходящая для использования в экспрессионных кассетах, представленных в настоящем описании, представляет собой полиА hGH (SEQ ID NO: 327) или синтетическую полиА (SEQ ID NO: 326). Как правило, последовательность полиА расположена в раскрытых в настоящем описании экспрессионных кассетах ниже полинуклеотида, кодирующего еTF.

[0239] В определенных вариантах осуществления, экспрессионные кассеты, представленные в настоящем описании, дополнительно содержат одну или более последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих один или более сигналов ядерной локализации (NLS). Может быть использован любой NLS-пептид, который облегчает импорт белка, к которому он прикреплен, в ядро клетки. Примеры NLS включают, например, NLS большого Т-антигена SV40, NLS нуклеоплазмина, NLS EGL-13, NLS с-Мус и NLS TUS-белка. См., например, C. Dingwall et al., *J. Cell Biol.* 107:841-9 (1988); JP. Makkerh et al., *Curr Biol.* 6:1025-7 (1996); и M. Ray et al., *Bioconjug. Chem.* 26:1004-7 (2015). NLS может быть расположен в любом месте последовательности белка еTF, но в предпочтительных вариантах осуществления он конъюгирован с N-концом еTF или доменом еTF. В иллюстративных вариантах осуществления представленные в настоящем описании кассеты нуклеиновой кислоты кодируют еTF с NLS, слитым с N-концом еTF. В других вариантах осуществления представленные в настоящем описании кассеты нуклеиновой кислоты кодируют еTF с первым NLS, слитым с N-концом еTF, и вторым NLS, расположенным между DBD и доменом TAD еTF.

Векторы экспрессии

[0240] В определенных вариантах осуществления раскрытые в настоящем описании экспрессионные кассеты могут быть включены в вектор экспрессии. Векторы экспрессии могут быть использованы для доставки экспрессионной кассеты в клетку-мишень посредством трансфекции или трансдукции. Вектор может быть интегрирующим

или неинтегрирующим вектором, что указывает на способность вектора интегрировать кассету экспрессии или трансген в геном клетки-хозяина. Примеры векторов экспрессии включают, без ограничения, (а) невирусные векторы, такие как векторы нуклеиновых кислот, включая линейные олигонуклеотиды и кольцевые плазмиды; искусственные хромосомы, такие как искусственные хромосомы человека (НАС), дрожжевые искусственные хромосомы (УАС) и бактериальные искусственные хромосомы (ВАС или РАС)); эписомные векторы; транспозоны (например, PiggyBac); и (b) вирусные векторы, такие как ретровирусные векторы, лентивирусные векторы, аденовирусные векторы и аденоассоциированные вирусные векторы.

[0241] Векторы экспрессии могут быть линейными олигонуклеотидами или кольцевыми плазмидами и могут доставляться в клетку различными способами трансфекции, включая физические и химические методы. Физические методы обычно относятся к способам доставки, в которых используется физическая сила для противодействия барьеру клеточной мембраны в облегчении внутриклеточной доставки генетического материала. Примеры физических методов включают использование иглы, баллистической ДНК, электропорацию, сонопорацию, фотопорацию, магнитофекцию и гидропорацию. Химические методы обычно относятся к методам, в которых молекулу нуклеиновой кислоты доставляют в клетку химические носители, и могут включать неорганические частицы, векторы на основе липидов, векторы на основе полимеров и векторы на основе пептидов.

[0242] В некоторых вариантах осуществления вектор экспрессии вводят в клетку-мишень с помощью катионного липида (например, катионной липосомы). Для доставки генов были исследованы различные типы липидов, такие как, например, липидная наноземля (например, которая представляет собой дисперсию одной несмешивающейся жидкости в другой, стабилизированной эмульгирующим агентом) или твердая липидная наночастица.

[0243] В некоторых вариантах осуществления вектор экспрессии вводят в клетку-мишень с помощью носителя для доставки на основе пептидов. Средства доставки на основе пептидов могут обладать преимуществами, заключающимися в защите генетического материала, подлежащего доставке, нацеливании на специфические клеточные рецепторы, разрушении эндосомальных мембран и доставке генетического материала в ядро. В некоторых вариантах осуществления вектор экспрессии вводят в клетку-мишень с помощью носителя для доставки на основе полимера. Средства доставки на основе полимеров могут содержать природные белки, пептиды и/или полисахариды или синтетические полимеры. В одном из вариантов осуществления средство доставки на основе полимера содержит полиэтиленимин (PEI). PEI может конденсировать ДНК в положительно заряженные частицы, которые связываются с остатками анионной клеточной поверхности и попадают в клетку посредством эндоцитоза. В других вариантах осуществления носитель для доставки на основе полимера может включать поли-L-лизин (PLL), поли(DL-молочную кислоту) (PLA), поли(DL-лактид-со-гликозид) (PLGA),

полиорнитин, полиаргинин, гистоны, протамины, дендримеры, хитозаны, синтетические аминокислотные производные декстрана и/или катионные акриловые полимеры. В определенных вариантах осуществления носители для доставки на основе полимеров могут содержать смесь полимеров, таких как, например, PEG и PLL.

[0244] В определенных вариантах осуществления вектор экспрессии может представлять собой вирусный вектор, подходящий для генной терапии. Предпочтительные характеристики вирусных векторов для генной терапии или векторов доставки генов могут включать способность воспроизводимо и стабильно размножаться и очищаться до высоких титров; опосредовать направленную доставку (например, доставлять трансген конкретно в представляющую интерес ткань или орган без широкого распространения векторов на другие ткани); и опосредовать доставку генов и экспрессию трансгена, не вызывая вредных побочных эффектов.

[0245] Для целей генной терапии было разработано несколько типов вирусов, например непатогенный парвовирус, называемый аденоассоциированным вирусом, путем сохранения пути вирусной инфекции, но исключения последующей экспрессии вирусных генов, которая может привести к репликации и токсичности. Такие вирусные векторы могут быть получены путем удаления всех или некоторых кодирующих областей из вирусного генома, не затрагивая при этом те последовательности (например, последовательности концевых повторов), которые могут быть необходимы для таких функций, как упаковка векторного генома в капсид вируса или интеграция векторной нуклеиновой кислоты (например, ДНК) в хроматин хозяина.

[0246] В различных вариантах осуществления подходящие вирусные векторы включают ретровирусы (например, вирусы А-типа, В-типа, С-типа и D-типа), аденовирус, парвовирус (например, аденоассоциированные вирусы или AAV), коронавирусы, РНК-вирусы с отрицательной цепью, такие как ортомиксовирус (например, вирус гриппа), рабдовирус (например, вирус бешенства и везикулярного стоматита), парамиксовирус (например, корь и Сендай), РНК-вирусы с положительной цепью, такие как пикорнавирус и альфа-вирус, и двухцепочечные ДНК-вирусы, включая аденовирус, вирус герпеса (например, вирусы простого герпеса типов 1 и 2, вирус Эпштейна-Барра, цитомегаловирус) и поксвирус (например, коровьей оспы, оспы птиц и оспы канареек). Примеры ретровирусов включают вирус лейкоза-саркомы птиц, Т-лимфоцитарный вирус человека 1 типа (HTLV-1), вирус лейкоза крупного рогатого скота (BLV), лентивирус и пенящийся вирус (spumavirus). Другие вирусы включают, например, вирус Норфолка, тогавирус, флавивирус, реовирусы, паповавирус, гепаднавирус и вирус гепатита. Вирусные векторы можно классифицировать на две группы в зависимости от их способности интегрироваться в геном хозяина - интегративный и неинтегративный. Онкоретровирусы и лентивирусы могут интегрироваться в клеточный хроматин хозяина, в то время как аденовирусы, аденоассоциированные вирусы и вирусы герпеса преимущественно сохраняются в ядре клетки в виде внехромосомных эписом.

[0247] В определенных вариантах осуществления подходящий вирусный вектор

представляет собой ретровирусный вектор. Ретровирусы относятся к вирусам семейства *Retroviridae*. Примеры ретровирусов включают онкоретровирусы, такие как вирус мышинного лейкоза (MLV), и лентивирусы, такие как вирус иммунодефицита человека 1 (ВИЧ-1). Ретровирусные геномы представляют собой одноцепочечные (ss) РНК и содержат различные гены, которые могут быть представлены в цис- или транс-положении. Например, ретровирусный геном может содержать цис-действующие последовательности, такие как два длинных концевых повтора (LTR), с элементами для экспрессии генов, обратной транскрипции и интеграции в хромосомы хозяина. Другие компоненты включают сигнал упаковки (ψ или ψ) для специфической упаковки РНК во вновь образованные вирионы и полипуриновый тракт (PPT), участок инициации синтеза ДНК положительной цепи во время обратной транскрипции. Кроме того, ретровирусный геном может содержать гены *gag*, *pol* и *env*. Ген *gag* кодирует структурные белки, ген *pol* кодирует ферменты, которые сопровождают оцРНК (ssRNA) и осуществляют обратную транскрипцию вирусной РНК в ДНК, а ген *env* кодирует вирусную оболочку. Как правило, *gag*, *pol* и *env* предоставляют в транс-положении для вирусной репликации и упаковки.

[0248] В некоторых вариантах осуществления ретровирусный вектор, представленный в настоящем описании, может представлять собой лентивирусный вектор. Существует по меньшей мере пять идентифицированных серогрупп или серотипов лентивирусов. Вирусы разных серотипов могут по-разному инфицировать определенные типы клеток и/или хозяев. Лентивирусы, например, включают ретровирусы приматов и ретровирусы неприматов. Ретровирусы приматов включают ВИЧ и вирус иммунодефицита обезьян (SIV). Ретровирусы неприматов включают вирус иммунодефицита кошек (FIV), вирус иммунодефицита крупного рогатого скота (BIV), вирус артрита-энцефалита коз и овец (CAEV), вирус инфекционной анемии лошадей (EIAV) и вирус Висна. Лентивирусы или лентикторы могут обладать способностью трансформировать покоящиеся клетки. Как и в случае онкоретровирусных векторов, конструкция лентикторов может быть основана на разделении цис- и транс-действующих последовательностей.

[0249] В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к векторам экспрессии, которые сконструированы для доставки с помощью оптимизированного терапевтического ретровирусного вектора. Ретровирусный вектор может представлять собой лентивирус, содержащий левый (5') LTR; последовательности, которые обеспечивают упаковку и/или импорт вируса в ядро; промотор; необязательно один или более дополнительных регуляторных элементов (таких как, например, энхансер или последовательность полиА); необязательно лентивирусный элемент обратного ответа (RRE); конструкцию, содержащую PV-селективный регуляторный элемент, функционально связанный с последовательностью, кодирующей eTF; необязательно изолятор; и правый (3') ретровирусный LTR.

[0250] В иллюстративных вариантах осуществления вирусный вектор,

представленный в настоящем описании, представляет собой аденоассоциированный вирус (AAV). AAV является небольшим вирусом животных с дефектами репликации, не содержащим оболочку, который поражает людей и некоторых других видов приматов. AAV, как известно, не вызывает заболевания у человека и вызывает слабый иммунный ответ. Векторы AAV также могут инфицировать как делящиеся, так и покоящиеся клетки без интеграции в геном клетки-хозяина.

[0251] Геном AAV состоит из линейной одноцепочечной ДНК длиной ~4,7 т.п.о. Геном состоит из двух открытых рамок считывания (ORF), окруженных последовательностью перевернутого концевой повтора (ITR), длина которой составляет примерно 145 п.о. ITR состоит из нуклеотидной последовательности на 5'-конце (5' ITR) и нуклеотидной последовательности, расположенной на 3'-конце (3' ITR), которая содержит палиндромные последовательности. ITR функционируют в цис-положении путем сворачивания с образованием Т-образных шпилечных структур за счет комплементарного спаривания оснований, которые функционируют в качестве праймеров во время инициации репликации ДНК для синтеза второй цепи. Две открытые рамки считывания кодируют гены гер и сар, которые участвуют в репликации и упаковке вириона. В иллюстративном варианте осуществления вектор AAV, представленный в настоящем описании, не содержит гены гер или сар. Такие гены могут быть предоставлены в транс-положении для получения вирионов, как описано далее ниже.

[0252] В определенных вариантах осуществления вектор AAV может содержать нуклеиновую кислоту-«вставку» (stuffer). В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота-вставка может кодировать зеленый флуоресцентный белок или ген устойчивости к антибиотику, такому как канамицин или ампициллин. В некоторых вариантах осуществления изобретения нуклеиновая кислота-вставка может быть расположена вне последовательностей ITR (например, относительно последовательности трансгена eTF и регуляторных последовательностей, которые расположены между 5'- и 3'-последовательностями ITR).

[0253] Существуют различные серотипы AAV, включая AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12 и AAV13. Эти серотипы различаются по тропизму или типам клеток, которые они заражают. AAV могут содержать геном и капсиды из нескольких серотипов (например, псевдотипов). Например, AAV может содержать геном серотипа 2 (например, ITR), упакованный в капсид серотипа 5 или серотипа 9. Псевдотипы могут улучшать эффективность трансдукции, а также изменять тропизм.

[0254] В некоторых случаях предпочтительным является серотип AAV, который может преодолевать гематоэнцефалический барьер или инфицировать клетки ЦНС. В некоторых случаях используется AAV9 или его вариант для доставки экспрессионной кассеты по изобретению, содержащей PV-селективные регуляторные элементы, функционально связанные с трансгеном, кодирующим eTF, который увеличивает экспрессию SCN1A.

[0255] В иллюстративных вариантах осуществления изобретение относится к векторам экспрессии, которые разработаны для доставки на основе AAV. AAV может быть любым серотипом, например, AAV1, AAV2, AAV3, AAV3b, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV-DJ, или химерным, гибридным AAV или его вариантом. AAV также может быть самокомплементарным AAV (scAAV). В некоторых вариантах осуществления вектор экспрессии, разработанный для доставки AAV, содержит 5'-ITR и 3'-ITR. В некоторых вариантах осуществления вектор экспрессии, разработанный для доставки AAV, содержит 5'-ITR, промотор, трансген, кодирующий eTF, и 3'-ITR. В некоторых вариантах осуществления вектор экспрессии, предназначенный для доставки AAV, содержит 5'-ITR, энхансер, промотор, трансген, кодирующий eTF, последовательность полиА и 3'-ITR. Типичные векторы экспрессии AAV проиллюстрированы на **фиг.36** и **фиг.37**.

Клетки-хозяева

[0256] В другом аспекте изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей экспрессионную кассету или вектор экспрессии, кодирующий eTF по изобретению. Клетки-хозяева могут быть бактериальной клеткой, дрожжевой клеткой, клеткой насекомого или клеткой млекопитающего. В иллюстративном варианте осуществления клетка-хозяин относится к любой клеточной линии, которая подвержена инфицированию представляющим интерес вирусом и поддается культивированию *in vitro*.

[0257] В определенных вариантах осуществления представленная в настоящем описании клетка-хозяин может использоваться для целей генной терапии *ex vivo*. В таких вариантах осуществления клетки трансфицируют молекулой нуклеиновой кислоты или вектором экспрессии, содержащим последовательность, кодирующую eTF по изобретению, и затем трансплантируют пациенту или субъекту. Трансплантированные клетки могут иметь аутологичное, аллогенное или гетерологичное происхождение. Для клинического использования выделение клеток, как правило, проводится в условиях надлежащей производственной практики (GMP). Перед трансплантацией обычно проверяют качество клеток и отсутствие микробных или других загрязняющих веществ и проводят предварительную обработку, такую как облучение и/или иммуносупрессивное лечение. Кроме того, клетки-хозяева могут быть трансплантированы вместе с факторами роста для стимуляции пролиферации и/или дифференцировки клеток.

[0258] В определенных вариантах осуществления клетка-хозяин может использоваться для генной терапии *ex vivo*. Предпочтительно указанные клетки представляют собой эукариотические клетки, такие как клетки млекопитающих, которые включают, без ограничения, людей, приматов, отличных от человека, таких как человекообразные обезьяны; шимпанзе; макаки и орангутаны, домашние животные, включая собак и кошек, а также домашний скот, такой как лошади, крупный рогатый скот, свиньи, овцы и козы, или другие виды млекопитающих, включая, без ограничения, мышей, крыс, морских свинок, кроликов, хомяков, и т.п. Специалист в данной области выберет более подходящие клетки в зависимости от пациента или подлежащего

трансплантации субъекта.

[0259] В определенных вариантах осуществления клетка-хозяин, представленная в настоящем описании, может представлять собой клетку со свойствами самообновления и плюрипотентности, такую как стволовые клетки или индуцированные плюрипотентные стволовые клетки. Стволовые клетки предпочтительно представляют собой мезенхимальные стволовые клетки. Мезенхимальные стволовые клетки (MSC) способны дифференцироваться по меньшей мере в одно из: остеобласты, хондроциты, адипоциты или миоциты, и могут быть выделены из любого типа ткани. Как правило, MSC выделяют из костного мозга, жировой ткани, пуповины или периферической крови. Способы их получения хорошо известны специалисту в данной области. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (также известные как iPS-клетки или iPSC) представляют собой тип плюрипотентных стволовых клеток, которые могут быть получены непосредственно из взрослых клеток. Yamanaka и соавт. индуцировали клетки iPS путем переноса генов Oct3/4, Sox2, Klf4 и c-Myc в фибробласты мыши и человека и стимуляции клеток к экспрессии этих генов (WO 2007/069666). Thomson и соавт. впоследствии получили человеческие iPS-клетки с помощью Nanog и Lin28 вместо Klf4 и c-Myc (WO 2008/118820).

[0260] В иллюстративном варианте осуществления клетка-хозяин, представленная в настоящем описании, является пакующей клеткой. Указанные клетки могут быть адгезивными или суспензионными клетками. Пакующая клетка и хелперный вектор или вирусная конструкция или ДНК-конструкция вместе обеспечивают в транс-положении все недостающие функции, которые необходимы для полной репликации и упаковки вирусного вектора.

[0261] Предпочтительно указанные пакующие клетки представляют собой эукариотические клетки, такие как клетки млекопитающих, включая клетки обезьян, человека, собак и грызунов. Примерами клеток человека являются клетки PER.C6 (WO1/38362), MRC-5 (ATCC CCL-171), WI-38 (ATCC CCL-75), клетки HEK-293 (ATCC CRL-1573), клетки HeLa (ATCC CCL2) и клетки легкого плода макака-резуса (ATCC CL-160). Примерами клеток приматов, отличных от человека, являются клетки Vero (ATCC CCL81), клетки COS-1 (ATCC CRL-1650) или клетки COS-7 (ATCC CRL-1651). Примерами клеток собаки являются клетки MDCK (ATCC CCL-34). Примерами клеток грызунов являются клетки хомячка, такие как клетки BHK21-F, клетки НКСС или клетки СНО.

[0262] В качестве альтернативы источникам клеточных линий млекопитающих в изобретении могут применяться клетки, полученные из птиц, таких как курица, утка, гусь, перепел или фазан. Примеры линий клеток птиц включают эмбриональные стволовые клетки птиц (WO1/85938 и WO3/076601), иммортализованные клетки сетчатки утки (WO2005/042728) и клетки, полученные из эмбриональных стволовых клеток птиц, включая куриные клетки (WO2006/108846) или клетки утки, такие как клеточная линия EB66 (WO2008/129058 и WO2008/142124).

[0263] В другом варианте осуществления указанные клетки-хозяева представляют собой клетки насекомых, такие как клетки SF9 (ATCC CRL-1711), клетки Sf21 (IPLB-Sf21), клетки MG1 (BTI-TN-MG1) или клетки High FiveTM (BTI-TN-5B1-4).

[0264] В некоторых вариантах осуществления клетки-хозяева, представленные в настоящем описании, содержащие рекомбинантный вектор/геном AAV по изобретению (например, содержащие последовательность, кодирующую eTF), могут дополнительно содержать одну или более дополнительных конструкций нуклеиновых кислот, таких как, например, (i) конструкция нуклеиновой кислоты (например, хелперная плаزمид AAV), которая кодирует гены гер и сар, но не несет последовательности ITR; и/или (ii) конструкция нуклеиновой кислоты (например, плазмид), обеспечивающая аденовирусные функции, необходимые для репликации AAV. В иллюстративном варианте осуществления клетка-хозяин, представленная в настоящем описании, содержит: i) вектор экспрессии, содержащий последовательность, кодирующую eTF по изобретению (т.е. рекомбинантный геном AAV); ii) конструкцию нуклеиновой кислоты, кодирующую гены гер и сар AAV, которые не несут последовательности ITR; и iii) конструкцию нуклеиновой кислоты, содержащую аденовирусные гены-хелперы (как описано далее ниже).

[0265] В некоторых вариантах осуществления гены гер, сар и аденовирусные гены-хелперы могут быть объединены в одной плазмиде (Blouin V et al. J Gene Med. 2004; 6 (Suppl):S223-S228; Grimm D et al. Hum. Gene Ther. 2003; 7:839-850). Таким образом, в другом иллюстративном варианте осуществления клетка-хозяин, представленная в настоящем описании, содержит: i) вектор экспрессии, содержащий последовательность, кодирующую eTF по изобретению (т.е. рекомбинантный геном AAV); и ii) плазмиду, кодирующую гены гер и сар AAV, которая не несет последовательности ITR и дополнительно содержит аденовирусные гены-хелперы.

[0266] В другом варианте осуществления клетка-хозяин, представленная в настоящем описании, содержит: а) вектор экспрессии, содержащий последовательность, кодирующую eTF по изобретению (т.е. рекомбинантный геном AAV); б) плазмиду, кодирующую гены гер и сар AAV, которая не несет последовательности ITR; и в) плазмиду, содержащую аденовирусные гены-хелперы РНК E2a, E4 и VA; причем котрансфецируют в клетки, предпочтительно клетки млекопитающих, которые конститутивно экспрессируют и транскомплементируют ген аденовируса E1, например клетки HEK-293 (ATCC CRL-1573).

[0267] В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин, подходящая для крупномасштабного производства векторов AAV, представляет собой клетки насекомых, которые могут быть инфицированы комбинацией рекомбинантных бакуловирусов (Urabe et al. Hum. Gene Ther. 2002; 13:1935-1943). Например, клетки SF9 могут быть коинфицированы тремя бакуловирусными векторами, экспрессирующими соответственно AAV гер, AAV сар и вектор AAV для упаковки. Рекомбинантные бакуловирусные векторы обеспечивают функции вирусного гена-хелпера, необходимые для репликации и/или упаковки вируса.

[0268] Дальнейшее руководство по конструированию и получению вирионов для генной терапии по изобретению можно найти в: *Viral Vectors for Gene Therapy, Methods and Protocols*. Series: *Methods in Molecular Biology*. 737. Merten and Al-Rubeai (Eds.); 2011 Humana Press (Springer); *Gene Therapy*. M. Giacca. 2010 Springer-Verlag; Heilbronn R. and Weger S. *Viral Vectors for Gene Transfer: Current Status of Gene Therapeutics*. IN: *Drug Delivery, Handbook of Experimental Pharmacology* 197; M. Schafer-Korting (Ed.). 2010 Springer-Verlag; pp. 143-170; *Adeno-Associated Virus: Methods and Protocols*. R.O. Snyder and P. Moullier (Ed.). 2011 Humana Press (Springer); Bunning H. et al. Recent developments in adeno-associated virus technology. *J. Gene Med.* 2008; 10:717-733; и *Adenovirus: Methods and Protocols*. M. Chillon and A. Bosch (Eds.); Third. Edition. 2014 Humana Press (Springer).

Вирионы и способы их получения

[0269] В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к вирусным частицам, содержащим вирусный вектор, содержащий последовательность, кодирующую eTF по изобретению. Термины «вирусная частица» и «вирион» используются в настоящем описании взаимозаменяемо и относятся к инфекционной и обычно дефектной по репликации вирусной частице, содержащей вирусный геном (например, вирусный вектор экспрессии), упакованный в капсид и, в зависимости от обстоятельств, например в случае ретровирусов, - в липидную оболочку, окружающую капсид. «Капсид» относится к структуре, в которую упакован вирусный геном. Капсид состоит из нескольких олигомерных структурных субъединиц, состоящих из белков. Например, AAV имеют икосаэдрический капсид, образованный взаимодействием трех капсидных белков: VP1, VP2 и VP3. В одном из вариантов осуществления вирион, представленный в настоящем описании, представляет собой рекомбинантный вирион AAV или вирион rAAV, полученный упаковкой в белковую оболочку вектора AAV, содержащего PV-селективный регуляторный элемент, функционально связанный с последовательностью, кодирующей eTF, раскрытой в настоящем описании.

[0270] В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный вирион AAV, представленный в настоящем описании, может быть получен путем инкапсуляции генома AAV, полученного из определенного серотипа AAV, в вирусную частицу, образованную природными белками Cap, соответствующими AAV того же конкретного серотипа. В других вариантах осуществления вирусная частица AAV, представленная в настоящем описании, содержит вирусный вектор, содержащий ITR (один или более) заданного серотипа AAV, упакованный в белки другого серотипа. См., например, Bunning H et al. *J Gene Med* 2008; 10:717-733. Например, вирусный вектор, имеющий ITR заданного серотипа AAV, может быть упакован в: а) вирусную частицу, состоящую из капсидных белков, полученных из одного или разных серотипов AAV (например, ITR AAV2 и капсидных белков AAV9; ITR AAV2 и капсидных белков AAV8; т.д.); б) частицу вируса мозаики, состоящую из смеси капсидных белков из разных серотипов AAV или мутантов (например, ITR AAV2 с капсидными белками AAV1 и AAV9); в) химерную вирусную частицу, состоящую из капсидных белков, которые были укорочены путем обмена

доменами между разными серотипами или вариантами AAV (например, ITR AAV2 с капсидными белками AAV8 с доменами AAV9); или d) целевую вирусную частицу, сконструированную для размещения доменов селективного связывания, обеспечивающих жесткое взаимодействие со специфическими рецепторами целевых клеток (например, ITR AAV5 с капсидными белками AAV9, генетически укороченными путем введения пептидного лиганда, или капсидными белками AAV9, которые не были генетически модифицированы путем соединения пептидного лиганда с поверхностью капсида).

[0271] Специалисту в данной области известно, что представленный в настоящем описании вирион AAV может содержать капсидные белки любого серотипа AAV. В одном из вариантов осуществления вирусная частица содержит капсидные белки из серотипа AAV, выбранного из группы, состоящей из AAV1, AAV2, AAV5, AAV8 и AAV9, которые являются более подходящими для доставки в ЦНС (M. Hocquemiller et al., *Hum Gene Ther* 27 (7):478-496 (2016)). В конкретном варианте осуществления вирусная частица содержит экспрессионную кассету по изобретению, в которой последовательности 5'-ITR и 3'-ITR экспрессионной кассеты имеют серотип AAV2, а капсидные белки имеют серотип AAV9.

[0272] В данной области техники известны многочисленные способы получения вирионов гAAV, включая трансфекцию, продуцирование стабильными клеточными линиями и системы для продуцирования на основе инфекционных гибридных вирусов, которые включают гибриды аденовирус-AAV, гибриды герпесвирус-AAV (Conway, JE et al., (1997) *J. Virology* 71(11):8780-8789) и гибриды бакуловирус-AAV. Всем культурам для продуцирования гAAV для получения частиц вируса гAAV необходимы: 1) подходящие клетки-хозяева, включая, например, клеточные линии, полученные от человека, такие как клетки HeLa, A549 или 293, или клеточные линии, полученные от насекомых, такие как SF-9, в случае систем для продуцирования бакуловируса; 2) подходящая функция вируса-хелпера, обеспечиваемая аденовирусом дикого типа или мутантным аденовирусом (таким как аденовирус, чувствительный к температуре), вирусом герпеса, бакуловирусом или плазмидной конструкцией, обеспечивающей хелперные функции; 3) гены гер и сар AAV и генные продукты; 4) трансген (например, промотор, функционально связанный с последовательностью, кодирующей eTF по изобретению), фланкированной последовательностями ITR AAV; и 5) подходящие носители и компоненты носителей для поддержания продуцирования гAAV.

[0273] В различных вариантах осуществления клетки-хозяева, раскрытые в настоящем описании, содержат следующие три компонента: (1) ген гер и ген сар, (2) гены, обеспечивающие хелперные функции, и (3) трансген (например, промотор, функционально связанный с последовательностью, кодирующей eTF по изобретению, фланкированной ITR). Ген гер AAV, ген сар AAV и гены, обеспечивающие хелперные функции, могут быть введены в клетку путем включения указанных генов в вектор, такой как, например, плазида, и введения указанного вектора в клетку-хозяина. Гены гер, сар и гены, обеспечивающие хелперную функцию, могут быть включены в одну и ту же

плазмиду или в разные плазмиды. В предпочтительном варианте осуществления гены гер и сар AAV включены в одну плазмиду, а гены, обеспечивающие хелперные функции, включены в другую плазмиду. В клетку могут быть введены различные плазмиды с получением клетки-хозяина для продуцирования вирионов (например, содержащих гены гер и сар AAV, хелперные функции или трансген) с помощью любого подходящего способа, хорошо известного в данной области. Примеры способов трансфекции включают, без ограничения, соосаждение фосфатом кальция, DEAE-декстраном, полибренном, электропорацию, микроинъекцию, опосредованное слиянием липосомами, липофекцию, ретровирусную инфекцию и биолистическую трансфекцию. В некоторых вариантах осуществления плазмиды, несущие гены гер и сар, хелперные функции и трансген (например, промотор, функционально связанный с последовательностью, кодирующей eTF по изобретению, фланкированной ITR), могут быть введены в клетку одновременно. В другом варианте осуществления плазмиды, несущие гены гер и сар и хелперные функции, могут быть введены в клетку до или после введения плазмиды, содержащей трансген. В иллюстративном варианте осуществления клетки трансфицируют одновременно тремя плазмидами (например, методом тройной трансфекции): (1) плазмидой, содержащей трансген (например, промотор, функционально связанный с последовательностью, кодирующей eTF по изобретению, фланкированной ITR), (2) плазмидой, содержащей гены гер и сар AAV, и (3) плазмидой, содержащей гены, обеспечивающие хелперную функцию. Типичными клетками-хозяевами могут быть клетки 293, A549 или HeLa.

[0274] В других вариантах осуществления одно или более из (1) генов гер и сар AAV, (2) генов, обеспечивающих хелперную функцию, и (3) трансгена, можно переносить с помощью пакующей клетки, или эписомально, и/или интегрировать в геном пакующей клетки. В одном из вариантов осуществления клетки-хозяева могут представлять собой пакующие клетки, в которых гены гер и сар AAV и хелперные функции стабильно поддерживаются в клетке-хозяине, и клетку-хозяин временно трансфицируют плазмидой, содержащей трансген (например, промотор, функционально связанный с последовательностью, кодирующей eTF по изобретению, фланкированной ITR). В другом варианте осуществления клетки-хозяева представляют собой пакующие клетки, в которых гены гер и сар AAV стабильно поддерживаются клеткой-хозяином, и клетку-хозяин временно трансфицируют плазмидой, содержащей трансген (например, промотор, функционально связанный с последовательностью, кодирующей eTF по изобретению, фланкированной ITR) и плазмидой, содержащей хелперную функцию. В другом варианте осуществления клетки-хозяева могут быть пакующими клетками, в которых хелперные функции стабильно поддерживаются клеткой-хозяином, и клетку-хозяин временно трансфицируют плазмидой, содержащей трансген (например, промотор, функционально связанный с последовательностью, кодирующей eTF по изобретению, фланкированной ITR) и плазмидой, содержащей гены гер и сар. В другом варианте осуществления клетки-хозяева могут представлять собой линии клеток-продуцентов, которые стабильно

трансфицированы генами *her* и *cap*, хелперными функциями и последовательностью трансгена (например, промотором, функционально связанным с последовательностью, кодирующей eTF по изобретению, фланкированной ITR). Типичные пакующие клетки и клетки-продуценты могут быть получены из клеток 293, A549 или HeLa.

[0275] В другом варианте осуществления линия клеток-продуцентов представляет собой линию клеток насекомых (обычно клеток Sf9), которая инфицирована бакуловирусными экспрессионными векторами, несущими белки *Rep* и *Cap*. Эта система не требует аденовирусных генов-хелперов (Ayuso E, et al., *Curr. Gene Ther.* 2010, 10:423-436).

[0276] Термин «белок *cap*», используемый в настоящем описании, относится к полипептиду, имеющему по меньшей мере одну функциональную активность природного белка *Cap* AAV (например, VP1, VP2, VP3). Примеры функциональной активности капсульных белков включают способность индуцировать образование капсида, облегчать накопление одноцепочечной ДНК, облегчать упаковку ДНК AAV в капсид (т.е. инкапсидирование), связываться с клеточными рецепторами и облегчать проникновение вириона в клетки-хозяева. В принципе, в контексте настоящего изобретения может быть использован любой белок *Cap*.

[0277] Имеются сообщения о том, что белки *cap* оказывают влияние на тропизм хозяина, специфичность к клеткам, тканям или органам, использование рецепторов, эффективность инфекции и иммуногенность вирусов AAV. Соответственно, *cap* AAV для использования в rAAV может быть выбран с учетом, например, вида субъекта (например, человека или не человека), иммунологического состояния субъекта, пригодности субъекта для длительного или краткосрочного лечения или конкретного терапевтического воздействия (например, лечения определенного заболевания или расстройства или для доставки к конкретным клеткам, тканям или органам). В некоторых вариантах осуществления белок *cap* получают из AAV группы, состоящей из серотипов AAV1, AAV2, AAV5, AAV8 и AAV9. В типичном варианте осуществления белок *cap* получают из AAV9.

[0278] В некоторых вариантах осуществления *cap* AAV для использования в способе по изобретению может быть получен путем мутагенеза (т.е. путем вставки, делеции или замены) одного из вышеупомянутых *cap* AAV или кодирующей его нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления *cap* AAV на по меньшей мере 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 или 99% или более аналогичен одному или более из вышеупомянутых *cap* AAV.

[0279] В некоторых вариантах осуществления *cap* AAV является химерным и содержит домены двух, трех, четырех или более из вышеупомянутых *cap* AAV. В некоторых вариантах осуществления *cap* AAV представляет собой мозаику мономеров VP1, VP2 и VP3, происходящих из двух или трех разных AAV или рекомбинантного AAV. В некоторых вариантах осуществления композиция rAAV содержит более одного из вышеупомянутых белков *cap*.

[0280] В некоторых вариантах осуществления сар AAV для использования в вирионе гAAV конструируют таким образом, чтобы он содержал гетерологичную последовательность или другую модификацию. Например, в белок сар может быть встроена пептидная или белковая последовательность, которая обеспечивает селективное нацеливание или уклонение от иммунитета. Альтернативно или в дополнение, сар может быть химически модифицирован таким образом, чтобы поверхность гAAV была полиэтиленгликолевой (т.е. пегилированной), что может способствовать уклонению от иммунитета. Белок сар также может быть подвержен мутагенезу (например, для исключения его естественного связывания с рецептором или для маскировки иммуногенного эпитопа).

[0281] Используемый в настоящем описании термин «белок гер» относится к полипептиду, имеющему по меньшей мере одну функциональную активность нативного белка гер AAV (например, гер 40, 52, 68, 78). Примеры функциональных активностей белка гер включают любую активность, связанную с физиологической функцией белка, включая облегчение репликации ДНК посредством распознавания, связывания и внесения разрыва в одну цепь (никование) AAV-источника репликации ДНК, а также геликазной активности ДНК. Дополнительные функции включают модуляцию транскрипции с (или других гетерологичных) промоторов AAV и сайт-специфическую интеграцию ДНК AAV в хромосому хозяина. В конкретном варианте осуществления гены гер AAV могут быть из серотипов AAV1, AAV2, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10 или AAVrh10; более предпочтительно из серотипа AAV, выбранного из группы, состоящей из AAV1, AAV2, AAV5, AAV8 и AAV9.

[0282] В некоторых вариантах осуществления белок гер AAV для использования в способе по изобретению может быть получен с помощью мутагенеза (т.е. путем вставок, делеций или замен) одного из вышеупомянутых повторов AAV или его кодирующей нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления гер AAV является на по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% или более аналогичным одному или более вышеупомянутым гер AAV.

[0283] Используемые в настоящем описании выражения «хелперная функции» или «гены-хелперы» относятся к вирусным белкам, от которых зависит репликация AAV. Хелперные функции включают белки-хелперы, которые необходимы для репликации AAV, включая, без ограничения, белки, которые участвуют в активации транскрипции гена AAV, стадии специфического сплайсинга мРНК AAV, репликации ДНК AAV, синтеза продуктов экспрессии сар и сборки капсида AAV. Вирусные вспомогательные функции могут быть обеспечены любым известным вирусом-хелпером, таким как аденовирус, вирус герпеса (кроме вируса простого герпеса типа 1) и вирус коровьей оспы. Хелперные функции включают, без ограничения, аденовирус E1, E2a, VA и E4 или герпесвирус UL5, ULB, UL52 и UL29 и полимеразу герпеса. В предпочтительном варианте осуществления белки, от которых зависит репликация AAV, получают из аденовируса.

[0284] В некоторых вариантах осуществления вирусный белок, от которого зависит репликация AAV при использовании в способе по изобретению, может быть получен путем мутагенеза (т.е. вставок, делеций или замен) одного из вышеупомянутых вирусных белков или кодирующей его нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления вирусный белок по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% или более подобен одному или более вышеупомянутым вирусным белкам.

[0285] Способы оценки функций белков сар, белков гер и вирусных белков, от которых зависит репликация AAV, хорошо известны в данной области.

[0286] Клетки-хозяева для экспрессии представляющего интерес трансгена (например, промотора, функционально связанного с последовательностью, кодирующей eTF) могут быть выращены в условиях, достаточных для сборки вирионов AAV. В определенных вариантах осуществления клетки-хозяева выращивают в течение периода времени, подходящего для обеспечения сборки вирионов AAV и высвобождения вирионов в среду. Обычно клетки можно выращивать в течение примерно 24 часов, примерно 36 часов, примерно 48 часов, примерно 72 часов, примерно 4 дней, примерно 5 дней, примерно 6 дней, примерно 7 дней, примерно 8 дней, примерно 9 дней или до примерно 10 дней. Примерно через 10 дней (или раньше, в зависимости от условий культивирования и конкретной используемой клетки-хозяина) уровень продуцирования обычно существенно снижается. Как правило, время культивирования измеряют по уровню продуцирования вируса. Например, в случае AAV продуцирование вируса, как правило, начинается после обеспечения функции вируса-хелпера в соответствующей клетке-хозяине, как раскрыто в настоящем описании. Как правило, клетки собирают через от примерно 48 до примерно 100, предпочтительно от примерно 48 до примерно 96, предпочтительно от примерно 72 до примерно 96, предпочтительно от примерно 68 до примерно 72 часов после заражения вирусом-хелпером (или после начала продуцирования вируса).

[0287] Культуры, продуцирующие гAAV, можно выращивать в различных условиях (в широком диапазоне температур, в течение различных периодов времени и т.п.), подходящих для конкретной используемой клетки-хозяина. Культуры, продуцирующие гAAV, включают зависимые от прикрепления к твердому субстрату культуры, которые можно культивировать в подходящих сосудах для зависимых от прикрепления к твердому субстрату культур, таких как, например, роллер-флаконы, фильтры с полыми волокнами, микроносители и биореакторы с уплотненным слоем или с псевдооживленным слоем. Культуры для продуцирования вектора гAAV также могут включать адаптированные к росту в суспензии клетки-хозяева, такие как клетки HeLa, 293 и SF-9, которые можно культивировать различными способами, включая, например, вращающиеся колбы, биореакторы с мешалкой и одноразовые системы, такие как система Wave Bag.

[0288] Для получения вирионов гAAV могут быть использованы подходящие среды, известные в данной области. Эти среды включают, без ограничения, среды,

производимые Nuclone Laboratories и JRH, включая модифицированную среду Игла (MEM), модифицированную Дульбекко среду Игла (DMEM), каждая из которых включена в настоящее описание во всей своей полноте в виде ссылки. В некоторых вариантах осуществления в культуральную среду для продуцирования гAAV могут быть добавлены сывороточные или полученные из сыворотки рекомбинантные белки на уровне 0,5-20% (об./об. или мас./об.). Альтернативно, векторы гAAV могут быть получены в не содержащих сыворотку средах, которые также могут называться средами без продуктов животного происхождения.

[0289] После культивирования клеток-хозяев с целью продуцирования вирионов AAV полученные вирионы могут быть затем собраны и очищены. В определенных вариантах осуществления вирионы AAV могут быть получены из (1) клеток-хозяев культуры для продуцирования путем лизиса клеток-хозяев и/или (2) культуральной среды указанных клеток через некоторый период времени после трансфекции, предпочтительно через 72 часа. Вирионы гAAV можно собирать из отработанной среды, полученной из культуры для продуцирования при условии, что клетки культивируют в условиях, которые вызывают высвобождение вирионов гAAV в среду из интактных клеток (см., например, патент США № 6,566,118). Подходящие способы лизиса клеток также известны в данной области и включают, например, несколько циклов замораживания/оттаивания, обработку ультразвуком, микрофлюидизацию и обработку химическими веществами, такими как детергенты и/или протеазы.

[0290] После сбора вирионы гAAV могут быть очищены. Используемый в настоящем описании термин «очищенный» включает получение вирионов гAAV, лишенных по меньшей мере некоторых других компонентов, которые также могут присутствовать в местах, где вирионы гAAV встречаются в естественной среде или из которых изначально получены. Так, например, очищенные вирионы гAAV могут быть получены с помощью методов выделения для обогащения их из исходной смеси, такой как культуральный лизат или супернатант культуры для продуцирования. Уровень обогащения можно измерять различными способами, такими как, например, доля устойчивых к ДНКазе частиц (DRP) или копий генома (gc), присутствующих в растворе, или инфекционность, или уровень обогащения можно измерить относительно второго, потенциально интерферирующего вещества, присутствующего в исходной смеси, например, загрязняющих веществ, в том числе загрязняющих веществ в культуре для продуцирования или загрязняющих веществ, присутствующих в процессе, включая вирус-хелпер, компоненты среды и т.п.

[0291] В определенных вариантах осуществления собранная культура для продуцирования гAAV может быть очищена с целью удаления остатков клеток-хозяев. В некоторых вариантах осуществления собранная культура для продуцирования может быть очищена стандартными методами, такими как центрифугирование или фильтрация через фильтр с размером пор 0,2 мкм или более (например, через ацетат-целлюлозный фильтр или несколько фильтров глубокого очищения).

[0292] В некоторых вариантах осуществления собранную культуру для продуцирования гAAV дополнительно обрабатывают Benzonase™ для расщепления любой высокомолекулярной ДНК, присутствующей в культуре для продуцирования. В некоторых вариантах осуществления расщепление с помощью Benzonase™ проводят в стандартных условиях, например, при конечной концентрации 1-2,5 единиц/мл Benzonase™ при температуре в диапазоне от температуры окружающей среды до 37°C в течение от 30 минут до нескольких часов.

[0293] В некоторых вариантах осуществления вирионы гAAV могут быть выделены или очищены с помощью одной или более из следующих стадий очистки: равновесное центрифугирование; проточная фильтрация через анионообменный фильтр; фильтрация в тангенциальном потоке (TFF) для концентрирования частиц гAAV; захват гAAV с помощью апатитовой хроматографии; тепловая инактивация вируса-хелпера; захват гAAV с помощью хроматографии гидрофобного взаимодействия; замена буфера методом эксклюзионной хроматографии (SEC); нанофильтрации; и захват гAAV с помощью анионообменной хроматографии, катионообменной хроматографии или аффинной хроматографии. Эти стадии можно использовать по отдельности, в различных комбинациях или в любом порядке. Способы очистки частиц гAAV можно найти, например, в Xiao et al., (1998) Journal of Virology 72:2224-2232; патентах США № 6,989,264 и 8,137,948; и WO 2010/148143.

[0294] В некоторых вариантах осуществления очищенные вирионы AAV можно диализовать против PBS, отфильтровать и хранить при -80°C. Титры вирусных геномов могут быть определены количественной ПЦР с использованием линеаризованной плазмидной ДНК для получения стандартной кривой (см., например, Lock M, et al., Hum. Gene Ther. 2010; 21:1273-1285).

Фармацевтические композиции

[0295] В определенных вариантах осуществления изобретение относится к композициям, содержащим последовательность, кодирующую eTF и фармацевтически приемлемый носитель. В других вариантах осуществления изобретение относится к вирионам, содержащим последовательность, кодирующую eTF, и фармацевтически приемлемый носитель. В иллюстративных вариантах осуществления такие композиции подходят для применений в генной терапии. Фармацевтические композиции предпочтительно являются стерильными и стабильными в условиях производства и хранения. Стерильные растворы могут быть достигнуты, например, путем фильтрации через стерильные мембранные фильтры.

[0296] Приемлемые носители и наполнители в фармацевтических композициях предпочтительно являются нетоксичными для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях. Приемлемые носители и наполнители могут включать буферы, такие как фосфатный, цитратный, HEPES и TAE, антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота и метионин, консерванты, такие как хлорид гексаметония, октадецилдиметилбензиламмоний хлорид, резорцин и хлорид бензалкония, белки, такие

как человеческий сывороточный альбумин, желатин, декстран и иммуноглобулины, гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон, аминокислоты, такие как глицин, глутамин, гистидин и лизин, и углеводы, такие как глюкоза, манноза, сахароза и сорбит. Фармацевтические композиции по изобретению могут вводиться парентерально в виде инъекционной композиции. Фармацевтические композиции для инъекций могут быть приготовлены в составе со стерильным раствором или любой фармацевтически приемлемой жидкостью в качестве носителя. Фармацевтически приемлемые носители включают, без ограничения, стерильную воду и физиологический раствор.

[0297] Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут быть приготовлены в микрокапсулах, таких как микрокапсулы из гидроксиметилцеллюлозы или желатиновые микрокапсулы и полиметилметакрилатные микрокапсулы. Фармацевтические композиции по изобретению также могут быть приготовлены в других системах доставки лекарственных средств, таких как липосомы, микросферы альбумина, микроэмульсии, наночастицы и нанокапсулы. Фармацевтическая композиция для генной терапии может находиться в приемлемом разбавителе или может содержать матрицу с медленным высвобождением, в которую встроен носитель для доставки гена.

[0298] Фармацевтические композиции, представленные в настоящем описании, могут быть приготовлены в виде составов для парентерального введения, подкожного введения, внутривенного введения, внутримышечного введения, внутриартериального введения, внутрипаренхимного введения, интратекального введения, интрацистернального введения, интрацеребровентрикулярного введения или внутрибрюшинного введения. Фармацевтическая композиция также может быть приготовлена или введена интраназально, в виде спрея, перорально, в виде аэрозоля, ректально или вагинально. В одном из вариантов осуществления фармацевтическую композицию, представленную в настоящем описании, вводят в ЦНС или спинномозговую жидкость (СМЖ, CSF), т.е. с помощью интрапаренхимальной инъекции, интратекальной инъекции, интрацистернальной инъекции или интрацеребровентрикулярной инъекции. Целевая ткань может быть специфической, например ЦНС, или она может представлять собой комбинацию нескольких тканей, например мышечную ткань и ткань ЦНС. Примеры тканей или других мишеней могут включать печень, скелетные мышцы, сердечную мышцу, жировые отложения, почки, легкие, сосудистый эндотелий, эпителиальные, кроветворные клетки, ЦНС и/или СМЖ. В предпочтительном варианте осуществления фармацевтическая композиция, представленная в настоящем описании, содержащая ETF, который увеличивает экспрессию SCN1A или GRN, вводят путем инъекции в ЦНС или СМЖ, т.е. путем интрапаренхимальной инъекции, интратекальной инъекции, интрацистернальной инъекции или интрацеребровентрикулярной инъекции. Для введения фармацевтической композиции по изобретению могут быть использованы один или более из этих способов.

[0299] В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция, представленная в настоящем описании, содержит «эффективное количество» или

«терапевтически эффективное количество». В контексте настоящего изобретения, такие количества относятся к количеству, эффективному в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого терапевтического результата, такого как увеличение уровня экспрессии SCN1A и/или уменьшение частоты и/или продолжительности приступов или увеличение уровня экспрессии GRN и/или лечения заболевания или расстройства, связанного с GRN, такого как FTD.

[0300] Доза фармацевтических композиций по настоящему изобретению зависит от факторов, включая путь введения, заболевание, подлежащее лечению, и физические характеристики (например, возраст, вес, общее состояние здоровья) субъекта. Доза может быть скорректирована для обеспечения оптимального терапевтического ответа. Как правило, доза может представлять собой количество, которое обеспечивает эффективное лечение заболевания, не вызывая существенной токсичности. В одном из вариантов осуществления вектор AAV, представленный в настоящем описании, можно вводить пациенту для лечения дефицита SCN1A (включая, например, синдром Драве) или для лечения дефицита GRN (включая, например, FTD) в количестве или дозе в пределах диапазона от 5×10^{11} до 1×10^{14} к.г./кг (копий генома на килограмм массы тела пациента (gc/kg)). В более конкретном варианте осуществления вектор AAV вводят в количестве, находящемся в диапазоне от примерно 5×10^{11} к.г./кг до примерно 3×10^{13} к.г./кг или от примерно 1×10^{12} до примерно 1×10^{14} к.г./кг, или от примерно 1×10^{12} до примерно 1×10^{13} к.г./кг, или примерно 5×10^{11} к.г./кг, 1×10^{12} к.г./кг, $1,5 \times 10^{12}$ к.г./кг, $2,0 \times 10^{12}$ к.г./кг, $2,5 \times 10^{12}$ к.г./кг, 3×10^{12} к.г./кг, $3,5 \times 10^{12}$ к.г./кг, 4×10^{12} к.г./кг, $4,5 \times 10^{12}$ к.г./кг, 5×10^{12} к.г./кг, $5,5 \times 10^{12}$ к.г./кг, 6×10^{12} к.г./кг, $6,5 \times 10^{12}$ к.г./кг, 7×10^{12} к.г./кг, $7,5 \times 10^{12}$ к.г./кг, 8×10^{12} к.г./кг, $8,5 \times 10^{12}$ к.г./кг, 9×10^{12} к.г./кг или $9,5 \times 10^{12}$ к.г./кг. Количество копий генома на кг может быть определено, например, методом кПЦР или цифровой капельной ПЦР (ddPCR) (см., например, M. Lock et al., Hum Gene Ther Methods. 2014 Apr; 25(2):115-25). В другом варианте осуществления вектор AAV, представленный в настоящем описании, можно вводить пациенту для лечения дефицита SCN1A (включая, например, синдром Драве) в количестве или дозе в диапазоне от 1×10^9 до 1×10^{11} ИЕ/кг (инфекционных единиц вектора (iu)/массу тела субъекта или пациента (кг)). В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция может быть приготовлена в виде единичной дозы, при необходимости. Такие единичные дозированные единицы могут содержать от примерно 1×10^9 до примерно 1×10^{15} г.

[0301] Фармацевтические композиции по изобретению могут вводиться нуждающемуся в этом субъекту, например, один или несколько раз (например, 1-10 раз или более) ежедневно, еженедельно, ежемесячно, два раза в год, ежегодно или по мере необходимости с медицинской точки зрения. В иллюстративном варианте осуществления достаточно одного введения. В одном из вариантов осуществления фармацевтическая композиция, содержащая экспрессионную кассету, кодирующую eTF, который увеличивает экспрессию SCN1A или GRN, является подходящей для применения людьми и вводится путем интрапаренхимальной инъекции, интратекальной инъекции,

интрацестеральной инъекции или интрацеребровентрикулярной инъекции. В одном из вариантов осуществления фармацевтическая композиция доставляется через периферическую вену путем болюсной инъекции. В других вариантах осуществления фармацевтическая композиция доставляется через периферическую вену путем инфузии в течение примерно 10 минут (± 5 минут), примерно 20 минут (± 5 минут), примерно 30 минут (± 5 минут), примерно 60 минут (± 5 минут) или примерно 90 минут (± 10 минут).

[0302] В другом аспекте изобретение также относится к набору, содержащему молекулу нуклеиновой кислоты, вектор, клетку-хозяин, вирион или фармацевтическую композицию по настоящему изобретению в одном или более контейнерах. Набор может включать инструкции или упаковочные материалы, в которых описан способ введения пациенту молекулы нуклеиновой кислоты, вектора, клетки-хозяина или вириона, содержащегося в наборе. Контейнеры набора могут быть изготовлены из любого подходящего материала, например стекла, пластика, металла и т.д., и могут быть любого подходящего размера, формы или конфигурации. В определенных вариантах осуществления наборы могут включать одну или более ампул или шприцев, которые содержат молекулу нуклеиновой кислоты, вектор, клетку-хозяин, вирион или фармацевтическую композицию в подходящей форме в виде жидкости или раствора.

Способы лечения

[0303] В различных вариантах осуществления изобретение относится к способам применения eTF, раскрытых в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способам введения экспрессионной кассеты, вектора экспрессии или вирусной частицы, содержащей полинуклеотид, кодирующий eTF, раскрытый в настоящем описании, для модуляции экспрессии представляющего интерес гена в клетке. В некоторых вариантах осуществления eTF может повышать экспрессию представляющего интерес гена. В других вариантах осуществления eTF может подавлять экспрессию представляющего интерес гена. В различных вариантах осуществления eTF можно использовать для модуляции экспрессии представляющего интерес гена в клетке *in vitro*, *in vivo* или *ex vivo*.

[0304] В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способам лечения заболевания или расстройства, связанного с представляющим интерес геном, путем введения нуждающемуся в этом субъекту экспрессионной кассеты, вектора экспрессии или вирусной частицы, содержащей полинуклеотид, кодирующий eTF, который модулирует экспрессию представляющего интерес гена. В иллюстративных вариантах осуществления заболевание или расстройство связано с гаплонедостаточностью представляющего интерес гена, и экспрессионная кассета, вектор экспрессии или вирусная частица содержат полинуклеотид, кодирующий eTF, который усиливает экспрессию представляющего интерес гена. В некоторых вариантах осуществления способ лечения заболевания или расстройства включает введение экспрессионной кассеты, вектора экспрессии или вирусной частицы, содержащей полинуклеотид, кодирующий eTF, который модулирует экспрессию представляющего интерес

эндогенного гена, связанного с таким заболеванием или расстройством, обеспечивая корректировку сверхэкспрессии или недостаточной экспрессии такого гена и приводя к уровню экспрессии, характерному для здорового индивидуума, или приводя к нормальному диапазону, определяемому медицинским стандартом. В определенных вариантах осуществления способы, раскрытые в настоящем описании, используются для лечения заболевания или расстройства, связанного с эндогенным геном, содержащим одну или более мутаций, которые приводят к аномальной экспрессии гена. В некоторых случаях такой эндогенный ген представляет собой ген, который слишком велик для доставки в качестве трансгена при генной терапии или неэффективно экспрессируется при доставке в виде трансгена.

[0305] В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способам ослабления симптома, связанного с заболеванием или расстройством, путем введения нуждающемуся в этом субъекту экспрессионной кассеты, вектора экспрессии или вирусной частицы, содержащей полинуклеотид, кодирующий eTF, который модулирует экспрессию гена, связанного с таким заболеванием или расстройством.

[0306] В иллюстративном варианте осуществления изобретение относится к способам лечения заболевания, расстройства или симптома, связанного с мутацией в SCN1A, дефицитом Nav1.1 и/или сниженной активностью Nav1.1, путем введения нуждающемуся в этом субъекту экспрессионной кассеты, вектора экспрессии или вирусной частицы, содержащей полинуклеотид, кодирующий eTF, который усиливает экспрессию гена SCN1A или его белкового продукта Nav1.1. Потенциалзависимые натриевые каналы важны для генерации и распространения потенциалов действия в поперечно-полосатой мышце и нейрональных тканях. Потенциалзависимые натриевые каналы представляют собой гетеромерные комплексы, состоящие из большой центральной порообразующей гликозилированной альфа-субъединицы и двух вспомогательных бета-субъединиц меньшего размера. Большая альфа-субъединица Nav1.1, кодируемая геном SCN1A, связана с различными заболеваниями или расстройствами, такими как синдром Драве. Nav1.1 экспрессируется в нейронах и может быть собран с различными бета-субъединицами, включая Nav β 1, экспрессируемый геном SCN1B.

[0307] В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способам лечения заболеваний, связанных с мутацией в SCN1A или сниженной активностью Nav1.1, с использованием eTF, который усиливает экспрессию эндогенного гена SCN1A. Заболевания и расстройства, связанные с мутациями SCN1A, включают, без ограничения: синдром Драве, синдром Отахара, эпилепсию, раннюю инфантильную эпилептическую энцефалопатию 6 (EIEE6), семейные фебрильные судороги типа 3A (FEB3A), инкурабельную детскую эпилепсию с генерализованными тонико-клоническими приступами (ICEGTC), мигрень, семейную гемиплегию 3, синдром Панайотопулоса, семейную фибрилляцию предсердий 13 (ATFB13), генерализованную эпилепсию с фебрильными судорогами плюс типа 1 (gefs+тип 1), синдром Бругада, неспецифический

дефект сердечной проводимости, генерализованную эпилепсию с фебрильными судорогами плюс, доброкачественную семейную инфантильную эпилепсию, раннюю инфантильную эпилептическую энцефалопатию 11 (EIEE11), доброкачественную семейную эпилепсию новорожденных, нейродегенерацию, тауопатию и болезнь Альцгеймера. В некоторых случаях неврологическим состоянием является синдром Драве. Мутации или аномалии в SCN1A также связаны с судорогами, эпилепсией, аутизмом, семейной гемиплегической мигренью типа 3 (FHM3), генетической эпилепсией с фебрильными судорогами плюс (GEFS+) и эффективностью некоторых противосудорожных препаратов. Например, мутация ICS5N+5G>A в SCN1A связана с максимально безопасным количеством (дозой) противосудорожных препаратов фенитоин и карбамазепин.

[0308] В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к способу лечения субъекта с синдромом Драве или с риском развития этого заболевания путем введения экспрессионной кассеты, вектора экспрессии или вирусной частицы, содержащей полинуклеотид, кодирующий eTF, который увеличивает экспрессию SCN1A. Синдром Драве характеризуется длительными фебрильными и нефебрильными судорогами в течение первого года жизни ребенка. Эта болезнь прогрессирует до припадков других типов, таких как миоклонические и частичные (фокальные) эпилепсии, психомоторная задержка и атаксия. Он характеризуется когнитивными нарушениями, поведенческими расстройствами и двигательным дефектом. Поведенческий дефицит часто включает гиперактивность и импульсивность, а в более редких случаях - аутистическое поведение. Синдром Драве также связан с нарушениями сна, включая сонливость и бессонницу. У многих пациентов синдром Драве вызван генетическими мутациями, которые приводят к выработке нефункциональных белков. Лечение расстройств, связанных с генетическими причинами, связано со многими проблемами. Таким образом, большинство существующих методов лечения направлено на профилактическое лечение судорог и других симптомов.

[0309] У 70-90% пациентов синдром Драве вызван нонсенс-мутациями в гене SCN1A, что приводит к преждевременному стоп-кодону и, следовательно, к нефункциональному белку. Как правило, миссенс-мутация в сегменте S5 или S6 поры натриевого канала приводит к потере функции канала и развитию синдрома Драве. Гетерозиготное наследование мутации SCN1A является достаточным условием для развития дефектного натриевого канала; у пациентов с синдромом Драве все еще сохраняется одна нормальная копия гена. Таким образом, заболевание характеризуется как одна из гаплонедостаточностей, и увеличение экспрессии функционирующей копии SCN1A позволяет восстановить нормальные уровни продуцирования Nav1.1.

[0310] Симптомы, связанные с синдромом Драве, включают судороги, дефекты памяти, задержку развития, плохой мышечный тонус и/или когнитивные проблемы. Лечение с помощью экспрессионной кассеты, вектора экспрессии или частицы вириона, раскрытых в настоящем описании, может привести к улучшению одного или более

симптомов, таких как уменьшение количества, продолжительности и/или интенсивности судорог. Предоставление генной терапии по изобретению субъекту, подверженному риску развития синдрома Драве, может предотвратить развитие или замедлить прогрессирование одного или более симптомов Драве.

[0311] В некоторых вариантах осуществления лечение с помощью экспрессионной кассеты, вектора экспрессии или вирусной частицы, содержащей полинуклеотид, кодирующий eTF, который увеличивает экспрессию SCN1A по настоящему изобретению, уменьшает продолжительность и/или частоту припадков, например, припадков, связанных с синдромом Драве, на по меньшей мере 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или более по сравнению с контролем без лечения или по сравнению с уровнем до лечения.

[0312] У некоторых пациентов с болезнью Альцгеймера вырабатывается амилоид β (A β) с участием многих пептидов и протеаз, которые могут влиять на возбудимость нейронов, вызывая судороги и подавляя натриевый канал Nav1.1 в PV-нейронах. В другом варианте осуществления изобретение относится к способам лечения субъекта, страдающего болезнью Альцгеймера, путем введения представленной в настоящем описании экспрессионной кассеты, вектора экспрессии или вирусной частицы, которая содержит полинуклеотид, кодирующий eTF, который увеличивает экспрессию SCN1A. Симптомы, связанные с болезнью Альцгеймера, включают кратковременную потерю памяти, когнитивные трудности, судороги и трудности с языком, исполнительными функциями, восприятием (агнозия) и выполнением движений (апраксия). Лечение с помощью экспрессионной кассеты, вектора экспрессии или вирусной частицы, содержащей полинуклеотид, кодирующий eTF, который увеличивает экспрессию SCN1A, может привести к улучшению одного или более симптомов болезни Альцгеймера, таких как уменьшение прогрессирования потери памяти или предупреждение развития одного или более симптомов. В некоторых случаях лечение может привести к коррекции высокой гамма-активности мозга. Лечение может привести к уменьшению частоты приступов и/или тяжести приступов или снижению высокой гамма-активности на по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% или более по сравнению с состоянием без лечения. В некоторых случаях лечение может привести к улучшению когнитивной функции. Обучение и/или память могут быть улучшены по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% или более чем на 100% по сравнению с состоянием без лечения или до лечения с помощью полинуклеотида, кодирующего eTF, который увеличивает экспрессию SCN1A по изобретению.

[0313] В некоторых случаях лечение с помощью экспрессионной кассеты, вектора экспрессии или вирусной частицы, содержащей полинуклеотид, кодирующий eTF, который увеличивает экспрессию SCN1A, снижает высокую гамма-активность (например, высокую гамма-активность, связанную с болезнью Альцгеймера) на по меньшей мере 1%,

2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% по сравнению с контролем, не получавшим лечение, или по сравнению с уровнем до лечения.

[0314] Паркинсонизм относится к совокупности признаков и симптомов, наблюдаемых при болезни Паркинсона (БП), включая медлительность (брадикинезию), скованность (ригидность), тремор и дисбаланс (постуральную нестабильность). В некоторых случаях введение экспрессионной кассеты, вектора экспрессии или вирусной частицы, содержащей полинуклеотид, кодирующий представленный в настоящем описании eTF, который увеличивает экспрессию SCN1A, субъекту с риском развития или болезнью Паркинсона позволяет предотвратить развитие одного или более симптомов или замедлить прогрессирование болезни Паркинсона на по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, или по меньшей мере 90% по сравнению с состоянием без лечения.

[0315] В определенных вариантах осуществления изобретение относится к способам, которые можно использовать для лечения субъекта, которому грозит риск развития заболевания. Известно, что субъект предрасположен к заболеванию, например неврологическому заболеванию или заболеванию, связанному с эпилепсией, судорогами и/или энцефалопатией. Субъект может быть предрасположен к заболеванию из-за генетического события или из-за известных факторов риска. Например, субъект может нести мутацию в SCN1A, которая связана с синдромом Драве. В некоторых случаях субъект может иметь предрасположенность к заболеванию, такому как болезнь Альцгеймера, вследствие возраста субъекта. В некоторых случаях у субъекта может быть недостаточное количество белка SCN1A, и лечение заболевания, связанного с SCN1A, включает введение экспрессионной кассеты, вектора экспрессии или вирусной частицы, содержащей полинуклеотид, кодирующий представленный в настоящем описании eTF, который увеличивает экспрессию эндогенный SCN1A.

[0316] В некоторых вариантах осуществления лечение с помощью экспрессионной кассеты, вектора экспрессии или вирусной частицы, содержащей полинуклеотид, кодирующий представленный в настоящем описании eTF, который увеличивает экспрессию эндогенный SCN1A, может приводить к уменьшению или купированию симптомов, связанных с синдромом Драве или другим связанным с SCN1A заболеванием или нарушениями. Например, лечение позволяет улучшить обучение, память, когнитивные функции и/или двигательную функцию; уменьшить частоту и/или продолжительность судорог; и/или уменьшить температурную чувствительность (или увеличить температурный порог запуска эпилепсии).

[0317] В другом иллюстративном варианте осуществления изобретение относится к способам лечения заболевания или расстройства, связанного с мутацией в гене GRN или

дефицитом или снижением активности белка GRN, путем введения нуждающемуся в этом субъекту экспрессионной кассеты, вектора экспрессии или вирусной частицы, содержащей полинуклеотид, кодирующий eTF, который усиливает экспрессию гена GRN или белкового продукта.

[0318] Програнулин является богатым цистеином секретлируемым гликопротеином со свойствами, подобными фактору роста, и принадлежит к семейству гранулиновых белков. Гранулины (например, гранулин A-G и парагранулин) играют роль в ангиогенезе, заживлении ран, пролиферации клеток и воспалении. Мутации в гене програнулина или дефицит секретлируемого програнулина связаны с различными нейродегенеративными заболеваниями и метаболическими нарушениями. Дефицит секретлируемого белка гранулина в центральной нервной системе (ЦНС) может привести к нейродегенерации, включая лобно-височную лобарную дегенерацию (FTLD); лобно-височную дегенерацию или лобно-височную деменцию (FTD), нейродегенеративное заболевание с ранним началом, ассоциированное с частичным дефицитом програнулина; прогрессирующую афазию со снижением беглости речи (PNFA); семантическую деменцию; болезнь Паркинсона; болезнь Альцгеймера; и нейрональный цероидный липофусциноз (NCL) с полным дефицитом програнулина. FTD относится к группе сложных нейродегенеративных заболеваний, характеризующихся прогрессирующим ухудшением функции лобно-височных долей, которое приводит к изменениям в поведении и/или речи, таким как потеря двигательной координации, социальная дисфункция, потеря памяти и тремор мышц.

[0319] Как правило, у пациентов с одной или более патогенными мутациями в одной копии гена програнулина развивается FTD, которая является подтипом FTLD. Клинические симптомы FTLD включают атрофию префронтальных и/или передних височных долей, поведенческую лобно-височную деменцию, характеризующуюся социальной и исполнительной дисфункцией, семантическую деменцию и прогрессирующую первичную афазию со снижением беглости речи с ранними языковыми нарушениями. FTD является нарушением поведения у взрослых, которое сопровождается деменцией лобной доли, паркинсонизмом и мышечной атрофией.

[0320] Програнулин также участвует в метаболических нарушениях и считается адипокином, участвующим в ожирении и резистентности к инсулину. Мутация или дефицит програнулина связаны с атеросклерозом, прогрессирующим заболеванием, характеризующимся сильным воспалительным компонентом и утолщением стенок артерий из-за накопления липидов и пролиферации клеток.

[0321] Мутации в GRN могут включать нонсенс-мутации, мутации сайта сплайсинга; вставки и делеции, которые приводят к сдвигу в нормальной рамке считывания; и различные точечные мутации. Нонсенс-мутации, мутации сайта сплайсинга и сдвиг рамки могут привести к гаплонедостаточности из-за разрушения мРНК, опосредованного нонсенс-мутацией, или ядерной деградации транскриптов. Миссенс-мутации наблюдали у некоторых пациентов со спорадическими случаями FTLD, болезни

Альцгеймера и амиотрофического бокового склероза (ALS). Известны различные мутации в GRN, которые связаны с заболеванием или нарушением, которые включают мутации в области, кодирующей GRN, например, -8+5G>C; -8+3A>T; 2T>C, 3G>A, 26CA(A9D); 63_64insC; 90_91insCTGC; 102ΔC; 138+1G>A; 154ΔA; 234_235ΔAG; 243ΔC; 361ΔG; 373C>T; 380_381ΔCT; 384_387ΔTAGT; 388_391ΔCAGT; 463-1G>A; 468_474ΔCTGCTGT; 675_676ΔCA; 708+1G>A; 707+1G>C; 709-2A>G; 759_760ΔTG; 813_816ΔCACT; 835_835+1insCTGA; 836-1G>C; 909ΔC; 910_911insTG; 911G>A; 933+1G>A; 942C>A; 998ΔG; 1095_1096ΔCT; 1145ΔC; 1157G>A; 1201C>T; 1231_1232ΔGT; 1232_1233insGT; 1252C>T; 1395_1296insC; 1402C>T; 1414-15_1590Δ; 1477C>T; или их комбинацию. См. Eriksen JL, Mackenzie IR. Progranulin: normal function and role in neurodegeneration. *J Neurochem.* 2008 Jan; 104(2):287-97. В настоящее время не существует лекарства от таких нейродегенеративных заболеваний, связанных с GRN, и метаболических нарушений. Существует потребность в вариантах лечения, которые нацелены на GRN, например, видах терапии, которые повышают уровни програнулина и/или функционируют *in vivo*.

[0322] В некоторых вариантах осуществления экспрессионную кассету, вектор экспрессии или вирусную частицу, содержащую полинуклеотид, кодирующий eTF, который усиливает эндогенную экспрессию GRN, раскрытый в настоящем описании, можно использовать для лечения нуждающегося в этом субъекта, который имеет любой одну или более из перечисленные выше мутаций GRN. В некоторых случаях у нуждающегося в этом субъекта имеется гаплонедостаточность GRN или дефицит GRN. В некоторых случаях нуждающийся в этом субъект имеет или подвержен риску развития FTD, болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона и/или атеросклероза.

[0323] В некоторых вариантах осуществления экспрессионную кассету, вектор экспрессии или вирусную частицу, содержащую полинуклеотид, кодирующий раскрытый в настоящем описании eTF, который усиливает эндогенную экспрессию GRN, вводят субъекту, страдающему от или имеющему риск развития FTD, болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона и/или атеросклероза. В другом примере лечение может быть назначено субъекту, страдающему от FTD, болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона и/или атеросклероза. Лечение с помощью экспрессионной кассеты, вектора экспрессии или вирусной частицы, содержащей полинуклеотид, кодирующий раскрытый в настоящем описании eTF, который усиливает эндогенную экспрессию GRN, может привести к ослаблению одного или более симптомов, связанных с FTD, болезнью Альцгеймера, болезнью Паркинсона и/или атеросклероза, например к ослаблению одного или более симптомов, связанных с поведенческими и/или речевыми изменениями вследствие FTD, или уменьшению толщины стенок артерий при атеросклерозе. Другие симптомы, связанные с расстройствами центральной нервной системы, связанными с GRN, включают, например, наличие телец Леви, гаплонедостаточность програнулина (GRN), социальный дефицит, лизосомную аномалию, потерю двигательной координации, мышечный тремор. В некоторых вариантах осуществления лечение может привести к восстановлению уровня экспрессии или функции GRN на по меньшей мере 5%, по

меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60% или по меньшей мере 70% по сравнению с GRN дикого типа. В некоторых вариантах осуществления лечение может привести к улучшению когнитивной функции, такой как улучшение речи и/или памяти на по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 100% или более чем на 100% по сравнению с состоянием до лечения. В некоторых вариантах осуществления лечение с помощью экспрессионной кассеты, вектора экспрессии или вирусной частицы, содержащей полинуклеотид, кодирующий eTF, который увеличивает эндогенную экспрессию GRN, раскрытого в настоящем описании, позволяет задержать развитие симптомов или купировать прогрессирование симптомов, связанных с FTD, болезнью Альцгеймера, болезнью Паркинсона и/или атеросклерозом. В некоторых случаях лечение с помощью экспрессионной кассеты, вектора экспрессии или вирусной частицы, содержащей полинуклеотид, кодирующий eTF, который усиливает эндогенную экспрессию GRN, раскрытый в настоящем описании, позволяет усиливать восстановление клеток или купировать повреждение клеток в ЦНС, лобной коре или в полосатом теле на по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 100% по сравнению с состоянием без лечения. В некоторых случаях лечение расстройства центральной нервной системы, связанного с GRN, включает снижение частоты и/или тяжести тремора мышц.

[0324] В определенных вариантах осуществления экспрессионную кассету, вектор экспрессии или вирусную частицу, содержащую полинуклеотид, кодирующий раскрытый в настоящем описании eTF, который усиливает эндогенную экспрессию GRN, можно использовать для лечения субъекта, у которого диагностировано заболевание, например неврологическое или нейродегенеративное заболевание или метаболическое нарушение, связанное с GRN. Субъектом может быть пациент, страдающий от FTD, болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона и/или атеросклероза. В некоторых аспектах субъект является пациентом с FTD. Субъект может быть пациентом, страдающим GRN-связанным заболеванием или состоянием, таким как деменция или метаболическое заболевание. В некоторых случаях для скрининга пациентов на наличие мутаций в гене GRN может использоваться генетическое тестирование. Если пациент содержит патологическую мутацию в GRN, экспрессионную кассету, вектор экспрессии или вирусную частицу, содержащую полинуклеотид, кодирующий раскрытый в настоящем описании eTF, который усиливает эндогенную экспрессию GRN, можно использовать для профилактики, облегчения или лечения прогрессирования нейродегенерации или метаболического нарушения, например, FTD, болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона и/или атеросклероза.

[0325] В некоторых вариантах осуществления субъект, получающий лечение с

помощью экспрессионной кассеты, вектора экспрессии или вирусной частицы, содержащей полинуклеотид, кодирующий раскрытый в настоящем описании eTF, который усиливает эндогенную экспрессию GRN, является субъектом, у которого диагностирована мутация или генетическая aberrация в GRN. Такая мутация может быть гомозиготной или гетерозиготной, или aberrантной вставкой, делецией или заменой одного или более оснований в гене GRN, которые влияют на экспрессию, секрецию, растворимость, активность и/или протеолитическое расщепление белка *in vivo*.

[0326] В некоторых вариантах осуществления экспрессионную кассету, вектор экспрессии или вирусную частицу, содержащую полинуклеотид, кодирующий раскрытый в настоящем описании eTF, который усиливает эндогенную экспрессию GRN, можно использовать для лечения субъекта, имеющего или подверженного риску нейродегенеративного заболевания или метаболического нарушения, связанного с мутацией и/или дефицитом GRN, для увеличения экспрессии и/или функции GRN *in vivo* для лечения, профилактики или уменьшения последствий заболевания, например, FTLD, FTD, прогрессирующей афазия со снижением беглости речи, семантической деменции, болезни Паркинсона, болезни Альцгеймера, NCL, диабета или атеросклероза. В некоторых случаях экспрессионная кассета, вектор экспрессии или вирусная частица, содержащая полинуклеотид, кодирующий раскрытый в настоящем описании eTF, который усиливает эндогенную экспрессию GRN, используются для лечения, ослабления, уменьшения или купирования симптомов таких заболеваний, например, нарушения речи, социального дефицита, нарушения двигательных навыков или координации движений, мышечной атрофии, мышечного тремора, атрофии нейронов, потери памяти, паркинсонизма и/или лизосомных аномалий. В некоторых случаях такие композиции используются для уменьшения воспаления, уменьшения гибели клеток, уменьшения атрофии нейронов, уменьшения атрофии двигательных нейронов и/или ускорения восстановления клеток в ЦНС или, в частности, в лобной коре или полосатом теле.

[0327] В некоторых вариантах осуществления экспрессионную кассету, вектор экспрессии или вирусную частицу, содержащую полинуклеотид, кодирующий раскрытый в настоящем описании eTF, который усиливает эндогенную экспрессию GRN, можно использовать для лечения субъекта, у которого имеется риск развития нейродегенеративного или метаболического заболевания. Узнать, имеет ли субъект предрасположенность к развитию заболевания, например неврологического или метаболического заболевания, можно с помощью различных методов скрининга или диагностики, в том числе методов поиска генетических мутаций в GRN или с помощью анализа крови на уровень секретируемого белка GRN. Субъект может быть предрасположен к заболеванию из-за генетического события или из-за известных факторов риска. Например, субъект может нести мутацию в GRN, которая ассоциирована с FTD, болезнью Альцгеймера, болезнью Паркинсона и/или атеросклерозом. В некоторых случаях субъект может иметь недостаточное количество белка GRN или его изоформ. Например, может быть известно, что субъект имеет недостаточное количество белка GRN.

[0328] Термины «субъект» и «индивидуум» используются в настоящем описании взаимозаменяемо для обозначения позвоночного животного, предпочтительно млекопитающего, более предпочтительно человека. Способы, раскрытые в настоящем описании, могут быть полезны для терапии человека, применения в ветеринарии и/или доклинических исследованиях на животных моделях заболевания или состояния. В различных вариантах осуществления субъект, которого можно лечить раскрытыми в настоящем описании способами, представляет собой млекопитающее, такое как, например, мышь, крыса, хомяк, морская свинка, песчанка, корова, овца, свинья, коза, осел, лошадь собака, кошка, лама, обезьяна (например, макака, такая как макак-резус или яванский макак) или человек. В иллюстративном варианте осуществления субъект является человеком.

[0329] В приведенных ниже таблицах представлены последовательности, раскрытые в настоящем описании.

Таблица 1: Последовательности геномных локусов и белков SCN1A и GRN

Местоположение в хромосоме представляющего интерес эндогенного гена	SEQ ID NO. белка	Аминокислотная последовательность (N-к-С концу)
SCN1A Пары оснований 165,989,160 до 166,149,216 на хромосоме 2 (Homo sapiens Annotation Release 109, GRCh38.p12)	SEQ ID NO: 180	MEQTVLVPPGPDSFNFFFTRESLAAIERRIAEEKAKNP KPDKKDDDENGGPKPNSDLEAGKNLPFIYGDIPPEMV SEPLEDLDPYYINKKTFIVLNKGKAIFRFSATSALYIL TPFNPLRKIAIKILVHSLFSMLIMCTILTNCVFMTMSN PPDWTKNVEYTFGTGIYTFESLIKIIARGFCLEDFTFLR DPWNWLDFTVITFA YVTEFVDLGNVSALRTRFVLRA LKTISVIPGLKTIVGALIQSVKKLSVDMILTVFCLSVF ALIGLQLFMGNLRNKCIQWPPTNASLEEHSIEKNITV NYNGTLINETVFEFDWKS YIQDSRYHYFLEGFLDAL LCGNSSDAGQCPEGYMCVKAGRNP NYGYTSFDTF WAFLSLFRLMTQDFWENLYQLTLRAAGKTYMIFV LVIFLGSFYLINLILAVVAMAYEEQNQATLEEAEQKE AEFQQMIEQLKKQEEAAQQAATATASEHSREPSAA GRLSDSSSEASKLSSKSAKERRNRRKKRKQKEQSGG EEKDEDEFQKSESEDSIRRKGFRRFSIEGNRLTYEKRY SSPHQSLLSIRGSLFSPRRNSRTSLFSFRGRAKDVGSE NDFADDEHSTFEDNESRRDLSLFPVRRHGERRNSNLS

QTSRSSRMLAVFPANGKMHSTVDCNGVVSLVGGPS
 VPTSPVGQLLPEVIIDKPATDDNGTTTETEMRKRSS
 SFHVSMDFLEDPSQRQRAMSIASILTNTVEELESRQ
 KCPPCWYKFSNIFLIWDCSPYWLKVKHVNNLVVMD
 PFVDLAITICIVLNTLFMAMEHYPMTDHFNNVLTVG
 NLVFTGIFTAEMFLKIIAMDPYYYFQEGWNIFDGFIV
 TLSLVELGLANVEGLSVLRSFRLLRVFKLAKSWPTL
 NMLIKIIGNSVGALGNLTLVLAIIVFIFAVVGMQLFG
 KSYKDCVCKIASDCQLPRWHMNDFFHSFLIVFRVLC
 GEWIETMWDCMEVAGQAMCLTVFMMVMVIGNLV
 VLNLFLALLSSFSADNLAATDDDNEMNNLQIAVDR
 MHKGVAYVKRKIYEFIQQSFIKQKILDEIKPLDDLN
 NKKDSCMSNHTAEIGKDLDYLDVNGTTSIGITGSS
 VEKYIIDESDYMSFINNPSLTVTVPIAVGESDFENLNT
 EDFSSESDLEESKEKLNESSSSSEGSTVDIGAPVEEQP
 VVEPEETLEPEACFTEGCVQRFKCCQINVEEGRGKQ
 WWNLRRTCFRIVEHNWFETFIVFMILLSSGALAFEDI
 YIDQRKTIKTMLEYADKVFTYIFILEMLLKWVAYGY
 QTYFTNAWCWLDLIVDVSLVSLTANALGYSELGAI
 KSLRTLRLRPLRALS RFEGMRVVVNALLGAIPSIM
 NVLLVCLIFWLIFSIMGVNLFAGKFYHCINTTTGDRF
 DIEDVNNHTDCLKLIERNETARWKNVKVNFNDVGF
 GYLSLLQVATFKGWMDIMYAAVDSRNVELQPKYEE
 SLYMYLYFVIFIFGSFFTLNLFIVIIDNFNQKQKQKFG
 GQDIFMTEEQKKYYNAMKKLGSKKPQKPIPRPGNKF
 QGMVDFVTRQVFDISIMILICLNMVTMMVETDDQS
 EYVTTILSRINLVFIVLFTGECVLKLI SLRHYYFTIGW
 NIFDFVVVILSIVGMFLAELIEKYFVSPTLFRVIRLARI
 GRILRLIKGAKGIRTL LFALMMSLPALFNIGLLLFLV
 MFIYAIFGMSNFAYVKREVGIDDMFN FETFGNSMIC
 LFQITTSAGWDGLLAPILNSKPPDCDPNKVNP GSSVK
 GDCGNPSVGIFFFVSYIIISFLVVVNMYIAVILENFSV
 ATEESAEPLEDDFEMFYEVWEKFDPDATQFMFEK
 LSQFAAALEPPLNLPQPNKLQLIAMDLPMVSGDRIH
 CLDILFAFTKRVLGEGEMDALRIQMEERFMASNPS

		KVSYQPITTTLKRKQEEVSAVIIQRAYRRHLLKRTVK QASFTYNKNKIKGGANLLIKEDMIIDRINENSITEKTD LTMSTAACPPSYDRVTKPIVEKHEQEGKDEKAKGK
GRN Пары оснований 44,345,086 до 44,353,106 на хромосоме 17 (Homo sapiens Annotation Release 109, GRCh38.p12)	SEQ ID NO: 181	MWTLVSWVALTAGLVAGTRCPDGGQFCPVACCLD PGGASYSCCRPLLDKWPTTLRHLGGPCQVDAHC SAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRG FHCSADGRSCFQRSNNVGAIQCPDSQFECPDFS TCCVMVDGSWGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAF CDLVHTRCITPTGTHPLAKKLPAQRTNRAVALSSS VMCPDARSRCPDGSTCCCELPSGKYGCCPMPNATC CSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSKENATDILLTKL PAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAWGCC PFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQ VPWMEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSS DTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYT CVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIG CDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACCQLPHAVCCED RQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFLARS PHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWAC CPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRRE APRWDAPLRDPALRQLL

Таблица 2: Последовательности eTF, имеющие высокую идентичность последовательности с человеческими EGR1/EGR3

	Аминокислотная последовательность (N-к-С-концу)
Последовательности eTF, имеющие высокую идентичность последовательности с человеческим EGR1	
SEQ ID NO: 1	MAAAKAEMQLMSPLQISDPFGSFPHSPTMDNYPKLEEMMLLSNGAPQFLG AAGAPEGSGSNSSSSSSGGGGGGGGGSNSSSSSSTFNPQADTGEQPYEHLT AESFPDISLNNEKVLVETSYPSQTTRLPPITYTGRFSLEPAPNSGNTLWPEPL FSLVSGLVSMTNPPASSSSAPSPAASSASASQSPPLSCAVPSNDSSPIYSAAPT FPTPNTDIFPEPQSQAFFGSAGTALQYPPA YPAAKGGFQVPMIPDYLFPPQ QGDGLGTPDQKPFQGLSRTQQPSLTPLSTIKAFATQSGSQDLKALNTSYQ SQLIKPSRMRYPNRPSKTPPHERPYACPVESCDRRFSRDELTRHIRIHTGQ KPFQCRICMRNFSRSDHLTTHIRHTTGEKPFACDICGRKFARSDERKRHTKI HLRQKDKKADKSVVASSATSSLSSYPSPVATSYPSPVTTSYSPATTSYPSP VPTSFSSPGSSTYSPVHSGFSPSVATTYSSVPPAFAQVSSFPSSAVTNSFS ASTGLSDMTATFSPRTIEIC
SEQ ID NO: 2	MAAAKAEMQLMSPLQISDPFGSFPHSPTMDNYPKLEEMMLLSNGAPQFLG AAGAPEGSGSNSSSSSSGGGGGGGGGSNSSSSSSTFNPQADTGEQPYEHLT AESFPDISLNNEKVLVETSYPSQTTRLPPITYTGRFSLEPAPNSGNTLWPEPL

	FSLVSGLVSMTNPPASSSSAPSPAASSASASQSPPLSCAVPSNDSSPIYSAAPT FPTPNTDIFPEPQSQAFPGSAGTALQYPPPAYPAAKGGFQVPMIPDYLPQQ QGDLGLGTPDQKPFQGLSRTQQPSLTPLSTIKAFATQSGSQDLKALNTSYQ SQLIKPSRMRKYPNRPSKTPPHELEPEGEKPYKCPECGKSFSRRDELNVHQR HTGEKPYKCPECGKSFSRRRTCRAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSSNLV RHQRTHHTGEKPYKCPECGKSFSQLAHLRAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFS SGNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSHRRTLTNHQRTHHTGKKTSSKADK SVVASSATSSLSSYPSPVATSYSPVTTSYSPATTSYSPVPTSFSSPGSSSTYP SPVHSGFSPSPVATTYSSVPPAFPAQVSSFPSSAVTNSFSASTGLSDMTATFS PRTIEIC
SEQ ID NO: 3	MAAAKAEMQLMSPLQISDPFGSFPHSPTMDNYPKLEEMMLLSNGAPQFLG AAGAPEGSGSNSSSSSSGGGGGGGGGNSSSSSSSTFNPQADTGEQPYEHLT AESFPDISLNNEKVLVETSYPSTTRLPPITYTGRFSLEPAPNSGNTLWPEPL FSLVSGLVSMTNPPASSSSAPSPAASSASASQSPPLSCAVPSNDSSPIYSAAPT FPTPNTDIFPEPQSQAFPGSAGTALQYPPPAYPAAKGGFQVPMIPDYLPQQ QGDLGLGTPDQKPFQGLSRTQQPSLTPLSTIKAFATQSGSQDLKALNTSYQ SQLIKPSRMRKYPNRPSKTPPHERPYACPVESCDRRFSQLAHLRAHIRIHTG QKPFQCRICMRNFSTSGNLVRHIRHTHTGEKPFACDICGRKFAHRTTLTNHTK IHLRQKDKKADKSVVASSATSSLSSYPSPVATSYSPVTTSYSPATTSYSP VPTSFSSPGSSSTYSPVHSGFSPSPVATTYSSVPPAFPAQVSSFPSSAVTNSFS ASTGLSDMTATFSPRTIEIC
SEQ ID NO: 4	MAAAKAEMQLMSPLQISDPFGSFPHSPTMDNYPKLEEMMLLSNGAPQFLG AAGAPEGSGSNSSSSSSGGGGGGGGGNSSSSSSSTFNPQADTGEQPYEHLT AESFPDISLNNEKVLVETSYPSTTRLPPITYTGRFSLEPAPNSGNTLWPEPL FSLVSGLVSMTNPPASSSSAPSPAASSASASQSPPLSCAVPSNDSSPIYSAAPT FPTPNTDIFPEPQSQAFPGSAGTALQYPPPAYPAAKGGFQVPMIPDYLPQQ QGDLGLGTPDQKPFQGLSRTQQPSLTPLSTIKAFATQSGSQDLKALNTSYQ SQLIKPSRMRKYPNRPSKTPPHERPYACPVESCDRRFSRRDELNVHIRIHTG QKPFQCRICMRNFSSRRRTCRAHIRHTHTGEKPFACDICGRKFAQSSNLVRHTK IHLRQKDRPYACPVESCDRRFSQLAHLRAHIRIHTGQKPFQCRICMRNFST GNLVRHIRHTHTGEKPFACDICGRKFAHRTTLTNHTKIHLRQKDKKADKSVV ASSATSSLSSYPSPVATSYSPVTTSYSPATTSYSPVPTSFSSPGSSSTYSPV HSGFSPSPVATTYSSVPPAFPAQVSSFPSSAVTNSFSASTGLSDMTATFSPRTI EIC
SEQ ID NO: 5	MAAAKAEMQLMSPLQISDPFGSFPHSPTMDNYPKLEEMMLLSNGAPQFLG AAGAPEGSGSNSSSSSSGGGGGGGGGNSSSSSSSTFNPQADTGEQPYEHLT AESFPDISLNNEKVLVETSYPSTTRLPPITYTGRFSLEPAPNSGNTLWPEPL FSLVSGLVSMTNPPASSSSAPSPAASSASASQSPPLSCAVPSNDSSPIYSAAPT FPTPNTDIFPEPQSQAFPGSAGTALQYPPPAYPAAKGGFQVPMIPDYLPQQ QGDLGLGTPDQKPFQGLSRTQQPSLTPLSTIKAFATQSGSQDLKALNTSYQ SQLIKPSRMRKYPNRPSKTPPHERPYACPVESCDRRFSRRDELNVHIRIHTG QKPFQCRICMRNFSSRRRTCRAHIRHTHTGEKPFACDICGRKFAQSSNLVRHIR HTHTGEKPFACDICGRKFSQLAHLRAHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSTSGNLV RHIRHTHTGEKPFACDICGRKFAHRTTLTNHTKIHLRQKDKKADKSVVASSA TSSLSSYPSPVATSYSPVTTSYSPATTSYSPVPTSFSSPGSSSTYSPVHSGF PSPSVATTYSSVPPAFPAQVSSFPSSAVTNSFSASTGLSDMTATFSPRTIEIC
SEQ ID NO: 6	MAAAKAEMQLMSPLQISDPFGSFPHSPTMDNYPKLEEMMLLSNGAPQFLG AAGAPEGSGSNSSSSSSGGGGGGGGGNSSSSSSSTFNPQADTGEQPYEHLT AESFPDISLNNEKVLVETSYPSTTRLPPITYTGRFSLEPAPNSGNTLWPEPL FSLVSGLVSMTNPPASSSSAPSPAASSASASQSPPLSCAVPSNDSSPIYSAAPT FPTPNTDIFPEPQSQAFPGSAGTALQYPPPAYPAAKGGFQVPMIPDYLPQQ QGDLGLGTPDQKPFQGLSRTQQPSLTPLSTIKAFATQSGSQDLKALNTSYQ

	<p>SQLIKPSRMRKYPNRPSKTPPHERPYACPVESCDRRFSRSDNLVRHIRIHTG QKPFQCRICMRNFSREDNLHHTHIRTHTGEKPFACDICGRKFARSDELVRHT KIHLRQKDRPYACPVESCDRRFSQSGNLTEHIRIHTGQKPFQCRICMRNFST SGHLVRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQNSTLTEHTKIHLRQKDKKADKSV VASSATSSLSSYPSPVATSYPSPVTTSYSPATTSYSPVPTSFSSPGSSTYSP VHSGFPSPSVATTYSSVPPAFPAQVSSFPSSAVTNSFSASTGLSDMTATFSPR TIEIC</p>
SEQ ID NO: 7	<p>MAAAKAEMQLMSPLQISDPFGSFPHSPTMDNYPKLEEMMLLSNGAPQFLG AAGAPEGSGSNSSSSSSGGGGGGGGGNSSSSSSSTFNPQADTGEQPYEHLT AESFPDISLNNEKVLVETSYPSTTRLPPITYTGRFSLEPAPNSGNTLWPEPL FSLVSGLVSMTNPPASSSSAPSPAASSASASQSPPLSCAVPSNDSSPIYSAAPT FPTPNTDIFPEPQSQAFPGSAGTALQYPPPA YPAAKGGFQVPMIPDYLPQQ QGDLGLGTPDQKPFQGLSRTQQPSLTPLSTIKAFATQSGSQDLKALNTSYQ SQLIKPSRMRKYPNRPSKTPPHERPYACPVESCDRRFSRSDNLVRHIRIHTG QKPFQCRICMRNFHRTTLTNHIRTHTGEKPFACDICGRKFAREDNLHTHT KIHLRQKDRPYACPVESCDRRFSTSHSLTEHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSQS SSLVRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAREDNLHTHTKIHLRQKDKKADKSVV ASSATSSLSSYPSPVATSYPSPVTTSYSPATTSYSPVPTSFSSPGSSTYSPV HSGFPSPSVATTYSSVPPAFPAQVSSFPSSAVTNSFSASTGLSDMTATFSPTI EIC</p>
SEQ ID NO: 8	<p>MAAAKAEMQLMSPLQISDPFGSFPHSPTMDNYPKLEEMMLLSNGAPQFLG AAGAPEGSGSNSSSSSSGGGGGGGGGNSSSSSSSTFNPQADTGEQPYEHLT AESFPDISLNNEKVLVETSYPSTTRLPPITYTGRFSLEPAPNSGNTLWPEPL FSLVSGLVSMTNPPASSSSAPSPAASSASASQSPPLSCAVPSNDSSPIYSAAPT FPTPNTDIFPEPQSQAFPGSAGTALQYPPPA YPAAKGGFQVPMIPDYLPQQ QGDLGLGTPDQKPFQGLSRTQQPSLTPLSTIKAFATQSGSQDLKALNTSYQ SQLIKPSRMRKYPNRPSKTPPHERPYACPVESCDRRFSRSDNLVRHIRIHTG QKPFQCRICMRNFHRTTLTNHIRTHTGEKPFACDICGRKFAREDNLHTHT HIRTHTGEKPFACDICGRKFSTSHSLTEHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSQSSSLV RHIRHTHTGEKPFACDICGRKFAREDNLHTHTKIHLRQKDKKADKSVVASSAT SSLSSYPSPVATSYPSPVTTSYSPATTSYSPVPTSFSSPGSSTYSPVHSGFP SPSVATTYSSVPPAFPAQVSSFPSSAVTNSFSASTGLSDMTATFSPTIEIC</p>
SEQ ID NO: 9	<p>MAAAKAEMQLMSPLQISDPFGSFPHSPTMDNYPKLEEMMLLSNGAPQFLG AAGAPEGSGSNSSSSSSGGGGGGGGGNSSSSSSSTFNPQADTGEQPYEHLT AESFPDISLNNEKVLVETSYPSTTRLPPITYTGRFSLEPAPNSGNTLWPEPL FSLVSGLVSMTNPPASSSSAPSPAASSASASQSPPLSCAVPSNDSSPIYSAAPT FPTPNTDIFPEPQSQAFPGSAGTALQYPPPA YPAAKGGFQVPMIPDYLPQQ QGDLGLGTPDQKPFQGLSRTQQPSLTPLSTIKAFATQSGSQDLKALNTSYQ SQLIKPSRMRKYPNRPSKTPPHERPYACPVESCDRRFSRDELNVHIRIHTG QKPFQCRICMRNFSRSDHLTNHIRTHTGEKPFACDICGRKFARSDDLVRHT KIHLRQKDRPYACPVESCDRRFSRSDNLVRHIRIHTGQKPFQCRICMRNFH RTTLTNHIRTHTGEKPFACDICGRKFAREDNLHTHTKIHLRQKDRPYACPV ESCDRRFSTSHSLTEHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSQSSSLVRHIRTHTGEK FACDICGRKFAREDNLHTHTKIHLRQKDKKADKSVVASSATSSLSSYPSPV ATSYPSPVTTSYSPATTSYSPVPTSFSSPGSSTYSPVHSGFPSPSVATTYSS VPPAFPAQVSSFPSSAVTNSFSASTGLSDMTATFSPTIEIC</p>
SEQ ID NO: 10	<p>MAAAKAEMQLMSPLQISDPFGSFPHSPTMDNYPKLEEMMLLSNGAPQFLG AAGAPEGSGSNSSSSSSGGGGGGGGGNSSSSSSSTFNPQADTGEQPYEHLT AESFPDISLNNEKVLVETSYPSTTRLPPITYTGRFSLEPAPNSGNTLWPEPL FSLVSGLVSMTNPPASSSSAPSPAASSASASQSPPLSCAVPSNDSSPIYSAAPT FPTPNTDIFPEPQSQAFPGSAGTALQYPPPA YPAAKGGFQVPMIPDYLPQQ QGDLGLGTPDQKPFQGLSRTQQPSLTPLSTIKAFATQSGSQDLKALNTSYQ</p>

	SQLIKPSRMRKYPNRPSTPPHERPYACPVESCDRRFSSPADLTRHIRIHTGQ KPFQCRICMRNFSDSGNLVRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQLAHLRAHTKI HLRQKDRPYACPVESCDRRFSQRANLRAHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSRE DNLHHTHIRTHTGEKPFACDICGRKFARSDNLVRHTKIHLRQKDKKADKSVV ASSATSSLSSYPSPVATSYSPSVTTSYSPATTSYSPVPTSFSSPGSSTYSPV HSGFPSPSVATTYSSVPPAFPAQVSSFPSSAVTNSFSASTGLSDMTATFSPRTI EIC
SEQ ID NO: 325	MAAAKAEMQLMSPLQISDPFGSFPHSPTMDNYPKLEEMMLLSNGAPQFLG AAGAPEGSGSNSSSSSSGGGGGGGGGNSSSSSSTFNPQADTGEQPYEHLT AESFPDISLNNEKVLVETSYPSTTRLPPITYTGRFSLEPAPNSGNTLWPEPL FSLVSGLVSMTNPPASSSSAPSPAASSASASQSPPLSCAVPSNDSSPIYSAAPT FPTPNTDIFPEPQSQAFPGSAGTALQYPPPA YPAAKGGFQVPMIPDYLPQQ QGDLGLGTPDQKPFQGLSRTQQPSLTPLSTIKAFATQSGSQDLKALNTSYQ SQLIKPSRMRKYPNRPSTPPHERPYACPVESCDRRFSRSDNLVRHIRIHTG QKPFQCRICMRNFSHRTTLTNHIRTHTGEKPFACDICGRKFAREDNLHTHIR THTGEKPFACDICGRKFSTSHSLTEHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSQSSSLVR HIRTHTGEKPFACDICGRKFAREDNLHTHTKIHLRQKDKKADKSVVASSAT SSLSSYPSPVATSYSPSVTTSYSPATTSYSPVPTSFSSPGSSTYSPVHSGFP SPSVATTYSSVPPAFPAQVSSFPSSAVTNSFSASTGLSDMTATFSPRTIEIC
Последовательности eTF, имеющие высокую идентичность последовательности с человеческим EGR3	
SEQ ID NO: 11	MTGKLAEKLPVTMSSLLNQLPDNLYPEEIPALNLFSGSSDSVVHYNQMAT ENVMDIGLTNEKPNPELSYSGSFQAPGNKTVTYLGKFAFDSPSNWCQDNII SLMSAGILGVPPASGALSTQTSTASMVQPPQGDVEAMYPALPPYSNCGDLY SEPVSFHDPQGNPGLAYSPQDYQSAKPALDSNLFPMPDYNLYHHPNDMGS IPEHKPFQGMPIRVNPPITPLETIKAFKDKQIHPGFGSLPQPPLTLKPIRPRK YPNRPSTPLHERPHACPAEGCDRRFSQLAHLRAHLRIHTGHKPFQCRICM RSFSTSGNLVRHIRTHTGEKPFACEFCGRKFAHRTTLTNHAKIHLKQKEKK AEKGGAPSASSAPPVSLAPVVTCA
SEQ ID NO: 12	MTGKLAEKLPVTMSSLLNQLPDNLYPEEIPALNLFSGSSDSVVHYNQMAT ENVMDIGLTNEKPNPELSYSGSFQAPGNKTVTYLGKFAFDSPSNWCQDNII SLMSAGILGVPPASGALSTQTSTASMVQPPQGDVEAMYPALPPYSNCGDLY SEPVSFHDPQGNPGLAYSPQDYQSAKPALDSNLFPMPDYNLYHHPNDMGS IPEHKPFQGMPIRVNPPITPLETIKAFKDKQIHPGFGSLPQPPLTLKPIRPRK YPNRPSTPLHERPHACPAEGCDRRFSRRDELNVHLRIHTGHKPFQCRICM RSFSSRRTCRAHIRTHTGEKPFACEFCGRKFAQSSNLVRHAKIHLKQKEHA CPAEGCDRRFSQLAHLRAHLRIHTGHKPFQCRICMRSFSTSGNLVRHIRTHT GEKPFACEFCGRKFAHRTTLTNHAKIHLKQKEKKAEEKGAPSASSAPPVSL APVVTCA
SEQ ID NO: 13	MTGKLAEKLPVTMSSLLNQLPDNLYPEEIPALNLFSGSSDSVVHYNQMAT ENVMDIGLTNEKPNPELSYSGSFQAPGNKTVTYLGKFAFDSPSNWCQDNII SLMSAGILGVPPASGALSTQTSTASMVQPPQGDVEAMYPALPPYSNCGDLY SEPVSFHDPQGNPGLAYSPQDYQSAKPALDSNLFPMPDYNLYHHPNDMGS IPEHKPFQGMPIRVNPPITPLETIKAFKDKQIHPGFGSLPQPPLTLKPIRPRK YPNRPSTPLHERPHACPAEGCDRRFSRSDNLVRHLRIHTGHKPFQCRICM RSFSREDNLHTHIRTHTGEKPFACEFCGRKFARSDNLVRHAKIHLKQKEHA CPAEGCDRRFSQSGNLTEHLRIHTGHKPFQCRICMRSFSTSGHLVRHIRTHT GEKPFACEFCGRKFAQNSTLTHEAKIHLKQKEKKAEEKGAPSASSAPPVSL APVVTCA
SEQ ID NO: 14	MTGKLAEKLPVTMSSLLNQLPDNLYPEEIPALNLFSGSSDSVVHYNQMAT ENVMDIGLTNEKPNPELSYSGSFQAPGNKTVTYLGKFAFDSPSNWCQDNII SLMSAGILGVPPASGALSTQTSTASMVQPPQGDVEAMYPALPPYSNCGDLY

	SEPVSFHDPQGNPGLAYSPQDYQSAKPALDSNLFPMPDYNLYHHPNDMGS IPEHKPFQGMPIRVNPPITPLETIKAFKDKQIHPGFGSLPQPPLTLKPIRPRK YPNRPSKTPLHERPHACPAEGCDRRFSRSDNLVRHLRIHTGHKPFQCRICM RSFSHRTTLTNHIRTHTGEKPFACEFCGRKFAREDNLHTHAKIHLKQKEHA CPAEGCDRRFSTSHSLTEHLRIHTGHKPFQCRICMRSFSQSSSLVRHIRTHTG EKPFACEFCGRKFAREDNLHTHAKIHLKQKEKKAEEKGGAPSASSAPPVSLA PVVTTC
SEQ ID NO: 15	MTGKLAEKLPVTMSSLLNQLPDNLYPEEIPALNLFSGSSDSVVHYNQMAT ENVMDIGLTNEKPNPELSYSGSFQAPGNKTVTYLGKFAFDSPSNWCQDNII SLMSAGILGVPPASGALSTQTSTASMVQPPQGDVEAMYPALPPYSNCGDLY SEPVSFHDPQGNPGLAYSPQDYQSAKPALDSNLFPMPDYNLYHHPNDMGS IPEHKPFQGMPIRVNPPITPLETIKAFKDKQIHPGFGSLPQPPLTLKPIRPRK YPNRPSKTPLHERPHACPAEGCDRRFSRDELNVHLRIHTGHKPFQCRICM RSFSRSDHLTNHIRTHTGEKPFACEFCGRKFAARSDDLVRHAKIHLKQKEHA CPAEGCDRRFSRSDNLVRHLRIHTGHKPFQCRICMRSFSHRTTLTNHIRTHT GEKPFACEFCGRKFAREDNLHTHAKIHLKQKEHACPAEGCDRRFSTSHSLT EHLRIHTGHKPFQCRICMRSFSQSSSLVRHIRTHTGEKPFACEFCGRKFARE DNLHTHAKIHLKQKEKKAEEKGGAPSASSAPPVSLAPVVTTC
SEQ ID NO: 16	MTGKLAEKLPVTMSSLLNQLPDNLYPEEIPALNLFSGSSDSVVHYNQMAT ENVMDIGLTNEKPNPELSYSGSFQAPGNKTVTYLGKFAFDSPSNWCQDNII SLMSAGILGVPPASGALSTQTSTASMVQPPQGDVEAMYPALPPYSNCGDLY SEPVSFHDPQGNPGLAYSPQDYQSAKPALDSNLFPMPDYNLYHHPNDMGS IPEHKPFQGMPIRVNPPITPLETIKAFKDKQIHPGFGSLPQPPLTLKPIRPRK YPNRPSKTPLHERPHACPAEGCDRRFSSPADLTRLRIHTGHKPFQCRICMR SFSDSGNLRVHIRTHTGEKPFACEFCGRKFAQLAHLRAHAKIHLKQKEHAC PAEGCDRRFSQRANLRAHLRIHTGHKPFQCRICMRSFSREDNLHTHIRTHTG EKPFACEFCGRKFARSDNLVRHAKIHLKQKEKKAEEKGGAPSASSAPPVSLA PVVTTC

Таблица 3: Последовательности DBD eTF, представленных в таблице 2

eTF	DBD SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность DBD (N-к-С-концу)
Последовательности DBD eTF, имеющие высокую идентичность последовательности с EGR1		
SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 17	RPYACPVESCDRRFSRDELTRHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSRS DHLTTHIRTHTGEKPFACDICGRKFARSDERKRHTKIHRLRQKD
SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 18	LEPGEKPYKCPECGKSFSRDELNVHQRTHTGEKPYKCPECGKS FSSRRTCRAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSSNLVRHQRTHTG EKPYKCPECGKSFSQLAHLRAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTS GNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSHRTTLTNHQRTHTGKKT S
SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 19	RPYACPVESCDRRFSQLAHLRAHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSTS GNLVRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAHRTTLTNHTKIHRLRQKD
SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 20	RPYACPVESCDRRFSRDELNVHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSSR RTCRAHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQSSNLVRHTKIHRLRQKDR PYACPVESCDRRFSQLAHLRAHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSTSG NLVRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAHRTTLTNHTKIHRLRQKD
SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 21	RPYACPVESCDRRFSRDELNVHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSSR RTCRAHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQSSNLVRHIRTHTGEKPF ACDICGRKFSQLAHLRAHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSTSGNLVRH IRTHTGEKPFACDICGRKFAHRTTLTNHTKIHRLRQKD
SEQ ID	SEQ ID	RPYACPVESCDRRFSRSDNLVRHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSRE

eTF	DBD SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность DBD (N-к-С-концу)
NO: 6	NO: 22	DNLHTHIRHTHTGEKPFACDICGRKFARSDLV RHTKIH LRQKDR PYACPVE SCDRRFSQSGNLTEHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSTSG HLVRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQNSTL TEHTKIH LRQKD
SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 23	RPYACPVE SCDRRFSRSDNLVRHIRIHTGQKPFQCRICMRNF SHR TTLTNHIRTHTGEKPFACDICGRKFAREDNLHTHTKIH LRQKDRP YACPVE SCDRRFSTSHSLTEHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSSSL VRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAREDNLHTHTKIH LRQKD
SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 24	RPYACPVE SCDRRFSRSDNLVRHIRIHTGQKPFQCRICMRNF SHR TTLTNHIRTHTGEKPFACDICGRKFAREDNLHTHIRTHTGEKPF A CDICGRKFSTSHSLTEHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSSSLVRHI RHTHTGEKPFACDICGRKFAREDNLHTHTKIH LRQKD
SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 25	RPYACPVE SCDRRFSRRDELNVHIRIHTGQKPFQCRICMRNF SRS DHLTNHIRTHTGEKPFACDICGRKFARSDDLVRHTKIH LRQKDR PYACPVE SCDRRFSRSDNLVRHIRIHTGQKPFQCRICMRNF SHRT TLTNHIRTHTGEKPFACDICGRKFAREDNLHTHTKIH LRQKDRP YACPVE SCDRRFSTSHSLTEHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSSSL VRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAREDNLHTHTKIH LRQKD
SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 26	RPYACPVE SCDRRFS SPADLTRHIRIHTGQKPFQCRICMRNF SDS GNLRVHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQLAHLRAHTKIH LRQKDR PYACPVE SCDRRFSQRANLRAHIRIHTGQKPFQCRICMRNF SRED NLHTHIRTHTGEKPFACDICGRKFARSDNLVRHTKIH LRQKD
SEQ ID NO: 325	SEQ ID NO: 351	RKYPNRPSKTPPHERPYACPVE SCDRRFSRSDNLVRHIRIHTGQK PFQCRICMRNF SHRTTLTNHIRTHTGEKPFACDICGRKFAREDNL HTHIRTHTGEKPFACDICGRKFSTSHSLTEHIRIHTGQKPFQCRIC MRNFSSSLVRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAREDNLHTHTKIH LRQDKKADKSVV
Последовательности DBD eTF, имеющие высокую идентичность последовательности с EGR3		
SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 27	PHACPAEGCDRRFSQLAHLRAHLRIHTGHKPFQCRICMRSFST S GNLVRHIRTHTGEKPFACEFCGRKFAHRTTLTNHAKIHLKQKE
SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 28	HACPAEGCDRRFSRRDELNVHLRIHTGHKPFQCRICMRSFSSRR TCRAHIRTHTGEKPFACEFCGRKFAQSSNLVRHAKIHLKQKEHA CPAEGCDRRFSQLAHLRAHLRIHTGHKPFQCRICMRSFSTSGNL VRHIRTHTGEKPFACEFCGRKFAHRTTLTNHAKIHLKQKE
SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 29	PHACPAEGCDRRFSRSDNLVRHLRIHTGHKPFQCRICMRSF SRE DNLHTHIRHTHTGEKPFACEFCGRKFARSDLV RHA KIH LRQKQKEH ACPAEGCDRRFSQSGNLTEHLRIHTGHKPFQCRICMRSFSTSGHL VRHIRTHTGEKPFACEFCGRKFAQNSTL TEHAKIHLKQKE
SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 30	PHACPAEGCDRRFSRSDNLVRHLRIHTGHKPFQCRICMRSF SHR TTLTNHIRTHTGEKPFACEFCGRKFAREDNLHTHAKIHLKQKEH ACPAEGCDRRFSTSHSLTEHLRIHTGHKPFQCRICMRSFSSSL VRHIRTHTGEKPFACEFCGRKFAREDNLHTHAKIHLKQKE
SEQ ID NO: 15	SEQ ID NO: 31	PHACPAEGCDRRFSRRDELNVHLRIHTGHKPFQCRICMRSF SRS DHLTNHIRTHTGEKPFACEFCGRKFARSDDLVRHAKIHLKQKEH ACPAEGCDRRFSRSDNLVRHLRIHTGHKPFQCRICMRSF SHRTTL TNHIRTHTGEKPFACEFCGRKFAREDNLHTHAKIHLKQKEHACP AEGCDRRFSTSHSLTEHLRIHTGHKPFQCRICMRSFSSSLVRHI RHTHTGEKPFACEFCGRKFAREDNLHTHAKIHLKQKE
SEQ ID	SEQ ID	PHACPAEGCDRRFS SPADLTRHLRIHTGHKPFQCRICMRSFSDSG

eTF	DBD SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность DBD (N-к-С-концу)
NO: 16	NO: 32	NLRVHIRTHTGKPFACEFCGRKFAQLAHLRAHAKIHLKQKEH ACPAEGCDRRFSQRANLRAHLRIHTGHKPFQCRICMRSFSREDN LHTHIRTHTGKPFACEFCGRKFARSDNLVRHAKIHLKQKE

Таблица 4: Последовательности целевых участков, распознаваемые eTF, представленными в таблице 2

eTF	Белковая основа для eTF	Целевой участок SEQ IDNO:	Последовательность целевого участка связывания (5'-к-3')	Целевой ген	Идентичность последовательности по NCBI-BLAST с белковой основой
SEQ ID NO: 1	WT EGR1	N/A	N/A	N/A	100%
SEQ ID NO: 2	EGR1	SEQ ID NO: 33	AGTGATAGAGAACGTATG	Репортер	87%
SEQ ID NO: 3	EGR1	SEQ ID NO: 34	AGTGATAGA	Репортер	97%
SEQ ID NO: 4	EGR1	SEQ ID NO: 33	AGTGATAGAGAACGTATG	Репортер	96%
SEQ ID NO: 5	EGR1	SEQ ID NO: 33	AGTGATAGAGAACGTATG	Репортер	94%
SEQ ID NO: 6	EGR1	SEQ ID NO: 35	CTAGGTCAAGTGTAGGAG	SCN1A	97%
SEQ ID NO: 7	EGR1	SEQ ID NO: 36	TAGGTACCATAGAGTGAG	SCN1A	96%
SEQ ID NO: 8	EGR1	SEQ ID NO: 36	TAGGTACCATAGAGTGAG	SCN1A	94%
SEQ ID NO: 9	EGR1	SEQ ID NO: 37	TAGGTACCATAGAGTGAGGCGAGGATG	SCN1A	97%
SEQ ID NO: 10	EGR1	SEQ ID NO: 38	GAGTAGAAAAGAAACACA	GRN	95%
SEQ ID NO: 11	EGR3	SEQ ID NO: 33	AGT GAT AGA GAA CGT ATG	Репортер	94%
SEQ ID NO: 12	EGR3	SEQ ID NO: 33	AGT GAT AGA GAA CGT ATG	Репортер	96%
SEQ ID NO: 13	EGR3	SEQ ID NO: 35	CTAGGTCAAGTGTAGGAG	SCN1A	97%
SEQ ID NO: 14	EGR3	SEQ ID NO: 36	TAGGTACCATAGAGTGAG	SCN1A	96%
SEQ ID NO: 15	EGR3	SEQ ID NO: 37	TAGGTACCATAGAGTGAGGCGAGGATG	SCN1A	97%
SEQ ID NO: 16	EGR3	SEQ ID NO: 38	GAGTAGAAAAGAAACACA	GRN	95%

Таблица 5: Различные типы структур цинковых пальцев и белков для генерации eTF

Название типа ZF		Структура ZF (где каждый х независимо может представлять собой любой остаток)	Примеры белков, которые могут служить в качестве белковой основы для eTF или ДНК-связывающего домена eTF, раскрытого в настоящем описании
Цинковые пальцы C2H2-типа (ZNF)	SEQ ID NO: 39	C-x-C-x-H-x-H	KLF4, KLF5, EGR3, ZFP637, SLUG, ZNF750, ZNF281, ZBP89, GLIS1, GLIS3
Белки с доменом Ring finger (RNF)	SEQ ID NO: 40	C-x-C-x-C-x-H-xxx-C-x-C-x-C-x-C	MDM2, BRCA1, ZNF179
Белки с доменом PHD finger (PHF)	SEQ ID NO: 41	C-x-C-x-C-x-C-xxx-H-x-C-x-C-x-C	KDM2A, PHF1, ING1
Содержащие LIM домен	SEQ ID NO: 42	C-x-C-x-H-x-C-x-C-x-C-x-C-x-(C, H, D)	ZNF185, LIMK1, PXN
Ядерные гормональные рецепторы (NR)	SEQ ID NO: 43	C-x-C-x-C-x-C-xxx-C-x-C-x-C-x-C	VDR, ESR1, NR4A1
Цинковые пальцы CCCH-типа (ZC3H)	SEQ ID NO: 44	C-x-C-x-C-x-H	RC3H1, HELZ, MBNL1, ZFP36, ZFP36L1
Цинковые пальцы FYVE-типа (ZFYVE)	SEQ ID NO: 43	C-x-C-x-C-x-C-xxx-C-x-C-x-C-x-C	EEA1, HGS, PIKFYVE
Цинковые пальцы CCHC-типа (ZCCHC)	SEQ ID NO: 45	C-x-C-x-H-x-C	CNBP, SF1, LIN28A
Цинковые пальцы DHHC-типа (ZDHHC)	SEQ ID NO: 46	C-x-C-x-H-x-C-xxx-C-x-C-x-H-x-C	ZDHHC2, ZDHHC8, ZDHHC9
Цинковые пальцы MYND-типа (ZMYND)	SEQ ID NO: 47	C-x-C-x-C-x-C-xxx-C-x-C-x-H-x-C	PDCD2, RUNX1T1, SMYD2, SMYD1
Цинковые пальцы RANBP2-типа (ZRANB)	SEQ ID NO: 48	C-x-C-x-C-x-C	YAF2, SHARPIN, EWSR1
Цинковые пальцы ZZ-типа (ZZZ)	SEQ ID NO: 48	C-x-C-x-C-x-C	HERC2, NBR1, CREBBP
Цинковые пальцы C2HC-типа (ZC2HC)	SEQ ID NO: 45	C-x-C-x-H-x-C	IKBK, L3MBTL1, ZNF746
Домен GATA, содержащий цинковый палец (GATAD)	SEQ ID NO: 48	C-x-C-x-C-x-C	GATA4, GATA6, MTA1
Гомеобоксы и	SEQ ID	C-x-C-x-H-x-H	ADNP, ZEB1, ZHX1

псевдогены ZF классов	NO: 39		
Домен THAP, содержащий цинковый палец (THAP)	SEQ ID NO: 44	C-x-C-x-C-x-H	THAP1, THAP4, THAP11
Цинковые пальцы CXXC-типа (CXXC)	SEQ ID NO: 43	C-x-C-x-C-x-C-xxx-C-x-C-x-C-x-C	CXXC1, CXXC5, MBD1, DNMT1
Цинковые пальцы SWIM-типа (ZSWIM)	SEQ ID NO: 44	C-x-C-x-C-x-H	MAP3K1, ZSWIM5, ZSWIM6
Цинковые пальцы AN1-типа (ZFAND)	SEQ ID NO: 49	C-x-C-x-C-x-C-xxx-C-x-H-x-H-x-C	ZFAND3, ZFAND6, IGHMBP2
Цинковые пальцы 3CxxC-типа (Z3CXXC)	SEQ ID NO: 45	C-x-C-x-H-x-C	ZAR1, RTP1, RTP4
Цинковые пальцы CW-типа (ZCW)	SEQ ID NO: 48	C-x-C-x-C-x-C	MORC1, ZCWPW1, KDM1B
Цинковые пальцы GRF-типа (ZGRF)	SEQ ID NO: 48	C-x-C-x-C-x-C	TTF2, NEIL3, TOP3A
Цинковые пальцы MIZ-типа (ZMIZ)	SEQ ID NO: 45	C-x-C-x-H-x-C	PIAS1, PIAS3, PIAS4
Цинковые пальцы BED-типа (ZBED)	SEQ ID NO: 39	C-x-C-x-H-x-H	ZBED1, ZBED4, ZBED6
Цинковые пальцы HIT-типа (ZNHIT)	SEQ ID NO: 47	C-x-C-x-C-x-C-xxx-C-x-C-x-H-x-C	ZNHIT3, DDX59, INO80B
Цинковые пальцы MYM-типа (ZMYM)	SEQ ID NO: 48	C-x-C-x-C-x-C	ZMYM2, ZMYM3, ZMYM4
Цинковые пальцы Матрин типа (ZMAT)	SEQ ID NO: 39	C-x-C-x-H-x-H	ZNF638, ZMAT1, ZMAT3, ZMAT5
Цинковые пальцы C2H2C-типа	SEQ ID NO: 39	C-x-C-x-H-x-H	MYT1, MYT1L, ST18
Цинковые пальцы DBF-типа (ZDBF)	SEQ ID NO: 39	C-x-C-x-H-x-H	DBF4, DBF4B, ZDBF2
Цинковые пальцы PARP-типа	SEQ ID NO: 45	C-x-C-x-H-x-C	LIG3, PARP1

Таблица 6: Примеры полноразмерных аминокислотных последовательностей eTF

	Аминокислотная последовательность (N-к-С-концу)
SEQ ID NO: 50	MAPKKRKRKVGIIHGVPAALEPGKPYKCPECGKSFSSRRDELNVHQRTHTGE KPYKCPECGKSFSSRRTCRAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSQSSNLVRHQ THTGEKPYKCPECGKSFSSQLAHLRAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSS VRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSHRTTLTNHQRTHTGKKTSCRPAATKKA GQAKKKKGSYPYDVPDYA
SEQ ID NO: 51	MAPKKRKRKVGIIHGVPAALEPGKPYKCPECGKSFSSRRDELNVHQRTHTGE KPYKCPECGKSFSSRRTCRAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSQSSNLVRHQ THTGEKPYKCPECGKSFSSQLAHLRAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSS VRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSHRTTLTNHQRTHTGKKTSCRPAATKKA GQAKKKKGSYPYDVPDYALEDALDDFDLMLGSDALDDFDLMLGSDAL DDFDLMLGSDALDDFDLML
SEQ ID NO: 52	MAPKKRKRKVGIIHGVPAALEPGKPYKCPECGKSFSSRRDELNVHQRTHTGE KPYKCPECGKSFSSRRTCRAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSQSSNLVRHQ THTGEKPYKCPECGKSFSSQLAHLRAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSS VRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSHRTTLTNHQRTHTGKKTSCRPAATKKA GQAKKKKGSYPYDVPDYALEMSGLEMADHMMAMNHGRFPDGTNGLHH HPAHRMGMGQFSPHHHQQQPQHAFNALMGEHIIHYGAGNMNATSGIRH AMGPGTVNGGHPPSALAPAARFNNSQFMGPPVASQGGSLPASMQLQKLN NQYFNHHPYPHNHYMPDLHPAAGHQMNGTNQHFRDCNPKHSGGSSTPGG SGGSSTPGGSGSSSGGAGSSNSGGGSGSGNMPASVAHVPAAMLPPNVIDT DFIDEEVLMSLVIEMGLDRIKELPELWLGQNEFDFTDFVCKQQPSRVSC
SEQ ID NO: 53	MAPKKRKRKVGIIHGVPAALEPGKPYKCPECGKSFSSRRDELNVHQRTHTGE KPYKCPECGKSFSSRRTCRAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSQSSNLVRHQ THTGEKPYKCPECGKSFSSQLAHLRAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSS VRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSHRTTLTNHQRTHTGKKTSCRPAATKKA GQAKKKKGSYPYDVPDYALEMADHLMLAEGYRLVQRPPSAAAAGHPHA LRTLPPYAGPGLDSGLRPRGAPLGGPPRQPGALAYGAFGPPSSFPFPV PPAAGIAHLQPVATPYPGRAAAPPNAPGGPPGPQPAPSAAAPPPAHALGG MDAELIDEEALTSLELELGLHRVRELPELFLGQSEFDCFSDLGSAPPAGSV C
SEQ ID NO: 54	MAADHLMLAEGYRLVQRPPSAAAAGHPHALRTLPPYAGPGLDSGLRPRG APLGGPPRQPGALAYGAFGPPSSFPFPVPPPAAGIAHLQPVATPYPGRA AAPPNAPGGPPGPQPAPSAAAPPPAHALGGMDAELIDEEALTSLELELGLH RVRELPELFLGQSEFDCFSDLGSAPPAGSVSCGGSGGGSGPKKRKVGIIHG VPAALEPGKPYKCPECGKSFSSRRDELNVHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSS RRTCRAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSQSSNLVRHQRTHTGEKPYKCPEC GKSFSSQLAHLRAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSQSSNLVRHQRTHTGEP YKCPECGKSFSSHRTTLTNHQRTHTGKKTSCRPAATKKAQAKKKKGSYPY DVPDYALEMADHLMLAEGYRLVQRPPSAAAAGHPHALRTLPPYAGPGLD SGLRPRGAPLGGPPRQPGALAYGAFGPPSSFPFPVPPPAAGIAHLQPVA TPYPGRAAAPPNAPGGPPGPQPAPSAAAPPPAHALGGMDAELIDEEALTS LELELGLHRVRELPELFLGQSEFDCFSDLGSAPPAGSVSC
SEQ ID NO: 55	MQSQLIKPSRMRKYPNRPSTPPHERPYACPVESCDRRFSRRDELNVHIRIH TGQKPFQCRICMRNFSSRRTCRAHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQSSNLVRH TKIHLRQKDRPYACPVESCDRRFSQLAHLRAHIRHTGQKPFQCRICMRNFS TSGNLVRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAHRTTLTNHTKIHLRQKDKLEMSG LEMADHMMAMNHGRFPDGTNGLHHHPAHRMGMGQFSPHHHQQQPQ HAFNALMGEHIIHYGAGNMNATSGIRHAMGPGTVNGGHPPSALAPAARFN NSQFMGPPVASQGGSLPASMQLQKLNQYFNHHPYPHNHYMPDLHPAAG HQMNGTNQHFRDCNPKHSGGSSTPGGSGGSSTPGGSGSSSGGAGSSNSG GGSGSGNMPASVAHVPAAMLPPNVIDTDFIDEEVLMSLVIEMGLDRIKELP

	ELWLGQNEFDFMTDFVCKQQPSRVSC
SEQ ID NO: 56	MSGLEMADHMMAMNHGRFPDGTNGLHHHPAHRMGMGQFSPHHHQQQ QPQHAFNALMGEHIIHYGAGNMNATSGVRHAMGPGTVNGGHPPSALAPAA RFNNSQFMGPPVASQGGSLPASMQLQKLNNQYFNHHPYPHNHYMPDLHP AAGHQMNGTNQHFRDCNPKHSGGSSTPGGSGGSSTPGGSGSSSGGGAGSS NSGGGSGSGNMPASVAHVPAAMLPPNVIDTDFIDEEVLMSLVIEMGLDRIK ELPELWLGQNEFDFMTDFVCKQQPSRVSCQSOLIKPSRMRKYPNRPSKTPP HERPYACPVESCDRRFSRRDELNVHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSSRRTCRA HIRTHTGEKPFACDICGRKFAQSSNLVRHTKIHRLRQKDRPYACPVESCDRRF SQLAHLRAHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSTSGNLVRHIRTHTGEKPFACDIC GRKFAHRTTLTNHTKIHRLRQKDK
SEQ ID NO: 57	MQSQLIKPSRMRKYPNRPSKTPPHERPYACPVESCDRRFSRSDNLVRHIRIH TGQKPFQCRICMRNFSREDNLHTHIRTHTGEKPFACDICGRKFARSDDELVR HTKIHRLRQKDRPYACPVESCDRRFSQSGNLTEHIRIHTGQKPFQCRICMRNF STSGHLVRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQNSTLTEHTKIHRLRQDKLEMS GLEMADHMMAMNHGRFPDGTNGLHHHPAHRMGMGQFSPHHHQQQQP QHAFNALMGEHIIHYGAGNMNATSGIRHAMGPGTVNGGHPPSALAPAARF NNSQFMGPPVASQGGSLPASMQLQKLNNQYFNHHPYPHNHYMPDLHPAA GHQMNGTNQHFRDCNPKHSGGSSTPGGSGGSSTPGGSGSSSGGGAGSSNS GGGSGSGNMPASVAHVPAAMLPPNVIDTDFIDEEVLMSLVIEMGLDRIKEL PELWLGQNEFDFMTDFVCKQQPSRVSC
SEQ ID NO: 58	MSGLEMADHMMAMNHGRFPDGTNGLHHHPAHRMGMGQFSPHHHQQQ QPQHAFNALMGEHIIHYGAGNMNATSGVRHAMGPGTVNGGHPPSALAPAA RFNNSQFMGPPVASQGGSLPASMQLQKLNNQYFNHHPYPHNHYMPDLHP AAGHQMNGTNQHFRDCNPKHSGGSSTPGGSGGSSTPGGSGSSSGGGAGSS NSGGGSGSGNMPASVAHVPAAMLPPNVIDTDFIDEEVLMSLVIEMGLDRIK ELPELWLGQNEFDFMTDFVCKQQPSRVSCQSOLIKPSRMRKYPNRPSKTPP HERPYACPVESCDRRFSRSDNLVRHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSREDNLHT HIRTHTGEKPFACDICGRKFARSDDELVRHTKIHRLRQKDRPYACPVESCDRRF SQSGNLTEHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSTSGHLVRHIRTHTGEKPFACDICG RKFAQNSTLTEHTKIHRLRQKDK
SEQ ID NO: 59	MQSQLIKPSRMRKYPNRPSKTPPHERPYACPVESCDRRFS SPADLTRHIRIH TGQKPFQCRICMRNFSDSGNLVRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQLAHLRA HTKIHRLRQKDRPYACPVESCDRRFSQRANLRAHIRIHTGQKPFQCRICMRNF SREDNLHTHIRTHTGEKPFACDICGRKFARSDNLVRHTKIHRLRQDKLEMS GLEMADHMMAMNHGRFPDGTNGLHHHPAHRMGMGQFSPHHHQQQQP QHAFNALMGEHIIHYGAGNMNATSGXRHAMGPGTVNGGHPPSALAPAARF NNSQFMGPPVASQGGSLPASMQLQKLNNQYFNHHPYPHNHYMPDLHPAA GHQMNGTNQHFRDCNPKHSGGSSTPGGSGGSSTPGGSGSSSGGGAGSSNS GGGSGSGNMPASVAHVPAAMLPPNVIDTDFIDEEVLMSLVIEMGLDRIKEL PELWLGQNEFDFMTDFVCKQQPSRVSC (где X может представлять собой I или V)
SEQ ID NO: 60	MSGLEMADHMMAMNHGRFPDGTNGLHHHPAHRMGMGQFSPHHHQQQ QPQHAFNALMGEHIIHYGAGNMNATSGVRHAMGPGTVNGGHPPSALAPAA RFNNSQFMGPPVASQGGSLPASMQLQKLNNQYFNHHPYPHNHYMPDLHP AAGHQMNGTNQHFRDCNPKHSGGSSTPGGSGGSSTPGGSGSSSGGGAGSS NSGGGSGSGNMPASVAHVPAAMLPPNVIDTDFIDEEVLMSLVIEMGLDRIK ELPELWLGQNEFDFMTDFVCKQQPSRVSCQSOLIKPSRMRKYPNRPSKTPP HERPYACPVESCDRRFSRRDELNVHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSSRRTCRA HIRTHTGEKPFACDICGRKFAQSSNLVRHTKIHRLRQKDRPYACPVESCDRRF SQLAHLRAHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSTSGNLVRHIRTHTGEKPFACDIC GRKFAHRTTLTNHTKIHRLRQKDK

SEQ ID NO: 61	MQSQLIKPSRMRKYPNRPSKTPPHERPYACPVESCDRRFSRSDNLVRHIRIH TGQKPFQCRICMRNFSREDNLHHTHIRTHTGKPFACDICGRKFARSDLV HTKIHRLQKDRPYACPVESCDRRFSQSGNLTEHIRIHTGQKPFQCRICMRNF STSGHLVRHIRTHTGKPFACDICGRKFAQNSTLTEHTKIHRLQKDKLEMA DHLMLAEGYRLVQRPPSAAA AHGPHALRTLPPYAGPGLDSGLRPRGAPLG PPPPRQPGALAYGAFGPPSSFQPFPAVPPPAAGIAHLQPVATPYPGRAAAPP NAPGGPPGPQPAPSAAAPPPPAHALGGMDAELIDEEALTSLELELGLHRVR ELPELFLGQSEFDCFSDLGSAPPAGSVSC
SEQ ID NO: 62	MAADHLMLAEGYRLVQRPPSAAA AHGPHALRTLPPYAGPGLDSGLRPRG APLGPPPPRQPGALAYGAFGPPSSFQPFPAVPPPAAGIAHLQPVATPYPGRA AAPPNAPGGPPGPQPAPSAAAPPPPAHALGGMDAELIDEEALTSLELELGLH RVRELPELFLGQSEFDCFSDLGSAPPAGSVSCGGSGGGSGQSQLIKPSRMRK YPNRPSKTPPHERPYACPVESCDRRFSRSDNLVRHIRIHTGQKPFQCRICMR NFSREDNLHHTHIRTHTGKPFACDICGRKFARSDLVHTKIHRLQKDRPY ACPVESCDRRFSQSGNLTEHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSTSGHLVRHIRT HTGKPFACDICGRKFAQNSTLTEHTKIHRLQKDKLEMADHLMLAEGYRLV QRPPSAAA AHGPHALRTLPPYAGPGLDSGLRPRGAPLGPPPPRQPGALAYG AFGPPSSFQPFPAVPPPAAGIAHLQPVATPYPGRAAAPPNAPGGPPGPQPAP SAAAPPPPAHALGGMDAELIDEEALTSLELELGLHRVRELPELFLGQSEFDC FSDLGSAPPAGSVSC
SEQ ID NO: 63	MQSQLIKPSRMRKYPNRPSKTPPHERPYACPVESCDRRFS SPADLTRHIRIH TGQKPFQCRICMRNFS DSGNLRVHIRTHTGKPFACDICGRKFAQLAHLRA HTKIHRLQKDRPYACPVESCDRRFSQRANLRAHIRIHTGQKPFQCRICMRNF SREDNLHHTHIRTHTGKPFACDICGRKFARSDNLVRHTKIHRLQKDKLEMA DHLMLAEGYRLVQRPPSAAA AHGPHALRTLPPYAGPGLDSGLRPRGAPLG PPPPRQPGALAYGAFGPPSSFQPFPAVPPPAAGIAHLQPVATPYPGRAAAPP NAPGGPPGPQPAPSAAAPPPPAHALGGMDAELIDEEALTSLELELGLHRVR ELPELFLGQSEFDCFSDLGSAPPAGSVSC
SEQ ID NO: 64	MAADHLMLAEGYRLVQRPPSAAA AHGPHALRTLPPYAGPGLDSGLRPRG APLGPPPPRQPGALAYGAFGPPSSFQPFPAVPPPAAGIAHLQPVATPYPGRA AAPPNAPGGPPGPQPAPSAAAPPPPAHALGGMDAELIDEEALTSLELELGLH RVRELPELFLGQSEFDCFSDLGSAPPAGSVSCGGSGGGSGQSQLIKPSRMRK YPNRPSKTPPHERPYACPVESCDRRFS SPADLTRHIRIHTGQKPFQCRICMR NFS DSGNLRVHIRTHTGKPFACDICGRKFAQLAHLRAHTKIHRLQKDRPY ACPVESCDRRFSQRANLRAHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSREDNLHHTHIRT HTGKPFACDICGRKFARSDNLVRHTKIHRLQKDKLEMADHLMLAEGYRLV QRPPSAAA AHGPHALRTLPPYAGPGLDSGLRPRGAPLGPPPPRQPGALAYG AFGPPSSFQPFPAVPPPAAGIAHLQPVATPYPGRAAAPPNAPGGPPGPQPAP SAAAPPPPAHALGGMDAELIDEEALTSLELELGLHRVRELPELFLGQSEFDC FSDLGSAPPAGSVSC
SEQ ID NO: 65	MQSQLIKPSRMRKYPNRPSKTPPHERPYACPVESCDRRFSRRDELNVHIRIH TGQKPFQCRICMRNFSRRTCRAHIRTHTGKPFACDICGRKFAQSSNLVRH TKIHRLQKDRPYACPVESCDRRFSQLAHLRAHIRIHTGQKPFQCRICMRNFS TSGNLVRHIRTHTGKPFACDICGRKFAHRTTLTNHTKIHRLQKDKLEMAD HLMLAEGYRLVQRPPSAAA AHGPHALRTLPPYAGPGLDSGLRPRGAPLGP PPPRQPGALAYGAFGPPSSFQPFPAVPPPAAGIAHLQPVATPYPGRAAAPPN APGGPPGPQPAPSAAAPPPPAHALGGMDAELIDEEALTSLELELGLHRVREL PELFLGQSEFDCFSDLGSAPPAGSVSC
SEQ ID NO: 66	MAADHLMLAEGYRLVQRPPSAAA AHGPHALRTLPPYAGPGLDSGLRPRG APLGPPPPRQPGALAYGAFGPPSSFQPFPAVPPPAAGIAHLQPVATPYPGRA AAPPNAPGGPPGPQPAPSAAAPPPPAHALGGMDAELIDEEALTSLELELGLH RVRELPELFLGQSEFDCFSDLGSAPPAGSVSCGGSGGGSGQSQLIKPSRMRK

	<p>YPNRPSKTPPHERPYACPVESCDRRFSRRDELNVHIRIHTGQKPFQCRICMR NFSSRRTCRAHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQSSNLVRHTKIHLRQKDRPYA CPVESCDRRFSQLAHLRAHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSTSGNLVRHIRTHT GEKPFACDICGRKFAHRTTTLNHTKIHLRQKDKLEMADHMLAEGYRLVQ RPPSAAA AHGPHALRTLPPYAGPGLDGLRPRGAPLGPPPPRQPGALAYGA FGPPSSFQPFPAVPPPAAGIAHLQPVATPYPGRAAAPPNAPGGPPGPQAPS AAAPPPAHALGGMDAELIDEEALTSLELELGLHRVRELPELFLGQSEFDCF SDLGSAPPAGSVSC</p>
SEQ ID NO: 67	<p>MAADHMLAEGYRLVQRPPSAAA AHGPHALRTLPPYAGPGLDGLRPRG APLGPPPPRQPGALAYGAFGPPSSFQPFPAVPPPAAGIAHLQPVATPYPGRA AAPPNAPGGPPGPQAPSAAAPPPAHALGGMDAELIDEEALTSLELELGLH RVRELPELFLGQSEFDCFSDLGSAPPAGSVSCGGSGGGSGSGLIKPSRMRK YPNRPSKTPPHERPYACPVESCDRRFSRSDNLVRHIRIHTGQKPFQCRICMR NFSHRTTTLNHIRTHTGEKPFACDICGRKFAREDNLHTHTKIHLRQKDRPY ACPVESCDRRFSTSHSLTEHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSQSSSLVRHIRTHT GEKPFACDICGRKFAREDNLHTHTKIHLRQKDKLEMADHMLAEGYRLVQ RPPSAAA AHGPHALRTLPPYAGPGLDGLRPRGAPLGPPPPRQPGALAYGA FGPPSSFQPFPAVPPPAAGIAHLQPVATPYPGRAAAPPNAPGGPPGPQAPS AAAPPPAHALGGMDAELIDEEALTSLELELGLHRVRELPELFLGQSEFDCF SDLGSAPPAGSVSC</p>
SEQ ID NO: 68	<p>MAADHMLAEGYRLVQRPPSAAA AHGPHALRTLPPYAGPGLDGLRPRG APLGPPPPRQPGALAYGAFGPPSSFQPFPAVPPPAAGIAHLQPVATPYPGRA AAPPNAPGGPPGPQAPSAAAPPPAHALGGMDAELIDEEALTSLELELGLH RVRELPELFLGQSEFDCFSDLGSAPPAGSVSCGGSGGGSGSGLIKPSRMRK YPNRPSKTPPHERPYACPVESCDRRFSRSDNLVRHIRIHTGQKPFQCRICMR NFSHRTTTLNHIRTHTGEKPFACDICGRKFAREDNLHTHTKIHLRQKDRPY ACPVESCDRRFSTSHSLTEHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSQSSSLVRHIRTHT GEKPFACDICGRKFAREDNLHTHTKIHLRQKDK</p>
SEQ ID NO: 69	<p>MAADHMLAEGYRLVQRPPSAAA AHGPHALRTLPPYAGPGLDGLRPRG APLGPPPPRQPGALAYGAFGPPSSFQPFPAVPPPAAGIAHLQPVATPYPGRA AAPPNAPGGPPGPQAPSAAAPPPAHALGGMDAELIDEEALTSLELELGLH RVRELPELFLGQSEFDCFSDLGSAPPAGSVSCGGSGGGSGSGLIKPSRMRK YPNRPSKTPPHERPYACPVESCDRRFSRSDNLVRHIRIHTGQKPFQCRICMR NFSREDNLHTHIRTHTGEKPFACDICGRKFA RSDDELVRHTKIHLRQKDRPY ACPVESCDRRFSQSGNLTEHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSTSGHLVRHIRTHT TGEKPFACDICGRKFAQNSTLTEHTKIHLRQKDK</p>
SEQ ID NO: 70	<p>MRPHACPAEGCDRRFSRSDNLVRHLRIHTGHKPFQCRICMRSFSREDNLHT HIRTHTGEKPFACEFCGRKFARSDELVRHAKIHLKQKEHACPAEGCDRRFS QSGNLTEHLRIHTGHKPFQCRICMRSFSTSGHLVRHIRTHTGEKPFACEFCG RKFAQNSTLTEHAKIHLKQKEKKA EKGGAPSASSAPPVSLAPVVTTCALM SGLEMADHMMAMNHGRFPDGTNGLHHHPAHRMGMGQFPPSPHHHQQQQ PQHAFNALMGEHIIHYGAGNMNATSGIRHAMGPGTVNGGHPPSALAPAAR FNNSQFMGPPVASQGGSLPASMQLQKLNNQYFNHHPYPHNHYMPDLHPA AGHQMNQTNQHFRDCNPKHSGGSSTPGGSGGSSTPGGSGSSSGGGAGSSN SGGGSGSGNMPASVAHVPAAMLPPNVIDTDFIDEVLMSLVIEMGLDRIKE LPELWLGQNEFDFMTDFVCKQQPSRVSC</p>
SEQ ID NO: 71	<p>MSGLEMADHMMAMNHGRFPDGTNGLHHHPAHRMGMGQFPPSPHHHQQQQ QPQHAFNALMGEHIIHYGAGNMNATSGVRHAMGPGTVNGGHPPSALAPAA RFNNSQFMGPPVASQGGSLPASMQLQKLNNQYFNHHPYPHNHYMPDLHP AAGHQMNQTNQHFRDCNPKHSGGSSTPGGSGGSSTPGGSGSSSGGGAGSS NSGGSGSGNMPASVAHVPAAMLPPNVIDTDFIDEVLMSLVIEMGLDRIK ELPELWLGQNEFDFMTDFVCKQQPSRVSCRPHACPAEGCDRRFSRSDNLV</p>

	RHLRIHTGHKPFQCRICMRSFSREDNLHTHIRTHHTGEKPFACEFCGRKFARS DELVRHAKIHLKQKEHACPAEGCDRRFSQSGNLTEHLRIHTGHKPFQCRIC MRSFSTSGHLVRHIRTHHTGEKPFACEFCGRKFAQNSTLTEHAKIHLKQKEK KAEKGGAPSASSAPPVSLAPVVTTCA
SEQ ID NO: 72	MRPHACPAEGCDRRFSSPADLTRHLRIHTGHKPFQCRICMRSFSDSGNLRV HIRTHHTGEKPFACEFCGRKFAQLAHLRAHAKIHLKQKEHACPAEGCDRRFS QRANLRAHLRIHTGHKPFQCRICMRSFSREDNLHTHIRTHHTGEKPFACEFCG RKFARSDNLVRHAKIHLKQKEKAEKGGAPSASSAPPVSLAPVVTTCALE MSGLEMADHMMAMNHGRFPDGTNGLHHHPAHRMGMGQFSPHHHQQQ QPQHAFNALMGEHIIHYGAGNMNATSGXRHAMGPGTVNGGHPPSALAPAA RFNNSQFMGPPVASQGGSLPASMQLQKLNNQYFNHHPYPHNHYMPDLHP AAGHQMNGTNQHFRDCNPKHSGGSSTPGGSGGSSTPGGSGSSSGGGAGSS NSGGGSGSGNMPASVAHVPAAMLPPNVIDTDFIDEEVLMSLVIEMGLDRIK ELPELWLGQNEFDFMTDFVCKQQPSRVSC (где X может представлять собой I или V)
SEQ ID NO: 73	MSGLEMADHMMAMNHGRFPDGTNGLHHHPAHRMGMGQFSPHHHQQQ QPQHAFNALMGEHIIHYGAGNMNATSGVRHAMGPGTVNGGHPPSALAPAA RFNNSQFMGPPVASQGGSLPASMQLQKLNNQYFNHHPYPHNHYMPDLHP AAGHQMNGTNQHFRDCNPKHSGGSSTPGGSGGSSTPGGSGSSSGGGAGSS NSGGGSGSGNMPASVAHVPAAMLPPNVIDTDFIDEEVLMSLVIEMGLDRIK ELPELWLGQNEFDFMTDFVCKQQPSRVSCRPHACPAEGCDRRFSSPADLTR HLRIHTGHKPFQCRICMRSFSDSGNLRVHIRTHHTGEKPFACEFCGRKFAQLA HLRAHAKIHLKQKEHACPAEGCDRRFSQRANLRAHLRIHTGHKPFQCRIC MRSFSREDNLHTHIRTHHTGEKPFACEFCGRKFARSDNLVRHAKIHLKQKEK KAEKGGAPSASSAPPVSLAPVVTTCA
SEQ ID NO: 74	MRPHACPAEGCDRRFSRSDNLVRHLRIHTGHKPFQCRICMRSFSREDNLHT HIRTHHTGEKPFACEFCGRKFARSDELVRHAKIHLKQKEHACPAEGCDRRFS QSGNLTEHLRIHTGHKPFQCRICMRSFSTSGHLVRHIRTHHTGEKPFACEFCG RKFAQNSTLTEHAKIHLKQKEKLEMADHMLAEGYRLVQRPPSAAA AHGP HALRTLPPYAGPGLDSGLRPRGAPLGPPPPRQPGALAYGAFGPPSSFQPFPA VPPPAAGIAHLQPVATPYPGRAAAPPNAPGGPPGPQPAPSAAAPPPPAHAL GGMDAELIDEEALTSLELELGLHRVRELPELFLGQSEFDCFSDLGSAPPAGS VSC
SEQ ID NO: 75	MAADHMLAEGYRLVQRPPSAAA AHGPHALRTLPPYAGPGLDSGLRPRG APLGPPPPRQPGALAYGAFGPPSSFQPFPAVPPPAAGIAHLQPVATPYPGRA AAPPNAPGGPPGPQPAPSAAAPPPPAHALGGMDAELIDEEALTSLELELGLH RVRELPELFLGQSEFDCFSDLGSAPPAGSVSCGGSGGSGRPHACPAEGCD RRFSRSDNLVRHLRIHTGHKPFQCRICMRSFSREDNLHTHIRTHHTGEKPFAC EFCGRKFARSDELVRHAKIHLKQKEHACPAEGCDRRFSQSGNLTEHLRIHT GHKPFQCRICMRSFSTSGHLVRHIRTHHTGEKPFACEFCGRKFAQNSTLTEHA KIHLKQKEKLEMADHMLAEGYRLVQRPPSAAA AHGPHALRTLPPYAGPG LDSGLRPRGAPLGPPPPRQPGALAYGAFGPPSSFQPFPAVPPPAAGIAHLQP VATPYPGRAAAPPNAPGGPPGPQPAPSAAAPPPPAHALGGMDAELIDEEAL TSLELELGLHRVRELPELFLGQSEFDCFSDLGSAPPAGSVSC
SEQ ID NO: 76	MRPHACPAEGCDRRFSSPADLTRHLRIHTGHKPFQCRICMRSFSDSGNLRV HIRTHHTGEKPFACEFCGRKFAQLAHLRAHAKIHLKQKEHACPAEGCDRRFS QRANLRAHLRIHTGHKPFQCRICMRSFSREDNLHTHIRTHHTGEKPFACEFCG RKFARSDNLVRHAKIHLKQKEKLEMADHMLAEGYRLVQRPPSAAA AHG PHALRTLPPYAGPGLDSGLRPRGAPLGPPPPRQPGALAYGAFGPPSSFQPF AVPPPAAGIAHLQPVATPYPGRAAAPPNAPGGPPGPQPAPSAAAPPPPAHA LGGMDAELIDEEALTSLELELGLHRVRELPELFLGQSEFDCFSDLGSAPPAG SVSC

SEQ ID NO: 77	MAADHMLAEGYRLVQRPPSAAA AHGPHALRTLPPYAGPGLDSGLRPRG APLGPPPPRQPGALAYGAFGPPSSFQPFPAVPPPAAGIAHLQPVATPYPGRA AAPPNAPGGPPGPQPAPSAAAPPPPAHALGGMDAELIDEEALTSLELELGLH RVRELPELFLGQSEFDCFSDLGSAPPAGSVSCGGSGGGSGRPHACPAEGCD RRFSSPADLTRHLRIHTGHKPFQCRICMRSFSDSGNLRVHIRTHTGEKPFAC EFCGRKFAQLAHLRAHAKIHLKQKEHACPAEGCDRRFSQRANLRAHLRIH TGHKPFQCRICMRSFSREDNLHTHIRTHTGEKPFACEFCGRKFARSDNLVR HAKIHLKQKEKLEMADHMLAEGYRLVQRPPSAAA AHGPHALRTLPPYA GPGLDSGLRPRGAPLGPPPPRQPGALAYGAFGPPSSFQPFPAVPPPAAGIAH LQPVATPYPGRAAAPPNAPGGPPGPQPAPSAAAPPPPAHALGGMDAELIDE EALTSLELELGLHRVRELPELFLGQSEFDCFSDLGSAPPAGSVSC
SEQ ID NO: 78	MRPHACPAEGCDRRFSRRDELNVHLRIHTGHKPFQCRICMRSFSSRRTCRA HIRTHTGEKPFACEFCGRKFAQSSNLVRHAKIHLKQKEHACPAEGCDRRFS QLAHLRAHLRIHTGHKPFQCRICMRSFSTSGNLVRHIRTHTGEKPFACEFCG RKFAHRTTTLTNHAKIHLKQKEKLEMSGLEMADHMMAMNHGRFPDGTNG LHHHPAHRMGMGQFSPHHHQQQPQHAFNALMGEHIIHYGAGNMNATS GIRHAMGPGTVNGGHPPSALAPAARFNNSQFMGPPVASQGGSLPASMQLQ KLNNQYFNHHPYPHNHYMPDLHPAAGHQMNNGTNQHFRDCNPKHSGGSST PGSGSGSSTPGSGSGSSGGGAGSSNSGGSGSGSNMPASVAHVPAAMLPPN VIDTDFIDEVLMMSLVIEMGLDRIKELPELWLGQNEFDFMTDFVCKQQPSR VSC
SEQ ID NO: 79	MAADHMLAEGYRLVQRPPSAAA AHGPHALRTLPPYAGPGLDSGLRPRG APLGPPPPRQPGALAYGAFGPPSSFQPFPAVPPPAAGIAHLQPVATPYPGRA AAPPNAPGGPPGPQPAPSAAAPPPPAHALGGMDAELIDEEALTSLELELGLH RVRELPELFLGQSEFDCFSDLGSAPPAGSVSCGGSGGGSGRPHACPAEGCD RRFSRRDELNVHLRIHTGHKPFQCRICMRSFSSRRTCRAHIRTHTGEKPFAC EFCGRKFAQSSNLVRHAKIHLKQKEHACPAEGCDRRFSQLAHLRAHLRIHT GHKPFQCRICMRSFSTSGNLVRHIRTHTGEKPFACEFCGRKFAHRTTTLTNH AKIHLKQKEKLEMADHMLAEGYRLVQRPPSAAA AHGPHALRTLPPYAGP GLDSGLRPRGAPLGPPPPRQPGALAYGAFGPPSSFQPFPAVPPPAAGIAHLQ PVATPYPGRAAAPPNAPGGPPGPQPAPSAAAPPPPAHALGGMDAELIDEEA LTSLELELGLHRVRELPELFLGQSEFDCFSDLGSAPPAGSVSC
SEQ ID NO: 80	MRPHACPAEGCDRRFSRRDELNVHLRIHTGHKPFQCRICMRSFSSRRTCRA HIRTHTGEKPFACEFCGRKFAQSSNLVRHAKIHLKQKEHACPAEGCDRRFS QLAHLRAHLRIHTGHKPFQCRICMRSFSTSGNLVRHIRTHTGEKPFACEFCG RKFAHRTTTLTNHAKIHLKQKEKLEMADHMLAEGYRLVQRPPSAAA AHG PHALRTLPPYAGPGLDSGLRPRGAPLGPPPPRQPGALAYGAFGPPSSFQPF AVPPPAAGIAHLQPVATPYPGRAAAPPNAPGGPPGPQPAPSAAAPPPPAHA LGGMDAELIDEEALTSLELELGLHRVRELPELFLGQSEFDCFSDLGSAPPAG SVSC
SEQ ID NO: 268	MAPKKRKRKVGIIHGVPAALEPGEKPYKCPECGKSFSFSDPGHLVRHQRTHTGE KPYKCPECGKSFSSTKNSLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRNDALTEHQ THTGEKPYKCPECGKSFSERSHLREHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSKHL AEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSTHLDLIRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFS QSGNLTEHQRTHTGKKTSCRPAATKKA G
SEQ ID NO: 269	MAPKKRKRKVGIIHGVPAALEPGEKPYKCPECGKSFSRRTCRAHQRTHTGE KPYKCPECGKSFSSTGALTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSDDELVRHQ THTGEKPYKCPECGKSFSRNDALTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSGDL RRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSTSHSLTEHQRTHTGKKTSCRPAATKKA G
SEQ ID NO: 270	MAPKKRKRKVGIIHGVPAALEPGEKPYKCPECGKSFSRNDNLKNHQRTHTGE KPYKCPECGKSFSFSDPGALVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSREDNLHTHQR

	THTGEKPYKCPECGKSFSDPGALVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTSGEL VRHQRTHTGEKPYKCPECGKSF SRKDNLNHQRTHTGKKT SKRPAATKKA G
SEQ ID NO: 271	MAPKKRKRKVG IHGVPAALEPGEKPYKCPECGKSF SRSDNLVRHQRTHTGE KPYKCPECGKSF SREDNLH THQRTH TGEKPYKCPECGKSF SRSD ELVRHQ RTH TGEKPYKCPECGKSF SQSGNLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSF STSGHL VRHQRTHTGEKPYKCPECGKSF SQNSTLTEHQRTHTGKKT SKRPAATKKA GQAKKKKGSYPYDVPDYALEDALDDFDL DMLGSDALDDFDL DMLGSDAL DDFDL DMLGSDALDDFDL DML
SEQ ID NO: 272	MAPKKRKRKVG IHGVPAALEPGEKPYKCPECGKSF SSKKALTEHQRTHTGE KPYKCPECGKSF SPADLTRHQRTHTGEKPYKCPECGKSF SRSDNLVRHQ RTH TGEKPYKCPECGKSF SREDNLH THQRTH TGEKPYKCPECGKSF SRSD EL VRHQRTHTGEKPYKCPECGKSF SQSGNLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSF S TSGHLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSF SQNSTLTEHQRTHTGKKT SKRPA A TKKAGQAKKKKGSYPYDVPDYALEDALDDFDL DMLGSDALDDFDL DML GSDALDDFDL DMLGSDALDDFDL DML
SEQ ID NO: 273	MAPKKRKRKVG IHGVPAALEPGEKPYKCPECGKSF SRSDNLVRHQRTHTGE KPYKCPECGKSF SRSDNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSF SREDNLH THQR RTH TGEKPYKCPECGKSF SRSD ELVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSF SQSGNL TEHQRTHTGEKPYKCPECGKSF STSGHLVRHQRTHTGKKT SKRPAATKKA G
SEQ ID NO: 274	MAPKKRKRKVG IHGVPAALEPGEKPYKCPECGKSF SSKKALTEHQRTHTGE KPYKCPECGKSF SPADLTRHQRTHTGEKPYKCPECGKSF SRSDNLVRHQ RTH TGEKPYKCPECGKSF SREDNLH THQRTH TGEKPYKCPECGKSF SRSD EL VRHQRTHTGEKPYKCPECGKSF SQSGNLTEHQRTHTGKKT SKRPAATKKA G
SEQ ID NO: 275	MAPKKRKRKVG IHGVPAALEPGEKPYKCPECGKSF SDCRDLARHQRTHTGE KPYKCPECGKSF SRNDALTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSF SRNDALTEHQ RTH TGEKPYKCPECGKSF SPADLTRHQRTHTGEKPYKCPECGKSF SDPGNL VRHQRTHTGEKPYKCPECGKSF QRAHLERHQRTHTGEKPYKCPECGKSF S QSSSLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSF SHRTTLTNHQRTHTGKKT SKRPA A TKKAG
SEQ ID NO: 276	MAPKKRKRKVG IHGVPAALEPGEKPYKCPECGKSF SRNDALTEHQRTHTGE KPYKCPECGKSF SPADLTRHQRTHTGEKPYKCPECGKSF SDPGNLVRHQ RTH TGEKPYKCPECGKSF QRAHLERHQRTHTGEKPYKCPECGKSF SQSSSL VRHQRTHTGEKPYKCPECGKSF SHRTTLTNHQRTHTGKKT SKRPAATKKA G
SEQ ID NO: 277	MAPKKRKRKVG IHGVPAALEPGEKPYKCPECGKSF STKNSLTEHQRTHTGE KPYKCPECGKSF SRADNLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSF SQLAHLRAHQ RTH TGEKPYKCPECGKSF STKNSLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSF SQAGH LASHQRTH TGEKPYKCPECGKSF STLHLIRHQRTHTGKKT SKRPAATKKA G
SEQ ID NO: 278	MAPKKRKRKVG IHGVPAALEPGEKPYKCPECGKSF SRNDALTEHQRTHTGE KPYKCPECGKSF SDPGHLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSF STSGELVRHQ RTH TGEKPYKCPECGKSF STLHLIRHQRTHTGEKPYKCPECGKSF SSKKALT EHQRTH TGEKPYKCPECGKSF SQLAHLRAHQRTHTGEKPYKCPECGKSF SR SDHLTNHQRTHTGKKT SKRPAATKKA G
SEQ ID NO: 279	MAPKKRKRKVG IHGVPAALEPGEKPYKCPECGKSF SRSDNLVRHQRTHTGE KPYKCPECGKSF SHRTTLTNHQRTHTGEKPYKCPECGKSF SREDNLH THQR RTH TGEKPYKCPECGKSF STSHSLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSF SQSSSLV RHQRTH TGEKPYKCPECGKSF SREDNLH THQRTH TGEKPYKCPECGKSF SR PAATKKA GQAKKKKGSYPYDVPDYALEDALDDFDL DMLGSDALDDFDL DMLGSDALD

	DFDLMLGSDALDDFDLDMML
SEQ ID NO: 280	MAPKKKRKVGIIHGVPAALEPGKPYKCPECGKSFSQAGHLASHQRTHTGE KPYKCPECGKSFSRSDNLVRHQRTHHTGEKPYKCPECGKSFSQSGDLRRHQR THTGEKPYKCPECGKSFSSTHLDLIRHQRTHHTGEKPYKCPECGKSFSSTSGNLV RHQRTHHTGEKPYKCPECGKSFSRSDNLVRHQRTHHTGKKTSCRPAATKKAG QAKKKKGSYPYDVPDYALEDALDDFDLMLGSDALDDFDLMLGSDALD DFDLMLGSDALDDFDLDMML
SEQ ID NO: 281	MAPKKKRKVGIIHGVPAALEPGKPYKCPECGKSFSQAGHLASHQRTHTGE KPYKCPECGKSFSREDNLHHTHQRTHHTGEKPYKCPECGKSFSSTSGNLTEHQR THTGEKPYKCPECGKSFSSTHLDLIRHQRTHHTGEKPYKCPECGKSFSQKSSLI AHQRTHHTGEKPYKCPECGKSFSQAGHLASHQRTHTGKKTSCRPAATKKAG
SEQ ID NO: 282	MAPKKKRKVGIIHGVPAALEPGKPYKCPECGKSFSSTTGNLTVHQRTHHTGE KPYKCPECGKSFSSTSGELVRHQRTHHTGEKPYKCPECGKSFSREDNLHHTHQR THTGEKPYKCPECGKSFSSTSGNLTEHQRTHHTGEKPYKCPECGKSFSQSSSLV RHQRTHHTGEKPYKCPECGKSFSQRANLRAHQRTHHTGKKTSCRPAATKKAG

Таблица 7: Последовательности DBD eTF, представленных в таблице 6

eTF SEQ ID NO:	DBD SEQ ID NO:	Последовательность DBD	Белковая основа для DBD	Идентичность последовательности по NCBI-BLAST между DBD и белковой основой
SEQ ID NO: 50	SEQ ID NO: 81	LEPGKPYKCPECGKSFSRRDELNVHQRTHHTG EKPYKCPECGKSFSRRTCRAHQRTHHTGEKPY KCPECGKSFSQSSNLVRHQRTHHTGEKPYKCPE CGKSFSQLAHLRAHQRTHHTGEKPYKCPECGKS FSTSGNLVRHQRTHHTGEKPYKCPECGKSFSHR TTLTNHQRTHHTGKKTS	Синтетическая	67%
SEQ ID NO: 51	SEQ ID NO: 81	(аналогична приведенной выше)	Синтетическая	67%
SEQ ID NO: 52	SEQ ID NO: 81	(аналогична приведенной выше)	Синтетическая	67%
SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 81	(аналогична приведенной выше)	Синтетическая	67%
SEQ ID NO: 54	SEQ ID NO: 81	(аналогична приведенной выше)	Синтетическая	67%
SEQ ID NO:	SEQ ID NO:	MQSQLIKPSRMRKYPNRPSTPPHERPYACPV ESCDRRFSRRDELNVHIRIHTGQKPFQCRICMR NFSSRRTCRAHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQS	EGR1	86%

55	82	SNLVRHTKIHRLRQKDRPYACPVESCDRRFSQL AHLRAHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSTSGNLVR HIRTHTGEKPFACDICGRKFAHRTTLTNHTKIH LRQKDK		
SEQ ID NO: 56	SEQ ID NO: 83	QSQLIKPSRMRKYPNRPSKTPPHERPYACPVES CDRRFSRRDELNVHIRIHTGQKPFQCRICMRNF SSRRTCRAHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQSSN LVRHTKIHRLRQKDRPYACPVESCDRRFSQLAH LRAHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSTSGNLVRHI RTHTGEKPFACDICGRKFAHRTTLTNHTKIH RQKDK	EGR1	86%
SEQ ID NO: 57	SEQ ID NO: 84	RPYACPVESCDRRFSRSDNLVRHIRIHTGQKPF QCRICMRNFSREDNLHTHIRTHTGEKPFACDIC GRKFARSDDELVRHTKIHRLRQKDRPYACPVESC DRRFSQSGNLTEHIRIHTGQKPFQCRICMRNFS TSGHLVRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQNSTL TEHTKIHRLRQKD	EGR1	93%
SEQ ID NO: 58	SEQ ID NO: 85	QSQLIKPSRMRKYPNRPSKTPPHERPYACPVES CDRRFSRSDNLVRHIRIHTGQKPFQCRICMRNF SREDNLHTHIRTHTGEKPFACDICGRKFARSDE LVRHTKIHRLRQKDRPYACPVESCDRRFSQSGN LTEHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSTSGHLVRHI RTHTGEKPFACDICGRKFAQNSTLTEHTKIHRL RQKDK	EGR1	93%
SEQ ID NO: 59	SEQ ID NO: 86	MQSQLIKPSRMRKYPNRPSKTPPHERPYACPV ESCDRRFSSPADLTRHIRIHTGQKPFQCRICMR NFSDSGNLRVHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQ LAHLRAHTKIHRLRQKDRPYACPVESCDRRFSQ RANLRAHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSREDNL HTHIRTHTGEKPFACDICGRKFARSDNLVRHT KIHRLRQKDK	EGR1	84%
SEQ ID NO: 60	SEQ ID NO: 87	RPYACPVESCDRRFSRRDELNVHIRIHTGQKPF QCRICMRNFSSRRTCRAHIRTHTGEKPFACDIC GRKFAQSSNLVRHTKIHRLRQKDRPYACPVESC DRRFSQLAHLRAHIRIHTGQKPFQCRICMRNFS TSGNLVRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAHRTTL TNHTKIHRLRQKDK*	EGR1	84%
SEQ ID NO: 61	SEQ ID NO: 88	RPYACPVESCDRRFSRSDNLVRHIRIHTGQKPF QCRICMRNFSREDNLHTHIRTHTGEKPFACDIC GRKFARSDDELVRHTKIHRLRQKDRPYACPVESC DRRFSQSGNLTEHIRIHTGQKPFQCRICMRNFS TSGHLVRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQNSTL TEHTKIHRLRQKDK	EGR1	93%
SEQ ID NO: 62	SEQ ID NO: 88	(аналогична приведенной выше)	EGR1	93%
SEQ ID NO: 63	SEQ ID NO: 89	RPYACPVESCDRRFSSPADLTRHIRIHTGQKPF QCRICMRNFSDSGNLRVHIRTHTGEKPFACDIC GRKFAQLAHLRAHTKIHRLRQKDRPYACPVESC DRRFSQRANLRAHIRIHTGQKPFQCRICMRNFS REDNLHTHIRTHTGEKPFACDICGRKFARSDN	EGR1	84%

		LVRHTKIHRLRQKDK		
SEQ ID NO: 64	SEQ ID NO: 89	(аналогична приведенной выше)	EGR1	84%
SEQ ID NO: 65	SEQ ID NO: 82	(аналогична приведенной выше)	EGR1	86%
SEQ ID NO: 66	SEQ ID NO: 82	(аналогична приведенной выше)	EGR1	86%
SEQ ID NO: 67	SEQ ID NO: 90	QSQLIKPSRMRKYPNRPSKTPPHERPYACPVES CDRRFSRSDNLVRHIRIHTGQKPFQCRICMRNF SHRTTLTNHIRTHTGEKPFACDICGRKFARN LHTHTKIHRLRQKDRPYACPVESCDRRFSTSHSL TEHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSQSSSLVRHIRT HTGEKPFACDICGRKFARNLHTHTKIHRLRQ KDK	EGR1	79%
SEQ ID NO: 68	SEQ ID NO: 90	(аналогична приведенной выше)	EGR1	79%
SEQ ID NO: 69	SEQ ID NO: 91	QSQLIKPSRMRKYPNRPSKTPPHERPYACPVES CDRRFSRSDNLVRHIRIHTGQKPFQCRICMRNF SREDNLHTHIRTHTGEKPFACDICGRKFARSDE LVRHTKIHRLRQKDRPYACPVESCDRRFSQSGN LTEHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSTSGHLVRHI RTHTGEKPFACDICGRKFAQNSTLTEHTKIHRLR QKDK	EGR1	81%
SEQ ID NO: 70	SEQ ID NO: 92	HACPAEGCDRRFSRSDNLVRHLRIHTGHKPFQ CRICMRSFSREDNLHTHIRTHTGEKPFACEFCG RKFARSDDELVRHAKIHLKQKEHACPAEGCDR RFSQSGNLTEHLRIHTGHKPFQCRICMRSFSTS GHLVRHIRTHTGEKPFACEFCGRKFAQNSTLT EHAKIHLKQKE	EGR3	92%
SEQ ID NO: 71	SEQ ID NO: 92	(аналогична приведенной выше)	EGR3	92%
SEQ ID NO: 72	SEQ ID NO: 93	HACPAEGCDRRFSSPADLTRHLRIHTGHKPFQ CRICMRSFSDSGNLRVHIRTHTGEKPFACEFCG RKFAQLAHLRAHAKIHLKQKEHACPAEGCDR RFSQRANLRAHLRIHTGHKPFQCRICMRSFSRE DNLHTHIRTHTGEKPFACEFCGRKFARSDNLV RHAKIHLKQKE	EGR3	80%
SEQ ID NO: 73	SEQ ID NO: 93	(аналогична приведенной выше)	EGR3	80%
SEQ	SEQ	(аналогична приведенной выше)	EGR3	92%

ID NO: 74	ID NO: 92			
SEQ ID NO: 75	SEQ ID NO: 92	(аналогична приведенной выше)	EGR3	92%
SEQ ID NO: 76	SEQ ID NO: 93	(аналогична приведенной выше)	EGR3	80%
SEQ ID NO: 77	SEQ ID NO: 93	(аналогична приведенной выше)	EGR3	80%
SEQ ID NO: 78	SEQ ID NO: 94	HACPAEGCDRRFSRRDELNVHLRIHTGHKPFQ CRICMRSFSSRRTCRAHIRTHTGEKPFACEFCG RKFAQSSNLVRHAKIHLKQKEHACPAEGCDR RFSQLAHLRAHLRIHTGHKPFQCRICMRSFSTS GNLVRHIRTHTGEKPFACEFCGRKFAHRTTTL NHAKIHLKQKE	EGR3	45%
SEQ ID NO: 79	SEQ ID NO: 94	(аналогична приведенной выше)	EGR3	45%
SEQ ID NO: 80	SEQ ID NO: 94	(аналогична приведенной выше)	EGR3	45%

Таблица 8: Аминокислотные последовательности иллюстративных TAD, которые могут быть слиты с любым DBD eTF, представленных в настоящем описании

TAD SEQ ID NO.	Последовательность TAD (N-к-С-концу)	Белковая основа TAD
SEQ ID NO: 95	DALDDFDLDM LGSDALDDFDLDM LGSDALDDFDLDM LGSDALDDFDLDM	VP64 (вирусный домен активатора)
SEQ ID NO: 114	DALDDFDLDM LGSDALDDFDLDM LGSDALDDFDLDM LGSDALDDFDLMLNSRSSGSPKKR KVG SQYLPD TD DRHRIEEKRKRTYETFKSIMKKSPFSGPTDPRPPPRRIA VPSRSSASVPKPAPQPYPFTSSLSTINYDEFPTMVFPSGQ	VPR (вирусный домен активатора)

	ISQASALAPAPPQVLPQAPAPAPAPAMVSALAQAPAPV PVLAPGPPQAVAPPAPKPTQAGEGTLSEALLQLQFDDE DLGALLGNSTDPVFTDLASVDNSEFQQLLNQGIPVAP HTTEPMLMEYPEAITRLVTGAQRPPDPAPAPLGAPGLP NGLLSGDEDFSSIADMDFSALLGSGSGSRDSREGMFLP KPEAGSAISDVFEGREVCQPKRIRPFHPPGSPWANRPLP ASLAPTPTGPVHEPVGSLTPAPVPQPLDPAPAVTPEASH LLEDPDEETSQAVKALREMA DTVIPQKEEA AICGQMD LSHPPPRGHLDELTTTLESMTEDLNLDSP LTPELNEILD TFLNDECLLHAMHISTGLSIFDTSLF	
SEQ ID NO: 96	MSGLEMADHMMAMNHGRFPDGTNGLHHHPAHRMG MGQFSPHHHQQQQPQHAFNALMGEHIIHYGAGNMNA TSGVRHAMGPGTVNGGHPPSALAPAARFNNSQFMGPP VASQGGSLPASMQLQKLNNQYFNHHPYPHNHYMPDL HPAAGHQMNGTNQHFRDCNPKHSGGSSTPGGSGGSST PGGSGSSSGGAGSSNSGGGSGSGNMPASVAHVPAAM LPPNVIDTDFIDEEVLMSLVIEMGLDRIKELPELWLGQN EFDGMTDFVCKQQPSRVSC	CITED2 (домен человеческого белка)
SEQ ID NO: 97	MADHLMLAEGYRLVQRPPSAAA AHGPHALRTLPPYA GPGLD SGLRPRGAPLGPPPPRQPGALAYGAFGPPSSFQP FPAVPPPAAGIAHLQPVATPYPGRAAAPPNAPGGPPGP QPAPSAAAPPPPAHALGGMDAELIDEEALTSLELELGL HRVRELPELFLGQSEFDCFSDLGSAPPAGSVSC	CITED4 (домен человеческого белка)
SEQ ID NO: 98	SGLEMADHMMAMNHGRFPDGTNGLHHHPAHRMG GQFSPHHHQQQQPQHAFNALMGEHIIHYGAGNMNAT SGVRHAMGPGTVNGGHPPSALAPAARFNNSQFMGPPV ASQGGSLPASMQLQKLNNQYFNHHPYPHNHYMPDLH PAAGHQMNGTNQHFRDCNPKHSGGSSTPGGSGGSSTP GGSGSSSGGAGSSNSGGGSGSGNMPASVAHVPAAML PPNVIDTDFIDEEVLMSLVIEMGLDRIKELPELWLGQNE FDFMTDFVCKQQPSRVSC	CITED2 (домен человеческого белка)
SEQ ID NO: 99	MSGLEMADHMMAMNHGRFPDGTNGLHHHPAHRMG MGQFSPHHHQQQQPQHAFNALMGEHIIHYGAGNMNA TSGVRHAMGPGTVNGGHPPSALAPAARFNNSQFMGPP VASQGGSLPASMQLQKLNNQYFNHHPYPHNHYMPDL	CITED2 (домен человеческого белка)

	HPAAGHQMNGTNQHFRDCNPKHSGGSSTPGGSGGSST PGGSGSSSGGGAGSSNSGGGSGSGNMPASVAHVPAAM LPPNVIDTDFIDEEVLMSLVIEMGLDRIKELPELWLGQN EFDFMTDFVCKQQPSRVSC	
SEQ ID NO: 100	AADHMLAEGYRLVQRPPSAAAHAHGPHALRTLPPYAG PGLDSGLRPRGAPLGPppPRQPGALAYGAFGPPSSFQPF PAVPPPAAGIAHLQPVATPYPGRAAAPPNAPGGPPGPQ PAPSAAAPPPPAHALGGMDAELIDEEALTSLELELGLH RVRELPELFLGQSEFDCFSDLGSAPPAGSVSC	CITED4 (домен человеческого белка)

Таблица 9: Процент идентичности последовательности между TAD и белковой

основой

еTF SEQ ID NO:	DBD SEQ ID NO:	TAD SEQ ID NO:	Белковая основа для TAD	Положение TAD относительно DBD	Идентичность последовательности по NCBI-BLAST (%) TAD с белковой основой
SEQ ID NO: 50	SEQ ID NO: 81	N/A	N/A	N/A	N/A
SEQ ID NO: 51	SEQ ID NO: 81	SEQ ID NO: 95	VP64	С-конец	0
SEQ ID NO: 52	SEQ ID NO: 81	SEQ ID NO: 96	CITED2	С-конец	100
SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 81	SEQ ID NO: 97	CITED4	С-конец	100
SEQ ID NO: 54	SEQ ID NO: 81	SEQ ID NO: 97	CITED4	N/С-конец	100
SEQ ID NO: 55	SEQ ID NO: 82	SEQ ID NO: 96	CITED2	С-конец	100
SEQ ID NO: 56	SEQ ID NO: 83	SEQ ID NO: 98	CITED2	N-конец	100
SEQ ID NO: 57	SEQ ID NO: 84	SEQ ID NO: 96	CITED2	С-конец	100
SEQ ID NO: 58	SEQ ID NO: 85	SEQ ID NO: 99	CITED2	N-конец	100
SEQ ID NO: 59	SEQ ID NO: 86	SEQ ID NO: 96	CITED2	С-конец	100
SEQ ID NO: 60	SEQ ID NO: 87	SEQ ID NO: 99	CITED2	N-конец	100
SEQ ID NO: 61	SEQ ID NO: 88	SEQ ID NO: 97	CITED4	С-конец	100
SEQ ID NO: 62	SEQ ID NO: 88	SEQ ID NO: 97	CITED4	N/С-конец	100

SEQ ID NO: 63	SEQ ID NO: 89	SEQ ID NO: 97	CITED4	С-конец	100
SEQ ID NO: 64	SEQ ID NO: 89	SEQ ID NO: 97	CITED4	N/C-конец	100
SEQ ID NO: 65	SEQ ID NO: 82	SEQ ID NO: 97	CITED4	С-конец	100
SEQ ID NO: 66	SEQ ID NO: 82	SEQ ID NO: 97	CITED4	N/C-конец	100
SEQ ID NO: 67	SEQ ID NO: 90	SEQ ID NO: 100	CITED4	N/C-конец	100
SEQ ID NO: 68	SEQ ID NO: 90	SEQ ID NO: 100	CITED4	N-конец	100
SEQ ID NO: 69	SEQ ID NO: 91	SEQ ID NO: 100	CITED4	N-конец	100
SEQ ID NO: 70	SEQ ID NO: 92	SEQ ID NO: 96	CITED2	С-конец	100
SEQ ID NO: 71	SEQ ID NO: 92	SEQ ID NO: 99	CITED2	N-конец	100
SEQ ID NO: 72	SEQ ID NO: 93	SEQ ID NO: 6	CITED2	С-конец	100
SEQ ID NO: 73	SEQ ID NO: 93	SEQ ID NO: 99	CITED2	N-конец	100
SEQ ID NO: 74	SEQ ID NO: 92	SEQ ID NO: 97	CITED4	С-конец	100
SEQ ID NO: 75	SEQ ID NO: 92	SEQ ID NO: 97	CITED4	N/C-конец	100
SEQ ID NO: 76	SEQ ID NO: 93	SEQ ID NO: 97	CITED4	С-конец	100
SEQ ID NO: 77	SEQ ID NO: 93	SEQ ID NO: 97	CITED4	N/C-конец	100
SEQ ID NO: 78	SEQ ID NO: 94	SEQ ID NO: 96	CITED2	С-конец	100
SEQ ID NO: 79	SEQ ID NO: 94	SEQ ID NO: 97	CITED4	N/C-конец	100
SEQ ID NO: 80	SEQ ID NO: 94	SEQ ID NO: 97	CITED4	С-конец	100

Таблица 10: Примеры eTF и последовательностей их целевых участков

eTF	Целевой участок, узнаваемый eTF	Последовательность целевого участка (5'-к-3')	Целевой ген
SEQ ID NO: 50	SEQ ID NO: 33	AGT GAT AGA GAA CGT ATG	Репортер
SEQ ID NO: 51	SEQ ID NO: 33	AGT GAT AGA GAA CGT ATG	Репортер
SEQ ID NO: 52	SEQ ID NO: 33	AGT GAT AGA GAA CGT ATG	Репортер
SEQ ID NO: 53	SEQ ID NO: 33	AGT GAT AGA GAA CGT ATG	Репортер
SEQ ID NO: 54	SEQ ID NO: 33	AGT GAT AGA GAA CGT ATG	Репортер
SEQ ID NO: 55	SEQ ID NO: 33	AGT GAT AGA GAA CGT ATG	Репортер

SEQ ID NO: 56	SEQ ID NO: 33	AGT GAT AGA GAA CGT ATG	Репортер
SEQ ID NO: 57	SEQ ID NO: 35	CTAGGTCAAGTGTAGGAG	SCN1A
SEQ ID NO: 58	SEQ ID NO: 35	CTAGGTCAAGTGTAGGAG	SCN1A
SEQ ID NO: 59	SEQ ID NO: 38	GAGTAGAAAAGAAACACA	PGRN
SEQ ID NO: 60	SEQ ID NO: 38	GAGTAGAAAAGAAACACA	PGRN
SEQ ID NO: 61	SEQ ID NO: 35	CTAGGTCAAGTGTAGGAG	SCN1A
SEQ ID NO: 62	SEQ ID NO: 35	CTAGGTCAAGTGTAGGAG	SCN1A
SEQ ID NO: 63	SEQ ID NO: 38	GAGTAGAAAAGAAACACA	PGRN
SEQ ID NO: 64	SEQ ID NO: 38	GAGTAGAAAAGAAACACA	PGRN
SEQ ID NO: 65	SEQ ID NO: 33	AGT GAT AGA GAA CGT ATG	Репортер
SEQ ID NO: 66	SEQ ID NO: 33	AGT GAT AGA GAA CGT ATG	Репортер
SEQ ID NO: 67	SEQ ID NO: 36	TAGGTACCATAGAGTGAG	SCN1A
SEQ ID NO: 68	SEQ ID NO: 36	TAGGTACCATAGAGTGAG	SCN1A
SEQ ID NO: 69	SEQ ID NO: 35	CTAGGTCAAGTGTAGGAG	SCN1A
SEQ ID NO: 70	SEQ ID NO: 35	CTAGGTCAAGTGTAGGAG	SCN1A
SEQ ID NO: 71	SEQ ID NO: 35	CTAGGTCAAGTGTAGGAG	SCN1A
SEQ ID NO: 72	SEQ ID NO: 38	GAGTAGAAAAGAAACACA	PGRN
SEQ ID NO: 73	SEQ ID NO: 38	GAGTAGAAAAGAAACACA	PGRN
SEQ ID NO: 74	SEQ ID NO: 35	CTAGGTCAAGTGTAGGAG	SCN1A
SEQ ID NO: 75	SEQ ID NO: 35	CTAGGTCAAGTGTAGGAG	SCN1A
SEQ ID NO: 76	SEQ ID NO: 38	GAGTAGAAAAGAAACACA	PGRN
SEQ ID NO: 77	SEQ ID NO: 38	GAGTAGAAAAGAAACACA	PGRN
SEQ ID NO: 78	SEQ ID NO: 33	AGT GAT AGA GAA CGT ATG	Репортер
SEQ ID NO: 79	SEQ ID NO: 33	AGT GAT AGA GAA CGT ATG	Репортер
SEQ ID NO: 80	SEQ ID NO: 33	AGT GAT AGA GAA CGT ATG	Репортер

Таблица 11: Пример последовательности белка dSaCas9 и гидовых РНК для

нацеливания на целевой участок, способный увеличивать экспрессию эндогенного гена SCN1A.

dCas каркас		
SEQ ID NO: 102	GTTTTAGTACTCTGGAAACAGAATCTACTAAAACAAGGCAAAAT GCCGTGTTTATCTCGTCAACTTGTGGCGAGA	
Аминокислотная последовательность dSaCas9		
SEQ ID NO: 103	KRNYILGLAIGITSVGYGIIDYETRDVIDAGVRLFKEANVENNEGRR SKRGARRLKRRRRHRIQRVKKLLFDYNLLTDHSELSGINPYEARVK GLSQKLSEEEFSAALLHLAKRRGVHNVNEVEEDTGNELSTKEQISR NSKALEEKYVAELQLERLKKDGEVRGSINRFKTSYVKEAKQLLK VQKAYHQLDQSFIDTYIDLLETRRTYYEGPGEGSPFGWKDIKEWYE MLMGHCTYFPEELRSVKYAYNADLYNALNDLNNLVITRDENEKLE YYEKFQIENVFKQKKKPTLKQIAKEILVNEEDIKGYRVTSTGKPEF TNLKVYHDIKDITARKEIENAELLDQIAKILTIYQSSEDIQEELTNLN SELTQEEIEQISNLKGYTGTHNLSLKAINLILDELWHTNDNQIAIFNR LKLVPKKVDLSQQKEIPTTLVDDFILSPVVKRSFIQSIKVINAIKKYGL LPNDIIELAREKNSKDAQKMINEMQKRNRQTNERIEEIIIRTTGKEN AKYLIEKIKLHDMQEGKCLYSLEAIPLEDLLNPNFYEVVDHIIPRSVS FDNSFNKVLVKQEEASKKGNRTPFQYLSSSDSKISYETFKKHILNL AKGKGRISKTKKEYLLEERDINRFSVQKDFINRNLVDTRYATRGLM NLLRSYFRVNNLDVKVKSINGGFTSFLRRKWKFKKERNKGYKHA EDALIANADFIFKEWKKLDKAKKVMENQMFEEKQAESMPEIETE QEYKEIFITPHQIKHIKDFKDYKYSHRVDKKNRELINDTLYSTRKDD KGNTLIVNNLNGLYDKDNDKLLKLINKSPEKLLMYHHPQTYQKL KLIMEQYGDEKNPLYKYEEETGNYLTKYSKKDNGPVIKKIKYYGN KLNAHLDITDDYPNSRNKVVKLSLKPYPYFDVYLDNGVYKFTVKN LDVIKKENYEVNSKCYEEAKKLLKISNQAEFIASFYNNDLIKINGE LYRVIGVNNDLLNRIEVNMIDITYREYLENMNDKRPPRIIKTIASKT QSIKKYSTDILGNLYEVKSKKHPQIIKKG	
SEQ ID NO: 104 (или SEQ ID NO: 103 с NLS и HA меткой)	MAPKKRKGVIHGVPAAKRNYILGLAIGITSVGYGIIDYETRDVIDA GVRLFKEANVENNEGRRSKRGARRLKRRRRHRIQRVKKLLFDYNL LTDHSELSGINPYEARVKGLSQKLSEEEFSAALLHLAKRRGVHNVN EVEEDTGNELSTKEQISRNSKALEEKYVAELQLERLKKDGEVRGSI NRFKTSYVKEAKQLLKVQKAYHQLDQSFIDTYIDLLETRRTYYEG PGEGSPFGWKDIKEWYEMLMGHCTYFPEELRSVKYAYNADLYNA LNDLNNLVITRDENEKLEYEKFQIENVFKQKKKPTLKQIAKEILV NEEDIKGYRVTSTGKPEFTNLKVYHDIKDITARKEIENAELLDQIAK ILTIYQSSEDIQEELTNLSELTQEEIEQISNLKGYTGTHNLSLKAINL ILDELWHTNDNQIAIFNRLKLVPKKVDLSQQKEIPTTLVDDFILSPV VKRSFIQSIKVINAIKKYGLPNDIIELAREKNSKDAQKMINEMQKR NRQTNERIEEIIIRTTGKENAKYLIEKIKLHDMQEGKCLYSLEAIPLED LLNPNFYEVVDHIIPRSVSFDNSFNKVLVKQEEASKKGNRTPFQY LSSSDSKISYETFKKHILNLAKGKGRISKTKKEYLLEERDINRFSVQK DFINRNLVDTRYATRGLM NLLRSYFRVNNLDVKVKSINGGFTSFLR RKWKFKKERNKGYKHAEDALIANADFIFKEWKKLDKAKKVMEN NQMFEEKQAESMPEIETEQEYKEIFITPHQIKHIKDFKDYKYSHRVD KKNRELINDTLYSTRKDDKGNTLIVNNLNGLYDKDNDKLLKLINK KSPEKLLMYHHPQTYQKLKLIMEQYGDEKNPLYKYEEETGNYLTK YSKKDNGPVIKKIKYYGNKLNAHLDITDDYPNSRNKVVKLSLKP YRFDVYLDNGVYKFTVKNLDVIKKENYEVNSKCYEEAKKLLKISN QAEFIASFYNNDLIKINGELYRVIGVNNDLLNRIEVNMIDITYREY	

	LENMNDKRPPRIIKTIASKTQSIKKYSTDILGNLYEVKSKKHPQIIKK GKRPAATKKAGQAKKKKGSYPYDVPDYALEDALDDFDLDMGLGSD ALDDFDLDMGLGSDALDDFDLDMGLGSDALDDFDLDMGL
Последовательности гидовой PНК SaCas9 (rPНК)	
SEQ ID NO: 105	TGACCTAGACAGCCTTACATA
SEQ ID NO: 106	TAAGGCTGTCTAGGTCAAGTG
SEQ ID NO: 107	AAGGCTGTCTAGGTCAAGTGT
SEQ ID NO: 108	GATGAAGCCGAGAGGATACTG
SEQ ID NO: 109	GCTGATTTGTATTAGGTACCA
Последовательности гидовой PНК SpCas9 (rPНК)	
SEQ ID NO: 110	CTTCGTTATGTAAGGCTGTCT
SEQ ID NO: 107	AAGGCTGTCTAGGTCAAGTGT
SEQ ID NO: 111	CAAGTGTAGGAGACACACTGC

Таблица 12: Примеры цинковых пальцев, которые могут быть объединены в eTF для модуляции гена SCN1A.

	Последовательность		Последовательность
SEQ ID NO: 115	RSDNLVR	SEQ ID NO: 123	QSGDLRR
SEQ ID NO: 116	REDNLHT	SEQ ID NO: 124	TSHSLTE
SEQ ID NO: 117	RSDELVR	SEQ ID NO: 125	THLDLIR
SEQ ID NO: 118	QSGNLTE	SEQ ID NO: 126	QSSSLVR
SEQ ID NO: 119	TSGHLVR	SEQ ID NO: 127	TSGNLVR
SEQ ID NO: 120	QNSTLTE	SEQ ID NO: 128	RRDELNV
SEQ ID NO: 121	DPGALVR	SEQ ID NO: 129	RSDDLVR
SEQ ID NO: 122	HRTTLTN	SEQ ID NO: 130	RSDHLTN

Таблица 13: Примеры DBD eTF для модуляции SCN1A

	Аминокислотная последовательность DBD (включая линкеры)
SEQ ID NO: 131	LEPGEKPYKCPECGKSFSRSDNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSF SREDNLHHTHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRDELVRHQRTHTGE KPYKCPECGKSFSQSGNLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTSGH LVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQNSTLTEHQRTHTGKKTS
SEQ ID NO: 132	LEPGEKPYKCPECGKSFSRSDNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSF SHRTTLTNHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSREDNLHHTHQRTHTGE KPYKCPECGKSFSTSHSLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSSSL VRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSREDNLHHTHQRTHTGKKTS
SEQ ID NO: 133	LEPGEKPYKCPECGKSFSRSDNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSF SRSDNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSGDLRRHQRTHTGE KPYKCPECGKSFSTHLDLIRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTSGN LVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSDNLVRHQRTHTGKKTS
SEQ ID NO: 134	LEPGEKPYKCPECGKSFSRSDNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSF SRSDHLTNHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRDDLVRHQRTHTGE KPYKCPECGKSFSRSDNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFHRTT

	LTNHQRTHTGKPYKCPECGKSFSDNLHHTHQRTHGKPYKC PECGKSFSTSHSLTEHQRTHTGKPYKCPECGKSFSSSLVRHQ RTHGKPYKCPECGKSFSDNLHHTHQRTHGKPYKC
SEQ ID NO: 135	RSDNLVR x REDNLHT x RDELVR x QSGNLTE x TSGHLVR x QNSTLTE (где X указывает линкер, содержащий 1-50 аминокислотных остатков)
SEQ ID NO: 371	RSDNLVR x HRTTLTN x REDNLHT x TSHSLTE x QSSSLVR x REDNLHT (где X указывает линкер, содержащий 1-50 аминокислотных остатков)
SEQ ID NO: 372	RRDELNV x RSDHLTN x RDDLVR x RSDNLVR x HRTTLTN x REDNLHT x TSHSLTE x QSSSLVR x REDNLHT (где X указывает линкер, содержащий 1-50 аминокислотных остатков)
SEQ ID NO: 376	DPGALVR x RSDNLVR x QSGDLRR x THLDLIR x TSGNLVR x RSDNLVR (где X указывает линкер, содержащий 1-50 аминокислотных остатков)
SEQ ID NO: 423	LEPGEKPYKCPECGKSFSDNLVRHQRTHTGKPYKCPECGKSF SREDNLHHTHQRTHGKPYKCPECGKSFSDNLVRHQRTHTGE KPYKCPECGKSFSSSLTEHQRTHTGKPYKCPECGKSFSTSGH LVRHQRTHTGKPYKCPECGKSFSSSLTEHQRTHTGKPYKC
SEQ ID NO: 424	LEPGEKPYKCPECGKSFSDNLVRHQRTHTGKPYKCPECGKSF SREDNLHHTHQRTHGKPYKCPECGKSFSDNLVRHQRTHTGE KPYKCPECGKSFSSSLTEHQRTHTGKPYKCPECGKSFSTSGH LVRHQRTHTGKPYKCPECGKSFSSSLTEHQRTHTGKPYKC
SEQ ID NO: 425	LEPGEKPYKCPECGKSFSDNLVRHQRTHTGKPYKCPECGKSF SREDNLHHTHQRTHGKPYKCPECGKSFSDNLVRHQRTHTGE KPYKCPECGKSFSSSLTEHQRTHTGKPYKCPECGKSFSTSGH LVRHQRTHTGKPYKCPECGKSFSSSLTEHQRTHTGKPYKC
SEQ ID NO: 426	LEPGEKPYKCPECGKSFSDNLVRHQRTHTGKPYKCPECGKSF SHRTTLTNHQRTHGKPYKCPECGKSFSDNLHHTHQRTHGK KPYKCPECGKSFSTSHSLTEHQRTHTGKPYKCPECGKSFSSSL VRHQRTHTGKPYKCPECGKSFSDNLHHTHQRTHGKPYKC
SEQ ID NO: 427	RKYPNRPSKTPPHERPYACPVESCDRRFSRSDNLVRHIRHTGQKP FQCRICMRNFSREDNLHHTHIRTHTGKPFACDICGRKFARSDELV RHTKIHLRQKDRPYACPVESCDRRFSQSGNLTEHIRHTGQKPFQ RICMRNFSTSGHLVRHIRHTHTGKPFACDICGRKFAQNSTLTEHT KIHLRQKDKKADKSVV
SEQ ID NO: 428	RKYPNRPSKTPPHERPYACPVESCDRRFSRSDNLVRHIRHTGQKP FQCRICMRNFSREDNLHHTHIRTHTGKPFACDICGRKFARSDELV RHTKIHLRQKDRPYACPVESCDRRFSQSGNLTEHIRHTGQKPFQ RICMRNFSTSGHLVRHIRHTHTGKPFACDICGRKFAQNSTLTEHT KIHLRQKDKKADKSVV
SEQ ID NO: 429	RKYPNRPSKTPPHERPYACPVESCDRRFSRSDNLVRHIRHTGQKP FQCRICMRNFSREDNLHHTHIRTHTGKPFACDICGRKFARSDELV RHTKIHLRQKDRPYACPVESCDRRFSQSGNLTEHIRHTGQKPFQ RICMRNFSTSGHLVRHIRHTHTGKPFACDICGRKFAQNSTLTEHT KIHLRQKDK
SEQ ID NO: 430	RKYPNRPSKTPPHERPYACPVESCDRRFSRSDNLVRHIRHTGQKP FQCRICMRNFSREDNLHHTHIRTHTGKPFACDICGRKFARSDELV

	RHTKIHRLRQKDRPYACPVESCDRRFSQSGNLTEHIRIHTGQKPFQC RICMRNFSTSGHLVRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQNSTLTEHT KIHRLRQKDK
SEQ ID NO: 431	RKYPNRPSKTPPHERPYACPVESCDRRFSRSDNLVRHIRIHTGQKP FQCRICMRNFSSHRTTLTNHIRTHTGEKPFACDICGRKFAREDNLH THIRTHTGEKPFACDICGRKFSTSHSLTEHIRIHTGQKPFQCRICMR NFSQSSSLVRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAREDNLHTHTKIHRLRQ KDKKADKSVV
SEQ ID NO: 432	QSQLIKPSRMRKYPNRPSKTPPHERPYACPVESCDRRFSRSDNLV RHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSSHRTTLTNHIRTHTGEKPFACDICG RKFAREDNLHTHTKIHRLRQKDRPYACPVESCDRRFSTSHSLTEHI RIHTGQKPFQCRICMRNFSQSSSLVRHIRTHTGEKPFACDICGRKF AREDNLHTHTKIHRLRQKDK
SEQ ID NO: 433	QSQLIKPSRMRKYPNRPSKTPPHERPYACPVESCDRRFSRSDNLV RHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSSHRTTLTNHIRTHTGEKPFACDICG RKFAREDNLHTHTKIHRLRQKDRPYACPVESCDRRFSTSHSLTEHI RIHTGQKPFQCRICMRNFSQSSSLVRHIRTHTGEKPFACDICGRKF AREDNLHTHTKIH
SEQ ID NO: 434	QSQLIKPSRMRKYPNRPSKTPPHERPYACPVESCDRRFSRSDNLV RHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSSHRTTLTNHIRTHTGEKPFACDICG RKFAREDNLHTHTKIHRLRQKDRPYACPVESCDRRFSTSHSLTEHI RIHTGQKPFQCRICMRNFSQSSSLVRHIRTHTGEKPFACDICGRKF AREDNLHTHTKIHRLRQKDK
SEQ ID NO: 435	RKYPNRPSKTPPHERPYACPVESCDRRFSRSDNLVRHIRIHTGQKP FQCRICMRNFSSHRTTLTNHIRTHTGEKPFACDICGRKFAREDNLH THIRTHTGEKPFACDICGRKFSTSHSLTEHIRIHTGQKPFQCRICMR NFSQSSSLVRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAREDNLHTHTKIHRLRQ KDKKADKSVV
SEQ ID NO: 441	RKYPNRPSKTPPHERPYACPVESCDRRFSRSDNLVRHIRIHTGQKP FQCRICMRNFSDNLHTHIRTHTGEKPFACDICGRKFARSDDELV RHIRTHTGEKPFACDICGRKFSQSGNLTEHIRIHTGQKPFQCRICM RNFSTSGHLVRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQNSTLTEHTKIHRLR QKDKKADKSVV
SEQ ID NO: 406	RKYPNRPSKTPPHERPYACPVESCDRRFSRSDNLVRHIRIHTGQKP FQCRICMRNFSSHRTTLTNHIRTHTGEKPFACDICGRKFAREDNLH HTHTKIHRLRQKDRPYACPVESCDRRFSTSHSLTEHIRIHTGQKPFQC RICMRNFSQSSSLVRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAREDNLHTHT KIHRLRQKDKKADKSVV
SEQ ID NO: 407	AAAKAEMQLMSPLQISDPFGSFPHSPTMDNYPKLEEMMLLSNGA PQFLGAAGAPEGSGSNSSSSSSGGGGGGGSSNSSSSSSTFNPQA DTGEQPYEHLTAESFPDISLNNEKVLVETSYPSQTTRLPPITYTGRF SLEPAPNSGNTLWPEPLFSLVSGLVSMTNPPASSSSAPSPAASSAS ASQSPPLSCAVPSNDSSPIYSAAPTFTPTNTDIFPEPQSQAFFPGSAG TALQYPPPAYPAAKGGFQVPMIPDYLPQQQGDGLGTPDQKPF QGLESRTQQPSLTPLSTIKAFATQSGSQDLKALNTSYQSQLIKPSR MRKYPNRPSKTPPHERPYACPVESCDRRFSRSDNLVRHIRIHTGQ KPFQCRICMRNFSDNLHTHIRTHTGEKPFACDICGRKFARSDDEL VRHTKIHRLRQKDRPYACPVESCDRRFSQSGNLTEHIRIHTGQKPF QCRICMRNFSTSGHLVRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQNSTLTE HTKIHRLRQKDKKADKSVVASSATSSLSSYSPVATSYSPVTTTYP SPATTSYSPVPTSFSSPGSSTYSPVHSGFSPSVATTYSSVPPAFP AQVSSFPSAVTNSFASSTGLSDMTATFSPRTIEIC

SEQ ID NO: 408	RPYACPVESCDRRFSDPGALVRHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSD NLVRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQSGDLRRHTKIHLRQKDRPY ACPVESCDRRFSTHLDLIRHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSTSGNLV RHIRTHTGEKPFACDICGRKFARSDNLVRHTKIHLRQKDRPYACP VESCDRRFSQSGHLTEHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSESHLREHI RTHHTGEKPFACDICGRKFAQAGHLASHTKIHLRQKD
SEQ ID NO: 409	RKYPNRPSKTPPHERPYACPVESCDRRFSRSDNLVRHIRIHTGQKP FQCRICMRNFSDNLHHTHIRTHTGEKPFACDICGRKFARSDDELV RHIRTHTGEKPFACDICGRKFSQSGNLTEHIRIHTGQKPFQCRICM RNFSTSGHLVRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQNSTLTEHTKIHLR QKDKKADKSVV
SEQ ID NO: 391	LEPGEKPYKCPECGKSFSDPGHLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSF STKNSLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDNDALTEHQRTHTGE KPYKCPECGKSFSESHLREHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSKKH LAEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTHLDLIRHQRTHTGEKPYKCP ECGKSFSQSGNLTEHQRTHTGKKTS
SEQ ID NO: 392	LEPGEKPYKCPECGKSFSSRRTCRAHQRTHTGEKPYKCPECGKSF STTGALTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDDELVRHQRTHTGEK PYKCPECGKSFSDNDALTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDGDL RRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTSHSLTEHQRTHTGKKTS
SEQ ID NO: 393	LEPGEKPYKCPECGKSFSDRDNLKNHQRTHTGEKPYKCPECGKS FSDPGALVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDNLHHTHQRTHTG EKPYKCPECGKSFSDPGALVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTSG ELVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDRDNLKNHQRTHTGKKTS
SEQ ID NO: 394	LEPGEKPYKCPECGKSFSDRSDNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSF SREDNLHHTHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDDELVRHQRTHTGE KPYKCPECGKSFSDQSGNLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTSGH LVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDQNSTLTEHQRTHTGKKTS
SEQ ID NO: 395	LEPGEKPYKCPECGKSFSSKKALTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSF SSPADLTRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDRSDNLVRHQRTHTGE KPYKCPECGKSFSDNLHHTHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDDEL LVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDQSGNLTEHQRTHTGEKPYKC PECGKSFSTSGHLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDQNSTLTEHQ RTHHTGKKTS
SEQ ID NO: 396	LEPGEKPYKCPECGKSFSSPADLTRHQRTHTGEKPYKCPECGKSF SRSDNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDNLHHTHQRTHTGE KPYKCPECGKSFSDDELVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDQSGN LTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTSGHLVRHQRTHTGKKTS
SEQ ID NO: 397	LEPGEKPYKCPECGKSFSSKKALTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSF SSPADLTRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDRSDNLVRHQRTHTGE KPYKCPECGKSFSDNLHHTHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDDEL LVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDQSGNLTEHQRTHTGKKTS
SEQ ID NO: 398	LEPGEKPYKCPECGKSFSDCRDLARHQRTHTGEKPYKCPECGKSF SRNDALTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDNDALTEHQRTHTGE KPYKCPECGKSFSSPADLTRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDPGN LVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDQRAHLERHQRTHTGEKPYKC PECGKSFSDQSSSLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDHRTTLTNHQ RTHHTGKKTS
SEQ ID NO: 399	LEPGEKPYKCPECGKSFSDNDALTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSF SSPADLTRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDPGNLVRHQRTHTGE KPYKCPECGKSFSDQRAHLERHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDQSS LVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDHRTTLTNHQRTHTGKKTS

SEQ ID NO: 400	LEPGEKPYKCPECGKSFSTKNSLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSF SRADNLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQLAHLRAHQRTHTGE KPYKCPECGKSFSTKNSLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFQAGH LASHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTHLDLIRHQRTHTGKKTS
SEQ ID NO: 401	LEPGEKPYKCPECGKSFSDALTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSF SDPGHLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTSGELVRHQRTHTGE KPYKCPECGKSFSTHLDLIRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSKKA LTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQLAHLRAHQRTHTGEKPYKC PECGKSFSDHLTNHQRTHTGKKTS
SEQ ID NO: 402	LEPGEKPYKCPECGKSFSDNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSF SHRTTLTNHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDNLHTEHQRTHTGE KPYKCPECGKSFSTSHSLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSSL VRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDNLHTEHQRTHTGKKTS
SEQ ID NO: 403	LEPGEKPYKCPECGKSFSDPGALVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSF SRSDNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSGDLRRHQRTHTGE KPYKCPECGKSFSTHLDLIRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTSGN LVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDNLVRHQRTHTGKKTS
SEQ ID NO: 404	LEPGEKPYKCPECGKSFQAGHLASHQRTHTGEKPYKCPECGKSF SREDNLHTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTSGNLTEHQRTHTGE KPYKCPECGKSFSTHLDLIRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFQKSS LIAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFQAGHLASHQRTHTGKKTS
SEQ ID NO: 405	LEPGEKPYKCPECGKSFSTGNLTVHQRTHTGEKPYKCPECGKSF STSGELVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDNLHTEHQRTHTGE KPYKCPECGKSFSTSGNLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSSL LVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFQRANLRAHQRTHTGKKTS

Таблица 14: Примеры ДНК-связывающих доменов, содержащих несколько цинковых пальцев, которые модулируют SCN1A

Количество ZF в DBD	DBD, содержащий приведенные ниже ZF (N-к-С концу):	Последовательности ZF:	DBD SEQ ID NO.
6	SEQ ID NO: 115 SEQ ID NO: 116 SEQ ID NO: 117 SEQ ID NO: 118 SEQ ID NO: 119 SEQ ID NO: 120	RSDNLVR; REDNLHT; RSDELVR; QSGNLTE; TSGHLVR; QNSTLTE	SEQ ID NO: 131
6	SEQ ID NO: 115 SEQ ID NO: 122 SEQ ID NO: 116 SEQ ID NO: 124 SEQ ID NO: 126 SEQ ID NO: 116	RSDNLVR; HRTTLTN; REDNLHT; TSHSLTE; QSSSLVR; REDNLHT	SEQ ID NO: 132
6	SEQ ID NO: 121 SEQ ID NO: 115 SEQ ID NO: 123 SEQ ID NO: 125 SEQ ID NO: 127 SEQ ID NO: 115	DPGALVR; RSDNLVR; QSGDLRR; THLDLIR; TSGNLVR; RSDNLVR	SEQ ID NO: 133
9	SEQ ID NO: 128 SEQ ID NO: 130 SEQ ID NO: 129	RRDELNV; RSDHLTN; RSDDLVR;	SEQ ID NO: 134

Количество ZF в DBD	DBD, содержащий приведенные ниже ZF (N-к-С концу):	Последовательности ZF:	DBD SEQ ID NO.
	SEQ ID NO: 115 SEQ ID NO: 122 SEQ ID NO: 116 SEQ ID NO: 124 SEQ ID NO: 126 SEQ ID NO: 116	RSDNLVR; HRTTLTN; REDNLHT; TSHSLTE; QSSSLVR; REDNLHT	

Таблица 15: Примеры последовательностей целевых участков для модуляции SCN1A

Целевая последовательность SEQ ID NO.	узнаваемая ZF или rPHK	Последовательности целевых участков SCN1A, узнаваемые eTF
SEQ ID NO: 35	ZF	CTAGGTCAAGTGTAGGAG
SEQ ID NO: 36	ZF	TAGGTACCATAGAGTGAG
SEQ ID NO: 37	ZF	TAGGTACCATAGAGTGAGGCGAGGATG
SEQ ID NO: 136	ZF	GAGGATACTGCAGAGGTC
SEQ ID NO: 252	ZF	CAAACCTCCCAGCCTGCCTGGC
SEQ ID NO: 253	ZF	CCAGCACTGGTGCTTCGT
SEQ ID NO: 254	ZF	AAGGCTGTCTAGGTCAAG
SEQ ID NO: 256	ZF	CTAGGTCAAGTGTAGGAGACACAC
SEQ ID NO: 257	ZF	GGTCAAGTGTAGGAGACA
SEQ ID NO: 258	ZF	CAAGTGTAGGAGACACAC
SEQ ID NO: 259	ZF	AGTGTAGGAGACACACTGCTGGCC
SEQ ID NO: 260	ZF	AGTGTAGGAGACACACTG
SEQ ID NO: 261	ZF	ACTTGACCTAGACAGCCT
SEQ ID NO: 262	ZF	AGGAGACACACTGCTGGCCTG
SEQ ID NO: 264	ZF	TGAATAACTCATTAGTGA
SEQ ID NO: 265	ZF	AAAGTACATTAGGCTAAT
SEQ ID NO: 105	rPHK	TGACCTAGACAGCCTTACATA
SEQ ID NO: 106	rPHK	TAAGGCTGTCTAGGTCAAGTG
SEQ ID NO: 108	rPHK	GATGAAGCCGAGAGGATACTG
SEQ ID NO: 109	rPHK	GCTGATTTGTATTAGGTACCA
SEQ ID NO: 110	rPHK	CTTCGTTATGTAAGGCTGTCT
SEQ ID NO: 107	rPHK	AAGGCTGTCTAGGTCAAGTGT
SEQ ID NO: 111	rPHK	CAAGTGTAGGAGACACACTGC
SEQ ID NO: 195	rPHK	CACTCATTGAGGACAGAAGCA
SEQ ID NO: 196	rPHK	ACAAAGTGGAGAGACTACCCG
SEQ ID NO: 197	rPHK	GGTACGGGCAAAGATTTCTTG
SEQ ID NO: 198	rPHK	TTTGCCCGTACCAAAGTCTTG
SEQ ID NO: 199	rPHK	TCTTCAGCCACAAAAA
SEQ ID NO: 200	rPHK	GTGTGCAACCCATGAGGTCGC
SEQ ID NO: 201	rPHK	ACACAATGAGCCACCTACAAG
SEQ ID NO: 202	rPHK	GTGGCTCATTGTGTGTGTGCC
SEQ ID NO: 203	rPHK	AGAAAGCTGATACAGATACAA
SEQ ID NO: 205	rPHK	AAACCAGCAACAACAGTATA
SEQ ID NO: 206	rPHK	GAGAATCATCTAGGTCAGGAC
SEQ ID NO: 207	rPHK	TTCTCAGTTTTGAAATTA
SEQ ID NO: 208	rPHK	CATATCCCTGCAGGTTACAGAA

Белок eTF SEQ ID NO:	Нукле иновая кислот а SEQ ID NO:	Последовательность нуклеиновой кислоты
		<p> gggtcacagatctgggggaacccccgggaaaagcactgaggcaaaaccgccgctcgtctcctacaat atatgggagggggaggttgagtacgttctggattactcataagaccttttttttccctccgggcgcaaaac cgtgagctggattataatcgccctataaagctccagaggcggtcaggcacctgcagaggagccccgc cgctccgcccgaactagctgccccgcgagcaacggcctcgtgattccccgccgatccgggtccccgcct ccccactctgccccgectacccccggagccgtgcagccgcctctccgaatctctctcttctcctggcgt cgcgtgcgagagggaaactagcagagaacgaggaagcagctggaggtgacgccgggcagattacgcc tgtcagggccgagccgagcggatcgtggcgctgtgcagaggaaaggcgggagtgcccggctcg ctgtcgcagagccgaggtgggtaagctagcaccacctggacttcccagcgcccaaccgtggctttc agccagctcctcctccccgggcttctcaaccaacccccatcccagcgccggccaccaacctcccga aatgagtgttctgccccagcagccgaaggcgctactaggaacggtaacctgttactttccaggggc cgtagtcgaccgctgcccagttgctgtgcgactgcgcgcgcccgggctagagtgaaggtgactgtg gttcttcttgccaagtccgagggagaacgtaaagatatgggcttttccccctctcacctgtctcacc aaagtcctagtccccggagcagtttagccttttcttccaggaattagccagacacaacaacgggaac cagacaccgaaccagacatgccccccccgctgcgccccccccgctcgtgcttctcctcttctgtctct ccagagccggatctcaaggggagcctccgtgccccggctgctcagtcctccgggtgagcaggacc cggaagtctccccgcacagctctcgttcttcttgcagcctgttctgcgcccggaccagtcgaggactct ggacagtagaggccccgggacgaccgagctgGAATTCGCCACCATGGCCCCAA AGAAGAAGCGGAAGGTTCGGTATCCACGGAGTCCCAGCAGCCC TCGAACCAGGTGAAAAACCTTACAAATGTCCTGAATGTGGGA AATCATTAGTCGCAGCGACAACCTGGTGAGACATCAACGCAC CCATACAGGAGAAAAACCTTATAAATGTCCAGAATGTGGAAA GTCCTTCTCACGAGAGGATAACTTGCACACTCATCAACGAACA CATACTGGTGAAAAACCATAACAAGTGTCCCGAATGTGGTAAA AGTTTTAGCCGGAGCGATGAACTTGTCCGACACCAACGAACCC ATACAGGCGAGAAGCCTTACAAATGTCCCGAGTGTGGCAAGA GCTTCTCACAAATCAGGGAATCTGACTGAGCATCAACGAACTCA TACCGGGGAAAAACCTTACAAGTGTCCAGAGTGTGGGAAGAG CTTTTCCACAAGTGGACATCTGGTACGCCACCAGAGGACACAT ACAGGGGAGAAGCCCTACAAATGCCCGAATGCGGTAAAAGT TTCTCTCAGAATAGTACCCTGACCGAACACCAGCGAACACACA CTGGGAAAAAACGAGTAAAAGGCCGGCGGCCACGAAAAAG GCCGGCCAGGCAAAAAAGAAAAAGGGATCCTACCCATACGAC GTACCAGATTACGCTCTCGAGGAGGCCAGCGGTTCCGGACGG GCTGACGCATTGGACGATTTTGATCTGGATATGCTGGGAAGTG ACGCCCTCGATGATTTTGACCTTGACATGCTTGGTTCGGATGCC CTTGATGACTTTGACCTCGACATGCTCGGCAGTGACGCCCTTG ATGATTTGACCTGGACATGCTGATTA ACTCTAGAAGTTCCGG ATCTCCGAAAAAGAAACGCAAAGTTGGTAGCCAGTACCTGCC CGACACCGACGACCGGCACCGGATCGAGGAAAAGCGGAAGCG GACCTACGAGACATTCAAGAGCATCATGAAGAAGTCCCCCTTC AGCGGCCCCACCGACCCTAGACCTCCACCTAGAAGAATCGCCG TGCCCAGCAGATCCAGCGCCAGCGTGCCAAAACCTGCCCCCA GCCTTACCCCTTACCAGCAGCCTGAGCACCATCAACTACGAC GAGTTCCTACCATGGTGTTCCTCCAGCGGCCAGATCTCTCAGG CCTCTGCTCTGGCTCCAGCCCCTCCTCAGGTGCTGCCTCAGGCT CCTGCTCCTGCACCAGCTCCAGCCATGGTGTCTGCACTGGCTC AGGCACCAGCACCCGTGCCTGTGCTGGCTCCTGGACCTCCACA </p>

Белок eTF SEQ ID NO:	Нукле иновая кислот а SEQ ID NO:	Последовательность нуклеиновой кислоты
		<p>tcttgcatacagcctcccaagtagctggaattacaggagtggcccaccatgccagctaatttttgattttta atagatacgggggttcacatatcaccaggctggtctcgaactcctggcctcaagtgatccacctgcc tcggcctcccaagtgctgggattataggcgtcagccactatgcccaaccgaccaacctttttaaaata aatatttaaaaaattggtatttcacatatatactagttttacattttaccacacaaaacggacgggcctccgc tgaaccagtgaggccccagacgtgcegcataaataaccctcgtgctgaccacctggggagagggg gaggaccacggtaatggagcagcgcataagcaaaaggacgcggggccttttctctgccggtggc actgggtagctgtggccaggtgtggtactttgatggggcccagggtggagctcaaggaagcgtcga gggtcacagatctgggggaaccccgggaaaagcactgaggcaaaaccgccctcgtctctacaat atatgggagggggaggttgatcgttctggattactcataagaccttttttttccctccgggcgcaaaa cgtgagctggattataatcgccctataaagctccagaggcggtcaggcacctgcagaggagccccgc cgctccgccgactagctgccccgcgagcaacggcctcgtgattccccgccgatccgggtccccgcct ccccactctgccccgcctaccccgagccgtgcagccgctctccgaatctctctctctctctggcgct cgcgtgcgagaggggaactagcgagaacgaggaagcagctggaggtgacgccgggcagattacgcc tgtcagggccgagccgagcggatcgtggcgctgtgcagaggaaagcggggagtgcccggctcg ctgtcgcagagccgaggtgggtaagctagcgaccacctggacttcccagcgeccaaccgtggctttt agccaggtcctctctctcccggttctcaaccaacccatcccagcgcggccaccaacctcccg aatgagtgcttctgccccagcagccgaaggcgtactaggaacggtaacctgttactttccaggggc cgtagtcgaccgctgcccagttgctgtgcgactgcgcgcgcccggctagagtgaaggtgactgtg gttcttcttgccaagtccgagggagaacgtaagafatgggccttttccccctctcacttgtctcacc aaagtccttagtccccggagcagttagccttttcttccaggaattagccagacacaacaacgggaac cagacaccgaaccagacatgccccccccgctgcgccccccccgctcgtcgtccttctcctcttctct ccagagccggatctcaaggggagcctccgtgccccggctgctcagtcctccgggtgagcaggacc cggaagtctccccgcacagctctcgttcttcttgcagcctgttctgcgcccggaccagtcgaggactc ggacagtagagggccccggagcagcagctgGAATTCGCCACCATGGCCCCAA AGAAGAAGCGGAAGGTTCGGTATCCACGGAGTCCCAGCAGCCC TCGAACCAGGTGAAAAACCTTACAAATGTCCTGAATGTGGGA AATCATTAGTCGCAGCGACAACCTGGTGAGACATCAACGCAC CCATACAGGAGAAAAACCTTATAAATGTCCAGAATGTGGAAA GTCCTTCTCACGAGAGGATAACTTGCACACTCATCAACGAACA CATACTGGTGAAAAACCATAACAAGTGTCCGAATGTGGTAAA AGTTTTAGCCGGAGCGATGAACTTGTCCGACACCAACGAACCC ATACAGGCGAGAAGCCTTACAAATGTCCCGAGTGTGGCAAGA GCTTCTCACAAATCAGGGAATCTGACTGAGCATCAACGAACTCA TACCGGGGAAAAACCTTACAAGTGTCCAGAGTGTGGGAAGAG CTTTTCCACAAGTGGACATCTGGTACGCCACCAGAGGACACAT ACAGGGGAGAAGCCCTACAAATGCCCCGAATGCGGTAAAAGT TTCTCTCAGAATAGTACCCTGACCGAACACCAGCGAACACACA CTGGGAAAAAACGAGTAAAAGGCCGGCGGCCACGAAAAAG GCCGGCCAGGCAAAAAAGAAAAAGGGATCCTACCCATACGAC GTACCAGATTACGCTCTCGAGGACGCGCTGGACGATTTTCGATC TCGACATGCTGGGTTCTGATGCCCTCGATGACTTTGACCTGGA TATGTTGGGAAGCGACGCATTGGATGACTTTGATCTGGACATG CTCGGCTCCGATGCTCTGGACGATTTTCGATCTCGATATGTTATA AACTAGTAAGCTTGGGTGGCATCCCTGTGACCCCTCCCCAGTG CCTCTCCTGGCCCTGGAAGTTGCCACTCCAGTGCCCACCAGCC TTGTCCTAATAAAATTAAGTTGCATCATTTTGTCTGACTAGGTG TCCTTCTATAAATATTATGGGGTGGAGGGGGGTGGTATGGAGCA</p>

Белок eTF SEQ ID NO:	Нукле иновая кислот а SEQ ID NO:	Последовательность нуклеиновой кислоты
		<p>cttcctctccccggctcctcgacctaccateccctgtgcacagtggettccccctccccgtgggtggcca ccacgtactcctctgttccccctgettccccggcccagggtcagcagettccccctcctcagetgtcaccaact ccttcagcgcctccacagggcttctggacatgacagcaacctttctcccaggacaattgaaatttgctaa ACTAGTAAGCTTGGGTGGCATCCCTGTGACCCCTCCCCAGTGC CTCTCCTGGCCCTGGAAGTTGCCACTCCAGTGCCCACCAGCCT TGTCCCTAATAAAATTAAGTTGCATCATTTTTGTCTGACTAGGTGT CCTTCTATAATATTATGGGGTGGAGGGGGGTGGTATGGAGCAA GGGGCAAGTTGGGAAGACAACCTGTAGGGCCTGCGGGGTCTA TTGGGAACCAAGCTGGAGTGCAGTGGCACAATCTTGGCTCACT GCAATCTCCGCCTCCTGGGTTCAGCGATTCTCCTGCCTCAGCC TCCCGAGTTGTTGGGATTCCAGGCATGCATGACCAGGCTCAGC TAATTTTTGTTTTTTTGGTAGAGACGGGGTTTCACCATATTGGC CAGGCTGGTCTCCAACCTCCTAATCTCAGGTGATCTACCCACCTT GGCCTCCCAAATTGCTGGGATTACAGGCGTGAACCACTGCTCC CTTCCCTGTCCTT</p>
	SEQ ID NO: 442	<p>ATGGCCCCAAAGAAGAAGCGGAAGGTTCGGTATCCACGGAGTC CCAGCAGCCCTCGAACCAGGTGAAAAACCTTACAAATGTCCTG AATGTGGGAAATCATTTCAGTCGCAGCGACAACCTGGTGAGAC ATCAACGCACCCATACAGGAGAAAAACCTTATAAATGTCCAG AATGTGGAAAGTCCTTCTCACGAGAGGATAACTTGCACACTCA TCAACGAACACATACTGGTGAAAAACCATACAAGTGTCCCGA ATGTGGTAAAAGTTTTAGCCGGAGCGATGAACTTGTCCGACAC CAACGAACCCATACAGGCGAGAAGCCTTACAAATGTCCCGAG TGTGGCAAGAGCTTCTCACAATCAGGGAATCTGACTGAGCATC AACGAACTCATACCGGGGAAAAACCTTACAAGTGTCCAGAGT GTGGGAAGAGCTTTTCCACAAGTGGACATCTGGTACGCCACCA GAGGACACATACAGGGGAGAAGCCCTACAAATGCCCCGAATG CGGTAAAAGTTTTCTCTCAGAATAGTACCCTGACCGAACACCAG CGAACACACACTGGGAAAAAAACGAGTAAAAGGCCGGCGGCC ACGAAAAAGGCCGGCCAGGCAAAAAAGAAAAAGGGATCCTA CCCATACGACGTACCAGATTACGCTCTCGAGGAGGCCAGCGGT TCCGGACGGGCTGACGCATTGGACGATTTTGATCTGGATATGC TGGAAGTGACGCCCTCGATGATTTTGACCTTGACATGCTTGG TTCGGATGCCCTTGATGACTTTGACCTCGACATGCTCGGCAGT GACGCCCTTGATGATTTTCGACCTGGACATGCTGATTAACCTTA GAAGTTCCGGATCTCCGAAAAAGAAACGCAAAGTTGGTAGCC AGTACCTGCCCAGACCCGACGACCGGCACCGGATCGAGGAAA AGCGGAAGCGGACCTACGAGACATTCAAGAGCATCATGAAGA AGTCCCCCTTCAGCGGCCCCACCGACCCTAGACCTCCACCTAG AGAATCGCCGTGCCAGCAGATCCAGCGCCAGCGTGCCAAA ACCTGCCCCCAGCCTTACCCCTTACCAGCAGCCTGAGCACC ATCAACTACGACGAGTTCCCTACCATGGTGTTCACCAGCGGCC AGATCTCTCAGGCCTCTGCTCTGGCTCCAGCCCCTCCTCAGGTG CTGCCTCAGGCTCCTGCTCCTGCACCAGCTCCAGCCATGGTGT CTGCACTGGCTCAGGCACCAGCACCCGTGCCTGTGCTGGCTCC TGGAACCTCCACAGGCTGTGGCTCCACCAGCCCCTAACCTACA CAGGCCGGCGAGGGCACACTGTCTGAAGCTCTGCTGCAGCTGC</p>

Белок eTF SEQ ID NO:	Нуклеиновая кислота SEQ ID NO:	Последовательность нуклеиновой кислоты
		AGTTCGACGACGAGGATCTGGGAGCCCTGCTGGGAAACAGCA CCGATCCTGCCGTGTTACACCGACCTGGCCAGCGTGGACAACAG CGAGTTCCAGCAGCTGCTGAACCAGGGCATCCCTGTGGCCCCT CACACCACCGAGCCCATGCTGATGGAATACCCCGAGGCCATCA CCCGGCTCGTGACAGGCGCTCAGAGGCCTCCTGATCCAGCTCC TGCCCCTCTGGGAGCACCAGGCCTGCCTAATGGACTGCTGTCT GCGACGAGGACTTCAGCTCTATCGCCGATATGGATTTCTCAG CCTTGCTGGGCTCTGGCAGCGGCAGCCGGGATTCCAGGGAAG GGATGTTTTTGCCGAAGCCTGAGGCCGGCTCCGCTATTAGTGA CGTGTGTTGAGGGCCGCGAGGTGTGCCAGCCAAAACGAATCCG GCCATTTTCATCCTCCAGGAAGTCCATGGGCCAACCGCCACTC CCCGCCAGCCTCGCACCAACACCAACCGGTCCAGTACATGAGC CAGTCGGGTCACTGACCCCGGCACCAGTCCCTCAGCCACTGGA TCCAGCGCCCGCAGTGAATCCCGAGGCCAGTACCTGTTGGAG GATCCCGATGAAGAGACGAGCCAGGCTGTCAAAGCCCTTCGG GAGATGGCCGATACTGTGATTCCCCAGAAGGAAGAGGCTGCA ATCTGTGGCCAAATGGACCTTTCCCATCCGCCCCCAAGGGGCC ATCTGGATGAGCTGACAACCACACTTGAGTCCATGACCGAGGA TCTGAACCTGGACTCACCCCTGACCCCGGAATTGAACGAGATT CTGGATACCTTCTGAACGACGAGTGCCTCTTGCATGCCATGC ATATCAGCACAGGACTGTCCATCTTCGACACATCTCTGTTT
	SEQ ID NO: 443	ATGGCCCCAAAGAAGAAGCGGAAGGTCCGGTATCCACGGAGTC CCAGCAGCCCTCGAACCAGGTGAAAAACCTTACAAATGTCCTG AATGTGGGAAATCATTAGTCGCAGCGACAACCTGGTGAGAC ATCAACGCACCCATACAGGAGAAAAACCTTATAAATGTCCAG AATGTGGAAAGTCCTTCTCACGAGAGGATAACTTGCACACTCA TCAACGAACACATACTGGTGAAAAACCATAACAAGTGTCCCGA ATGTGGTAAAAGTTTTAGCCGGAGCGATGAACTTGTCCGACAC CAACGAACCCATACAGGCGAGAAGCCCTTACAAATGTCCCGAG TGTGGCAAGAGCTTCTCACAAATCAGGGAATCTGACTGAGCATC AACGAACTCATAACGGGGGAAAAACCTTACAAGTGTCCAGAGT GTGGGAAGAGCTTTTCCACAAGTGGACATCTGGTACGCCACCA GAGGACACATACAGGGGAGAAGCCCTACAAATGCCCCGAATG CGGTAAAAGTTTCTCTCAGAATAGTACCCTGACCGAACACCAG CGAACACACACTGGGAAAAAAACGAGTAAAAGGCCGGCGGCC ACGAAAAAGGCCGGCCAGGCAAAAAAGAAAAAGGGATCCTA CCCATACGACGTACCAGATTACGCTCTCGAGGACGCGCTGGAC GATTTTCGATCTCGACATGCTGGGTTCTGATGCCCTCGATGACTT TGACCTGGATATGTTGGGAAGCGACGCATTGGATGACTTTGAT CTGGACATGCTCGGCTCCGATGCTCTGGACGATTTTCGATCTCG ATATGTTA
	SEQ ID NO: 444	ATGGCCCCAAAGAAGAAGCGGAAGGTCCGGTATCCACGGAGTC CCAGCAGCCCTCGAACCAGGTGAAAAACCTTACAAATGTCCTG AATGTGGGAAATCATTAGTCGCAGCGACAACCTGGTGAGAC ATCAACGCACCCATACAGGAGAAAAACCTTATAAATGTCCAG AATGTGGAAAGTCCTTCTCACGAGAGGATAACTTGCACACTCA TCAACGAACACATACTGGTGAAAAACCATAACAAGTGTCCCGA

Белок eTF SEQ ID NO:	Нуклеиновая кислота SEQ ID NO:	Последовательность нуклеиновой кислоты
		<p>ATGTGGTAAAAGTTTTAGCCGGAGCGATGAACTTGTCCGACAC CAACGAACCCATACAGGCGAGAAGCCTTACAAATGTCCCGAG TGTGGCAAGAGCTTCTCACAATCAGGGAATCTGACTGAGCATC AACGAACTCATAACGGGGGAAAAACCTTACAAGTGTCCAGAGT GTGGGAAGAGCTTTTCCACAAGTGGACATCTGGTACGCCACCA GAGGACACATACAGGGGAGAAGCCCTACAAATGCCCCGAATG CGGTAAAAGTTTCTCTCAGAATAGTACCCTGACCGAACACCAG CGAACACACACTGGGAAAAAAACGAGTAAAAGGCCGGCGGCC ACGAAAAGGCCGGCCAGGCAAAAAGAAAAGGGGATCCTA CCCATACGACGTACCAGATTACGCTCTCGAGGACGCGCTGGAC GATTTTCGATCTCGACATGCTGGGTTCTGATGCCCTCGATGACTT TGACCTGGATATGTTGGGAAGCGACGCATTGGATGACTTTGAT CTGGACATGCTCGGCTCCGATGCTCTGGACGATTTTCGATCTCG ATATGTTA</p>
	SEQ ID NO: 445	<p>ATGGccgcgcccaaggccgagatgcagctgatgtccccgctgcagatcttgaccggttcggatcc tttctcactgcccaccatggacaactaccctaagctggaggagatgatgctgctgagcaacggggct ccccagtctcggcgccgccccggggccccagagggcagcggcagcaacagcagcagcagcagca gccccggcggtggaggcgccggggcgccgagcaacagcagcagcagcagcagcacctcaacc tcaggcggacacggcgagcagccctacgagcacctgaccgagagcttttctgacatctctgaa caacgagaaggtgctggaggagaccagttaccagccaaaccactgactgcccccatcaactata ctggccgctttccctggagcctgacccaacagtggcaacacctgtggcccagagccctcttcagctt ggtcagtggcctagtgagcatgaccaaccaccggcctcctgctcctcagcaccatctccagcggcctc ctccgctccgctccagagcccaccctgagctgcgagtgccatcaacgacagcagtcctcattta ctcagcggcaccaccctccccacgccaactgacatftccctgagccacaaagccagccttccc gggctcggcagggacagcgtccagtagccgctcctgctaccctgcccgaagggtggttccag gttccatgatccccgactacctgtttccacagcagcaggggatctgggctgggcacccagacca gaagccctccagggcctggagagccgaccagcagccttcgctaaccctctgtctactatfaaggc ctttgccactcagtcgggctcccaggacctgaaggccctcaataccagctaccagctcccagctcatca accagccgatgcgcaagtacccaaccggcccagcaagacgccccccacgaacgcccctacgc ttgccagtgagtcctgtgatcgccgcttctccCGCAGCGACAACCTGGTGAGAc catccgatccacacagggcagaagccctccagtgccgatctgatGAAaactcagcCGA GAGGATAACTTGCACACTcacatccgacccacacaggcgaagcccttcgctg gacatctgtgaagaaagttgccCGGAGCGATGAACTTGTCCGAcataccaagatc cacttggcgagaggaccgcccctacgcttcccagtgagtcctgtgatcgccgcttctccCAAT CAGGGAATCTGACTGAGcacatccgatccacacagggcagaagccctccagtgcc gcatctgatGAAaactcagcACAAGTGGACATCTGGTACGCCacatccgca cccacacagggcgaagcccttcgctgacatctgtgaagaaagttgccCAGAATAGT ACCCTGACCGAAcataccaagatecacttgcggcagaaggacaagaaagcagacaaaagt gttgGCTAGCtcggccacctctctctctcttctaccggtccccgggtgctacctctaccgctcc ccggttactacctttatccatccccggccaccacctataccatcccctgtgccacctctctctctc ccgctctcagactaccatcccctgtgacagtggttccccctcccgtgggtggccaccagctactc ctctgttccccctgcttcccggcccaggctcagcagcttcccttctcagctgtaccaactcttcagcgc ctccacagggcttccggacatgacagcaacctttctcccaggacaattgaaattgc</p>
	SEQ ID NO: 446	<p>ATGGCCgcccagaccactgatgctcgcgagggtaccgctgggtgcagaggccgcccgtccgcc gcccggcccctatggcctcatgctcggactctgcccggctacgcccggggcccgggctggacagtg ggctgaggcccggggggctccgctggggccgcccgcgccccgcaaccggggccctggcgta cggggccttcgggcccgcctctcttccagcccttccggccgtgctccgcccggccgggcatcg</p>

Белок eTF SEQ ID NO:	Нукле иновая кислот а SEQ ID NO:	Последовательность нуклеиновой кислоты
		<p>cgcacctgcagcctgtggcgacgccgtaccccggccgcgcggccgcgcccccaacgctccggga ggcccccgggcccgagccggcccaagcggcgcagccccgcccgcgcccgcgacgccttgg gcgcatggacgccgaactcatcgacgaggaggcgtgacgtcgtggagctggagctggggctgc accgctgcgcgagctgcccagctgttctgggccagagcgagttcgactgcttctggacttgggg ccgcccggccggtccgtgagctgcggtggttctggtggtggttctggtcagtcaccagctcatca aaccagccgcatgcgcaagtacccaaccggcccagcaagacgccccccacgaacgcccttacg cttggccagtggagctctgtgatgccgcttctccCGCAGCGACAACCTGGTGAGAc acatccgcatccacacaggccagaagcccttccagtgccgcatctgcatgAGAAacttcagcCGA GAGGATAACTTGCACACTcatatccgacccacacaggcgaagcccttcgctgc gacatctgtggaagaaagttgccCGGAGCGATGAACTTGTCCGAcataccaagatc cacttggcgagaaggaccgccccttacgcttcccagtgagctctgtgatgccgcttctccCAAT CAGGGAATCTGACTGAGcacatccgcatccacacaggccagaagcccttccagtgcc gcatctgcatgAGAAacttcagcACAAGTGGACATCTGGTACGCcacatccgca cccacacaggcgaaaagcccttcgctgcgacatctgtggaagaaagttgccCAGAATAGT ACCCTGACCGAAcataccaagatccacttgcggcagaaggacaagCTCGAGatggcc gaccactgatgctcggcagggtaccgctggtgcagaggccgcccgtccgcccggccgccc ggccctcatgcctccggactctgccgctacgcccggccgcccggcctggacagtgggctgaggccg cggggggctccgctggggccgcccggcccggcccaaccggggccctggcgtacgggcccctcgg gcccgtcctcctccagccccttccggcctgctccgcccggcggggcagcgcgacctgcagc ctgtggcgacgccgtaccccggccgcgcccggcgcgcccccaacgctccgggaggccccccgggc ccgacggcccccgaagcggcgagccccggcccggccgcccggcagccctggggcggcatggagc ccgaactcatcgacgaggaggcgtgacgtcgtggagctggagctggggctgcaccgctgcgcg agctcccagctgttctgggccagagcgagttcgactgcttctcgacttggggtccgcccggcc gcccgtccgtgagctgc</p>
	SEQ ID NO: 447	<p>ATGGccgcgccaaggccgagatgcagctgatgtccccgctgcagatcttgaccgttcggatcc tttctcactgcccaccatggacaactaccctaagctggaggagatgatgctgtgagcaacggggct ccccagttctcggcggccggggggccccagaggcgagcggcagcaacagcagcagcagcagca gccccgggggtggaggcggcggggggcggcagcaacagcagcagcagcagcagcagcacttcaacc tcaggcggacacgggcgagcagccctacgagcactgaccgcagagcttttctgacatctctgaa caacgagaaggtgctggtggagaccagttaccccagccaaaccactgactgcccccatcactata ctggccgctttccctggagcctgacccaacagtggaacaccttggcccagcccccttctcagctt ggtcagtgccctagtgagcatgaccaaccaccggcctcctcgtcctcagcaccatctccaggcctc ctccgctccgctcccagagcccaccctgagctgcgagtgccatccaacgacagcagtccttca ctcagcggcaccacactccccacggcgaactgacatfttccctgagccaaaagccaggccttccc gggctcggcagggacagcgtccagtagccgctcctgctaccctgcccgaagggtggcttccag gttcccatgatccccgactacctgttccacagcagcaggggatctggcctgggcaccccagacca gaagccctccaggcctggagagccgaccagcagccttcgtaaccctctgtctactattaaggc ctttgccactcagtcgggctcccaggacctgaaggccctcaalaccagctaccagtcccagctcatca accagccgcatgcgcaagtacccaaccggcccagcaagacgccccccacgaacgcccttacgc ttgcccagtgagctctgtgatgccgcttctccCGCTCAGACAACCTCGTTTCGAcac atccgcatccacacaggccagaagcccttccagtgccgcatctgcatgAGAAacttcagcCACC GGACTACACTCACGAACcacatccgacccacacaggcgaagcccttcgctgcg acatctgtggaagaaagttgccAGAGAAGACAATCTCCATACTCACATCCG GACACACACGGGAGAGAAGCCATTCGCATGtGATATATGTGGG AGAAAGTTCTCCACCAGCCATTCTCTCACTGAAcacatccgcatccaca caggccagaagcccttccagtgccgcatctgcatgAGAAacttcagcCAGTCTAGCTCA CTGGTGAGGcacatccgacccacacaggcgaagcccttcgctgcgacatctgtggaag</p>

Белок eTF SEQ ID NO:	Нукле иновая кислот а SEQ ID NO:	Последовательность нуклеиновой кислоты
		<p>aaagtttgccAGGGAGGATAACCTGCATACGcataccaagatecacttgcggcaga aggacaagaaagcagacaaaagtgtgtgGCTAGCtcggccacctctctctcttctaccctgc cccgggtgtacctcttaccctgccccgggtactactcttaccatccccggccaccactcataccatc ccctgtgcccacctctctctctctccccggctctctgacctaccatccccctgtgcacagtggcttcccctc cccgtcgggtggccaccacgtactctctgttccccctgtttccccggcccagtcagcagcttcccttct cagctgtcaccactcctcagcgcctccacagggctttcggacatgacagcaaccttttctcccaggac aattgaaatttgc</p>
	SEQ ID NO: 448	<p>ATGGCCgccgaccacctgatgctcgcggaggctaccgctggtgcagaggccgccgtccgcc gccgccgcccattggcctcatgcgctccggactctgccgccgtacgcggggcccgggctggacagt ggctgaggcccggggggctccgctggggccgccgccgccccgcaaccggggccctggcgta cggggccttcggggccgccgtctctctccagccctttccggcgtgctccgccggccgcgggcatc cgcacctgcagcctgtggcgacgccgtacccggccgcgcggccgcgcccccaacgctccggga ggccccggggccgcagccggccccaaagcgcgcagccccgcccgcgcccgcacgcctgg gggcatggacgccgaactcatcgacgaggaggcgtgacgtcgtggagctggagctggggtgc accgctgcccgcagctgcccagctgttctgggccaagcgcagttcagctgcttctggacttgggt ccgcccggcccggctccgctgagctgcggtggttctggtggtggttctggtcagctccagctcatca aaccagccgatgcgaagtacccaaccggcccagcaagacgccccccacgaacgcccctacg cttggccagtgagctctgtgatgccgcttccCGCAGCGACAACCTGGTGAGAc acatccgatccacacaggccagaagccctccagtgccgatctgcatGAGaaactcagcCGA GAGGATAACTTGCACACTcatatccgacccacacaggcgaagcccttcgctgc gacatctgtggaagaaagtttgcCGGAGCGATGAACTTGTCCGAcataccaagatc cacttgggcagaaggaccgcccctacgcttcccagtgaggctctgtatcgcgcttctccCAAT CAGGGAATCTGACTGAGcatatccgatccacacaggccagaagccctccagtgcc gatctgcatGAGaaactcagcACAAGTGGACATCTGGTACGCcatatccga ccccacagcgaagcccttcgctgcgacatctgtggaagaaagtttgcCAGAATAGT ACCCTGACCGAAcataccaagatccacttgcggcagaaggacaag</p>
	SEQ ID NO: 449	<p>ATGGCCgccgaccacctgatgctcgcggaggctaccgctggtgcagaggccgccgtccgcc gccgccgcccattggcctcatgcgctccggactctgccgccgtacgcggggcccgggctggacagt ggctgaggcccggggggctccgctggggccgccgccgccccgcaaccggggccctggcgta cggggccttcggggccgccgtctctctccagccctttccggcgtgctccgccggccgcgggcatc cgcacctgcagcctgtggcgacgccgtacccggccgcgcggccgcgcccccaacgctccggga ggccccggggccgcagccggccccaaagcgcgcagccccgcccgcgcccgcacgcctgg gggcatggacgccgaactcatcgacgaggaggcgtgacgtcgtggagctggagctggggtgc accgctgcccgcagctgcccagctgttctgggccaagcgcagttcagctgcttctggacttgggt ccgcccggcccggctccgctgagctgcggtggttctggtggtggttctggtcagctccagctcatca aaccagccgatgcgaagtacccaaccggcccagcaagacgccccccacgaacgcccctacg cttggccagtgagctctgtgatgccgcttccCGCTCAGACAACCTCGTTCGAc catccgatccacacaggccagaagccctccagtgccgatctgcatGAGaaactcagcCAC CGGACTACACTCACGAACcatatccgacccacacaggcgaagcccttcgctgc gacatctgtggaagaaagtttgcAGAGAAGACAATCTCCATACTcataccaagatc cacttgggcagaaggaccgcccctacgcttcccagtgaggctctgtatcgcgcttctccACCA GCCATTCTCTCACTGAAcatatccgatccacacaggccagaagccctccagtgccc catctgcatGAGaaactcagcCAGTCTAGCTCACTGGTGAGGcatatccgacc cacacaggcgaagcccttcgctgcgacatctgtggaagaaagtttgcAGGGAGGATA ACCTGCATACGcataccaagatccacttgcggcagaaggacaagCTCGAGatggccg accacctgatgctcgcggaggctaccgctggtgcagaggccgccgtccgcccggcccattg gccctcatgcgctccggactctgccgccgtacgcggggcccgggctggacagtgggtgaggccgc</p>

Белок eTF SEQ ID NO:	Нуклеиновая кислота SEQ ID NO:	Последовательность нуклеиновой кислоты
		<p>ggggggctccgctggggccgccgccccccaaccggggccctggcgtacggggccttcggg ccgccgtcctcctccagcccttccggccgtgctccgccggccgcgggcatcgcgcacctcagcc tgtggcgacgccgtacccggccgcgcggccgcgcccccaacgtccgggagggccccggggcc cgcagccggccccaaagcggcgagccccgccgccccgcgcacgccctggggggcatggagcc cgaactatcgcagaggaggcgtgacgtcgtggagctggagctggggctgcaccgctgcgcga gctgcccagctgttctgggccaagagcgagttcgactgcttctcgactgggggtccgcgccccc ccggctccgtgagctgc</p>
	SEQ ID NO: 450	<p>ATGGCCgccgaccactgatgctgccgaggctaccgctggtgcagaggccgccgtccgcc gccgccgccatggcctcatgctcggactctgccgccgtacgcggggccgggctggacagt ggctgaggccgcggggggctccgctggggccgccgccccccaaccggggccctggcgta cggggccttcggggccgccgtcctcctccagcccttccggccgtgctccgccggccgcgggcatc cgacctgcagcctgtggcgacgccgtacccggccgcgcggccgcgcccccaacgtccggga ggccccggggccgcagccggccccaaagcggcgagccccgcgcccgcgcacgccctgg ggggcatggagccgaactatcgcagaggaggcgtgacgtcgtggagctggagctggggctgc accgctgcgcgagctgcccagctgttctgggccaagagcgagttcgactgcttctcgactgggg ccgcgcccccggcctccgtgagctgcggtggttctggtggtggttctggtcagtcaccgtcatca aaccagccgatgcgaagtacccaaccggcccagaagacgcccccaacgaacgcccttacg cttcccagtgaggctctgtgatgccgcttccCGCTCAGACAACCTCGTTTCGAc caccgcatccacagggcagaagccctccagtggcgcactctgatgAGAaactcagcCAC CGGACTACACTCACGAACccatccgcaccacacaggcgaaaagcccttcgctgc gacatctgtgaagaaagtttccAGAGAAGACAATCTCCATACTcataccaagatc cacttggggcagaaggaccgcccttacgcttcccagtgaggctctgtgatcggcgttctccACCA GCCATTCTCTCACTGAACacatccgcacccacacagggcagaagccctccagtggc catctgatgAGAaactcagcCAGTCTAGCTCACTGGTGAGGccatccgcacc cacacaggcgaaaagcccttcgctgcgacatctgtgaagaaagtttccAGGGAGGATA ACCTGCATACGcataccaagatccacttgcggcagaaggacaag</p>
	SEQ ID NO: 451	<p>ATGGccgggccaaggccgagatgcagctgatgtccccgctgcagatctctgaccgcttcggatcc ttcctcactcgeccaccatggacaactaccctaagctggaggagatgatgctgagcaacggggt cccagttcctcggcggccggggggccccagagggcagcggcagcaacagcagcagcagcagca gcggggggcgggtggaggcggcggggggcggcagcaacagcagcagcagcagcagcaccctcaacc tcaggcggacacgggcgagcagccctacgagcactgaccgcagagcttttctgacatctctctgaa caacgagaaggtgctggtggagaccagttacccagccaaccactgactgcccccatcacctata ctggccgctttccctggagcctgcaccaacagtggcaacacctgtggcccagcctcttcagctt ggtcagtgccctagtgagcatgaccaaccaccggcctcctgctcctcagcaccatctccagcggcctc ctcegcctccgctccagagcccaccctgagctgcgcagtccatccaacgacagcagtcctctta ctcagcggcaccaccctccccacgccgaactgacatttccctgagccaaaagccagggcctccc gggctcggcagggacagcgtccagtaaccgctcctgctaccctgccgccaagggtggcttccag gttcccatgatccccgactacctgttccacagcagcagggggatctgggctgggacccccagacca gaagccctccagggcctggagagccgcaccagcagccttcgtaaccctctgtctactattaaggc ctttgccactcagtcgggctcccaggacctgaaggccctcaataaccagctaccagtcacagctcatca accagccgcatgcgaagtacccaaccggcccagcaagacgcccccaacgaacgcccttacgc ttgccagtgagctctgtgatcggcgttctccCGCAGCGACAACCTGGTGAGAc caccgcatccacagggcagaagccctccagtggcgcactctgatgAGAaactcagcCGA GAGGATAACTTGCACACTccatccgcaccacacaggcgaaaagcccttcgctgc gacatctgtgaagaaagtttccCGGAGCGATGAACTTGTCCGAcataccaagatc cacttggggcagaaggaccgcccttacgcttcccagtgaggctctgtgatcggcgttctccCAAT CAGGGAATCTGACTGAGccatccgcacccacacagggcagaagccctccagtgcc</p>

eTF SEQ ID NO:	Последовательности белка eTF
	ECGKSFSQSSSLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSREDNLHTHQRTHTGKKT SKRPAATKKAGQAKKKKGSYPYDVPDYALEEASGSGRADALDDFDL DMLGSDALDDFDLMLGSDALDDFDLMLGSDALDDFDLMLGSDALDDFDL DMLNSRSSGSPKKRKRKVGVSQYLPDTDDRHRIEEKRKRTYETFKSIMK KSPFSGPTDPRPPRRIAVPSRSSASVPKPAPQYPFTSSLSTINYDEFPT MVFPSGQISQASALAPAPPQVLPQAPAPAPAPAMVSALAQAPAPVPV LAPGPPQAVAPPAPKPTQAGEGTLSEALLQLQFDDDELGALLGNSTD PAVFTDLASVDNSEFQQLLNQGIPVAPHTTEPMLMEYPEAITRLVTGA QRPPDPAPAPLGAPGLPNGLLSGDEDFSSIADMDFSALLGSGSGSRDS REGMFLPKPEAGSAISDVFEGREVCQPKRIRPFHPPGSPWANRPLPAS LAPPTGPVHEPVGSLTPAPVPQPLDPAPA VTPPEASHLLEDPDEETSQ AVKALREMA DTVIPQKEEA AICGQMDLSHPPPRGHLDELTTTLESMT EDLNLDSP LTP ELNEILD TFLNDECLLHAMHISTGLSIFDTSLF
SEQ ID NO: 310	MAPKKRKRKVGIHGVPAALEPGEKPYKCPECGKSFSRSDNLVRHQRT HTGEKPYKCPECGKSFSHRTTLTNHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRE DNLHTHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSTSHSLTEHQRTHTGEKPYKCP ECGKSFSQSSSLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSREDNLHTHQRTHT GKKT SKRPAATKKAGQAKKKKGSYPYDVPDYALEDALDDFDLDM LGSDALDDFDLMLGSDALDDFDLMLGSDALDDFDLML
SEQ ID NO: 311	MAPKKRKRKVGIHGVPAALEPGEKPYKCPECGKSFSRRDELNVHQRT HTGEKPYKCPECGKSFSRSDHLTNHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRS DDLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSDNLVRHQRTHTGEKPYKC PEGKSFHRTTLTNHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSREDNLHTHQRT HTGEKPYKCPECGKSFSSTSHSLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSS SLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSREDNLHTHQRTHTGKKT SKRPA ATKKAGQAKKKKGSYPYDVPDYALEEASGSGRADALDDFDLMLG SDALDDFDLMLGSDALDDFDLMLGSDALDDFDLMLNSRSSGSP PPKRKRKVGVSQYLPDTDDRHRIEEKRKRTYETFKSIMKKSPFSGPTDPR PPRRIA VPSRSSASVPKPAPQYPFTSSLSTINYDEFPTMV FPSGQISQ ASALAPAPPQVLPQAPAPAPAPAMVSALAQAPAPVPV LAPGPPQAVA PPAPKPTQAGEGTLSEALLQLQFDDDELGALLGNSTDPAVFTDLASV DNSEFQQLLNQGIPVAPHTTEPMLMEYPEAITRLVTGAQRPPDPAPAP LGAPGLPNGLLSGDEDFSSIADMDFSALLGSGSGSRDSREGMFLPKPE AGSAISDVFEGREVCQPKRIRPFHPPGSPWANRPLPASLAPPTGPVHE PVGSLTPAPVPQPLDPAPA VTPPEASHLLEDPDEETSQAVKALREMA DTVIPQKEEA AICGQMDLSHPPPRGHLDELTTTLESMTEDLNLDSP LTP ELNEILD TFLNDECLLHAMHISTGLSIFDTSLF
SEQ ID NO: 312	MAPKKRKRKVGIHGVPAALEPGEKPYKCPECGKSFSRRDELNVHQRT HTGEKPYKCPECGKSFSRSDHLTNHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRS DDLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSDNLVRHQRTHTGEKPYKC PEGKSFHRTTLTNHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSREDNLHTHQRT HTGEKPYKCPECGKSFSSTSHSLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSS SLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSREDNLHTHQRTHTGKKT SKRPA ATKKAGQAKKKKGSYPYDVPDYALEDALDDFDLMLGSDALDDFD LDMLGSDALDDFDLMLGSDALDDFDLML
SEQ ID NO: 313	MAAKAEMQLMSPLQISDPFGSFPHSPTMDNYPKLEEMMLLSNGAP QFLGAAGAPEGSGSNSSSSSSGGGGGGGGNSSSSSSSTFN PQADTGE QPYEHLTAESFPDISLNNEKVLVETSYPSTTRLPPIY TGRFSLEPAPN SGNLWPEPLFSLVSGLVSM TNPPASSSSAPSPAASSASASQSPPLSCA VPSNDSSPIYSAAPTFTPN TDIFPEPQSQA FPGSAGTALQYPPPAYPA

eTF SEQ ID NO:	Последовательности белка eTF
	AKGGFQVPMIPDYLFPPQQQDLGLGTPDQKPFQGLSRTQQPSLTPLS TIKAFATQSGSQDLKALNTSYQSQLIKPSRMRYPNRPSKTPPHERPY ACPVESCDRRFSRSDNLVRHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSREDNLHHT IRHTHTGKPFACDICGRKFARSDELVRHTKIHLRQKDRPYACPVESCD RRFSQSGNLTEHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSTSGHLVRHIRTHTGKPF FACDICGRKFAQNSTLTEHTKIHLRQKDKKADKSVVASSATSSLSSYP SPVATSYSPVTTTSYSPATTSYSPVPTSFSSPGSSSTYSPVHSGFPPSPS VATTYSSVPPAFPAQVSSFPSSAVTNSFSASTGLSDMTATFSPRTIEIC
SEQ ID NO: 314	MAAKAEMQLMSPLQISDPFGSFPHSPTMDNYPKLEEMMLLSNGAP QFLGAAGAPEGSGSNSSSSSSSGGGGGGGGSSNSSSSSSTFNPQADTGE QPYEHLTAESFPDISLNNEKVLVETSYPSTTRLPITYTGRFSLEPAPN SGNTLWPEPLFSLVSGLVSMTNPPASSSSAPSPAASSASASQSPPLSCA VPSNDSSPIYSAAPTFTPTNDIFPEPQSQAFFPGSAGTALQYPPPAYPA AKGGFQVPMIPDYLFPPQQQDLGLGTPDQKPFQGLSRTQQPSLTPLS TIKAFATQSGSQDLKALNTSYQSQLIKPSRMRYPNRPSKTPPHERPY ACPVESCDRRFSRSDNLVRHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSREDNLHHT IRHTHTGKPFACDICGRKFARSDELVRHTKIHLRQKDRPYACPVESCD RRFSQSGNLTEHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSTSGHLVRHIRTHTGKPF FACDICGRKFAQNSTLTEHTKIHLRQKDKKADKSVVASSATSSLSSYP SPVATSYSPVTTTSYSPATTSYSPVPTSFSSPGSSSTYSPVHSGFPPSPS VATTYSSVPPAFPAQVSSFPSSAVTNSFSASTGLSDMTATFSPRTIEIC
SEQ ID NO: 315	MAADHLMLAEGYRLVQRPPSAAA AHGPHALRTLPPYAGPGLDSGLR PRGAPLGPPPPRQPGALAYGAFGPPSSFQPFPAVPPPAAGIAHLQPVAT PYPGRAAAPPNAPGGPPGPQAPSAAPPPPAHALGGMDAELIDEEA LTSLELELGLHRVRELPELFLGQSEFDCFSDLGSAPPAGSVSCGGSGG GSGQSQLIKPSRMRYPNRPSKTPPHERPYACPVESCDRRFSRSDNLV RHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSREDNLHTHIRTHTGKPFACDICGRKF ARSDELVRHTKIHLRQKDRPYACPVESCDRRFSQSGNLTEHIRIHTGQ KPFQCRICMRNFSTSGHLVRHIRTHTGKPFACDICGRKFAQNSTLTE HTKIHLRQKDK
SEQ ID NO: 316	MAADHLMLAEGYRLVQRPPSAAA AHGPHALRTLPPYAGPGLDSGLR PRGAPLGPPPPRQPGALAYGAFGPPSSFQPFPAVPPPAAGIAHLQPVAT PYPGRAAAPPNAPGGPPGPQAPSAAPPPPAHALGGMDAELIDEEA LTSLELELGLHRVRELPELFLGQSEFDCFSDLGSAPPAGSVSCGGSGG GSGQSQLIKPSRMRYPNRPSKTPPHERPYACPVESCDRRFSRSDNLV RHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSREDNLHTHIRTHTGKPFACDICGRKF ARSDELVRHTKIHLRQKDRPYACPVESCDRRFSQSGNLTEHIRIHTGQ KPFQCRICMRNFSTSGHLVRHIRTHTGKPFACDICGRKFAQNSTLTE HTKIHLRQKDKLEMADHLMLAEGYRLVQRPPSAAA AHGPHALRTL PYAGPGLDSGLRPRGAPLGPPPPRQPGALAYGAFGPPSSFQPFPAVPP AAGIAHLQPVATPYPGRAAAPPNAPGGPPGPQAPSAAPPPPAHAL GGMDAELIDEEALTSLELELGLHRVRELPELFLGQSEFDCFSDLGSAP PAGSVSC
SEQ ID NO: 317	MAAKAEMQLMSPLQISDPFGSFPHSPTMDNYPKLEEMMLLSNGAP QFLGAAGAPEGSGSNSSSSSSSGGGGGGGGSSNSSSSSSTFNPQADTGE QPYEHLTAESFPDISLNNEKVLVETSYPSTTRLPITYTGRFSLEPAPN SGNTLWPEPLFSLVSGLVSMTNPPASSSSAPSPAASSASASQSPPLSCA VPSNDSSPIYSAAPTFTPTNDIFPEPQSQAFFPGSAGTALQYPPPAYPA AKGGFQVPMIPDYLFPPQQQDLGLGTPDQKPFQGLSRTQQPSLTPLS TIKAFATQSGSQDLKALNTSYQSQLIKPSRMRYPNRPSKTPPHERPY

eTF SEQ ID NO:	Последовательности белка eTF
	ACPVESCRRFRSRSNDLVRHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSHRTTLTNHIR RTHHTGEKPFACDICGRKFAREDNLHTHIRTHTGEKPFACDICGRKFST SHSLTEHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSQSSSLVRHIRTHTGEKPFACDIC GRKFAREDNLHTHTKIHLRQKDKKADKSVVASSATSSLSSYPSPVAT SYPSPVTTSYSPATTSYSPVPTSFSSPGSSTYSPVHSGFPPSPSVATTY SSVPPAFPAQVSSFPSSAVTNSFSASTGLSDMTATFSPRTIEIC
SEQ ID NO: 318	MAADHMLLAEGYRLVQRPPSAAAAGHGPALRTLPPYAGPGLDSGLR PRGAPLGPPPPRQPGALAYGAFGPPSSFQPFPAVPPPAAGIAHLQPVA TYPGRAAAPPNAPGGPPGPQAPSAAPPPPAHALGGMDAELIDEEA LTSLELELGLHRVRELPELFLGQSEFDCFDLGSAPPAGSVSCGGSGG GSGQSQLIKPSRMRYPNRPSKTPPHERPYACPVESCRRFRSRSNDLV RHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSHRTTLTNHIRTHHTGEKPFACDICGRKF AREDNLHTHTKIHLRQKDRPYACPVESCRRRFSTSHSLTEHIRIHTGQ KPFQCRICMRNFSQSSSLVRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAREDNLHT HTKIHLRQKDK
SEQ ID NO: 319	MAADHMLLAEGYRLVQRPPSAAAAGHGPALRTLPPYAGPGLDSGLR PRGAPLGPPPPRQPGALAYGAFGPPSSFQPFPAVPPPAAGIAHLQPVA TYPGRAAAPPNAPGGPPGPQAPSAAPPPPAHALGGMDAELIDEEA LTSLELELGLHRVRELPELFLGQSEFDCFDLGSAPPAGSVSCGGSGG GSGQSQLIKPSRMRYPNRPSKTPPHERPYACPVESCRRFRSRSNDLV RHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSHRTTLTNHIRTHHTGEKPFACDICGRKF AREDNLHTHTKIHLRQKDRPYACPVESCRRRFSTSHSLTEHIRIHTGQ KPFQCRICMRNFSQSSSLVRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAREDNLHT HTKIHLRQKDKLEMADHMLLAEGYRLVQRPPSAAAAGHGPALRTLP PYAGPGLDSGLRPRGAPLGPPPPRQPGALAYGAFGPPSSFQPFPAVPP PAAGIAHLQPVA TYPGRAAAPPNAPGGPPGPQAPSAAPPPPAHAL GGMDAELIDEEALTSLELELGLHRVRELPELFLGQSEFDCFDLGSAP PAGSVSC
SEQ ID NO: 320	MAAKAEMQLMSPLQISDPFGSFPHSPTMDNYPKLEEMMLLSNGAP QFLGAAGAPEGSGSNSSSSSSSGGGGGGGGGSNSSSSSSTFNPQADTGE QPYEHLTAESFPDISLNNEKVLVETSYPSTTRLPITYTGRFSLEPAPN SGNTLWPEPLFSLVSGLVSMNTNPPASSSSAPSPAASSASASQSPPLSCA VPSNDSSPIYSAAPTFTPTNDIFPEPQSQAFFGSAGTALQYPPPAYPA AKGGFQVPMIPDYLFPPQQGDLGLGTPDQKPFQGLSRTQQPSLTPLS TIKAFATQSGSQDLKALNTSYQSQLIKPSRMRYPNRPSKTPPHERPY ACPVESCRRFRSRRDELNVHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSRSNDLTH IRTHTGEKPFACDICGRKFARSDDLVRHTKIHLRQKDRPYACPVESC RFRSRSNDLVRHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSHRTTLTNHIRTHHTGEK PFAACDICGRKFAREDNLHTHTKIHLRQKDRPYACPVESCRRRFSTSHSL TEHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSQSSSLVRHIRTHTGEKPFACDICGRK FAREDNLHTHTKIHLRQKDKKADKSVVASSATSSLSSYPSPVATSYPS PVTTSYSPATTSYSPVPTSFSSPGSSTYSPVHSGFPPSPSVATTYSSVP PAFPAQVSSFPSSAVTNSFSASTGLSDMTATFSPRTIEIC
SEQ ID NO: 321	MAAKAEMQLMSPLQISDPFGSFPHSPTMDNYPKLEEMMLLSNGAP QFLGAAGAPEGSGSNSSSSSSSGGGGGGGGGSNSSSSSSTFNPQADTGE QPYEHLTAESFPDISLNNEKVLVETSYPSTTRLPITYTGRFSLEPAPN SGNTLWPEPLFSLVSGLVSMNTNPPASSSSAPSPAASSASASQSPPLSCA VPSNDSSPIYSAAPTFTPTNDIFPEPQSQAFFGSAGTALQYPPPAYPA AKGGFQVPMIPDYLFPPQQGDLGLGTPDQKPFQGLSRTQQPSLTPLS TIKAFATQSGSQDLKALNTSYQSQLIKPSRMRYPNRPSKTPPHERPY

eTF SEQ ID NO:	Последовательности белка eTF
	ACPVESCRRFRSRRDELNVHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSRSDHLTNH IRTHTGEKPFACDICGRKFARSDDLVRHTKIHRLRQKDRPYACPVESC RFRSRSNDLVRHIRIHTGQKPFQCRICMRNFHRTTTLNHIRTHTGEK FACDICGRKFAREDNLHTHTKIHRLRQKDRPYACPVESCRRFSTSHSL TEHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSQSSSLVRHIRTHTGEKPFACDICGRK FAREDNLHTHTKIHRLRQKDKKADKSVVASSATSSLSSYPSPVATSYP PVTTSYSPATTSYSPVPTSFSSPGSSTYSPVHSGFSPSPVATTYSSVP PAFPAQVSSFPSSAVTNSFSASTGLSDMTATFSPRTIEIC
SEQ ID NO: 322	MAAAKAEMQLMSPLQISDPFGSFPHSPTMDNYPKLEEMMLLSNGAP QFLGAAGAPEGSGSNSSSSSSGGGGGGGGGNSSSSSSSTFNPQADTGE QPYEHLTAESFPDISLNNEKVLVETSYPSTTRLPPITYTGRFSLEPAPN SGNLWPEPLFSLVSGLVSMNPPASSSSAPSPAASSASASQSPPLSCA VPSNDSSPIYSAAPTFTPTNDIFPEPQSQAFFPGSAGTALQYPPPAYPA AKGGFQVPMIPDYLFPPQQQDLGLGTPDQKPFQGLSRTQQPSLTPLS TIKAFATQSGSQDLKALNTSYQSQLIKPSRMRKYPNRPSKTPPHERPY ACPVESCRRFRSRRDELNVHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSRSDHLTNH IRTHTGEKPFACDICGRKFARSDDLVRHTKIHRLRQKDRPYACPVESC RFRSRSNDLVRHIRIHTGQKPFQCRICMRNFHRTTTLNHIRTHTGEK FACDICGRKFAREDNLHTHTKIHRLRQKDRPYACPVESCRRFSTSHSL TEHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSQSSSLVRHIRTHTGEKPFACDICGRK FAREDNLHTHTKIHRLRQKDKKADKSVVASSATSSLSSYPSPVATSYP PVTTSYSPATTSYSPVPTSFSSPGSSTYSPVHSGFSPSPVATTYSSVP PAFPAQVSSFPSSAVTNSFSASTGLSDMTATFSPRTIEIC
SEQ ID NO: 323	MTGKLAEKLPVTMSSLLNQLPDNLYPEEIPALNLFSGSSDSVVHYN QMATENVMDIGLTNEKPNPELSYSGSFQAPAGNKTVTYLKGFADFSP SNWCQDNIISLMSAGILGVPPASGALSTQTSTASMVQPPQGDVEAMY PALPPYSNCGDLYSEPVSFHDPQGNPGLAYSPQDYQSAKPALDSNLF MIPDYNLYHHPNDMGSIPEHKPFQGMPIRVNPPPITPLETIKAFKDK QIHPGFGSLPQPPLTLKPIRPRKYPNRPSKTPHERPHACPAEGCRRF SRSDNLVRHLRIHTGHKPFQCRICMRFSREDNLHTHIRTHTGEKPF CFCGRKFARSDELVRHAKIHLKQKEHACPAEGCRRFSQSGNLTEH LRIHTGHKPFQCRICMRFSSTSGHLVRHIRTHTGEKPFACFCGRKFA QNSTLTEHAKIHLKQKEKKAEGGAPSASSAPPVSLAPVVTCA
SEQ ID NO: 324	MAADHMLAEGYRLVQRPPSAAAAGHGPLALRTLPPYAGPGLDSGLR PRGAPLGPPPPRQPGALAYGAFGPPSSFQPPAVPPPAAGIAHLQPVAT PYPGRAAAPPNAPGGPPGPQAPSAAAPPPAHALGGMDAELIDEEA LTSLELELGLHRVRELPELFLGQSEFDCFDLGSAPPAGSVSCQSQLIK PSRMRKYPNRPSKTPPHERPYACPVESCRRFRSRSNDLVRHIRIHTGQ KPFQCRICMRNFHRTTTLNHIRTHTGEKPFACDICGRKFAREDNLHT HTKIHRLRQKDRPYACPVESCRRFSTSHSLTEHIRIHTGQKPFQCRIC MRNFSQSSSLVRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAREDNLHTHTKIHRLRQ DK
SEQ ID NO: 325	MAAAKAEMQLMSPLQISDPFGSFPHSPTMDNYPKLEEMMLLSNGAP QFLGAAGAPEGSGSNSSSSSSGGGGGGGGGNSSSSSSSTFNPQADTGE QPYEHLTAESFPDISLNNEKVLVETSYPSTTRLPPITYTGRFSLEPAPN SGNLWPEPLFSLVSGLVSMNPPASSSSAPSPAASSASASQSPPLSCA VPSNDSSPIYSAAPTFTPTNDIFPEPQSQAFFPGSAGTALQYPPPAYPA AKGGFQVPMIPDYLFPPQQQDLGLGTPDQKPFQGLSRTQQPSLTPLS TIKAFATQSGSQDLKALNTSYQSQLIKPSRMRKYPNRPSKTPPHERPY ACPVESCRRFRSRSNDLVRHIRIHTGQKPFQCRICMRNFHRTTTLNHI

eTF SEQ ID NO:	Последовательности белка eTF
	RTHHTGEKPFACDICGRKFAREDNLHHTHIRTHTGEKPFACDICGRKFST SHSLTEHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSQSSSLVRHIRTHTGEKPFACDIC GRKFAREDNLHHTHTKIHLRQKDKKADKSVVASSATSSLSSYPSPVAT SYSPVTTSYSPATTSYSPVPTSFSPPGSSTYSPVHSGFSPSPVATTY SSVPPAFPAQVSSFPSSAVTNSFSASTGLSDMTATFSPRTIEIC
SEQ ID NO: 365	MAPKKKRKVGIIHGVPAALEPGEKPYKCPECGKSFSRSDNLVRHQRT HTGEKPYKCPECGKSFSHRTTLTNHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRE DNLHHTHQTHTHTGEKPYKCPECGKSFSSTSHSLTEHQRTHTGEKPYKCP ECGKSFSQSSSLVRHQRTHTHTGEKPYKCPECGKSFSREDNLHHTHQTHT TGKKTSKRPAATKKAGQAKKKKGSYPYDVPDYALEDALDDFDLDM LGSDALDDFDLDMLGSDALDDFDLDMLGSDALDDFDLDM
SEQ ID NO: 366	MAPKKKRKVGIIHGVPAALEPGEKPYKCPECGKSFSRSDNLVRHQRT HTGEKPYKCPECGKSFSHRTTLTNHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRE DNLHHTHQTHTHTGEKPYKCPECGKSFSSTSHSLTEHQRTHTGEKPYKCP ECGKSFSQSSSLVRHQRTHTHTGEKPYKCPECGKSFSREDNLHHTHQTHT TGKKTSKRPAATKKAGQAKKKKGSYPYDVPDYALEEASGSGRADA LDDFDLDMLGSDALDDFDLDMLGSDALDDFDLDMLGSDALDDFDL DMLNRSRSGSPKKKRKVGSIQLPDTDDRHRHIEEKRKRTYETFKSIMK KSPFSGPTDPRPPRRIVPSRSSASVPKPAPQYPFTSSLSTINYDEFPT MVFSPGQISQASALAPAPPQVLPQAPAPAPAPAMVSALAQAPAPVPV LAPGPPQAVAPPAPKPTQAGEGTLSEALLQLQFDDDELGALLGNSTD PAVFTDLASVDNSEFQQLLNQGIPVAPHTTEPMLMEYPEAITRLVTGA QRPPDPAPAPLGAPGLPNGLSGDEDFSSIADMDFSALLGSGSGSRDS REGMFLPKPEAGSAISDVFEGREVCQPKRIRPFHPPGSPWANRPLPAS LAPPTGPVHEPVGSLTPAPVPQPLDPAPAVTPEASHLLEDPEETSQ AVKALREMADEVIPQKEEAICGQMDLSHPPPRGHLDELTTTLESMT EDNLDSPLTPELNEILDFTLNDECLLHAMHISTGLSIFDTSLF
SEQ ID NO: 364	MYPYDVPDYAGYPYDVPDYAGSYPYDVPDYAGSGSGSAAAKAEMQ LMSPLQISDPFGSFPHTMDNYPKLEEMMLLSNGAPQFLGAAGAPE GSGSNSSSSSSGGGGGGGGGSSNSSSSSSTFNPQADTGEQPYEHLTAES FPDISLNNEKVLVETSYPSTTRLPITYTGRFSLEPAPNSGNLWPEP LFSLVSGLVSMTNPPASSSSAPSPAASSASASQSPPLSCAVPSNDSSPIY SAAPTFTPTNTDIFPEPQSQAFFGSAGTALQYPPPAYPAAKGGFQVPMI PDYLFPQQQGDGLGTPDQKPFQGLSRTQQPSLTPLSTIKAFATQSG SQDLKALNTSYQSQLIKPSRMRKYPNRPSKTPPHERPYACPVESCDRR FSRSDNLVRHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSHRTTLTNHIRTHTGEKPFAC CDICGRKFAREDNLHHTHTKIHLRQKDRPYACPVESCDRRFSTSHSLTE HIRIHTGQKPFQCRICMRNFSQSSSLVRHIRTHTGEKPFACDICGRKFA REDNLHHTHTKIHLRQKDKKADKSVVASSATSSLSSYPSPVATSYSPV TTSYSPATTSYSPVPTSFSPPGSSTYSPVHSGFSPSPVATTYSSVPPA FPAQVSSFPSSAVTNSFSASTGLSDMTATFSPRTIEIC
SEQ ID NO: 295	MYPYDVPDYAGYPYDVPDYAGSYPYDVPDYAGSGSGSAAAKAEMQ LMSPLQISDPFGSFPHTMDNYPKLEEMMLLSNGAPQFLGAAGAPE GSGSNSSSSSSGGGGGGGGGSSNSSSSSSTFNPQADTGEQPYEHLTAES FPDISLNNEKVLVETSYPSTTRLPITYTGRFSLEPAPNSGNLWPEP LFSLVSGLVSMTNPPASSSSAPSPAASSASASQSPPLSCAVPSNDSSPIY SAAPTFTPTNTDIFPEPQSQAFFGSAGTALQYPPPAYPAAKGGFQVPMI PDYLFPQQQGDGLGTPDQKPFQGLSRTQQPSLTPLSTIKAFATQSG SQDLKALNTSYQSQLIKPSRMRKYPNRPSKTPPHERPYACPVESCDRR FSRSDNLVRHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSREDNLHHTHIRTHTGEKPFAC

eTF SEQ ID NO:	Последовательности белка eTF
	CDICGRKFARSDELVRHTKIHRLQKDRPYACPVESCDRRFSQSGNLTEHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSTSGHLVRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQNSTLTEHTKIHRLQKDKKADKSVVASSATSSLSSYPSPVATSYPSPVTTSYPSPATTSYPSVPVTSFSSPGSSSTYPSPVHSGFSPSPSVATTYSSVPPAFPAQVSSFPSAVTNSFSASTGLSDMTATFSPRTIEIC
SEQ ID NO: 296	MAAKAEMQLMSPLQISDPFGSFPHSPTMDNYPKLEEMMLLSNGAPQFLGAAGAPEGSGSNSSSSSSGGGGGGGGGNSSSSSSSTFNPQADTGEQPYEHLTAESFPDISLNNEKVLVETSYPSTTRLPPIYTGFRSLEPAPNSGNTLWPEPLFSLVSGLVSMTNPPASSSSAPSPAASSASASQSPPLSCAVPSNDSSPIYSAAPTFTPTNDIFPEPQSQAFFPGSAGTALQYPPPAYPAKGGFQVPMIPDYLFQQQGDLGLGTPDQKPFQGLSRTQQPSLTPLSTIKAFATQSGSQDLKALNTSYQSqliKPSRMRYPNRPSKTPPHERPYACPVESCDRRFSDPGALVRHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSDNLVRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQSGDLRRHTKIHRLQKDRPYACPVESCDRRFSTHLDLIRHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSTSGNLVRHIRTHTGEKPFACDICGRKFARSDNLVRHTKIHRLQKDRPYACPVESCDRRFSQSGHLTEHIRIHTGQKPFQCRICMRNFERSHLREHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQAGHLASHTKIHRLQKDKKADKSVVASSATSSLSSYPSPVATSYPSPVTTSYPSPATTSYPSVPVTSFSSPGSSSTYPSPVHSGFSPSPSVATTYSSVPPAFPAQVSSFPSAVTNSFSASTGLSDMTATFSPRTIEIC
SEQ ID NO: 297	MRKYPNRPSKTPPHERPYACPVESCDRRFSDNLTRHIRIHTGQKPFQCRICMRNFHSHSTLTNHIRTHTGEKPFACDICGRKFARSDNRKTHIRTHTGEKPFACDICGRKFSTSHSLTEHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSQSSLTRHIRTHTGEKPFACDICGRKFARSDNRKTHTKIHRLQKDKKADKSVVAS
SEQ ID NO: 298	MRKYPNRPSKTPPHERPYACPVESCDRRFSDNLTRHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSDNLTHIRTHTGEKPFACDICGRKFARSDERKRHIRTHTGEKPFACDICGRKFSQSGNLTEHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSTSGHLTRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQSSTRKEHTKIHRLQKDKKADKSVVAS
SEQ ID NO: 299	MAAKAEMQLMSPLQISDPFGSFPHSPTMDNYPKLEEMMLLSNGAPQFLGAAGAPEGSGSNSSSSSSGGGGGGGGGNSSSSSSSTFNPQADTGEQPYEHLTAESFPDISLNNEKVLVETSYPSTTRLPPIYTGFRSLEPAPNSGNTLWPEPLFSLVSGLVSMTNPPASSSSAPSPAASSASASQSPPLSCAVPSNDSSPIYSAAPTFTPTNDIFPEPQSQAFFPGSAGTALQYPPPAYPAKGGFQVPMIPDYLFQQQGDLGLGTPDQKPFQGLSRTQQPSLTPLSTIKAFATQSGSQDLKALNTSYQSqliKPSRMRYPNRPSKTPPHERPYACPVESCDRRFSDNLVRHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSDNLHITHIRTHTGEKPFACDICGRKFARSDELVRHIRTHTGEKPFACDICGRKFSQSGNLTEHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSTSGHLVRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQNSTLTEHTKIHRLQKDKKADKSVVASSATSSLSSYPSPVATSYPSPVTTSYPSPATTSYPSVPVTSFSSPGSSSTYPSPVHSGFSPSPSVATTYSSVPPAFPAQVSSFPSAVTNSFSASTGLSDMTATFSPRTIEIC
SEQ ID NO: 440	MAAKAEMQLMSPLQISDPFGSFPHSPTMDNYPKLEEMMLLSNGAPQFLGAAGAPEGSGSNSSSSSSGGGGGGGGGNSSSSSSSTFNPQADTGEQPYEHLTAESFPDISLNNEKVLVETSYPSTTRLPPIYTGFRSLEPAPNSGNTLWPEPLFSLVSGLVSMTNPPASSSSAPSPAASSASASQSPPLSCAVPSNDSSPIYSAAPTFTPTNDIFPEPQSQAFFPGSAGTALQYPPPAYPAKGGFQVPMIPDYLFQQQGDLGLGTPDQKPFQGLSRTQQPSLTPLSTIKAFATQSGSQDLKALNTSYQSqliKPSRMRYPNRPSKTPPHERPY

eTF SEQ ID NO:	Последовательности белка eTF
	ACPVESCDRRFSRSDNLVRHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSREDNLHHTH IRTHHTGEKPFACDICGRKFARSDLVHRHRTHTGEKPFACDICGRKFSQ SGNLTEHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSTSGHLVRHRTHTGEKPFACDI CGRKFAQNSTLIENTKIHLRQKDKKADKSVVASSATSSLSSYPSPVAT SYPSPVTTSPSPATTSYPSPVPTSFSSPGSSTYPSPVHSGFPSPSVATTY SSVPPAFPAQVSSFPSSAVTNSFSASTGLSDMTATFSPRTIEIC

Таблица 19: ПолиА последовательности, раскрытые в настоящем описании

ПолиА последовательность	
SEQ ID NO: 326 spA (синтетическая полиА)	AATAAAAGATCTTTATTTTCATTAGATCTGTGTGTTGGTTTTTT GTGTGCGGACCGCACGTG
SEQ ID NO: 327 hGH (полиА) человеческого гормона роста)	GGGTGGCATCCCTGTGACCCCTCCCCAGTGCCTCTCCTGGCCC TGGAAGTTGCCACTCCAGTGCCACCAGCCTTGTCCTAATAAAA ATTAAGTTGCATCATTTTGTCTGACTAGGTGTCCTTCTATAATA TTATGGGGTGGAGGGGGGTGGTATGGAGCAAGGGGCAAGTTG GGAAGACAACCTGTAGGGCCTGCGGGGTCTATTGGGAACCAA GCTGGAGTGCAGTGGCACAATCTTGGCTCACTGCAATCTCCGC CTCCTGGGTTCAAGCGATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCGAGTTG TTGGGATTCCAGGCATGCATGACCAGGCTCAGCTAATTTTTGT TTTTTTGGTAGAGACGGGGTTTCACCATATTGGCCAGGCTGGT CTCCAACCTCCTAATCTCAGGTGATCTACCCACCTTGGCCTCCC AAATTGCTGGGATTACAGGCGTGAACCACTGCTCCCTTCCCTG TCCTT

ТАБЛИЦА 20: Примеры цинковых пальцев для модуляции экспрессии эндогенного гена GRN

	Аминокислотная последовательность		Аминокислотная последовательность
SEQ ID NO: 141	RNDTLTE	SEQ ID NO: 153	RSDKLVR
SEQ ID NO: 142	RSDNLVR	SEQ ID NO: 154	QLAHLRA
SEQ ID NO: 143	RSDHLTT	SEQ ID NO: 155	ERSHLRE
SEQ ID NO: 144	SPADLTR	SEQ ID NO: 156	TTGNLTV
SEQ ID NO: 145	TSHSLTE	SEQ ID NO: 157	QRANLRA
SEQ ID NO: 146	QSGDLRR	SEQ ID NO: 158	SKKALTE
SEQ ID NO: 147	DPGALVR	SEQ ID NO: 159	REDNLHT
SEQ ID NO: 148	DPGHLVR	SEQ ID NO: 160	TKNSLTE
SEQ ID NO: 149	RSDLVLR	SEQ ID NO: 161	RKDNLKN
SEQ ID NO: 150	DSGNLRV	SEQ ID NO: 162	QSSNLVR
SEQ ID NO: 151	HKNALQN	SEQ ID NO: 163	QSSSLVR
SEQ ID NO: 152	TSGELVR	SEQ ID NO: 164	QAGHLAS

Таблица 21: Примеры DBD eTF, которые модулируют экспрессию GRN, содержащего несколько ZF

	Аминокислотная последовательность
SEQ ID NO: 165	LEPGEKPYKCECGKSFSDNLTEHQRTHTGEKPYKCECGKSFSD DPGALVRHQRTHTGEKPYKCECGKSFSTSGELVRHQRTHTGEKPY KCECGKSFSDNLVRHQRTHTGEKPYKCECGKSFSTSGELVR

		Аминокислотная последовательность
		HQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTKNSLTEHQRTHTGKKTS
SEQ ID NO:	166	LEPGEKPYKCPECGKSFSDNLVLRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDPGHLVLRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDHLLTHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDDELVLRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDKLVLRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTTGNLTVHQRTHTGKKTS
SEQ ID NO:	167	LEPGEKPYKCPECGKSFSDHLLTHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDDELVLRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDKLVLRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTTGNLTVHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQLAHLRAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTKNSLTEHQRTHTGKKTS
SEQ ID NO:	168	LEPGEKPYKCPECGKSFSSPADLTRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDSGNLRVHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQLAHLRAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFQRANLRAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDKLVLRHQRTHTGKKTS
SEQ ID NO:	169	LEPGEKPYKCPECGKSFSTSHSLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFHKNALQNHQRTHTGEKPYKCPECGKSFERSHLEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSKKALTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFQRANLRAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDKLVLRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSQSSNLVLRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSSLVLRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFQAGHLASHQRTHTGKKTS
SEQ ID NO:	170	LEPGEKPYKCPECGKSFSSQSGDLRRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSPADLTRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDSGNLRVHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQLAHLRAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFQRANLRAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDKLVLRHQRTHTGKKTS
SEQ ID NO:	171	RNDTLTE x DPGALVR x TSGELVR x RSDNLVR x TSGELVR x TKNSLTE (где X указывает линкер, содержащий 1-50 аминокислотных остатков)
SEQ ID NO:	412	RSDNLVR x DPGHLVR x RSDHLLT x RDELVLR x RDKLVLR x TTGNLTV (где X указывает линкер, содержащий 1-50 аминокислотных остатков)
SEQ ID NO:	413	RSDHLLT x RDELVLR x RDKLVLR x TTGNLTV x QLAHLRA x TKNSLTE (где X указывает линкер, содержащий 1-50 аминокислотных остатков)
SEQ ID NO:	414	SPADLTR x DSGNLRV x QLAHLRA x QRANLRA x REDNLHT x RSDNLVR (где X указывает линкер, содержащий 1-50 аминокислотных остатков)
SEQ ID NO:	415	TSHSLTE x HKNALQN x ERSHLRE x SKKALTE x QRANLRA x RKDNLKN x QSSNLVR x QSSSLVLR x QAGHLAS (где X указывает линкер, содержащий 1-50 аминокислотных остатков)
SEQ ID NO:	416	QSGDLRR x SPADLTR x DSGNLRV x QLAHLRA x QRANLRA x REDNLHT x RSDNLVR (где X указывает линкер, содержащий 1-50 аминокислотных остатков)

Таблица 22: Примеры последовательностей целевых участков для модуляции экспрессии GRN

Целевой участок SEQ ID NO:	ZF или гРНК, которые распознают целевой участок	Последовательность целевого участка	Координаты начала chr17
SEQ ID NO: 38	ZF	GAGTAGAAAAGAAACACA	44345153
SEQ ID NO:	ZF	CGCACTGTCAATGCCCA	44344963

Целевой участок SEQ ID NO:	ZF или гРНК, которые распознают целевой участок	Последовательность целевого участка	Координаты начала chr17
330			
SEQ ID NO: 331	ZF	CCTGCTGAGGCTGTCCCG	44345058
SEQ ID NO: 332	ZF	AATGGGGTGTGGGGCGAG	44345111
SEQ ID NO: 333	ZF	CCTAGAAATGGGGTGTGG	44345105
SEQ ID NO: 334	ZF	TGAGTAGAAAAGAAACACAGCA TTCCA	44345152
SEQ ID NO: 335	ZF	GAGTAGAAAAGAAACACAGCA	44345153
SEQ ID NO: 336	ZF	AGTAGAAAAGAAACACAGCAT	44345154
SEQ ID NO: 113	gRNA	CATGATCCCTAGAAATGGGGT	44345098

Таблица 23: Примеры eTF, которые модулируют экспрессию GRN

Экспрессионная кассета	Целевой участок SEQ ID NO:	DBD SEQ ID NO:	TAD SEQ ID NO:	Регуляторный элемент SEQ ID NO:
Контроль	N/A	отсутствует	отсутствует	SEQ ID NO: 178
A	SEQ ID NO: 331	SEQ ID NO: 165	SEQ ID NO: 95	SEQ ID NO: 178
B	SEQ ID NO: 331	SEQ ID NO: 165	SEQ ID NO: 114	SEQ ID NO: 178
C	SEQ ID NO: 332	SEQ ID NO: 166	SEQ ID NO: 95	SEQ ID NO: 178
D	SEQ ID NO: 333	SEQ ID NO: 167	SEQ ID NO: 95	SEQ ID NO: 178
E	SEQ ID NO: 333	SEQ ID NO: 167	SEQ ID NO: 114	SEQ ID NO: 178
F	SEQ ID NO: 38	SEQ ID NO: 168	SEQ ID NO: 95	SEQ ID NO: 178
G	SEQ ID NO: 38	SEQ ID NO: 168	SEQ ID NO: 114	SEQ ID NO: 178
H	SEQ ID NO: 334	SEQ ID NO: 169	SEQ ID NO: 114	SEQ ID NO: 178
I	SEQ ID NO: 335	SEQ ID NO: 170	SEQ ID NO: 114	SEQ ID NO: 179
J (K+eGFP)	SEQ ID NO: 38	SEQ ID NO: 168	SEQ ID NO: 95	SEQ ID NO: 179
K	SEQ ID NO: 38	SEQ ID NO: 168	SEQ ID NO: 95	SEQ ID NO: 179
L	SEQ ID NO: 38	SEQ ID NO: 168	SEQ ID NO: 114	SEQ ID NO: 179
M	SEQ ID NO: 113	SEQ ID NO: 112	SEQ ID NO: 95	SEQ ID NO: 178

Таблица 24: Примеры регуляторных элементов (RE), раскрытых в настоящем описании

	Тип RE	Последовательность
SEQ ID NO: 178	Интронна я	GTGTGTATGCTCAGGGGCTGGGAAAGGAGGGGAGGGAGC TCCGGCTCAG
SEQ ID NO: 179	промотор СВА	CGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCG CCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATG TCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCA ATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTA CATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACG TCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTA CATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTAC GTATTAGTCATCGCTATTACCATGGGTTCGAGGTGAGCCCC ACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCTCCCCACC CCCAATTTTGTATTTATTTATTTTAAATTATTTTGTGCAG CGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCCAGGCGG GGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGA GAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAA AGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCGGCCCTA TAAAAAGCGAAGCGCGCGGCGGGGAGTCGCTGCGTT GCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCGCCGCTCGCGCCGC CCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCACAGGTGA GCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCG CTTGTTTTAATGACGGCTCGTTTTCTTTCTGTGGCTGCGTG AAAGCCTTAAAGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGG GGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTGTGTGCGTG GGGAGCGCCGCGTGCGGCCCGCGCTGCCCGGCGGCTGTG AGCGCTGCGGGCGCGGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCG TGTGCGCGAGGGGAGCGCGGCCGGGGGCGGTGCCCCGCG GTGCGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAGGCTGCGTGCG GGGTGTGTGCGTGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGC GGCGGTGCGGCTGTAACCCCCCCTGCACCCCCCTCCCCG AGTTGCTGAGCACGGCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCG TGCGGGGCGTGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGG GTGGCGGCAGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCGGCC

		TCGGGCCGGGGAGGGCTCGGGGGAGGGGCGCGGGCGGCC CCGGAGCGCCGGCGGCTGTGAGGCGCGGCGAGCCGCAG CCATTGCCTTTTATGGTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGG ACTTCCTTTGTCCCAAATCTGGCGGAGCCGAAATCTGGGA GGCGCCGCCGCACCCCCTCTAGCGGGCGCGGGCGAAGCG GTGCGGCGCCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCC TTCGTGCGTCGCCGCGCCGCGTCCCCTTCTCCATCTCCA GCCTCGGGGCTGCCGCAGGGGGACGGCTGCCTTCGGGGG GGACGGGGCAGGGCGGGGTTCGGCTTCTGGCGTGTGACC GGCGGCTCTAGAGCCTCTGCTAACCATGTTTCATGCCTTCT TCTTTTTTCTACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTTGTTGTG CTGTCTCATCATTTTTGGCAAAGAATT
SEQ ID NO: 182	Интронна я	GTAAGGTAAGAATTGAATTTCTCAGTTGAAGGATGCTTAC ACTCTTGTCCATCTAG
SEQ ID NO: 183	Парвальб умин (PV)- селективн ая	GGAGGAAGCCATCAACTAACTACAATGACTGTAAGATA CAAAATTGGGAATGGTAACATATTTTGAAGTTCTGTTGAC ATAAAGAATCATGATATTAATGCCCATGGAAATGAAAGG GCGATCAACACTATGGTTTGAAAAGGGGGAAATTGTAGA GCACAGATGTGTTTCGTGTGGCAGTGTGCTGTCTCTAGCAA ТАСТCAGAGAAGAGAGAGAACAATGAAATTCTGATTGGC CCCAGTGTGAGCCCAGATGAGGTTСAGCTGCCAACTTTCT CTTTCACATCTTATGAAAGTCATTTAAGCACAACTAACTT TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGAGACAGAGTCTTGCTCTGTT GCCCAGGACAGAGTGCAGTAGTГACTCAATCTCGGCTCA CTGCAGCCTCCACCTCCTAGGCTCAAACGGTCCTCCTGCA TCAGCCTCCCAAGTAGCTGGAATTACAGGAGTGGCCCAC CATGCCCAGCTAATTTTTGTATTTTAAATAGATACGGGGG TTTCACCATATCACCCAGGCTGGTCTCGAACTCCTGGCCT CAAGTGATCCACCTGCCTCGGCCTCCCAAAGTGCTGGGAT TATAGGCGTCAGCCACTATGCCCAACCCGACCAACCTTTT TTAAAATAAATATTTAAAAAATTGGTATTTACATATATA CTAGTATTTACATTTATCCACACAAAACGGACGGGCCTCC GCTGAACCAGTGAGGCCCCAGACGTGCGCATAAATAACC CCTGCGTGCTGCACCACCTGGGGAGAGGGGGAGGACCAC GGTAAATGGAGCGAGCGCATAGCAAAGGGACGCGGGG

		<p>TCCTTTTCTCTGCCGGTGGCACTGGGTAGCTGTGGCCAGG TGTGGTACTTTGATGGGGCCCAGGGCTGGAGCTCAAGGA AGCGTCGCAGGGTCACAGATCTGGGGGAACCCCGGGGAA AAGCACTGAGGCAAACCGCCGCTCGTCTCCTACAATAT ATGGGAGGGGGAGGTTGAGTACGTTCTGGATTACTCATA AGACCTTTTTTTTTTTCCTTCCGGGCGCAAACCGTGAGCT GGATTTATAATCGCCCTATAAAGCTCCAGAGGCGGTCAG GCACCTGCAGAGGAGCCCCGCCGCTCCGCCGACTAGCTG CCCCCGCGAGCAACGGCCTCGTGATTTCCCCGCCGATCCG GTCCCCGCCTCCCCACTCTGCCCCCGCCTACCCCGGAGCC GTGCAGCCGCCTCTCCGAATCTCTCTTCTCTCTGGCGCTC GCGTGCGAGAGGGAAGTACGCGAGAACGAGGAAGCAGCT GGAGGTGACGCCGGGCAGATTACGCCTGTCAGGGCCGAG CCGAGCGGATCGCTGGGCGCTGTGCAGAGGAAAGGCGGG AGTGCCCGGCTCGCTGTCGCAGAGCCGAGGTGGGTAAGC TAGCGACCACCTGGACTTCCCAGCGCCCAACCGTGGCTTT TCAGCCAGGTCCTCTCCTCCCGCGGCTTCTCAACCAACCC CATCCCAGCGCCGGCCACCCAACCTCCCGAAATGAGTGC TTCTGCCCCAGCAGCCGAAGGCGCTACTAGGAACGGTA ACCTGTTACTTTTCCAGGGGCGTAGTCGACCCGCTGCC GAGTTGCTGTGCGACTGCGCGCGCGGGGCTAGAGTGCAA GGTGACTGTGGTTCTTCTCTGGCCAAGTCCGAGGGAGAAC GTAAAGATATGGGCCTTTTTCCCCCTCTCACCTTGTCTCAC CAAAGTCCCTAGTCCCCGGAGCAGTTAGCCTCTTTCTTTC CAGGGAATTAGCCAGACACAACAACGGGAACCAGACACC GAACCAGACATGCCCGCCCCGTGCGCCCTCCCCGCTCGCT GCCTTTCCTCCCTCTTGTCTCTCCAGAGCCGGATCTTCAAG GGGAGCCTCCGTGCCCCCGGCTGCTCAGTCCCTCCGGTGT GCAGGACCCCGGAAGTCTCCCGCACAGCTCTCGCTTCT CTTTGCAGCCTGTTTCTGCGCCGGACCAGTCGAGGACTCT GGACAGTAGAGGCCCGGGACGACCGAGCTG</p>
<p>SEQ ID NO: 184</p>	<p>Парвальб умин (PV)- селективн</p>	<p>TCAACAGGGGGACACTTGGGAAAGAAGGATGGGGACAG AGCCGAGAGGACTGTTACACATTAGAGAAACATCAGTGA CTGTGCCAGCTTTGGGGTAGACTGCACAAAAGCCCTGAG GCAGCACAGGCAGGATCCAGTCTGCTGGTCCCAGGAAGC</p>

ая	TAACCGTCTCAGACAGAGCACAAAGCACCGAGACATGTG CCACAAGGCTTGTGTAGAGAGGTCAGAGGACAGCGTACA GGTCCCAGAGATCAAACCTCACCTCACCAGGCTTGGCAG CAAGCCTTTACCAACCCACCCCCACCCACCCACCTGCA CGCGCCCCTCTCCCCTCCCATGGTCTCCCATGGCTATCTC ACTTGGCCCTAAAATGTTTAAGGATGACACTGGCTGCTGA GTGGAAATGAGACAGCAGAAGTCAACAGTAGATTTTAGG AAAGCCAGAGAAAAAGGCTTGTGCTGTTTTTAGAAAGCC AAGGGACAAGCTAAGATAGGGCCCAAGTAATGCTAGTAT TTACATTTATCCACACAAAACGGACGGGCCTCCGCTGAAC CAGTGAGGCCCCAGACGTGCGCATAAATAACCCCTGCGT GCTGCACCACCTGGGGAGAGGGGGAGGACCACGGTAAAT GGAGCGAGCGCATAGCAAAGGGACGCGGGGTCTTTTC TCTGCCGGTGGCACTGGGTAGCTGTGGCCAGGTGTGGTAC TTTGATGGGGCCCAGGGCTGGAGCTCAAGGAAGCGTCGC AGGGTCACAGATCTGGGGGAACCCCGGGGAAAAGCACTG AGGCAAACCGCCGCTCGTCTCCTACAATATATGGGAGG GGGAGGTTGAGTACGTTCTGGATTACTCATAAGACCTTTT TTTTTTCCTTCCGGGCGCAAACCGTGAGCTGGATTTATA ATCGCCCTATAAAGCTCCAGAGGCGGTCAGGCACCTGCA GAGGAGCCCCGCCGCTCCGCCGACTAGCTGCCCCCGCGA GCAACGGCCTCGTGATTTCCCCGCCGATCCGGTCCCCGCC TCCCCACTCTGCCCCCGCTACCCCGGAGCCGTGCAGCCG CCTCTCCGAATCTCTCTCTCTCCTGGCGCTCGCGTGCGA GAGGGAAGTACGAGAACGAGGAAGCAGCTGGAGGTGA CGCCGGGCAGATTACGCCTGTCAGGGCCGAGCCGAGCGG ATCGCTGGGCGCTGTGCAGAGGAAAGGCGGGAGTGCCCG GCTCGCTGTCGCAGAGCCGAGGTGGGTAAGCTAGCGACC ACCTGGACTTCCCAGCGCCAACCGTGGCTTTTCAGCCAG GTCCTCTCTCCCAGCGGCTTCTCAACCAACCCCATCCCAG CGCCGGCCACCCAACCTCCCGAAATGAGTGCTTCTGCCC CAGCAGCCGAAGGCGCTACTAGGAACGGTAACCTGTTAC TTTTCCAGGGGCCGTAGTCGACCCGCTGCCCCGAGTTGCTG TGCGACTGCGCGCGCGGGGCTAGAGTGCAAGGTGACTGT GGTTCTTCTCTGGCCAAGTCCGAGGGAGAACGTAAAGAT
----	--

	GACACCCTGTCAGCAGTGGGCTCCCGTCCTGAGCTGCCAT GCTTCCTGCTCTCCTCCCGTCCCGGCTCCTCATTTTCATGCA GCCACCTGTCCCAGGGAGAGAGGAGTCACCCAGGCCCT CAGTCCGCCCTTAAATAAGAAAGCCTCCGTTGCTCGGCA CACATACCAAGCAGCCGCTGGTGCAATCT
--	--

Таблица 25: Дополнительные последовательности, раскрытые в настоящем

описании

	Последовательность
SEQ ID NO: 112 (dSaCas 9 последо вательн ость для модуляц ии GRN)	KRNYILGLAIGITSVGYGIIDYETRDVIDAGVRLFKEANVENNEGRRSKRGA RRLKRRRRHRIQRVKKLLFDYNLLTDHSELSGINPYEARVKGLSQKLSEEE FSAALLHLAKRRGVHNVNEVEEDTGNELSTKEQISRNSKALEEKYVAELQ LERLKKDGEVRSINRFKTSYVKEAKQLLKVQKAYHQLDQSFIDTYIDLL ETRRTYYEGPGEPSFGWKDIKEWYEMLMGHCTYFPEELRSVKYAYNAD LYNALNDLNNLVITRDENEKLEYEKFQIENVFKQKKKPTLKQIAKEILVN EEDIKGYRVTSTGKPEFTNLKVYHDIKDITARKEIENAELLDQIAKILTIYQS SEDIQEELTNLSELQEEIEQISNLKGYTGTHNLSLKAINLILDELWHTNDN QIAIFNRLKLVPKKVDLSQQKEIPTLVDDFILSPVVKRSFIQSIKVINAIKK YGLPNDIIELAREKNSKDAQKMINEMQKRNRQTNERIEEIIIRTGKENAKY LIEKIKLHDMQEGKCLYSLEAIPLEDLLNPNFNYEVDHIIIPRSVSFDNSFNK VLVKQEEASKKGNRTPFQYLSSSDSKISYETFKKHILNLA KGKGRISKTKKE YLLEERDINRFSVQKDFINRLVDTRYATRGLMNLLRSYFRVNNLDVKVK SINGGFTSFLRRKWKFKKERNKGYKHAEDALIANADFIFKEWKKLDKA KKVMENQMFEKQAESMPEIETEQEYKEIFITPHQIKHIKDFDYKYSHRV DKKPNRELINDTLYSTRKDDKGNLIVNNLNGLYDKDNDKLLKLINKSPE KLLMYHHDPTQYQKLKLIMEQYGDENPLYKYEEETGNYLTKYSKKNNG PVIKKIKYYGNKLNALHDITDDYPNSRNKVVKLSLKPYPYFDVYLDNGVYK FVTVKNLDVIKKENYEVNSKCYEEAKKLLKISNQAEFIASFYNNDLIKIN GELYRVIGVNNDLLNRIEVMIDITYREYLENMNDKRPPRIIKTIASKTQSIK KYSTDILGNLYEVKSKKHPQIIKKG
SEQ ID NO: 186 промото р EF1a	GAGTAATTCATACAAAAGGACTCGCCCCTGCCTTGGGGAATCCCAGGG ACCGTCGTAAACTCCCCTAACGTAGAACCCAGAGATCGCTGCGTTCC CGCCCCCTCACCCGCCCGCTCTCGTCATCACTGAGGTGGAGAAGAGCAT GCGTGAGGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCCACA GTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAG AGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCGTGTACTGGCTC CGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCCTATATAAGTGCAGTAGTC GCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAA GTGCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTACGGGTTATGGCCC TTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACGCCCTGGCTGCAGTACGTGATTCTT GATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGC GCTTAAGGAGCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCTTGGGC GCTGGGGCCCGCGGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGC TGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTTGATGACCTGCTGCGA CGCTTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAATGCGGGCCAAGATCTGCA CACTGGTATTTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCCTGCG TCCCAGCGCACATGTTTCGGCGAGGCGGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCG AGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCT GGCCTCGCGCCCGCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCC

	Последовательность
	CGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAA GGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGA GTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAA GAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGG CAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGGCGA CGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCC CTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAG TTCGTGACCGCCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGT CCGGACTCAGATCTCGAGAGGAGGAGGAGGAGACAGACAGCAGGATG CCCCACCTCGACAGCCCCGGCAGCTCCCAGCCGAGACGCTCCTTCCTCT CAAGGGTGATCAGGGCAGCTCTACCGTTGCAGCTGCTTCTGCTGCTGCT GCTGCTCCTGGCCTGCCTGCTACCTGCCTCTGAAGATGACTACAGCTGC ACCCAGGCCAACAACTTTGCCCGATCCTTCTACCCCATGCTGCGGTACA CCAACGGGCCACCTCCCACCTAG
SEQ ID NO: 365	MAPKKRKRKVGIIHGVPAALEPGEKPYKCPECGKSFSRSDNLVRHQRTHTGE KPYKCPECGKSFSHRITLTNHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSREDNLHHTQR THTGEKPYKCPECGKSFSSTSHSLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSSSLV RHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSREDNLHHTQRHTHTGKKTSKRPAATKKAG QAKKKKGSYPYDVPDYALEDALDDFDLDMLGSDALDDFDLDMLGSDAL DDFDLDMLGSDALDDFDLDM
SEQ ID NO: 366	MAPKKRKRKVGIIHGVPAALEPGEKPYKCPECGKSFSRSDNLVRHQRTHTGE KPYKCPECGKSFSHRITLTNHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSREDNLHHTQR THTGEKPYKCPECGKSFSSTSHSLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSSSLV RHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSREDNLHHTQRHTHTGKKTSKRPAATKKAG QAKKKKGSYPYDVPDYALEEASGSGRADALDDFDLDMLGSDALDDFDLDM MLGSDALDDFDLDMLGSDALDDFDLDMINSRSSGSPKKRKRKVGSIYLPD TDDRHRIEEKRRKRTYETFKSIMKKSPFSGPTDPRPPPRRIA VPSRSSASVPKP APQYPFTSSSLTINYDEFPTMVFPSPGQISQASALAPAPPQVLPQAPAPAPAP AMVSALAQAPAPVPLAPGPPQAVAPPAPKPTQAGEGTLSEALLQLQFDD EDLGALLGNSTDPAVFTDLASVDNSEFQQLLNQGIPVAPHTTEPMLMEYPE AITRLVTGAQRPPDPAPAPLGLPGLNGLLSGDEDFSSIADMDFSALLGSGS GSRDSREGMFLPKPEAGSAISDVFEGREVCQPKRIRPFHPPGSPWANRPLPA SLAPTPTGPVHEPVGSLTPAPVPQPLDPAPA VTPEASHLLEDPEETSQAVK ALREMA DTVIPQKEEAICGQMDLSHPPPRGHLDELTTTLESMTEDLNLDL PLPELNEILD TFLNDECLLHAMHISTGLSIFDTSLF
SEQ ID NO: 367 Контрол ьный вектор EGFP- KASH	GCGGCCGCACGCGTGGCGCGCCGTTTAAACTTAATTAAGCTAGCCGTTA CATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCC GCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGG GACTTTCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCAC TTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACG TCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTT ATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATT ACCATGggtcgaggtgagccccacgttctgcttactctccccatctcccccccccccccccccaattttgattt atttattttttaattttttgtgcagcgatggggggcggggggggggggggggcgcgcgccaggcggggcggggcgggg cgagggggcggggcggggcgagggcggagaggtgcgggcggcagccaatcagagcgggcgcgctccgaaagtctct ttatggcgagggcggcgggcggcgccctataaaaagcgaagcgcgcggcgggcgaggtagctgctgctgctgct tcgccccgtccccgctccgcgccgctcgcgcccccggctctgactgaccgcgftactccccaggtga gcgggcggggacggccttctcctccggggtgtaattagcgcttggtttaatgacggctcgtttctttctgtggctgctg aaagccttaagggctccgggagggcctttgtcggggggggagcggctcgggggtgctgctgctgtgtgtgctg tggggagcggcgctgcccggcgctgcccggcgctgagcgcctcggggcggcgggggctttgtgcgc tccgctgtgctgcgagggggagcggcgggcggggcggtgccccgggtgccccggggctgcgaggggaacaaa

	Последовательность
	<p> ggctgcgtgcggggtgtgtgcgtgggggggtgagcagggggtgtgggcgcggcggtcgggctgtaacccccct gcacccccctccccgagttgctgagcacggcccggcttcgggtgcggggctccgtgcggggcggtggcgcggggct cgccgtgccggggcggggggtggcggcaggtgggggtgccggggcggggcggggccgcctcggggccggggagg gctcgggggaggggcgcggcgccccggagcgccggcggtgtcgaggcgcggcgagccgcagccattgcctt ttatgtaatcgtgcgagaggcgcagggaacttctttgtcccaaatctggcggagccgaaatctgggaggcgcgcg cgcacccccctagcgggcgcgggcgaagcgggtgcggcgccggcaggaaggaaatgggcggggaggggcctcgtg tgcgtgcgcgcgcgcgcctcccccttccatctccagcctcggggctgccgcagggggacggctgccttcgggggg gacggggcagggcgggggttcggcttctggcgtgtgaccggcggtctagacctctgctaaccatgttcatgccttct cttttctacagctcctgggcaacgtgctggttgtgtgctgtctcatcttttgcaaaagaattGGTACCGCCA CCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCC TGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCG GCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCA TCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCAC CCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAG CAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAG CGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAG GTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGC ATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTAC AACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAAC GGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGC GTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGC CCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGA GCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCG TGACCGCCGCGGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTCCG GACTCAGATCTCGAGAGGAGGAGGAGGAGACAGACAGCAGGATGCC CACCTCGACAGCCCCGGCAGCTCCCAGCCGAGACGCTCCTTCTCTCAA GGGTGATCAGGGCAGCTCTACCGTTGCAGCTGCTTCTGCTGCTGCTGCT GCTCCTGGCCTGCCTGCTACCTGCCTCTGAAGATGACTACAGCTGCACC CAGGCCAACAACCTTTGCCCGATCCTTCTACCCCATGCTGCGGTACACCA ACGGGCCACCTCCCACCTAGAGCGCTaatcaacctctggattacaaaattgtgaaagattgact ggtattcttaactatgttctccttttacgctatgtgatacctctttaatgcctttgtatcatgctattgctcccgatggct ttcattttctctcctgtataaatcctggtgctgtctctttatgaggagttgtggcccgttgcaggcaacgtggcgtggtg tgcactgtgttgcacgaacccccactggttggggcattgccaccacctgcagctccttccgggacttgccttcc ccccctcctattgccacggcggaactcatcgcgcctgcttgcctgcccgtgctggacaggggctcggctgttgggcaact gacaattccgtggtgttgcgggaaalcatcgtccttcttggctgctcgcctatgttccacctggattctgcgcggg acgtccttctgctacgtccttcggccctcaatccagcggaccttcttcccgggctgctcgcggetctgcggcctct tccgcttcttgccttgcctcagacgagtcggatctcctttgggcccgcctccccgcAGATCTACGGGT GGCATCCCTGTGACCCCTCCCCAGTGCCTCTCCTGGCCCTGGAAGTTGC CACTCCAGTGCCACCAGCCTTGTCTAATAAAAATTAAGTTGCATCATT TTGTCTGACTAGGTGTCCTTCTATAATATTATGGGGTGGAGGGGGGTGG TATGGAGCAAGGGGCAAGTTGGGAAGACAACCTGTAGGGCCTGCGGGG TCTATTGGGAACCAAGCTGGAGTGCAGTGGCACAATCTTGGCTCACTGC AATCTCCGCCTCCTGGGTTCAAGCGATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCGAG TTGTTGGGATTCCAGGCATGCATGACCAGGCTCAGCTAATTTTTGTTTTT TTGGTAGAGACGGGGTTTACCATATTGGCCAGGCTGGTCTCCAACCTCC TAATCTCAGGTGATCTACCCACCTTGGCCTCCCAAATTGCTGGGATTAC AGGCGTGAACCACTGCTCCCTTCCCTGTCTTCTGATTTTGTAGGTAACC ACGTGCGGACCGAGCGGCCGC </p>
SEQ ID NO: 368 EGFP-	<p> GCGGCCGCACGCGTGGCGCGCCGTTTAACTTAATTAAGCTAGCCGTTA CATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCC GCCCATGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGG </p>

	Последовательность
	CACTCCAGTGCCACCAGCCTTGTCTAATAAAAATTAAGTTGCATCATT TTGTCTGACTAGGTGTCCTTCTATAATATTATGGGGTGGAGGGGGGGTGG TATGGAGCAAGGGGCAAGTTGGGAAGACAACCTGTAGGGCCTGCGGGG TCTATTGGGAACCAAGCTGGAGTGCAGTGGCACAATCTTGGCTCACTGC AATCTCCGCCTCCTGGGTTCAAGCGATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCGAG TTGTTGGGATTCCAGGCATGCATGACCAGGCTCAGCTAATTTTTGTTTTT TTGGTAGAGACGGGGTTTCACCATATTGGCCAGGCTGGTCTCCAACCTCC TAATCTCAGGTGATCTACCCACCTTGGCCTCCCAAATTGCTGGGATTAC AGGCGTGAACCACTGCTCCCTTCCCTGTCTTCTGATTTTGTAGGTAACC ACGTGCGGACCGAGCGGCCGC
SEQ ID NO: 422 WT EGR3	MTGKLAEKLPVTMSSLLNQLPDNLYPEEIPALNLFSGSSDSVVHYNQMAT ENVMDIGLTNEKPNPELSYSGSFQAPGNKTVTYLGKFAFDSPSNWCQDNI ISLMSAGILGVPPASGALSTQTSTASMVQPPQGDVEAMYPALPPYSNCGDL YSEPVSFHDPQGNPGLAYSPODYQSAKPALDSNFLFPMIPDYNLYHHPNDM GSIPEHKPFQGMPIRVNPPPIPLETIKAFKDKQIHPGFGSLPQPPLTLKPIRP RKYPNRPSKTPHERPHACPAEGCDRRFSRDELTRHLRIHTGHKPFQCRIC MRSFSRSDHLTTHIRTHTGEKPFACEFCGRKFARSDERKRHAKIHLKQKEK KAEKGGAPSASSAPPVSLAPVTTCA

Таблица 26: SCN1A геномные области, нацеленные на гРНК и белок dCas

Стартовое положение в Chr 2 человека, где расположена целевая последовательность	SEQ ID NO гРНК	Последовательность гидовой РНК (соответствующая последовательности, узнаваемой гРНК)
166178880	197	ggtacgggcaagatttcttg
166178871	198	ttgcccgtaccaaagtcttg
166177369	201	ACACAATGAGCCACCTACAAG
166177362	202	GTGGCTCATTGTGTGTGTGCC
166177299	203	AGAAAGCTGATACAGATACAA
166155393	207	TTCTCAGTTTTGAAATTA AAA
166155264	208	CATATCCCTGCAGGTTTCAGAA
166155255	209	TGGATTCTCTTCTGAACCTGC
166155099	210	agagagagagagagagagaga
166149373	211	TGGTCTCATTCTTTTTGTGGG
166149176	107	aaggctgtctaggtcaagtgt
166149118	224	tgttctccagattaacactt
166148953	225	ATTACAGTTCTGTCAGCATGC
166148843	226	ATCATCTGTAACCATCAAGGA
166148565	227	TCCTGCCTACTTAGTTTCAAG
166148361	228	TGCTGAGGCAGGACACAGTGT
166142396	229	ACAAAGTAAGTGTCAGTGTGG
166142391	230	CTGACACTTACTTTGTCTAAA
166142344	231	ATAATAGTTGTGTCTTTATAA
166142239	232	CGATATTTTCATGGATTCCTT
166142219	233	AAAACCTGGAACCGCATTCCCA
166141162	234	TGTACAAGCAGGGCTGCAAAG
166141145	235	AAAGGGGAATGGGAACACCCG
166141090	236	ATGTTCAAGGTGCAGAAGGAA
166140928	237	tcaacaagctccaagaagt

Стартовое положение в Chr 2 человека, где расположена целевая последовательность	SEQ ID NO гРНК	Последовательность гидовой РНК (соответствующая последовательности, узнаваемой гРНК)
166140590	238	GTTAACAAATACACTAAACAC
166128037	109	gctgatttgtaggtacca
166128002	108	gatgaagccgagaggatactg
165990246	247	TGTTTGCTCAAACGTGCACCA
165990193	248	AAATATGTACCACAAGAAATG
165990076	249	TATCTGGTTTCTCTCACTGCT
165989684	250	AAATAAGACATGAAAACAAGA
165989571	251	ATTGCAAAGCATAATTTGGAT

Таблица 27: Примеры геномных областей SCN1A, на которые нацелены цинковые пальцы eTF

Стартовое положение в Chr 2 человека, где расположена целевая последовательность	SEQ ID NO целевого участка	Последовательность целевого участка, узнаваемая ДНК-связывающим белком	SEQ ID NO eTF
166149168	35	ctaggtcaagtgtaggag	271
166149165	257	GGTCAAGTGTAGGAGAC A	273
166128025	36	taggtaccatagagtgag	279
166127991	136	gaggatactgcagaggtc	280

Таблица 28: Аминокислотные последовательности eTF, которые распознают целевые участки SCN1A

eTF SEQ ID NO:	Последовательность eTF	Распознаваемый целевой участок
SEQ ID NO: 272	MAPKKKRKVGIHGVPAALEPGEKPYKCPECGKSFSSKKALTEHQ RTHTGEKPYKCPECGKSFSSPADLTRHQRTHTGEKPYKCPECGKS FSRSDNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSREDNLHQRTHTG EKPYKCPECGKSFSRSDNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSG NLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTSGHLVRHQRTHTGEKPYK CPECGKSFSQNSTLTEHQRTHTGKKTSKRPAATKKAGQAKKKKG SYPYDVPDYALEDALDDFDLDMLGSDALDDFDLDMLGSDALDD FDLDMLGSDALDDFDLDM	SEQ ID NO: 257
SEQ ID NO: 280	MAPKKKRKVGIHGVPAALEPGEKPYKCPECGKSFSDPGALVRHQ RTHTGEKPYKCPECGKSFSDNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGK SFSQSGDLRRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTHLDLIRHQRTHTG EKPYKCPECGKSFSTSGNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSD NLVRHQRTHTGKKTSKRPAATKKAGQAKKKKGSYPYDVPDYAL EDALDDFDLDMLGSDALDDFDLDMLGSDALDDFDLDMLGSDAL DDFDLDM	SEQ ID NO: 136

Таблица 29: Аминокислотные последовательности DBD eTF

eTF SEQ ID NO:	DBD SEQ ID NO:	Последовательность DBD
SEQ ID NO: 270	SEQ ID NO: 393	LEPGEKPYKCPECGKSFSSRKNLKNHQRTHTGEKPYKCPECGKS FSDPGALVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSREDNLHTHQRTHTG EKPYKCPECGKSFSDPGALVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTS GELVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSRKNLKNHQRTHTGKKTS
SEQ ID NO: 272	SEQ ID NO: 395	LEPGEKPYKCPECGKSFSSKKALTEHQRTHTGEKPYKCPECGKS FSSPADLTRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSRSDNLVRHQRTHTG EKPYKCPECGKSFSSREDNLHTHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSRS DELVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSQSGNLTEHQRTHTGEKPY KCPECGKSFSTSGHLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSQNSTLT EHQRTHTGKKTS
SEQ ID NO: 278	SEQ ID NO: 401	LEPGEKPYKCPECGKSFSSRNDALTEHQRTHTGEKPYKCPECGKS FSDPGHLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTSGELVRHQRTHTG EKPYKCPECGKSFSTHLDLIRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSKK ALTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSQLAHLRAHQRTHTGEKPY KCPECGKSFSSRSDHLTNHQRTHTGKKTS
SEQ ID NO: 280	SEQ ID NO: 403	LEPGEKPYKCPECGKSFSDPGALVRHQRTHTGEKPYKCPECGKS FSSRSDNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSQSGDLRRHQRTHTG EKPYKCPECGKSFSTHLDLIRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTSG NLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSRSDNLVRHQRTHTGKKTS
SEQ ID NO: 281	SEQ ID NO: 404	LEPGEKPYKCPECGKSFSSQAGHLASHQRTHTGEKPYKCPECGKS FSSREDNLHTHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTSGNLTEHQRTHTG EKPYKCPECGKSFSTHLDLIRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSQKS SLIAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSQAGHLASHQRTHTGKKTS
SEQ ID NO: 282	SEQ ID NO: 405	LEPGEKPYKCPECGKSFSTTGNLTVHQRTHTGEKPYKCPECGKS FSTSGELVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSREDNLHTHQRTHTG EKPYKCPECGKSFSTSGNLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSQSS SLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSQRANLRAHQRTHTGKKTS

Таблица 30: Целевые участки GRN и eTF для увеличения экспрессии GRN

eTF SEQ ID NO:	Последовательность eTF	Целевой участок SEQ ID NO:
SEQ ID NO: 337	MAPKKRKRKVGIIHGVPAALEPGEKPYKCPECGKSFSTSHSLTE HQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDCDLARHQRTHTGEKPYKCP ECGKSFSTTGNLTVHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDPGALVR HQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTHLDLIRHQRTHTGEKPYKCP ECGKSFSTGHLLHQRTHTGKKTSKRPAATKKAGQAKKKK GYPYDVPDYALEDALDDFDLDMLGSDALDDFDLDMLGSD ALDDFDLDMLGSDALDDFDLDM	SEQ ID NO: 330
SEQ ID NO: 338	MAPKKRKRKVGIIHGVPAALEPGEKPYKCPECGKSFSSRNDTLTE HQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDPGALVRHQRTHTGEKPYKCP ECGKSFSTSGELVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSRSDNLVR HQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTSGELVRHQRTHTGEKPYKCP ECGKSFSTKNSLTEHQRTHTGKKTSKRPAATKKAGQAKKKK GYPYDVPDYALEDALDDFDLDMLGSDALDDFDLDMLGSD ALDDFDLDMLGSDALDDFDLDM	SEQ ID NO: 331

	<p>PRPPRRIAVPSRSSASVPKPAPQYPFTSSLSTINYDEFPTMVF PSGQISQASALAPAPPQVLPQAPAPAPAPAMVSALAQAPAPVP VLAPGPPQAVAPPAPKPTQAGEGTLSEALLQLQFDDDEDLGA LGNSTDPAVFTDLASVDNSEFQQLLNQGIPVAPHTTEPMLME YPEAITRLVTGAQRPPDPAPAPLGAPGLPNGLLSGDEDFSSIA DMDFSALLGSGSGSRDSREGMFLPKPEAGSAISDVFEGREVC QPKRIRPFHPPGSPWANRPLPASLAPTPTGPVHEPVGSLTPAPV PQPLDPAPAVTPEASHLLEDPDEETSQAVKALREMA DTVIPQ KEEAAICGQMDLSHPPPRGHLDELTTTLESMTEDLNLDSP LTP ELNEILD TFLNDECLLHAMHISTGLSIFDTSLF</p>	
SEQ ID NO: 343	<p>MAPKKRKRKVG IHGVPAALEPGEKPYKCPECGKSFSSPADLTR HQRTH TGEKPYKCPECGKSFSDSGNLRVHQRTH TGEKPYKCP ECGKSFSQLAHLRAHQRTH TGEKPYKCPECGKSF SQRANLRA HQRTH TGEKPYKCPECGKSF SREDNLH THQRTH TGEKPYKCP ECGKSFSRSDNLVRHQRTH TGGKTSKRPAATKKAGQAKKKK GSY PYDVPDY ALEDALDDFDLDMLGSDALDDFDLDMLGSD ALDDFDLDMLGSDALDDFDLDML</p>	SEQ ID NO: 38
SEQ ID NO: 344	<p>MAPKKRKRKVG IHGVPAALEPGEKPYKCPECGKSFSTSHSLTE HQRTH TGEKPYKCPECGKSF SHKNALQNHQRTH TGEKPYKC PECGKSF SERSHLREHQRTH TGEKPYKCPECGKSF SSKKALTE HQRTH TGEKPYKCPECGKSF SQRANLRAHQRTH TGEKPYKC PECGKSF SRKDNLKNHQRTH TGEKPYKCPECGKSF SQSSNLV RHQRTH TGEKPYKCPECGKSF SQSSSLVRHQRTH TGEKPYKC PECGKSF SQAGHLASHQRTH TGGKTSKRPAATKKAGQAKKK KGSY PYDVPDY ALEEASGSGRADALDDFDLDMLGSDALDDF DLDMLGSDALDDFDLDMLGSDALDDFDLDMLINSRSSGSPK KKRKVG SQYLPD TDDRHRIEEK RKR TYETFKSIMKKSPFSGPT DPRPPRRIAVPSRSSASVPKPAPQYPFTSSLSTINYDEFPTMVF FPSGQISQASALAPAPPQVLPQAPAPAPAPAMVSALAQAPAPV PVLAPGPPQAVAPPAPKPTQAGEGTLSEALLQLQFDDDEDLGA LLGNSTDPAVFTDLASVDNSEFQQLLNQGIPVAPHTTEPMLM EYPEAITRLVTGAQRPPDPAPAPLGAPGLPNGLLSGDEDFSSIA DMDFSALLGSGSGSRDSREGMFLPKPEAGSAISDVFEGREVC QPKRIRPFHPPGSPWANRPLPASLAPTPTGPVHEPVGSLTPAPV PQPLDPAPAVTPEASHLLEDPDEETSQAVKALREMA DTVIPQ KEEAAICGQMDLSHPPPRGHLDELTTTLESMTEDLNLDSP LTP ELNEILD TFLNDECLLHAMHISTGLSIFDTSLF</p>	SEQ ID NO: 335
SEQ ID NO: 345	<p>MQSQLIKPSRMRKY PNRPSKTPPHERPY ACPVESC DRRFSSPA DLTRHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSDSGNLRVHIRTH TGEKPF AC DICGRKFAQLAHLRAHTKIHLRQKDRPY ACPVESC DRRFS QRANLRAHIRIHTGQKPFQCRICMRNF SREDNLH THIRTH TGE KPFAC DICGRKFARSDNLVRHTKIHLRQKDKLEMSGLEMAD HMMAMNHGRFPDGTNGLHHHPAHRMGMGQFPSPHHHQQQ QPQHAFNALMGEHIHYGAGNMNATSGIRHAMGPGTVNGGH PPSALAPAARFNNSQFMGPPVASQGGSLPASMQLQKLNQYF NHPYPHNHYMPDLHPAAGHQMN GTNQHFRCNPKHSGGS STPGGSGGSSTPGGSGSSSGGAGSSNSGGGSGSGNMPASVA HVPAAMLPPNVIDTDFIDEEVLMSLVIEMGLDRIKELPELWLG QNEFD FMTDFVCKQQPSRVSC</p>	SEQ ID NO: 38
SEQ ID NO: 60	<p>MSGLEMADHMMAMNHGRFPDGTNGLHHHPAHRMGMGQFP SPHHHQQQQPQHAFNALMGEHIHYGAGNMNATSGVRHAMG PGTVNGGHPPSALAPAARFNNSQFMGPPVASQGGSLPASMQL</p>	SEQ ID NO: 38

	<p>QKLNNQYFNHHPYPHNHYMPDLHPAAGHQMNGTNQHFRDC NPKHSGGSSTPGGSGGSSTPGGSGSSSGGGAGSSNSGGGSGSG NMPASVAHVPAAMLPPNVIDTDFIDEEVLMSLVIEMGLDRIK ELPELWLGQNEFDFMTDFVCKQQPSRVSCQSQLIKPSRMRKY PNRPSKTPPHERPYACPVESCDRRFSRRDELNVHIRIHTGQKPF QCRICMRNFSSRRTCRAHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQSSNL VRHTKIHLRQKDRPYACPVESCDRRFSQLAHLRAHIRIHTGQ KPFQCRICMRNFSTSGNLRVHIRTHTGEKPFACDICGRKFAHR TTLTNHTKIHLRQKDK</p>	
SEQ ID NO: 346	<p>MSGLEMADHMMAMNHGRFPDGTNGLHHHPAHRMGMGQFP SPHHHQQQQPQHAFNALMGEHIHYGAGNMNATSGVRHAMG PGTVNGGHPPSALAPAARFNNSQFMGPPVASQGGSLPASMQL QKLNNQYFNHHPYPHNHYMPDLHPAAGHQMNGTNQHFRDC NPKHSGGSSTPGGSGGSSTPGGSGSSSGGGAGSSNSGGGSGSG NMPASVAHVPAAMLPPNVIDTDFIDEEVLMSLVIEMGLDRIK ELPELWLGQNEFDFMTDFVCKQQPSRVSCQSQLIKPSRMRKY PNRPSKTPPHERPYACPVESCDRRFS SPADLTRHIRIHTGQKPF QCRICMRNFSDSGNLRVHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQLAH LRAHTKIHLRQKDRPYACPVESCDRRFSQRANLRAHIRIHTGQ KPFQCRICMRNFSREDNLHTHIRTHIRTHIRTHIRTHIRTHIR DNLVRHTKIHLRQKDK</p>	SEQ ID NO: 38
SEQ ID NO: 63	<p>MQSQLIKPSRMRKYPNRPSKTPPHERPYACPVESCDRRFSSPA DLTRHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSDSGNLRVHIRTHTGEKPF ACDICGRKFAQLAHLRAHTKIHLRQKDRPYACPVESCDRRFS QRANLRAHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSREDNLHTHIRTHIRTHIR KPFACDICGRKFARSDNLVRHTKIHLRQKDKLEMADHMLLA EGYRLVQRPPSAAA AHGPHALRTLPPYAGPGLDSGLRPRGAP LGPPPPRQPGALAYGAFGPPSSFQPFPAVPPPAAGIAHLQPVA TPYPGRAAAPNAPGGPPGPQAPSAAAPPPPAHALGGMDAE LIDEEALTSLELELGLHRVRELPELFLGQSEFDCFSDLGSAPPA GSVSC</p>	SEQ ID NO: 38
SEQ ID NO: 64	<p>MAADHMLLAEGYRLVQRPPSAAA AHGPHALRTLPPYAGPGL DSGLRPRGAPLGPPPPRQPGALAYGAFGPPSSFQPFPAVPPPA AGIAHLQPVATPYPGRAAAPNAPGGPPGPQAPSAAAPPPPA HALGGMDAELIDEEALTSLELELGLHRVRELPELFLGQSEFDC FSDLGSAPPAGSVSCGGSGGGSGQSQLIKPSRMRKYPNRPSKT PHERPYACPVESCDRRFSSPADLTRHIRIHTGQKPFQCRICMR NFSDSGNLRVHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQLAHLRAHTKIH LRQKDRPYACPVESCDRRFSQRANLRAHIRIHTGQKPFQCRIC MRNFSREDNLHTHIRTHIRTHIRTHIRTHIRTHIRTHIRTHIR KIHLRQKDKLEMADHMLLAEGYRLVQRPPSAAA AHGPHALR TLPPYAGPGLDSGLRPRGAPLGPPPPRQPGALAYGAFGPPSSF QPFPAVPPPAAGIAHLQPVATPYPGRAAAPNAPGGPPGPQAP PSAAAPPPPAHALGGMDAELIDEEALTSLELELGLHRVRELPE LFLGQSEFDCFSDLGSAPPAGSVSC</p>	SEQ ID NO: 38
SEQ ID NO: 347	<p>MRPHACPAEGCDRRFSSPADLTRHLRIHTGHKPFQCRICMRSF SDSGNLRVHIRTHTGEKPFACEFCGRKFAQLAHLRAHAKIHL KQKEHACPAEGCDRRFSQRANLRAHLRIHTGHKPFQCRICMR SFSREDNLHTHIRTHIRTHIRTHIRTHIRTHIRTHIRTHIRTHIR LKQKEKKAKEGGAPSASSAPPVSLAPVVTTCALEMSGLEMA DHMMAMNHGRFPDGTNGLHHHPAHRMGMGQFPSPHHHQQ QQPQHAFNALMGEHIHYGAGNMNATSGIRHAMGPGTVNGG</p>	SEQ ID NO: 38

	HPPSALAPAARFNNSQFMGPPVASQGGSLPASMQLQKLNNQ YFNHHPYPHNHYMPDLHPAAGHQMNGTNQHFRDCNPKHSG GSSTPGGSGGSSTPGGSGSSSGGGAGSSNSGGGSGSGNMPAS VAHVPAAMLPPNVIDTDFIDEEVLMSLVIEMGLDRIKELPELW LGQNEFDFMTDFVCKQQPSRVSC	
SEQ ID NO: 348	MSGLEMADHMMAMNHGRFPDGTNGLHHHPAHRMGMGQFP SPHHHQQQPQHAFNALMGEHIHYGAGNMNATSGVRHAMG PGTVNGGHPPSALAPAARFNNSQFMGPPVASQGGSLPASMQL QKLNNQYFNHHPYPHNHYMPDLHPAAGHQMNGTNQHFRDC NPKHSGGSSTPGGSGGSSTPGGSGSSSGGGAGSSNSGGGSGSG NMPASVAHVPAAMLPPNVIDTDFIDEEVLMSLVIEMGLDRIK ELPELWLGQNEFDFMTDFVCKQQPSRVSCRPHACPAEGCDR RFSSPADLTRLRIHTGHKPFQCRICMRSFSDSGNLRVHIRTHT GKPFACEFCGRKFAQLAHLRAHAKIHLKQKEHACPAEGCD RRFSQRANLRAHLRIHTGHKPFQCRICMRSFSREDNLHTHIRT HTGKPFACEFCGRKFARSDNLVRHAKIHLKQKEKKAKEGG APSASSAPPVSLAPVVTTCA	SEQ ID NO: 38
SEQ ID NO: 349	MRPHACPAEGCDRRFSSPADLTRLRIHTGHKPFQCRICMRSF SDSGNLRVHIRTHTGKPFACEFCGRKFAQLAHLRAHAKIHL KQKEHACPAEGCDRRFSQRANLRAHLRIHTGHKPFQCRICMR SFSREDNLHTHIRTHTGKPFACEFCGRKFARSDNLVRHAKIH LKQKEKLEMADHLMLAEGYRLVQRPPSAAA AHGPHALRTL PYAGPGLDSGLRPRGAPLGGPPRQPGALAYGAFGPPSSFQPF PAVPPPAAGIAHLQPVATPYPGRAAAPPNAPGGPPGPQPAPSA AAPPPPAHALGGMDAELIDEEALTSLELELGLHRVRELPELFL GQSEFDCFSDLGSAPPAGSVSC	SEQ ID NO: 38
SEQ ID NO: 350	MAADHLMLAEGYRLVQRPPSAAA AHGPHALRTLPPYAGPGL DSGLRPRGAPLGGPPRQPGALAYGAFGPPSSFQPFPAVPPPA AGIAHLQPVATPYPGRAAAPPNAPGGPPGPQPAPSA AAPPPPA HALGGMDAELIDEEALTSLELELGLHRVRELPELFLGQSEFDC FSDLGSAPPAGSVSCGGSGGSGRPHACPAEGCDRRFSSPAD LTRLRIHTGHKPFQCRICMRSFSDSGNLRVHIRTHTGKPF ACEFCGRKFAQLAHLRAHAKIHLKQKEHACPAEGCDRRFSQR ANLRAHLRIHTGHKPFQCRICMRSFSREDNLHTHIRTHTGKPF FACEFCGRKFARSDNLVRHAKIHLKQKEKLEMADHLMLAEG YRLVQRPPSAAA AHGPHALRTLPPYAGPGLDSGLRPRGAPL GGPPRQPGALAYGAFGPPSSFQPFPAVPPPAAGIAHLQPVATPY PGRAAAPPNAPGGPPGPQPAPSA AAPPPPAHALGGMDAELID EEALTSLELELGLHRVRELPELFLGQSEFDCFSDLGSAPPAGS VSC	SEQ ID NO: 38

Таблица 31: Иллюстративные DBD eTF для увеличения экспрессии GRN

eTF SEQ ID NO:	DBD SEQ ID NO:	Последовательность DBD
SEQ ID NO: 337	SEQ ID NO: 377	LEPGEKPYKCPEC GKSFSSTSHSLTEHQRTHTGKPYKCPEC GKSFSDCRDLARHQRTHTGKPYKCPEC GKSFSSTGNLTVH QRTHTGKPYKCPEC GKSFSDPGALVRHQRTHTGKPYKC PEC GKSFSSTHLDLIRHQRTHTGKPYKCPEC GKSFSHTGHL EHQRTHTGKKTS
SEQ ID NO: 338	SEQ ID NO: 378	LEPGEKPYKCPEC GKSFSRNDLTHEHQRTHTGKPYKCPEC GKSFSDPGALVRHQRTHTGKPYKCPEC GKSFSSTSGELVRH QRTHTGKPYKCPEC GKSFSRSDNLVRHQRTHTGKPYKC

		PECGKSFSTSGELVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSTKNSL TEHQRTHTGKKTSCRPAATKKAGQAKKKK
SEQ ID NO: 339	SEQ ID NO: 379	LEPGEKPYKCPECGKSFSTSGNLTEHQRTHTGEKPYKCPEC GKSFSRADNLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSPADLTRH QRTHTGEKPYKCPECGKSFSSQSSNLVRHQRTHTGEKPYKCP ECGKSFSQRANLRAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQLAHL RAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFHRTTLTNHQRTHTGKKT S
SEQ ID NO: 340	SEQ ID NO: 380	LEPGEKPYKCPECGKSFSSPADLTRHQRTHTGEKPYKCPEC GKSFSDSGNLRVHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQLAHLRA HQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSQRANLRAHQRTHTGEKPYK CPECGKSFSSREDNLHTHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSRSDN LVRHQRTHTGKKT
SEQ ID NO: 341	SEQ ID NO: 381	LEPGEKPYKCPECGKSFSSPADLTRHQRTHTGEKPYKCPEC GKSFSDSGNLRVHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQLAHLRA HQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSQRANLRAHQRTHTGEKPYK CPECGKSFSSREDNLHTHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSRSDN LVRHQRTHTGKKT
SEQ ID NO: 342	SEQ ID NO: 382	LEPGEKPYKCPECGKSFSSPADLTRHQRTHTGEKPYKCPEC GKSFSDSGNLRVHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQLAHLRA HQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSQRANLRAHQRTHTGEKPYK CPECGKSFSSREDNLHTHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSRSDN LVRHQRTHTGKKT
SEQ ID NO: 343	SEQ ID NO: 383	LEPGEKPYKCPECGKSFSSPADLTRHQRTHTGEKPYKCPEC GKSFSDSGNLRVHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQLAHLRA HQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSQRANLRAHQRTHTGEKPYK CPECGKSFSSREDNLHTHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSRSDN LVRHQRTHTGKKT
SEQ ID NO: 344	SEQ ID NO: 384	LEPGEKPYKCPECGKSFSTSHSLTEHQRTHTGEKPYKCPEC GKSFSHKNALQNHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSERSHLREH QRTHTGEKPYKCPECGKSFSSKKALTEHQRTHTGEKPYKCP ECGKSFSQRANLRAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSRSDNL KNHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSQSSNLVRHQRTHTGEK PYKCPECGKSFSSSSLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSQA GHLASHQRTHTGKKT
SEQ ID NO: 345	SEQ ID NO: 385	RKYPNRPSTPPHERPYACPVESCDRRFSSPADLTRHIRIHT GQKPFQCRICMRNFSDSGNLRVHIRTHTGEKPFACDICGRK FAQLAHLRAHTKIHLRQKDRPYACPVESCDRRFSQRANLR AHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSSREDNLHTHIRHTHTGEKPFAC DICGRKFARSDNLVRHTKIHLRQKD
SEQ ID NO: 346	SEQ ID NO: 386	RKYPNRPSTPPHERPYACPVESCDRRFSSPADLTRHIRIHT GQKPFQCRICMRNFSDSGNLRVHIRTHTGEKPFACDICGRK FAQLAHLRAHTKIHLRQKDRPYACPVESCDRRFSQRANLR AHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSSREDNLHTHIRHTHTGEKPFAC DICGRKFARSDNLVRHTKIHLRQKDK
SEQ ID NO: 347	SEQ ID NO: 387	HACPAEGCDRRFSSPADLTRHLRIHTGHKPFQCRICMRSFSD SGNLRVHIRTHTGEKPFACFCGRKFAQLAHLRAHAKIHLK QKEHACPAEGCDRRFSQRANLRAHLRIHTGHKPFQCRICM RSFSREDNLHTHIRHTHTGEKPFACFCGRKFARSDNLVRHA KIHLKQKE
SEQ ID NO: 348	SEQ ID NO: 388	HACPAEGCDRRFSSPADLTRHLRIHTGHKPFQCRICMRSFSD SGNLRVHIRTHTGEKPFACFCGRKFAQLAHLRAHAKIHLK

		QKEHACPAEGCDRRFSQRANLRAHLRIHTGHKPFQCRICM RSFSREDNLHHTHIRTHTGEKPFACEFCGRKFARSDNLVRHA KIHLKQKE
SEQ ID NO: 349	SEQ ID NO: 389	HACPAEGCDRRFSSPADLTRHLRIHTGHKPFQCRICMRSFSD SGNLRVHIRTHTGEKPFACEFCGRKFAQLAHLRAHAKIHLK QKEHACPAEGCDRRFSQRANLRAHLRIHTGHKPFQCRICM RSFSREDNLHHTHIRTHTGEKPFACEFCGRKFARSDNLVRHA KIHLKQKE
SEQ ID NO: 350	SEQ ID NO: 390	MADHMLAEGYRLVQRPPSAAAANHGPHALRTLPPYAGPG LDSGLRPRGAPLGPPPRQPGALAYGAFGPPSSFQPFPAVPP PAAGIAHLQPVATPYPGRAAAPPNAPGGPPGPQAPSAAAP PPPAHALGGMDAELIDEEALTSLELELGLHRVRELPELFLG QSEFDCFSDLGSAPPAGSVSC

ПРИМЕРЫ

[0330] Приведенные ниже примеры включены для дополнительного описания некоторых аспектов настоящего изобретения и не должны использоваться для ограничения объема изобретения.

Пример 1

Увеличение экспрессии генов в клетках НЕК293Т

[0331] НЕК293Т трансфицировали плазмидной ДНК, содержащей ген люциферазы под контролем одного из нескольких различных регуляторных элементов, т.е. без контроля промотора; SCP; CMV; SEQ ID NO: 178, функционально связанная с minCMV; SEQ ID NO: 182, функционально связанная с minCMV; и CAG. Нормализованные значения люциферазы для каждой конструкции показаны на фиг.1. Значения нормализованной активности каждой конструкции приведены на фиг.2. Конструкции с промотором minCMV, связанным с регуляторным элементом SEQ ID NO: 178 или 182, обеспечивают более высокие уровни экспрессии люциферазы по сравнению с одним только minCMV и одним только SCP.

[0332] Этот эксперимент показал, что и SEQ ID NO: 178 и 182 являются RE, которые обеспечивают высокий уровень экспрессии генов в клетке. Такие RE могут быть добавлены в экспрессионную кассету, раскрытую в настоящем описании, содержащую не встречающийся в природе активатор транскрипции SCN1A, для увеличения экспрессии активатора транскрипции в клетке, обеспечивая увеличенную экспрессию эндогенного гена SCN1A. В некоторых случаях один или более RE, выбранные из SEQ ID NO: 178 и/или 182, связаны с активатором транскрипции для увеличения экспрессии SCN1A в клетке. Такие регуляторные элементы могут быть добавлены в экспрессионную кассету выше и/или ниже активатора транскрипции в экспрессионной кассете.

Пример 2

Селективность по отношению к парвальбумин-положительным нейронам

[0333] Селективность в отношении парвальбумин-положительных клеток, тип ГАМК-эргических нейронов, определяли с помощью флуоресцентной визуализации. Векторы AAV, содержащие eGFP, функционально связанные либо с контрольным промотором (EF1), либо с PV-селективным RE, и векторы AAV, содержащие CRE-

зависимый tdTomato, совместно вводили мышам GAD2-IRES-CRE (Jackson Labs).

[0334] Мышам вводили инфузию 1,5 мкл вектора AAV (от 5^{12} до 1^{13} к.г./мл) билатерально в дорсальный и вентральный гиппокамп со скоростью 0,3 мкл/мин с 4 мин перерывом после инъекции. Мышей анестезировали для инъекции с помощью изофлурана (2%, 800 мл/мин O₂). Бупивакаин/адреналин использовали для местной анестезии, а карпрофен - для пери/послеоперационной анестезии. Животных помещали в стереотаксическую рамку (Kopf instruments, США), используя следующие координаты для дорсального гиппокампа (AP -2,0 мм, латеральное $\pm 1,5$, DV -1,4 мм от твердой мозговой оболочки) и вентрального гиппокампа (AP -3,1 мм, латеральное $\pm 2,8$, DV -3,8 мм от твердой мозговой оболочки). Шприц Гамильтона (модель № 80308; 10 мкл шприц с соответствующей иглой с 30 ga тупым концом) использовали со стереотаксическим микроманипулятором для обозначения и просверливания отверстий. Дрель использовали только для проникновения в кость. После сверления в мозг вводили инфузионную канюлю до требуемой глубины. Настройки инъекции для ультрамикронасоса III с контроллером micro4 (World Precision Instruments) были следующими: объем инъекции: 1,5 мкл; скорость инъекции: 0,3 мкл/мин. Иглу медленно опускали (в течение примерно 1 минуты) до DV -0,1 мм ниже координат инфузии (-1,5 мм для дорсального гиппокампа и -3,9 мм для вентрального гиппокампа, а затем поднимали до DV -1,4 или -3,8, соответственно). Перед инфузией оставляли иглу на 1 минуту для приведения в состояние равновесия. После завершения введения иглу оставляли на 4 минуты и затем извлекали в течение примерно 1 минуты. После завершения всех четырех инфузий разрез кожи закрывали швами. В течение оставшейся части исследования выполняли ежедневный мониторинг состояния обработанных мышей, и взвешивали их один раз в неделю для контроля массы тела.

[0335] Для сбора ткани мышей умерщвляли с помощью передозировки изофлурана и перфузировали 4% параформальдегидом (PFA). Кусочек ткани головного мозга, содержащий гиппокамп, извлекали и помещали в 4% PFA при 4°C на по меньшей мере 12 часов. Затем ткани головного мозга дегидратировали в 30% сахарозе (в фосфатно-солевом буфере) при 4°C до тех пор, пока ткань не опускалась на дно пробирки. Ткань мозга помещали в Tissue-Tek OCT для получения срезов в криостате. Срезы ткани головного мозга окрашивали на eGFP и tdTomato с помощью стандартных методов иммуногистохимии, используя кроличье поликлональное анти-RFP антитело (Rockland Antibodies and Assay) и поликлональное анти-eGFP антитело цыпленка (Aves Labs).

[0336] На Фиг.3 приведены репрезентативные изображения, полученные у мышей, обработанных вектором AAV, содержащим eGFP и любой PV-селективный элемент (SEQ ID NO: 183 или SEQ ID NO: 184) или конститутивный контрольный промотор EF1 α (SEQ ID NO: 186), вместе со вторым вектором AAV, содержащим флуоресцентный репортер tdTomato, экспрессия которого зависит от активности рекомбиназы Cre. GAD2 селективно экспрессируется в ГАМК-эргических нейронах, включая PV-нейроны, таким образом, экспрессия tdTomato позволяет идентифицировать ГАМК-эргические нейроны (фиг.3,

нижний ряд).

[0337] На фиг.4 показана эффективность экспрессии в PV-клетках для каждого промотора или регуляторного элемента. Экспрессия eGFP, управляемая конститутивным промотором EF1 α показала примерно 40% эффективность экспрессии. Напротив, экспрессия eGFP, управляемая SEQ ID NO: 183 (содержащей промотор, имеющий последовательность SEQ ID NO: 185) или SEQ ID NO: 184, показала примерно 90% эффективность экспрессии, демонстрируя гораздо более высокую эффективность экспрессии, чем в случае промотора EF1 α .

[0338] На фиг.5 показана специфичность экспрессии различных регуляторных последовательностей, SEQ ID NO: 183 и 184, обе стимулировали экспрессию eGFP в PV-клетках со специфичностью примерно 75% по сравнению с промотором EF1 α , который показал менее чем 10%-ную специфичность по отношению к парвальбумин (PV)-положительным клеткам.

[0339] Эти эксперименты подтвердили селективность SEQ ID NO: 183 и 184 регуляторных элементов по отношению к ГАМК-эргическим/PV-нейронам и продемонстрировали анализы, которые можно использовать для измерения селективности к ГАМК-эргическим/PV-клеткам. Один или более из SEQ ID NO: 183-184 регуляторных элемента могут быть включены в экспрессионную кассету, раскрытую в настоящем описании, для увеличения селективной экспрессии активатора транскрипции к ГАМК-эргическим/PV-клеткам по сравнению с клетками, не являющимися ГАМК-эргическими, с целью минимизации нецелевых эффектов, что продемонстрировано с помощью описанных выше анализов. В некоторых случаях, используя анализы, аналогичные описанным выше, в экспрессионной кассете используют один или более RE, селективных к PV-клеткам, для увеличения селективной экспрессии активатора транскрипции в PV-клетках по сравнению с не-PV-клетками.

Пример 3

Идентификация целевых областей, способных активировать SCN1A с помощью SCN1A-специфических активаторов транскрипции

[0340] Для идентификации областей генома, способных усиливать эндогенную экспрессию SCN1A, были сконструированы различные факторы транскрипции (либо нуклеазы цинкового пальца, либо конструкции гРНК/daCas9), которые нацелены на разные области генома, как показано в таблицах 26-29 выше. В гРНК/daCas9 конструкциях гРНК имела ту же последовательность, что и целевая область, потому что гРНК была разработана для нацеливания на комплементарную геномную цепь. Последовательность белка dCas9 представляла собой SEQ ID NO: 104, которая также является SEQ ID NO: 103 с NLS и HA меткой.

[0341] Клетки HEK293 культивировали стандартными методами и трансфицировали (FugeneHD, Promega) плазмидами, несущими сконструированный фактор транскрипции или контрольную конструкцию, в количестве 3 мкг на лунку 6-луночного планшета. Клетки трансфицировали плазмидами, экспрессирующими

конструкции, показанные выше в таблицах 26-29. Через 48 ч после трансфекции клетки собирали и выделяли РНК (набор Qiagen RNeasy Mini), и обрабатывали ДНКазой. РНК (3 мкг) подвергали обратной транскрипции с использованием праймеров OligoDT (Superscript IV, Invitrogen). Образцы кДНК анализировали методом кПЦР, используя полимеразу Phusion (New England Biolabs) и SYBR Green I: (30 с при 98°C, 40 х[10 с при 98°C, 15 с при 66°C, 15 с при 72°C]). Праймеры к SCN1A (5'-TGTCTCGGCATTGAGAACATTC-3' (SEQ ID NO: 190); 5'-ATTGGTGGGAGGCCATTGTAT-3' (SEQ ID NO: 191)) использовали для количественного определения уровней эндогенного транскрипта SCN1A, и относительные уровни экспрессии SCN1A определяли методом дельта-дельта Ct с GAPDH в качестве эталонного гена (5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC'-3' (SEQ ID NO: 192); 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3' (SEQ ID NO: 193)). Данные представлены в виде кратных изменений относительно контроля.

[0342] Результаты показаны на фиг.6 и в приведенной ниже таблице 32 в виде кратного изменения транскрипции SCN1A относительно контрольных условий (например, EGFP-KASH репортерная конструкция).

Таблица 32: Влияние на транскрипцию разных целевых участков генома и соответствующих eTF

Целевой участок SEQ ID NO:	Целевая последовательность, распознаваемая eTF	Среднее значение	T-критерий
197	ggtacgggcaagatttcttg	1,36801947	0,48762102
198	tttgcccgtaccaaagtcttg	1,26748653	0,71262289
201	ACACAATGAGCCACCTACAAG	1,31187425	0,42605224
202	GTGGCTCATTTGTGTGTGTGCC	1,25217773	0,26572657
203	AGAAAGCTGATACAGATACAA	1,7542842	0,34519408
203	AGAAAGCTGATACAGATACAA	1,45636874	0,44464045
207	TTCTCAGTTTTGAAATTA AAA	1,64498972	0,21705582
208	CATATCCCTGCAGGTTTCAGAA	1,75688991	0,28984533
209	TGGATTCTCTTCTGAACCTGC	2,27026665	0,43195546
210	agagagagagagagagagaga	2,05701745	0,42409102
211	TGGTCTCATTCTTTTTGTGGG	1,71471378	0,32104302
107	aaggctgtctaggtcaagtgt	1,36378425	0,18753821
35	ctaggtcaagttaggag	5,12090848	0,0096628
257	GGTCAAGTG TAGGAGACA	1,52068773	0,62403349
224	tgttcctccagattaacactt	1,63040825	0,46710683
225	ATTACAGTTCTGTCAGCATGC	1,34500323	0,32186367
226	ATCATCTGTAACCATCAAGGA	2,58328006	0,0748197
227	TCCTGCCTACTTAGTTTCAAG	1,97097781	0,25980859
228	TGCTGAGGCAGGACACAGTGT	2,4290169	0,30364553

229	ACAAAGTAAGTGTCAGTGTGG	1,30739959	0,72725347
230	CTGACACTTACTTTGTCTAAA	1,95513108	0,02069095
231	ATAATAGTTGTGTCTTTATAA	1,55783618	0,29846459
232	CGATATTTTCATGGATTCCCTT	1,7735976	0,21954265
233	AAAACCTGGAACCGCATTCCCA	2,08698135	0,0454403
234	TGTACAAGCAGGGGCTGCAAAG	1,4663605	0,02946062
235	AAAGGGGAATGGGAACACCCG	1,16749665	0,65768346
236	ATGTTCAAGGTGCAGAAGGAA	2,04547409	0,09880194
237	tcaacaagctccaagaagt	1,46929899	0,24465271
238	GTTAACAATACACTAAACAC	1,37399196	0,33638238
109	gctgattgtattaggtacca	22,4892633	0,09291316
36	taggtaccatagagtgag	25,4730028	0,14942042
108	gatgaagccgagaggatactg	18,7579211	0,13148732
136	gaggatactgcagaggtc	8,6766618	0,16432794
247	TGTTTGCTCAAACGTGCACCA	2,13402102	0,25583999
248	AAATATGTACCACAAGAAATG	2,29522738	0,41829497
249	TATCTGGTTTCTCTCACTGCT	1,44542116	0,0947106
250	AAATAAGACATGAAAACAAGA	1,27016182	0,32368695
251	ATTGCAAAGCATAATTTGGAT	1,42246971	0,18117243

Пример 4

Относительный уровень экспрессии SCN1A, обеспечиваемый экспрессионной кассетой

[0343] В этом примере описан относительный уровень экспрессии SCN1A, обеспечиваемый разными экспрессионными кассетами, включающими не встречающийся в природе модулятор транскрипции, который увеличивает экспрессию SCN1. Ген SCN1A принадлежит к семейству генов, которые обеспечивают инструкции для создания натриевых каналов. Эти каналы, транспортирующие положительно заряженные атомы натрия (ионы натрия) в клетки, играют ключевую роль в способности клетки генерировать и передавать электрические сигналы. Для проверки экспрессионной кассеты культивировали НЕК293 клетки стандартными методами, и трансинфицировали их (PEI) плазмидой в количестве 3 г на лунку 6-луночного планшета. Через 48 часов после трансфекции клетки собирали, и РНК выделяли (Quiagen RNeasy Mini kit) и обрабатывали ДНКазой. РНК (3 мкг) подвергали обратной транскрипции с использованием праймеров OligoDT (Superscript IV, Invitrogen). Образцы кДНК анализированы методом кПЦР, используя полимеразу Phusion (New England Biolabs) и SYBR Green I: (30 сек при 98°C, 40 x[10 сек при 98°C, 15 сек при 66°C, 15 сек при 72°C]).

[0344] Конструировали разные экспрессионные кассеты, включая контрольную экспрессионную кассету, содержащую eGFP репортерный трансен без активатора транскрипции; и экспрессионные кассеты А-Н, представленные выше в таблице 17. Для экспрессионных кассет А-Ф, каждая из которых состояла из не встречающегося в природе

ДНК-связывающего домена, который состоял из шести-девяти цинковых пальцев в соответствии с SEQ ID NO: 103, 131-134, связанными либо с VP64 доменом активации транскрипции, имеющим последовательность SEQ ID NO: 95, либо с VPR доменом активации транскрипции, имеющим последовательность SEQ ID NO: 114. Такие не встречающиеся в природе активаторы транскрипции конструировали таким образом, чтобы они связались с целевым участком, имеющим последовательность любую из SEQ ID: 35-37, 107-108 или 136, или областью генома, содержащей любую из SEQ ID NO: 35-37, 107-108 или 136. Каждая из экспрессионных кассет G и H состояла из dSaCas9-связывающего домена, имеющего последовательность SEQ ID NO: 103, связанную с VP64 доменом активации транскрипции, имеющим последовательность SEQ ID NO: 95. Каждая из экспрессионных кассет G и H также содержала гРНК для нацеливания на не встречающийся в природе активатор транскрипции, причем каждая гРНК содержала последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 107-108. Каждая экспрессионная кассета также содержала RE, имеющий последовательность SEQ ID NO: 178.

[0345] Для количественной оценки уровней эндогенного транскрипта SCN1A использовали праймеры для SCN1A (5'-TGTCTCGGCATTGAGGAGACATTC-3' (SEQ ID NO: 190); 5'-ATTGGTGGGAGGCCATGTGTAT-3' (SEQ ID NO: 191)), и относительные уровни экспрессии SCN1A определяли методом дельта-дельта Ct с GAPDH в качестве эталонного гена (5'-ACCACAGTCCATGCCATCATCATCAC'-3' (SEQ ID NO: 192); 5'-TCCACCCTGTTGTTGCTGTA-3' (SEQ ID NO: 193)).

[0346] На фиг.7 показан относительный уровень экспрессии SCN1A в клетках, трансфицированных разными экспрессионными кассетами, представленный в виде кратного изменения (\log_{10}) по отношению к контрольной конструкции eGFP. Экспрессия не встречающихся в природе активаторов транскрипции экспрессионными кассетами А-Н обеспечила увеличение экспрессии гена SCN1A в клетках HEK293 относительно контрольной экспрессионной кассеты.

[0347] На фиг.8 показана экспрессионная кассета А, состоящая из не встречающегося в природе активатора транскрипции, который использовали для увеличения экспрессии гена SCN1A по сравнению с другими генами в клетках HEK293. Кроме того, для количественного определения уровней эндогенных транскриптов TTC21B, SCN9A, GRN, UTRN и TTN использовали праймеры для TTC21B (5'-GGTCACGTACAGCTTCGCAT-3' (SEQ ID NO: 283); 5'-CTGGTTCTGGCTCGTGGAG-3' (SEQ ID NO: 284)), SCN9A (5'-AAGCCCCAAAGCCAAGCAG-3' (SEQ ID NO: 285); 5'-AGGTGTGGCATGAAACGG-3' (SEQ ID NO: 286)), GRN (5'-ATGGTCAGTTCTCTGCCCGTG-3' (SEQ ID NO: 287); 5'-CGGTAAGATGCAGGAGGAGTGGCC-3' (SEQ ID NO: 288)), UTRN (5'-TGACAATGGGCAGAACGAAT-3' (SEQ ID NO: 289); 5'-TGCACTCTGTTGACGTT (SEQ ID NO: 290)), и TTN (5'-TGTTGCCACTGGTGCTAAAG-3' (SEQ ID NO: 291); 5'-ACAGCAGTCTCTCTCCCCTCTC-3' (SEQ ID NO: 292)), и относительные уровни экспрессии этих генов определяли методом дельта-дельта Ct с GAPDH в качестве

эталонного гена, используя праймеры, имеющие последовательности SEQ ID NO: 192-193.

[0348] На фиг.8 показан относительный уровень экспрессии эндогенных транскриптов SCN1A, TTC21B, SCN9A, GRN, UTRN и TTN, представленный в виде кратного изменения относительно контрольных условий. Описанная выше экспрессионная кассета А обеспечивала специфическое увеличение экспрессии гена SCN1A или белка Nav1.1 по сравнению с другими протестированными генами. Это указывало на то, что целевой участок, распознаваемый активатором транскрипции экспрессионной кассеты А, является специфическим для гена SCN1A, и приводит к увеличению экспрессии гена SCN1A в клетках HEK293.

Пример 5

Активация SCN1A

[0349] Клетки HEK293 культивировали стандартными методами и трансфицировали (FuGene HD, Promega) каждым из тестируемых активаторов или контролем EGFP в количестве 3 мкг. Через 48 ч после трансфекции клетки собирали и выделяли РНК (набор Qiagen RNeasy Mini), и обрабатывали ДНКазой. РНК (3 мкг) подвергали обратной транскрипции с использованием праймеров OligoDT (Superscript IV, Invitrogen). Образцы кДНК анализировали методом кПЦР, используя полимеразу Phusion (New England Biolabs) и SYBR Green I: (30 с при 98°C, 40 x[10 с при 98°C, 15 с при 68°C, 15 с при 72°C]). Праймеры к человеческому SCN1A (5'-TGTCTCGGCATTGAGAACATTC-3' (SEQ ID NO: 190); 5'-ATTGGTGGGAGGCCATTGTAT-3' (SEQ ID NO: 191)) использовали для количественного определения уровней управляемой репортером транскрипции EGFP, и относительные уровни экспрессии EGFP определяли методом дельта-дельта Ct с GAPDH в качестве эталонного гена (5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' (SEQ ID NO: 192); 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3' (SEQ ID NO: 193)). Данные представлены в виде кратных изменений относительно контрольного состояния. См. фиг. 12B и фиг. 13B. Последовательности SEQ ID NO: 6, 7 и 9 представляют собой eTF, полученные из человеческого белка EGR1 и сконструированные для связывания с целевым участком, расположенным вблизи или в эндогенном гене SCN1A, где целевой участок имеет SEQ ID NO: 35-37. По сравнению с репортерным контролем EGFP, eTF, содержащие любую из SEQ ID NO: 6, 7 или 9, приводили к увеличению относительного уровня экспрессии SCN1A по меньшей мере в 2, 7 или 20 раз, соответственно.

Пример 6

Увеличение экспрессии эндогенного SCN1A в клетках HEK293 с помощью SCN1A-специфических факторов транскрипции

[0350] Клетки HEK293 культивировали стандартными способами и трансфицировали (FugeneHD, Promega) плазмидой, несущей сконструированный фактор транскрипции или контрольную конструкцию EGFP в количестве 3 мкг на лунку 6-луночного планшета. Клетки трансфицировали плазмидами, содержащими конструкции, показанные ниже в таблице 33. Через 48 ч после трансфекции клетки собирали, и

выделяли РНК (набор Qiagen RNeasy Mini), и обрабатывали ДНКазой. РНК (3 мкг) подвергали обратной транскрипции с использованием праймеров OligoDT (Superscript IV, Invitrogen). Образцы кДНК анализировали методом кПЦР, используя полимеразу Phusion (New England Biolabs) и SYBR Green I: (30 с при 98°C, 40 x[10 с при 98°C, 15 с при 66°C, 15 с при 72°C]). Праймеры к SCN1A (5'-TGTCTCGGCATTGAGAACATTC-3' (SEQ ID NO: 190); 5'-ATTGGTGGGAGGCCATTGTAT-3' (SEQ ID NO: 191)) использовали для количественного определения уровней эндогенного транскрипта SCN1A, и относительные уровни экспрессии SCN1A определяли методом дельта-дельта Ct с GAPDH в качестве эталонного гена (5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC'-3' (SEQ ID NO: 192); 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3' (SEQ ID NO: 193)). Данные представлены в виде кратных изменений относительно контрольного условия (см. фиг. 15). Контрольная конструкция состояла из EGFP, экспрессируемого под контролем промотора, имеющего последовательность согласно SEQ ID NO: 178. Доставка сконструированных факторов транскрипции приводила к увеличению в разной степени экспрессии эндогенного транскрипта SCN1A по отношению к EGFP состоянию.

Таблица 33. Конструкции, использованные в примере 6 и приведенные на фиг. 15.

eTF SEQ ID NO:	
Экспрессионная кассета D в таблице 17	SEQ ID NO: 15
Экспрессионная кассета B в таблице 17	SEQ ID NO: 364
Экспрессионная кассета C в таблице 17	SEQ ID NO: 9
Экспрессионная кассета E в таблице 17	SEQ ID NO: 8
SEQ ID NO: 67	SEQ ID NO: 7
SEQ ID NO: 68	SEQ ID NO: 295
SEQ ID NO: 88	SEQ ID NO: 14
SEQ ID NO: 69	SEQ ID NO: 296
SEQ ID NO: 87	SEQ ID NO: 297
SEQ ID NO: 83	SEQ ID NO: 13
SEQ ID NO: 84	SEQ ID NO: 298
SEQ ID NO: 75	SEQ ID NO: 299
SEQ ID NO: 74	
SEQ ID NO: 70	
SEQ ID NO: 71	

Таблица 34. Конструкции, использованные в примере 6 и приведенные на фиг. 15.

eTF SEQ ID NO:	DBD SEQ ID NO:
SEQ ID NO: 364	SEQ ID NO: 406
SEQ ID NO: 295	SEQ ID NO: 407
SEQ ID NO: 296	SEQ ID NO: 408
SEQ ID NO: 299	SEQ ID NO: 409

Пример 7

Увеличение экспрессии эндогенного SCN1A в ГАМК нейронах с помощью SCN1A-специфических факторов транскрипции

[0351] ГАМК нейроны iCell (Cellular Dynamics) высевали в 6-луночный планшет (~1Е6 клеток/лунку) и поддерживали в соответствии с рекомендациями производителя. Через 72 часа после посева рекомбинантный AAV (серотип AAV-DJ), экспрессирующий EGFP или активатор (SEQ ID NO: 366 на фиг. 16А или SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 15 на фиг. 16В) под контролем универсального промотора (промотор СВА), добавляли в культуральную среду в количестве примерно 2Е11 копий генома/лунку. Через одну неделю (фиг. 16А) или две недели (фиг. 16В) после инфицирования РНК выделяли из культивируемых клеток (набор Qiagen RNeasy Mini) и обрабатывали ДНКазой. Выделенную РНК подвергали обратной транскрипции с использованием праймеров OligoDT (Superscript IV, Invitrogen). Образцы кДНК анализировали методом кПЦР, используя полимеразу Phusion (New England Biolabs) и SYBR Green I: (30 с при 98°C, 40 x[10 с при 98°C, 15 с при 66°C, 15 с при 72°C]). Праймеры к SCN1A (5'-TGTCTCGGCATTGAGAACATTC-3' (SEQ ID NO: 190); 5'-ATTGGTGGGAGGCCATTGTAT-3' (SEQ ID NO: 191)) использовали для количественного определения уровней эндогенного транскрипта SCN1A, и относительные уровни экспрессии SCN1A определяли методом дельта-дельта Ct с GAPDH в качестве эталонного гена (5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC'-3' (SEQ ID NO: 192); 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3' (SEQ ID NO: 193)). Данные представлены в виде кратных изменений относительно контрольного условия (см. фиг. 16А и фиг. 16В). AAV-управляемая экспрессия сконструированных факторов транскрипции обеспечивает существенное увеличение экспрессии эндогенного транскрипта SCN1A в культивируемых ГАМК нейронах, полученных из iPS.

Пример 8

Специфическая активация эндогенного SCN1A в ГАМК нейронах с помощью SCN1A-специфического фактора транскрипции

[0352] ГАМК нейроны iCell (Cellular Dynamics) высевали в 6-луночный планшет (~1Е6 клеток/лунку) и поддерживали в соответствии с рекомендациями производителя. Через 72 часа после посева рекомбинантный AAV (серотип AAV-DJ), экспрессирующий EGFP или активатор (SEQ ID NO: 366, который включает DBD цинкового пальца, слитый с TAD VPR, управляемый промотором СВА) под контролем промотора СВА, добавляли в культуральную среду в количестве примерно 2Е11 копий генома/лунку.

[0353] Через неделю после инфицирования из культивируемых клеток выделяли РНК (набор Qiagen RNeasy Mini) и обрабатывали ДНКазой. Библиотеки RNAseq получали из восстановленной РНК с помощью набора библиотек мРНК TruSeq Stranded (Illumina) и секвенировали на Illumina NextSeq (2×75 циклических парно-концевых секвенирований). Чтения секвенирования сопоставляли с геномом человека (RNASTAR), и выполняли анализ дифференциальной экспрессии, используя DESeq2. Данные представлены в виде кратного изменения относительно контрольных образцов (AAVDJ-СВА-EGFP) (см. Фиг.17). Результаты показаны в таблице 35, и на фиг. 17 показаны относительные уровни экспрессию эндогенного SCN1A и 40 ближайших соседних транскриптов генов,

представленные в виде кратных изменений относительно контрольного состояния. Описанная выше SEQ ID NO: 366 обеспечивала специфическое увеличение экспрессии гена SCN1A или белка Nav1.1 по сравнению с другими протестированными генами. Это указывает на то, что целевой участок, распознаваемый активатором транскрипции SEQ ID NO: 366, является специфическим для гена SCN1A, что приводит к увеличению экспрессии гена SCN1A в ГАМК нейронах.

Таблица 35. Влияние на транскрипцию эндогенного SCN1A и 40 ближайших соседних генов в ГАМК нейронах, обработанных SCN1A-специфическим фактором транскрипции (SEQ ID NO: 366).

Название гена	Начало на хромосоме 2	Конец на хромосоме 2	Нить хромосомы	Кратность изменения по сравнению с контролем
PLA2R1	160788518	160919121	-	0,16367458
ITGB6	160956176	161128399	-	0,20679884
RBMS1	161128661	161350305	-	1,63514667
TANK	161993418	162092732	+	0,90946407
PSMD14	162164548	162268228	+	0,92699237
TBR1	162272604	162282381	+	0,53199642
SLC4A10	162280842	162841792	+	1,89407328
DPP4	162848750	162931052	-	2,82345284
FAP	163027193	163101661	-	2,26977379
IFIH1	163123588	163175213	-	1,46146481
GCA	163175349	163228105	+	2,58702426
FIGN	164449905	164592522	-	0,46785861
GRB14	165349321	165478358	-	0,5631965
COBLL1	165510133	165700189	-	0,43199257
SLC38A11	165752695	165812035	-	4,06730119
SCN3A	165944031	166060577	-	1,0807866
SCN2A	166095911	166248818	+	1,24475196
CSRNP3	166326156	166545917	+	0,82971233
GALNT3	166604100	166651192	-	0,33804418
TTC21B	166713984	166810353	-	1,58661143
SCN1A	166845669	166984523	-	62,9552975
SCN9A	167051694	167232503	-	1,71659087
SCN7A	167260082	167350757	-	0,29331967
B3GALT1	168675181	168730551	+	0,64436013
STK39	168810529	169104651	-	1,19821739
CERS6	169312371	169631644	+	0,86828378
NOSTRIN	169643048	169722024	+	1,82142718
SPC25	169690641	169769881	-	0,86880697
ABCB11	169779447	169887832	-	3,1441368
DHRS9	169921298	169952677	+	1,10381777

BBS5	170335687	170382432	+	0,65476347
KLHL41	170366211	170382772	+	0,87373377
FASTKD1	170386258	170430385	-	1,02786927
PPIG	170440849	170497916	+	1,09866236
CCDC173	170501934	170550943	-	0,67290779
PHOSPHO2	170550974	170558218	+	0,91339152
KLHL23	170550997	170633499	+	0,73926347
SSB	170648442	170668574	+	1,00631994
METTL5	170666590	170681441	-	1,21271497
UBR3	170683967	170940641	+	1,21350908
MYO3B	171034654	171511681	+	0,52839217

Пример 9

Экспрессия SCN1A из экспрессионной кассеты *in vivo*

[0354] Для тестирования экспрессии активаторов транскрипции SCN1A *in vivo* создавали рекомбинантные векторы AAV9 в Vector Biolabs (Malvern, PA). Самцам мышей C57Bl/6 (N=5 на группу, 7-8 недель) вводили билатерально 1,5 мкл очищенного вектора AAV в дорсальный гиппокамп (AP -2,0 мм, латеральное $\pm 1,5$, DV -1,4 мм от твердой мозговой оболочки) и вентральный гиппокамп (AP -3,1 мм, латеральное $\pm 2,8$, DV -3,8 мм от твердой мозговой оболочки), всего 4 участка инъекции. AAV вводили со скоростью 0,3 мкл/мин с 4 мин перерывом после каждой инъекции. Через четыре недели после введения мышей подвергали эвтаназии, и иссекали ткани гиппокампа. В каждой группе животных практически у всех животных (N=4) извлекали ткань из левого и правого гиппокампа и объединяли для гомогенизации, за исключением одного животного, у которого извлекали и гомогенизировали только левый гиппокамп. Из гомогената выделяли РНК (набор Qiagen RNeasy Mini) и обрабатывали ДНКазой. РНК (3 мкг) подвергали обратной транскрипции с использованием праймеров OligoDT (Superscript IV, Invitrogen). Образцы кДНК анализировали методом кПЦР на экспрессию мышинового SCN1A, используя полимеразу Phusion (New England Biolabs) и SYBR Green I: 30 с при 98°C, 40 x[10 с при 98°C, 15 с при 64°C, 15 с при 72°C]. Праймеры к мышиному SCN1A (5'-CAAAAAGCCACAAAAGCCT-3' (SEQ ID NO: 374); 5'-TTAGCTCCGCAAGAAACATC-3' (SEQ ID NO: 375)) использовали для количественного определения уровней эндогенного транскрипта SCN1A, и относительные уровни экспрессии SCN1A *in vivo* определяли методом дельта-дельта Ct с GAPDH в качестве эталонного гена, используя для GAPDH те же самые праймеры, как описано в примере 1 выше.

[0355] На фиг. 18А и фиг. 18В показаны средние значения для пяти животных, каждому из которых инъецировали конструкцию AAV9. Контрольная конструкция eGFP содержала репортерный трансген eGFP. Экспрессионная кассета А (см. таблицу 17) содержала активатор транскрипции, который распознавал целевую последовательность, содержащую SEQ ID NO: 35, показанную в таблице 17 выше. На фиг. 18А показан относительный уровень экспрессию SCN1A *in vivo*. На фиг. 18В показано изменение экспрессии SCN1A *in vivo* в процентах от среднего уровня экспрессии eGFP. Эти

результаты показали, что активатор транскрипции SCN1A экспрессионной кассеты А приводит к примерно 20-30% увеличению экспрессии SCN1A *in vivo*.

[0356] Такие экспрессионные кассеты могут быть адаптированы для применения у людей для лечения синдрома Драве, эпилепсии, судорог, болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона и/или любых других заболеваний или состояний, связанных с дефицитом и/или нарушением активности SCN1A.

Пример 10

Увеличение экспрессии эндогенного транскрипта SCN1A в гиппокампе мышей WT с помощью SCN1A-специфичного фактора транскрипции, определенное методом кПЦР

[0357] Рекомбинантный вектор AAV9 создавали в Vector Biolabs (Malvern, PA). Самцам мышей C57Bl/6 (N=5 на группу в возрасте 7-8 недель) билатерально вводили 1,5 мкл очищенного вектора AAV в дорсальный гиппокамп (AP -2,0 мм, латеральное \pm 1,5, DV -1,4 мм от твердой мозговой оболочки) и вентральный гиппокамп (AP -3,1 мм, латеральное \pm 2,8, DV -3,8 мм от твердой мозговой оболочки), всего 4 участка инъекции. Использовали векторы AAV, содержащие разные SCN1A-специфические факторы транскрипции: экспрессионную кассету А см. в таблице 17 (фиг. 19А), экспрессионную кассету В (фиг. 19В) и SEQ ID NO: 366 и SEQ ID NO: 365 (фиг. 19С), и сравнивали с контрольным вектором (EGFP-KASH, управляемым тем же промотором) (фиг. 19А-С) и EGFP-KASH, управляемым промотором СВА (фиг. 19С).

[0358] AAV вводили со скоростью 0,3 мкл/мин с 4 мин перерывом после каждой инъекции. Через четыре недели после лечения мышей подвергали эвтаназии и иссекали ткани гиппокампа. В каждой группе практически у всех животных (N=4) извлекали ткани как левого, так и правого гиппокампа для гомогенизации, за исключением одного животного, у которого извлекали и гомогенизировали только левый гиппокамп. Из гомената выделяли РНК (набор Qiagen RNeasy Mini) и обрабатывали ДНКазой. РНК (3 г) подвергали обратной транскрипции с использованием праймеров OligoDT (Superscript IV, Invitrogen). Образцы кДНК анализировали методом кПЦР на наличие мышинового SCN1A (mNav1.1 прямой праймер: 5'-CAAAAAGCCACAAAGCCT-3' (SEQ ID NO: 293) и mNav1.1 обратный праймер: 5'-TTAGCTCCGCAAAAACATC-3' (SEQ ID NO: 294)) с использованием полимеразы Phusion (New England Biolabs) и SYBR Green I: (30 с при 98°C, 40 х[10 с при 98°C, 15 с при 64°C, 15 с при 72°C]).

[0359] Прямая инъекция AAV каждой созданной конструкции фактора транскрипции приводила к увеличению экспрессии эндогенного транскрипта SCN1A в ткани гиппокампа мыши.

Пример 11

Анализ гипертермических судорог (HTS) в мышинной модели синдрома Драве

[0360] Лечение синдрома Драве и/или его симптомов с помощью экспрессионных кассет изучали на мышах линии Scn1a^{tm1^{Kea}}. Мыши этой линии являются установленной мышинной моделью синдрома Драве. Мышам линии Scn1a^{tm1^{Kea}} не нужна рекомбиназа

CRE. Мышь *Scn1a^{tm1Kca}* (доступная из лаборатории Jackson; описана Hawkins et al., *Scientific Reports*, vol.7:15327 (2017)) содержит делецию первого кодирующего экзона *SCN1A*. Мыши гомозиготные по аллелю с нокаутным гена *SCN1A* характеризуются тремором, атаксией, судорогами, и умирают на 16 день после рождения. У гетерозиготных мышей на фоне C57BL/6 развиваются спонтанные судороги, и большой процент мышей умирают в течение нескольких недель. Такой штамм мышей можно использовать для изучения безопасности и эффективности лечения эпилепсии и синдрома Драве. Для дополнительной информации см. Miller et al., *Genes Brain Behav.* 2014 Feb.; 13(2):163-72.

[0361] Для проверки эффективности активаторов транскрипции пометам новорожденных мышей линии *Scn1^{atm1Kca}*, полученным от скрещивания самцов *Scn1a/-* с женскими особями C57Bl/6J, вводили векторы AAV билатерально в ICV на P1. Мышам вводили конструкции, приведенные в таблице 36 ниже. Мышей не трогали до отъема до P18, после чего снова оставляли в покое до начала анализа HTS на P26-P28. Отдельные пометы мышей P1 отнимали на P18 и ежедневно отмечали смертность. Гипертермические судороги индуцировали на P26-P28 у мышей HET и WT *Scn1a*, и у мышей 129Stac X C57BL/6, использованных в качестве контроля. Перед тестированием мышам ректально вводили зонд для измерения температуры (Ret-4) и подключали его к модулю контроля температуры (TCAT 2DF, Physitemp), который последовательно соединяли с нагревательной лампой (HL-1). Затем мышей помещали в большой стеклянный стакан и оставляли на короткий промежуток времени для акклиматизации к окружающей среде. После этого температуру тела увеличивали на 0,5°C каждые 2 минуты до наступления первых тонико-клонических судорог, сопровождаемых неестественной позой, или до 43°C. Если у мыши возникали судороги, которые сопровождались неестественной позой, эксперимент завершали, и записывали внутреннюю температуру тела мыши. Если в течение всего эксперимента судороги, сопровождающиеся неестественной позой, не наблюдались, то мышь считали не подверженной судорогам, и эксперимент завершали. Образцы тканей получали от мышей на P1, а генотипирование мышей проводили в ходе эксперимента методом ПЦР в реальном времени. Генотипирование осуществляли открытым способом до завершения анализа, и определяли корреляцию статуса мышей как HET, так и WT с полученными данными. По полученным данным строили кривую выживания Каплан-Мейера, и определяли значимость с помощью теста Кокс-Мантела. Результаты показаны в таблице 36 и таблице 37 и на фиг. 20А-Е.

Таблица 36. Описание условий, используемых в примере 11.

SEQ ID NO eTF	Дозы (копии генома/мышь)	Регуляторный элемент	Целевой участок, распознаваемый eTF	Структура DBD+TAD eTF	ПолиА
SEQ ID NO: 305	5,8E+10	SEQ ID NO: 185	SEQ ID NO: 35	ZF DBD+VPR	sPA
SEQ ID NO: 306	6,0E+10	SEQ ID NO: 185	SEQ ID NO: 35	ZF DBD+VP64	hGH
SEQ ID	1,4/1,7E+11	SEQ ID NO: 417	SEQ ID NO: 35	ZF DBD+VP64	sPA

SEQ ID NO eTF	Дозы (копии генома/мышь)	Регуляторный элемент	Целевой участок, распознаваемый eTF	Структура DBD+TAD eTF	ПолиА
NO: 307					
SEQ ID NO: 308	3,1E+11	SEQ ID NO: 185	SEQ ID NO: 35	ZF DBD+VP64	hGH
SEQ ID NO: 309	4,3E+11	SEQ ID NO: 183	SEQ ID NO: 36	ZF DBD+VPR	sPA

Таблица 37. Результаты анализа гипертермических судорог.

SEQ ID NO of eTF	# контрольные животные (обработанные PBS)	# обработанные животные	% свободные от судорог 42,6°C	P значение
EGFP reporter	16	N/A	44%	
SEQ ID NO: 305	16	14	93	P<0,001
SEQ ID NO: 306	16	18	95	P<0,0001
SEQ ID NO: 307	16	15	87	P<0,01
SEQ ID NO: 308	16	21	76	P<0,05
SEQ ID NO: 309	16	24	62,5	P<0,05

Пример 12

Анализ выживания на мышинной модели синдрома Драве

[0362] Для проверки эффективности активаторов транскрипции в линии мышей *Scn1a^{tm1Kea}*, пометам новорожденных мышей, полученным от скрещивания самцов *Scn1a* +/- с самками C57Bl/6J, вводили вектор AAV билатерально через ICV на P1. Мышей не трогали до отъема. После отлучения на P18 ежедневно наблюдали за состоянием здоровья мышей *Scn1a* +/- . Регистрировали дату смерти мышей, которых находили мертвыми в своей клетке независимо от причины. Данные заносили на график кривой выживаемости Каплана-Мейера и определяли значимость по критерию Кокса-Мантеля.

[0363] Результаты показаны в таблице 38 и на фиг. 21А-Е.

Таблица 38: Описание условий и результаты анализа выживаемости.

SEQ ID	доза (копии генома/мышь)	# контрольные животные (получавшие PBS)	# животные, получившие лечение	% Выживаемость в P100 (*в P83)	P значение
PBS	N/A	53	N/A	49%	
SEQ ID NO: 305	5,8E+10	53	29	76%	P<0,05

SEQ ID	доза (копии генома/ мышь)	# контрольны е животные (получавши е PBS)	# животные, получивши е лечение	% Выживаемос ть в P100 (*в P83)	P значение
SEQ ID NO: 306	6,0E+10	53	34	97%	P<0,0001
SEQ ID NO: 307	1,7E+11	53	37	92%	P<0,0001
SEQ ID NO: 309	4,3E+11	53	12	100%	P<0,001

Пример 13

Уровни транскрипции SCN1A у приматов, не являющихся человеком, после лечения AAV, кодирующим SCN1A-специфический фактор транскрипции

[0364] В исследовании использовали самцов яванского макака (*macaca flavicularis*) в возрасте от 2 до 3 лет. Животных подвергали предварительному скринингу на наличие перекрестно-реактивных антител к AAV9 до включения в исследование с помощью анализа нейтрализующих антител в клетках. AAV9, экспрессирующий SCN1A-специфический фактор транскрипции (SEQ ID NO: 305) или контроль разводили в PBS и инъецировали внутривенно в дозе 1,2E12 мкг/животное. Для инъекций определяли три разные стереотаксические координаты в каждом полушарии, шесть мест инъекции на животное. В участок вводили объем 10 мкл. Инъекции в правом полушарии были симметричны инъекциям в левом. Двух необработанных животных использовали в качестве контроля.

[0365] Для оценки экспрессии мРНК Scn1A выполняли обратную транскрипцию с последующим методом кПЦР. При вскрытии, через 28 дней после введения дозы собирали в RNAlater срезы тканей из различных областей головного мозга (лобной коры, теменной коры, височной коры, затылочной коры, гиппокампа, медуллы, мозжечка; по 200 мг каждой) от контрольных и обработанных животных собирали и затем замораживали. Вкратце, иссекали 30 мг ткани, экстрагировали РНК (с помощью мини-набора Qiagen Rneasy Lipid для тканей, каталог # 1023539), конвертировали в кДНК с помощью обратной транскрипции (используя набор для высокоэффективной обратной транскрипции кДНК Applied Biosystems, каталог # 4368814) и выполняли кПЦР с использованием набора праймеров/зондов для Scn1A и конститутивного гена GAPDH (Applied Biosystems, каталог № Rh02621745-gI FAM).

[0366] Наборы праймеров/зондов для SCN1A приведены ниже.

Таблица 39: Последовательности праймеров, использованные в примере 13

Ген	SEQ ID NO	Последовательность (5'-3')	Примечание
Scn1A	SEQ ID NO: 328	CCATGGAACCTGGCTCGATTTTCAC	F-праймер
	SEQ ID NO: 439	ATTGGTGGGAGGCCACTGTAT	R-праймер
	SEQ ID NO: 329	AGGCCTGAAAACCATTTGTGGGA	зонд (FAM)

	GCCCT	
--	-------	--

[0367] Наборы праймеров/зондов для SCN1A приведены ниже. Экспрессию гена Scn1A в каждом тестируемом образце определяли с помощью оценки относительного количества (RQ) методом сравнения Ct (ΔCt). Этот метод измеряет разницу Ct (ΔCt) между целевым геном и конститутивным геном, а затем сравнивает значения ΔCt обработанных образцов и контрольных образцов.

[0368] $\Delta Ct = \text{среднему Ct целевого гена} - \text{среднее Ct конститутивного гена}$

[0369] $\Delta \Delta Ct = \Delta Ct \text{ обработанного образца} - \Delta Ct \text{ контрольного образца}$

[0370] Относительная экспрессия (обработанный образец) = $2^{-\Delta \Delta Ct}$

[0371] Данные выражали в виде нормализованного уровня экспрессии целевой мРНК в различных участках ткани мозга (см. FIG. 22). Как показано на фиг. 22, участки мозга, проксимальные к интрапаренхимальным участкам инъекции, показали самые высокие уровни экспрессии.

Пример 14

Лечение синдрома Драве в различных линиях мышей

[0372] Лечение синдрома Драве и/или его симптомов с помощью экспрессионных кассет, раскрытых в настоящем описании, может быть протестировано на различных линиях мышей, таких как линии мышей B6(Cg)-Scn1a^{tm1.1Dsf/J}, Scn1a^{tm1Kea} и Scn1a-R1470X. Эти мышинные линии являются установленными мышинными моделями для синдрома Драве. Мышиным линиям Scn1a^{tm1Kea} и Scn1a-R1470X не нужна рекомбиназа Cre.

[0373] Мышей B6(Cg)-Scn1a^{tm1.1Dsf/J} можно получить в лабораториях Jackson Европейской Федерации по изучению синдрома Драве для изучения безопасности и эффективности композиции SCN1A активатора транскрипции, раскрытой в настоящем описании, при лечении синдрома Драве. Эти мыши содержат ассоциированную с синдромом Драве мутацию в экзоне 24 SCN1A (A → V в положении 1783). Мыши также содержат loxP-фланкированный экзон 24 с последовательностью дикого типа. Без модификации этот штамм мышей экспрессирует две копии аллеля WT SCN1A. Однако, после доставки AAV, экспрессирующего рекомбиназу Cre, или при скрещивании этого штамма с линией мышей Cre, любая клетка, экспрессирующая Cre, переключится на экспрессию одной копии мутантного аллеля. При экспрессии субъединицы мутантного SCN1A у мышей развиваются спонтанные судороги в течение 4 недель. Для экспериментов на B6(Cg)-Scn1a^{tm1.1Dsf/J} мышцах можно использовать B6(Cg)-Scn1a^{tm1.1Dsf/J} мышей и контрольных C57Bl6 мышей.

[0374] Scn1a^{tm1Kea} мыши (доступные в лаборатории Jackson; описанные в Hawkins et al., Scientific Reports, vol.7:15327 (2017)) содержат делецию первого кодирующего экзона SCN1A. Мыши гомозиготные по аллелю нокаутного гена SCN1A характеризуются тремором, атаксией, судорогами и умирают на 16 день после рождения. У гетерозиготных мышей относительно C57BL/6 контроля развиваются спонтанные судороги, и они умирают в течение нескольких недель. Такой штамм мышей может быть использован для изучения безопасности и эффективности лечения эпилепсии и синдрома Драве. Для

дополнительной информации см. Miller et al., Genes Brain Behav. 2014 Feb; 13(2):163-72.

[0375] Мыши Scn1a-R1470X являются нокаутными мышами, несущими преждевременный стоп-кодон, R1407X, в экзоне 21 гена SCN1A. Такая же мутация определена как патогенная мутация у трех неродственных пациентов SMEI. Новорожденные Scn1a^{RX/RX} характеризуются периодическими спонтанными судорогами в течение 12 послеродовых дней, включая тонико-клонические и клонические судороги в течение 12-16 послеродовых дней, а также ритмическими саккадическими движениями и непроизвольным сокращением мышц. Для получения дополнительной информации см. Ogiwara et al., Journal of Neuroscience, May, 30, 2007, 27(22) 5903-5914.

[0376] Для тестирования композиций, раскрытых в настоящем описании, в том числе AAV генной терапии и лечения с помощью такой генной терапии, содержащей eTF, который увеличивает экспрессию SCN1A *in vivo*, каждой мышам с синдромом Драве из мышинных штаммов, описанных выше, и контрольным мышам (например, мышам с диким типом SCN1A или необработанным мышам с синдромом Драве) вводят (например, вводят путем интраперитонеальной инъекции) AAV, экспрессирующие либо EGFP, либо другой репортерный ген, или экспрессионную кассету, состоящую из eTF, который связывается с целевой связывающей последовательностью, проксимальной к эндогенному SCN1A (например, любую экспрессионную кассету, раскрытую в настоящем описании). Некоторые AAV могут дополнительно содержать один или более регуляторных элементов, селективных по отношению к типу клеток.

[0377] После инъекций AAV, отслеживают выживаемость мышей с течением времени. Всех мышей ежедневно проверяют на общее состояние здоровья (например, вес, уровень гидратации, уход за шерстью и подвижность), и регистрируют смертельные случаи.

[0378] Имплантацию телеметрии можно выполнить сразу после инъекций AAV (F20-EET, Data Sciences International). Данные по электрокортикограмме могут быть записаны и отслеживаться непрерывно в течение не менее 14 дней через 10 дней после операции. Все судороги могут регистрироваться в течение не менее 14 дней после введения AAV, даты отлучения, с указанием времени начала, времени завершения, продолжительности и степени тяжести. Снижение частоты и/или продолжительности судорог после введения AAV, содержащего активатор транскрипции SCN1A, относительно контроля EGFP или необработанного контроля указывает на эффективность активатора транскрипции SCN1A в отношении уменьшения симптомов и/или тяжести синдрома Драве.

[0379] После введения мышам AAV уровни экспрессии SCN1A можно отслеживать с течением времени с помощью различных методов ПЦР и/или секвенирования, чтобы показать, что введение AAV, содержащего активатор транскрипции SCN1A, может привести к увеличению экспрессии эндогенного SCN1A. Для анализа экспрессии SCN1A *in vivo* также можно использовать нозерн-блот анализ и гибридизацию *in situ*. После обработки также можно контролировать уровень белка Nav1.1, чтобы показать, что

увеличение экспрессии SCN1A коррелирует с увеличением белка Nav1.1. Белок Nav1.1 можно анализировать различными методами, включая, без ограничения, вестерн-блот анализ, иммуногистохимию, иммунофлуоресцентную гистохимию и/или анализы ELISA. Формирование функциональных потенциалзависимых натриевых каналов также может быть определено с помощью анализа с использованием токоизмерительных клещей.

[0380] Индуцированные гипертермией судороги могут быть оценены путем сравнения мышей дикого типа и/или необработанных мышей с синдромом Драве с мышами с синдромом Драве, получавшими генную терапию AAV, который содержит раскрытую в настоящем описании экспрессионную кассету. В таких экспериментах центральную температуру тела контролируют с помощью ректального температурного датчика RET-3 (Physitemp Instruments, Inc., Нью-Джерси, США) и тепловой лампы, подключенной к регулятору температуры тела грызунов (TCAT-2DF, Physitemp), перенастраиваемому с помощью контроллера Partlow 1160 + (West Control Solutions, Брайтон, Великобритания). Температуру тела повышают на 0,5°C каждые две минуты до начала первых клонических судорог. Ожидается, что у мышей с синдромом Драве, получивших AAV, который содержит активатор транскрипции SCN1A, пороговая температура перед наступлением первых клонических судорог будет выше, чем у необработанных мышей с синдромом Драве.

[0381] Для определения профиля безопасности и эффективности лечения каждым видом генной терапии мышам также можно вводить разные дозы AAV, содержащие экспрессионную кассету. Эти доклинические исследования позволят также определить оптимальную дозу(ы) генной терапии для лечения синдрома Драве.

Пример 15

Лечение болезни Альцгеймера у мышей

[0382] Для изучения безопасности и эффективности раскрытых в настоящем описании композиций активатора транскрипции SCN1A при лечении болезни Альцгеймера можно использовать самок мышей APP/PS1 и дикого типа (WT), которых выращивают в PsychoGenics и которые являются признанной мышью моделью болезни Альцгеймера. Мыши APP/PS1 содержат человеческие транскены как белка предшественника бета-амилоида (APP), несущего мутацию Swedish (670 G-T и 671 A-C), так и пресенилина-1 (PSEN1), содержащего мутацию L166P, причем оба находятся под контролем промотора Thy1. У этих мышей развиваются симптомы болезни Альцгеймера, в том числе амилоидные бляшки и дефекты памяти. Дополнительное описание этих мышей можно найти в Radde et al, 2006 (Radde, Rebecca, et al. «Aβ42- driven cerebral amyloidosis in transgenic mice reveals early and robust pathology». EMBO reports 7.9 (2006):940-946).

[0383] Мышам APP/PS1 и нетрансгенным контролям вводят либо контрольный вектор AAV, экспрессирующий EGFP, либо лечебный вектор AAV, содержащий активатор транскрипции SCN1A (например, любую из экспрессионных кассет, раскрытых в настоящем описании). Некоторые AAV могут дополнительно содержать ГАМК-

селективный и/или PV-селективный регуляторный элемент.

[0384] После инъекций AAV контролируют выживаемость мышей с течением времени. Всех мышей ежедневно наблюдают на общее состояние здоровья (например, вес, уровень гидратации, уход и мобильность) и регистрируют смертность. После инъекций AAV мышам также имплантируют передатчик EET. Активность мозга может быть записана и контролироваться через 24 часа по меньшей мере в течение 4 недель после операции. Данные электрокортикограммы могут быть автоматически проанализированы, и уровни мощности в различных частотных диапазонах (50-100 Гц) можно сравнить у разных групп: мышей WT, необработанных мышей APP/PS1 и мышей APP/PS1, обработанных AAV, каждая из которых получала AAV генную терапию, как описано выше. Повышенная высокая гамма-активность связана с судорогами у пациентов с болезнью Альцгеймера и больных эпилепсией. Таким образом, ожидается, что необработанные мыши APP/PS1 покажут более высокий уровень высокой гамма-активности, чем контрольные мыши, при этом ожидается, что такое увеличение будет отсутствовать или будет меньше у обработанных мышей, указывая на эффективное лечение генной терапией с помощью AAV, который содержит активатор транскрипции SCN1A.

[0385] После лечения мышей с помощью AAV уровни экспрессии SCN1A можно контролировать с течением времени различными методами ПЦР и/или секвенирования, чтобы показать, что лечение с помощью AAV, содержащим активатор транскрипции SCN1A, может привести к увеличению экспрессии эндогенного SCN1A. Для анализа экспрессии SCN1A *in vivo* также можно использовать Нозерн-блот анализ и гибридизацию *in situ*. После лечения также можно контролировать уровень белка Nav1.1, чтобы показать, что увеличение экспрессии SCN1A коррелирует с увеличением белка Nav1.1. Белок Nav1.1 можно анализировать с помощью различных методов, включая, без ограничения, вестерн-блот анализ, иммуногистохимию, иммунофлюоресцентную гистохимию и/или анализы ELISA. Формирование функциональных потенциалзависимых каналов натрия также может быть определено с помощью анализа с использованием токоизмерительных клещей.

[0386] Для определения профиля безопасности и эффективности лечения каждым видом генной терапии мышам также можно вводить разные дозы AAV, содержащие экспрессионную кассету. Эти доклинические исследования также позволяют определить оптимальную дозу(ы) генной терапии для лечения болезни Альцгеймера.

Пример 16

Идентификация целевых областей, способных увеличивать экспрессию GRN, с помощью GRN-специфического активатора транскрипции

[0387] Для определения областей генома, способных увеличивать экспрессию эндогенного GRN, были разработаны различные факторы транскрипции (либо нуклеазы цинковые пальцы, либо конструкции гРНК/daCas9), которые нацелены на различные области генома, как показано в таблице 40 ниже. Для конструкций гРНК/daCas9 гРНК

имела ту же последовательность, что и в целевой области, поскольку гРНК была разработана для нацеливания на комплементарную геномную нить. НЕК293 клетки культивировали стандартными методами, и трансфицировали (FugeneHD, Promega) плазмидой, несущей сконструированный фактор транскрипции или контрольную конструкцию, в количестве 3 мкг на лунку 6-луночного планшета. Клетки трансфицировали плазмидами, экспрессирующими конструкции, показанные ниже в таблице 40 и таблице 41. Через 48 часов после трансфекции клетки собирали, и РНК выделяли (мини набор Qiagen RNeasy) и обрабатывали ДНКазой. РНК (3 мкг) подвергали обратной транскрипции с помощью праймеров OligoDT (Superscript IV, Invitrogen). Образцы кДНК анализировали методом кПЦР с использованием полимеразы Phusion (New England Biolabs) и SYBR Green I: (30 с при 98°C, 40 х[10 с при 98°C, 15 с при 66°C, 15 с при 72°C]). Праймеры к SCN1A (5'-TGTCTCGGCATTGAGGAGGAGACATTC-3' (SEQ ID NO: 190; 5'-ATTGGGGGGGCCATGTAT-3' (SEQ ID NO: 191)) использовали для количественной оценки уровней транскрипта эндогенного SCN1A, и относительные уровни экспрессии SCN1A определяли методом дельта-дельта Ct с GAPDH в качестве эталонного гена (5'-ACCAGTCCATGCCATCATCATCAC'-3' (SEQ ID NO: 192); 5'-TCCACCCTGTTGTTGCGtTA-3' (SEQ ID NO: 193)). Данные представлены в виде кратного изменения относительно контрольного условия.

[0388] Результаты показаны на фиг. 23 и в таблице 40 ниже в виде кратного изменения транскрипции GRN по отношению к контрольным условиям (например, контролю egFP-KASH).

Таблица 40: GRN целевые области и влияние на увеличение экспрессии эндогенного GRN с использованием указанных факторов транскрипции.

еTF SEQ ID NO:	Последовательность еTF	целевой участок SEQ ID NO:
SEQ ID NO: 337	(см. выше)	SEQ ID NO: 330
A	(см. таблицу 23)	SEQ ID NO: 331
C	(см. таблицу 23)	SEQ ID NO: 332
M	(см. таблицу 23)	SEQ ID NO:113
D	(см. таблицу 23)	SEQ ID NO: 333
E	(см. таблицу 23)	EQ ID NO: 333
F	(см. таблицу 23)	SEQ ID NO: 38
J	(см. таблицу 23)	SEQ ID NO: 38
G	(см. таблицу 23)	SEQ ID NO: 38
B	(см. таблицу 23)	SEQ ID NO: 331
SEQ ID NO: 338	(см. выше)	SEQ ID NO: 331
H	(см. таблицу 23)	SEQ ID NO: 334
I	(см. таблицу 23)	SEQ ID NO: 335
SEQ ID NO: 339	(см. выше)	SEQ ID No: 336
SEQ ID NO: 340	(см. выше)	SEQ ID NO: 38
SEQ ID NO: 341	(см. выше)	SEQ ID NO: 38
K	(см. таблицу 23)	SEQ ID NO: 38
L	(см. таблицу 23)	SEQ ID NO: 38
SEQ ID NO: 342	(см. выше)	SEQ ID NO: 38

eTF SEQ ID NO:	Последовательность eTF	целевой участок SEQ ID NO:
SEQ ID NO: 343	(см. выше)	SEQ ID NO: 38
SEQ ID NO: 344	(см. выше)	SEQ ID NO: 335
SEQ ID NO: 10	(см. выше)	SEQ ID NO: 38
SEQ ID NO: 16	(см. выше)	SEQ ID NO: 38
SEQ ID NO: 46	(см. выше)	SEQ ID NO: 38
SEQ ID NO: 345	(см. выше)	SEQ ID NO: 38
SEQ ID NO: 60	(см. выше)	SEQ ID NO: 38
SEQ ID NO: 346	(см. выше)	SEQ ID NO: 38
SEQ ID NO: 63	(см. выше)	SEQ ID NO: 38
SEQ ID NO: 64	(см. выше)	SEQ ID NO: 38
SEQ ID NO: 347	(см. выше)	SEQ ID NO: 38
SEQ ID NO: 348	(см. выше)	SEQ ID NO: 38
SEQ ID NO: 349	(см. выше)	SEQ ID NO: 38
SEQ ID NO: 350	(см. выше)	SEQ ID NO: 38

Таблица 41: DBD GRN

eTF SEQ ID NO:	DBD SEQ ID NO:
SEQ ID NO: 337	SEQ ID NO: 377
SEQ ID NO: 338	SEQ ID NO: 378
SEQ ID NO: 339	SEQ ID NO: 379
SEQ ID NO: 340	SEQ ID NO: 380
SEQ ID NO: 341	SEQ ID NO: 381
SEQ ID NO: 342	SEQ ID NO: 382
SEQ ID NO: 343	SEQ ID NO: 383
SEQ ID NO: 344	SEQ ID NO: 384
SEQ ID NO: 345	SEQ ID NO: 385
SEQ ID NO: 346	SEQ ID NO: 386
SEQ ID NO: 347	SEQ ID NO: 387
SEQ ID NO: 348	SEQ ID NO: 388
SEQ ID NO: 349	SEQ ID NO: 389
SEQ ID NO: 350	SEQ ID NO: 390

Пример 17**Относительный уровень экспрессии GRN из экспрессионных кассет**

[0389] В этом примере описан относительный уровень экспрессии GRN из экспрессионной кассеты, состоящей из не встречающегося в природе активатора транскрипции, который увеличивает экспрессию гена GRN (по данным измерения РНК GRN) в клетках HEK293. Создавали экспрессионные кассеты А, Б, С, D, E, F, J, K, L, G, H, I и M, каждая из которых состояла из не встречающегося в природе модулятора транскрипции, который содержал ДНК-связывающий домен, выбранный из SEQ ID NO: 165-170 и SEQ ID NO: 112, связанные с доменом активации транскрипции VPR или VP64 (например, SEQ ID NO: 95 или SEQ ID NO: 114), как описано в таблице 23 выше. Каждая экспрессионная кассета также состояла из регуляторного элемента, имеющего последовательность SEQ ID NO: 178 или 179. Экспрессионная кассета J похожа на экспрессионную кассету K, за исключением того, что J дополнительно содержит репортер eGFP.

[0393] Клетки HEK293T трансфицировали плазмидной ДНК, содержащей ген люциферазы под контролем одного из нескольких различных регуляторных элементов, т.е. без контроля промотора, с SCP, CMV, SEQ ID NO: 178, оперативно связанной с minCMV и CAG. Нормализованные значения уровня люциферазы для каждой конструкции показаны на фиг. 25. Регуляторный элемент SEQ ID NO: XX, функционально связанный с промотором minCMV, вызывал более высокие уровни экспрессии люциферазы по сравнению с одним только minCMV и одним только SCP.

[0394] Этот эксперимент показал, что SEQ ID NO: 178 является RE, который обеспечивает высокий уровень экспрессии гена в клетке. Такой RE может быть добавлен в раскрытую в настоящем описании экспрессионную кассету, содержащую не встречающийся в природе активатор транскрипции GRN, для увеличения экспрессии активатора транскрипции в клетке, приводя к повышенной экспрессии эндогенного гена GRN. В некоторых случаях один или более RE, имеющих последовательность SEQ ID NO: 178, функционально связывают с активатором транскрипции для увеличения экспрессии GRN в клетке. Такой регуляторный элемент может быть добавлен в экспрессионную кассету выше и/или ниже активатора транскрипции в экспрессионной кассете.

Пример 19

Увеличение экспрессии транскрипта програнулина и уровня белка в клетках HEK293 с использованием програнулин-специфических факторов транскрипции

[0395] Клетки HEK293 культивировали стандартными методами и трансфицировали (FugeneHD, Promega) плазмидой в количестве 3 мкг на лунку 6-луночного планшета. Клетки трансфицировали плазмидами, содержащими конструкции, показанные ниже в таблице 42. Через 48 ч после трансфекции РНК выделяли из клеток для анализа методом кПЦР, и среду собирали из инфицированных лунок для количественного определения уровней секретлируемого PGRN с помощью анализа ELISA.

Для анализа кПЦР клетки собирали, и выделяли РНК (набор Qiagen RNeasy Mini) и обрабатывали ДНКазой. РНК (3 мкг) подвергали обратной транскрипции с использованием праймеров OligoDT (Superscript IV, Invitrogen). Образцы кДНК анализировали методом кПЦР с использованием полимеразы Phusion (New England Biolabs) и SYBR Green I: (30 с при 98°C, 40 x[10 с при 98°C, 15 с при 66°C, 15 с при 72°C]). Праймеры к PGRN (5'-ATGGTCAGTTCTGCCCTGTG-3' (SEQ ID NO: 287); 5'-CGGTAAGATGCAGGAGTGGC-3' (SEQ ID NO: 288)) использовали для количественного определения уровней эндогенного транскрипта PGRN, и относительные уровни экспрессии PGRN определяли методом дельта-дельта Ct с GAPDH в качестве эталонного гена (5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC'-3' (SEQ ID NO: 192); 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3' (SEQ ID NO: 193)). Данные представлены в виде кратных изменений относительно контрольного условия (см. фиг. 26). Введение сконструированных факторов транскрипции вызывало увеличение экспрессии в разной степени эндогенного транскрипта GRN по отношению к контрольному условию EGFP.

Для анализа ELISA среды для культивирования клеток собирали в указанный день

после инфицирования вирусом и подвергали анализу ELISA с помощью набора ELISA для человеческого PGRN (R&D systems, DPGRN0). Процедуру ELISA выполняли в соответствии с инструкциями производителя. Данные представлены в виде кратных изменений относительно контрольного состояния (см. Фиг. 27). Эти данные подтверждают, что активация GRN с помощью сконструированных факторов транскрипции приводила к повышенной секреции белка PGRN.

Таблица 42. Конструкции GRN, использованные в примере 19.

SEQ ID NO eTF
SEQ ID NO: 10
SEQ ID NO: 16
SEQ ID NO: 59
SEQ ID NO: 341
SEQ ID NO: 63
SEQ ID NO: 60
SEQ ID NO: 64
SEQ ID NO: 335
SEQ ID NO: 336

Пример 20

Увеличение экспрессии транскрипта програнулина и уровня белка в ГАМК нейронах с помощью програнулин-специфического фактора транскрипции

[0396] ГАМК нейроны iCell (Cellular Dynamics) высевали в 6-луночный планшет (~1E6 клеток/лунку) и поддерживали в соответствии с рекомендациями производителя. Через 72 часа после посева рекомбинантный AAV (серотип AAV-DJ), экспрессирующий EGFP или активатор (SEQ ID NO: 342) под контролем промотора СВА, добавляли к культуральной среде в количестве примерно 2E11 копий генома/лунку. Через одну неделю после инфицирования РНК выделяли из клеток для анализа кПЦР, и собирали среду из инфицированных лунок для количественного определения уровней секретируемого PGRN с помощью анализа ELISA.

[0397] Для анализа кПЦР выделяли РНК из культивируемых клеток (набор Qiagen RNeasy Mini) и обрабатывали ДНКазой. Выделенную РНК подвергали обратной транскрипции с использованием праймеров OligoDT (Superscript IV, Invitrogen). Образцы кДНК анализировали методом кПЦР с использованием полимеразы Phusion (New England Biolabs) и SYBR Green I: (30 с при 98°C, 40 x[10 с при 98°C, 15 с при 66°C, 15 с при 72°C]). Праймеры к PGRN (5'-ATGGTCAGTTCTGCCCTGTG-3' (SEQ ID NO: 287); 5'-CGGТАААGATGCAGGAGTGGC-3' (SEQ ID NO: 288)) использовали для количественного определения уровней эндогенного транскрипта PGRN, и относительные уровни экспрессии PGRN определяли методом дельта-дельта Ct с GAPDH в качестве эталонного гена (5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC'-3' (SEQ ID NO: 192); 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3' (SEQ ID NO: 193)). Данные представлены в виде кратных изменений относительно контрольного условия (см. фиг. 28). Введение SEQ ID NO: 342 привело к сильному увеличению экспрессии транскрипта эндогенного GRN относительно контрольного условия EGFP.

[0398] Для анализа ELISA среды для культивирования клеток собирали в указанный день после инфицирования вирусом в количестве 0,5E11 копий генома/лунка (условие низкой дозы) или 2E11 копий генома/лунка (условие высокой дозы) и подвергали анализу ELISA с помощью набора ELISA для человеческого PGRN (R&D systems, DPGRN0). Процедуру ELISA выполняли в соответствии с инструкциями производителя. Данные представлены на фиг. 29. Эти данные подтверждают, что увеличение экспрессии GRN с помощью SEQ ID NO: 342 приводит к увеличению секреции белка PGRN в культивируемых нейронах.

Пример 21

Повышение уровня белка GRN в плазме *in vivo*

[0399] Для тестирования экспрессии активаторов транскрипции GRN *in vivo* мышам инъецировали AAV9, содержащий экспрессионную кассету J или G, как описано в таблице 23 выше. Очищенный вирус AAV9 создавали в VectorBioLabs и перед инъекцией восстанавливали до общего объема 200 мкл (с PBS). Самцов животных C57BL6 в возрасте 6~9 недель использовали для инъекции в хвостовую вену после периода акклиматизации. Сбор крови у живых животных осуществляли из хвостовой вены, а образцы плазмы получали методом K2EDTA. Анализ ELISA выполняли с помощью набора ELISA для мышинового PGRN (Thermo Fisher Scientific) в соответствии с инструкцией производителя. На фиг. 30 показаны результаты ELISA для уровня GRN в плазме в мкг/мл у мышей, которым вводили разные конструкции AAV9 или контроль, через одну неделю после инъекции. По сравнению с контролем (буфер PBS) у всех мышей, обработанных AAV9, которые содержали активатор транскрипции GRN, наблюдали увеличение уровня белка GRN в плазме. Были испытаны разные дозы AAV9-J и AAV9-G: 1E11 копий генома (GC) и 5E11 копий генома на мыш. В случае AAV9-G увеличение количества копий генома, инъецированных мыш, приводило к по меньшей мере двукратному увеличению белка GRN в плазме по сравнению с более низкой дозой, 1E11 GC/мыш.

Пример 22

Управление высоким уровнем экспрессии GRN в глиальных клетках

[0400] Селективность в отношении глиальных клеток, в частности клеток микроглии, может быть определена с помощью флуоресцентной визуализации. Векторы AAV, содержащие репортерный ген eGFP, функционально связывали либо с контрольным промотором (EF1 α), либо с RE, селективным к глии или микроглии. Такие AAV-векторы инъецировали совместно с CRE-зависимым вектором tdTomato CRE-мышам, у которых экспрессировался Cre, в частности, в глии или микроглии.

[0401] Мышам вводили билатерально инфузию вектора AAV (от 5¹² до 1¹³ мкг/мл) в количестве 1,5 мкл в лобную кору или стриатум со скоростью 0,3 мкл/мин с 4 мин перерывом после инъекции. После введения ежедневно наблюдали здоровье и массу тела мыш. Для сбора тканей мыш умерщвляли с помощью передозировки изофлурана и перфузии 4% параформальдегида (PFA). Для анализа селективной экспрессии репортерного гена в глиальных клетках или микроглии извлекали кусок мозговой ткани из

лобной коры или стриатума, изготавливали срезы ткани и окрашивали на eGFP и tdTomato с помощью стандартных процедур иммуногистохимии с использованием кроличьих поликлональных анти-RFP антител (Rockland Antibodies and Assay) и поликлональных анти-eGFP антител цыпленка (Aves Labs). При флуоресцентной микроскопии сильное перекрытие флуоресценции репортерного гена eGFP и флуоресценции tdTomato по сравнению с контролем указывало на селективную экспрессию в глиальных клетках или микроглии.

[0402] Этот метод можно использовать для идентификации регуляторных элементов, которые нацелены на высокий уровень экспрессии генов в лобной коре или других клетках ЦНС, таких как клетки Пуркинью, пирамидальные клетки (например, клетки Бетца), двигательные нейроны и нейроны коры головного мозга, на которые влияет дефицит GRN.

[0403] После идентификации регуляторных элементов, которые являются селективными по отношению к глиальным клеткам, микроглии или клеткам ЦНС любого другого типа, на которые негативно влияет дефицит GRN, такие регуляторные элементы можно функционально связать с активатором транскрипции, который нацелен на ген GRN в экспрессионной кассете, раскрытой в настоящем описании, для селективного увеличения экспрессии GRN в целевой клетке или типе ткани *in vivo*. Например, RE, селективные к глиальным клеткам или клеткам микроглии, могут быть функционально связаны с любым из активаторов транскрипции экспрессионных кассет, раскрытых в настоящем описании, для селективного увеличения GRN *in vivo*.

Пример 23

Увеличение уровня белка GRN в плазме *in vivo*

[0404] Тестирование экспрессии активаторов транскрипции GRN *in vivo* осуществляли с помощью AAV9, содержащим любую из экспрессионных кассет, раскрытых в настоящем описании. Очищенный вирус AAV9 можно генерировать в VectorBioLabs и восстанавливать перед инъекцией до общего объема 200 мкл (с PBS). Можно использовать самцов животных C57BL6 в возрасте 6~9 недель для инъекции в хвостовую вену после периода акклиматизации. Сбор крови у живых животных можно брать из хвостовой вены, а образцы плазмы можно получать методом K2EDTA. Анализ ELISA можно выполнять с помощью набора ELISA для мышинового GRN (Thermo Fisher Scientific) в соответствии с инструкцией производителя. Ожидается, что по сравнению с контролем (буфер PBS) все мыши, обработанные AAV9, который содержит активатор транскрипции GRN, будут демонстрировать увеличение уровня белка GRN в плазме. Можно тестировать разные дозы AAV9-eTF, такие как 1E11 копий генома (GC) и 5E11 копий генома на мышшь.

Пример 24

Лечение симптомов FTD у мышей

[0405] Гетерозиготные GRN-нокаутные мыши, у которых проявляются симптомы FTD, т.е. гаплонедостаточности GRN, являются животной моделью *in vivo* для

подтверждения эффективности композиций и способов, раскрытых в настоящем описании. Экспрессионные кассеты AAV, раскрытые в настоящем описании, инъецируют мышам для восстановления гаплонедостаточности GRN путем увеличения уровней экспрессии GRN *in vivo*. После введения экспрессионных кассет мышам путем инъекции/инфузии с течением времени можно контролировать восстановление гаплонедостаточности GRN с помощью различных методов, таких как измерение уровней секретируемого GRN в образцах крови, измерение транскрипции GRN методом ПЦР и/или измерение поведенческих изменений (например, двигательной координации, обучения, социализации с другими мышами и других когнитивных функций) у обработанных мышей по сравнению с контрольной и/или необработанной группой.

[0406] Подобные методы могут быть использованы на мышинных моделях болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона и атеросклероза (например, измерение уменьшения утолщения артериальной стенки у мышей после лечения с помощью раскрытых в настоящем описании экспрессионных кассет).

Пример 25

Скрининг репортерных систем

[0407] Клетки HEK293 культивировали стандартными методами и котрансфицировали (FuGene HD, Promega) 1,5 мкг репортерной плазмиды, состоящей из EGFP под контролем плотного соединения промотора с тетрациклин-чувствительным элементом (TRE), и 1,5 мкг каждого тестируемого активатора или пустого контрольного вектора (pUC57). Через 48 часов после трансфекции клетки визуализировали с помощью эпифлуоресцентного микроскопа на наличие экспрессии GFP. Клетки собирали и выделяли РНК (набор Qiagen RNeasy Mini) и обрабатывали ДНКазой. РНК (3 мкг) подвергали обратной транскрипции с использованием праймеров OligoDT (Superscript IV, Invitrogen). Образцы кДНК анализировали методом кПЦР с использованием полимеразы Phusion (New England Biolabs) и SYBR Green I: (30 с при 98°C, 40 х[10 с при 98°C, 15 с при 65°C, 15 с при 72°C]). Праймеры к EGFP (5'-GCTACCCCGACCACATGAAG-3' (SEQ ID NO: 369); 5'-TCTTGTAGTTGCCGTCGTCC-3' (SEQ ID NO: 370)) использовали для количественной оценки уровней управляемого репортером транскрипта EGFP, и относительные уровни экспрессии EGFP определяли методом дельта-дельта Ct с GAPDH в качестве эталонного гена (5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' (SEQ ID NO: 192); 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3' (SEQ ID NO: 193)).

[0408] Данные представлены в виде кратных изменений относительно контрольного состояния. На фиг. 31А и фиг. 31В показано, что eTF SEQ ID NO: 2-4 приводили к увеличению экспрессии EGFP по сравнению с пустым контрольным вектором. eTF SEQ ID NO: 51, содержащий вирусный TAD VP64, обеспечивал самый высокий относительный уровень экспрессии EGFP. Как показано на фиг. 32, eTF, содержащий SEQ ID NO: 12, приводил к по меньшей мере 5-кратному увеличению относительного уровня экспрессии EGFP по сравнению с контрольной SEQ ID NO: 187. На фиг. 33 показано, что eTF SEQ ID NO: 51-53 приводит к более чем 10-кратному

увеличению относительного уровня экспрессии EGFP по сравнению с одним только репортером или контрольным белком (SEQ ID NO: 50) без TAD.

[0409] Различные варианты осуществления настоящего изобретения определены со ссылкой на приведенные ниже пронумерованные пункты:

1. Кассета нуклеиновой кислоты, кодирующая не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок, содержащая три или более ДНК-связывающих домена, причем не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок увеличивает или подавляет экспрессию эндогенного гена по меньшей мере в 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 25, 50 или 100 раз, причем не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок имеет по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% локальной идентичности последовательности с соответствующим доменом природного человеческого белка (например, внутри ДНК-связывающего домена или домена эффектора транскрипции между двумя белками) или по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% глобальной идентичности последовательности с природным человеческим белком (например, EGR1 или EGR3).

2. Кассета нуклеиновой кислоты, кодирующая не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок, содержащая несколько связывающих доменов, которые в совокупности связываются по меньшей мере с 21 основанием в геноме человека и имеют по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% локальной идентичности последовательности с соответствующим доменом природного человеческого белка (например, внутри ДНК-связывающего домена или домена эффектора транскрипции между двумя белками) или по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% глобальной идентичности последовательности с природным человеческим белком (например, EGR1 или EGR3).

3. Кассета нуклеиновой кислоты по п.1 или п.2, в которой ДНК-связывающий белок связывается с целевым участком, который не связывается с человеческим аналогом.

4. Кассета нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-3, где человеческим аналогом является EGR1 или EGR3.

5. Кассета нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-4, в которой связывающие домены представляют собой цинковые пальцы.

6. Кассета нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-5, в которой связывающие домены содержат две копии или три копии связывающего домена человеческого аналога.

7. Кассета нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-5, в которой связывающие домены содержат 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9 копий ДНК-связывающего домена или цинкового пальца человеческого аналога.

8. Кассета нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-7, в которой не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок содержит по меньшей мере 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 цинковых пальцев.

9. Кассета нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-8, в которой эндогенный ген представляет собой SCN1A или GRN.

10. Кассета нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-9, в которой ДНК-связывающий белок распознает участок связывания в местоположении в геноме, такой что связывание в этом участке позволяет ДНК-связывающему белку модулировать экспрессию эндогенного гена.

11. Кассета нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-10, в которой ДНК-связывающий белок распознает участок связывания, расположенный вблизи или в эндогенном локусе гена SCN1A или GRN.

12. Кассета нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-11, в которой ДНК-связывающий белок распознает участок связывания, имеющий последовательность: (i) SEQ ID NO: 35-38, 105-111, 113, 136, 195-211, 224-238, 240-267 или 330-336; (ii) ее вариант; (iii) последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с любой из (i) или (ii); или (iv) область генома в пределах 5, 10, 50, 100, 200 или 500 п.о.

13. Кассета нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-11, в которой ДНК-связывающий белок распознает участок связывания, имеющий последовательность: (i) SEQ ID NO: 36 или 38; (ii) ее вариант; (iii) последовательность, имеющую по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с любой из (i) или (ii); или (iv) область генома в пределах 5, 10, 50, 100, 200 или 500 п.о.

14. Кассета нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-12, в которой ДНК-связывающий белок имеет последовательность: (i) SEQ ID NO: 22-26, 29-32, 84-93, 112, 131-135, 165-171, 371-372, 376-409 или 412-416; (ii) ее вариант или функциональный фрагмент; или (iii) последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с любой из (i) или (ii).

15. Кассета нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-11 и п.13, в которой ДНК-связывающий белок имеет последовательность: (i) SEQ ID NO: 6-10, 13-16, 57-61, 63, 64, 67-73, 74-77, 268-282, 295-299, 337-350 или 365-366; (ii) ее вариант или функциональный фрагмент; или (iii) последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с любой из (i) или (ii).

16. Кассета нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-15, в которой ДНК-связывающий белок содержит домен эффектора транскрипции, полученный из EGR1 или EGR3.

17. Кассета нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-15, в которой ДНК-связывающий белок содержит домен эффектора транскрипции, полученный из CITED2 или CITED4.

18. Кассета нуклеиновой кислоты по любому из пп.16-17, в которой домен

эфффектора расположен на С-конце ДНК-связывающих доменов в ДНК-связывающем белке.

19. Кассета нуклеиновой кислоты по любому из пп.16-17, в которой домен эфффектора расположен на N-конце ДНК-связывающих доменов в ДНК-связывающем белке.

20. Кассета нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-19, в которой ДНК-связывающие домены вместе содержат последовательность: (i) SEQ ID NO: 22-26, 29-32, 84-93, 112, 131-135, 165-171, 371-372, 376-409 или 412-416; (ii) ее вариант или функциональный фрагмент; или (iii) последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с любой из (i) или (ii).

21. Кассета нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-20, в которой ДНК-связывающий белок содержит домен эфффектора, имеющий последовательность: (i) SEQ ID NO: 95-100 или 114, (ii) ее вариант или функциональный фрагмент; или (iii) последовательность, имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с любой из (i) или (ii).

22. Кассета нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-21, в которой ДНК-связывающие домены содержат по меньшей мере одну аминокислотную замену в положении -1, 2, 3 или 6 спирали распознавания цинковых пальцев в доменах.

23. Кассета нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-22, в которой ДНК-связывающий белок распознает целевой участок связывания длиной 18 нуклеотидов или более, 21 нуклеотидов или более или 24 нуклеотидов или более.

24. Кассета нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-23, в которой идентичность последовательности измеряют с помощью BLAST или ClustalW.

25. Кассета нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-24, в которой ДНК-связывающий белок находится в вирусном векторе.

26. Кассета нуклеиновой кислоты по п.25, где вирусный вектор представляет собой AAV.

27. Кассета нуклеиновой кислоты по п.26, где AAV представляет собой AAV9.

28. Кассета нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-27, в которой не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок обладает иммуногенностью, сравнимой с его человеческим аналогом согласно результатам анализа elispot (например, где сравнимый относится к уровню иммуногенности в пределах 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9% или 10% иммунного ответа, генерируемого природным человеческим белком).

29. Вектор AAV, содержащий кассету нуклеиновой кислоты, кодирующую не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок, имеющий >90% идентичности последовательности с человеческим белком или по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% локальной идентичности последовательности с соответствующим доменом природного

человеческого белка (например, внутри ДНК-связывающего домена или домена эффектора транскрипции между двумя белками), или по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% глобальной идентичности последовательности с природным человеческим белком (например, EGR1 или EGR3), и содержащий ДНК-связывающий домен, содержащий несколько связывающих мотивов, которые в совокупности связываются с >9, >10, >11, >12, >13, >14, >15, >16, >17, >18, >19, >20, >21, >22, >23, >24, >25, >26, >27, >28, >29 или >30 основаниями.

30. Вектор AAV по п.29, в котором не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок связывается с целевым участком в геноме человека, который не связывается с человеческим белком.

31. Вектор AAV по любому из пп.29-30, в котором человеческий белок представляет собой EGR1 или EGR3.

32. Вектор AAV по любому из пп.29-31, в котором ДНК-связывающий домен содержит по меньшей мере 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 цинковых пальцев.

33. Вектор AAV по любому из пп.29-32, в котором ДНК-связывающий домен содержит две копии, три копии или четыре копии ДНК-связывающего домена в человеческом белке.

34. Вектор AAV по любому из пп.29-33, в котором не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок распознает целевой участок связывания, расположенный около или в геномном локусе SCN1A или GRN (например, геномных локусах, представленных в таблице 1), или выше от стартового кодона эндогенного SCN1A или GRN.

35. Вектор AAV по любому из пп.29-34, в котором не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок модулирует экспрессию (например, увеличивает экспрессию) эндогенного SCN1A или GRN.

36. Вектор AAV по любому из пп.29-35, в котором не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок распознает участок связывания, содержащий последовательность: (i) SEQ ID NO: 35-38, 105-111, 113, 136, 195-211, 224-238, 240-267 или 330-336; (ii) ее вариант; (iii) последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности (или по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с любой из (i) или (ii); или (iv) область генома в пределах 5, 10, 50, 100, 200 или 500 п.о.

37. Вектор AAV по любому из пп.29-36, в котором не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок содержит последовательность: (i) SEQ ID NO: 6-9, 13-15, 44-45, 48-49, 54-55, 58-62, 67-77, 103, 112, 114, 268-282, 305-325, 337-350, 364, 295-299, 365-366; (ii) ее вариант или функциональный фрагмент; или (iii) последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности (или по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с любой из (i) или (ii).

38. Вектор AAV по любому из предшествующих пунктов, в котором не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок содержит последовательность: (i)

SEQ ID NO: 22-26, 29-32, 84-93, 112, 131-135, 165-171, 371-372, 376-409 или 412-416; (ii) ее вариант или функциональный фрагмент; или (iii) последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности (или по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с любой из (i) или (ii).

39. Вектор AAV по любому из пп.29-38, в котором не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок содержит домен эффектора транскрипции EGR1 или EGR3.

40. Вектор AAV по любому из пп.29-39, в котором не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок содержит домен эффектора транскрипции CITED2 или CITED4.

41. Вектор AAV по любому из пп.39-40, в котором домен эффектора расположен на С-конце ДНК-связывающего домена в ДНК-связывающем белке.

42. Вектор AAV по любому из пп.39-41, в котором домен эффектора расположен на N-конце ДНК-связывающего домена в ДНК-связывающем белке.

43. Вектор AAV по любому из пп.29-42, в котором ДНК-связывающий домен содержит последовательность: (i) SEQ ID NO: 22-26, 29-32, 84-93, 112, 131-135, 165-171, 371-372, 376-409 или 412-416; (ii) ее вариант или функциональный фрагмент; или (iii) последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности (или по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с любой из (i) или (ii).

44. Вектор AAV по любому из пп.29-43, в котором ДНК-связывающий белок содержит домен эффектора, имеющий последовательность: (i) SEQ ID NO: 95-100 или 114 (ii) ее вариант или функциональный фрагмент; или (iii) последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности (или по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с любой из (i) или (ii).

45. Вектор AAV по любому из пп.29-44, в котором ДНК-связывающий домен содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену в положении -1, 2, 3 или 6 спирали распознавания цинковых пальцев в домене.

46. Вектор AAV по любому из пп.29-45, в котором ДНК-связывающий белок распознает целевой участок связывания длиной 18 нуклеотидов или более, 21 нуклеотидов или более или 24 нуклеотидов или более.

47. Вектор AAV по любому из пп.29-46, в котором не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок обладает иммуногенностью, сравнимой с человеческим белком согласно результатам анализа elispot (например, где сравнимый относится к уровню иммуногенности в пределах 1%, 2% 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9% или 10% иммунного ответа, генерируемого природным человеческим белком).

48. Вектор AAV по любому из пп.29-47, в котором идентичность последовательности измеряют с помощью BLAST или ClustalW.

49. Вектор AAV по любому из пп.29-48, где AAV представляет собой AAV9.

50. Вектор, кодирующий не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок,

имеющий 90% или более идентичности последовательности с человеческим белком или по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% локальной идентичности последовательности с соответствующим доменом природного человеческого белка (например, внутри ДНК-связывающего домена или домена эффектора транскрипции между двумя белками), или по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% глобальной идентичности последовательности с природным человеческим белком (например, EGR1 или EGR3), причем ДНК-связывающий белок способен модулировать экспрессию эндогенного человеческого гена.

51. Вектор по п.50, в котором не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок содержит ДНК-связывающий домен, который распознает целевой участок связывания, длина которого составляет по меньшей мере 9 п.о.

52. Вектор по любому из пп.50-51, в котором не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок содержит ДНК-связывающий домен, который распознает целевой участок связывания длиной по меньшей мере 12, 15, 18, 21 или 24 п.о.

53. Вектор по любому из пп.50-52, в котором ДНК-связывающий белок связывается с целевым участком в геноме человека, который не распознается человеческим EGR1 или EGR3.

54. Вектор по любому из пп.50-53, в котором эндогенный ген человека представляет собой SCN1A или GRN.

55. Вектор по любому из пп.50-54, в котором ДНК-связывающий белок распознает целевой участок связывания, расположенный около или в геномном локусе SCN1A или GRN (например, в геномном локусе, представленном в таблице 1), или выше стартового кодона эндогенного SCN1A или GRN.

56. Вектор по любому из пп.50-55, в котором ДНК-связывающий белок содержит по меньшей мере 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 цинковых пальцев.

57. Вектор по любому из пп.50-56, в котором ДНК-связывающий белок содержит две копии, три копии или четыре копии ДНК-связывающего домена или одного или более цинковых пальцев EGR1 или EGR3.

58. Вектор по любому из пп.50-57, в котором ДНК-связывающий белок распознает участок связывания, содержащий последовательность: (i) SEQ ID NO: 35-38, 105-111, 113, 136, 195-211, 224-238, 240-267 или 330-336; (ii) ее вариант; (iii) последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности (или по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с любой одной из (i) или (ii); или (iv) область генома в пределах 5, 10, 50, 100, 200 или 500 п.о.

59. Вектор по любому из пп.50-58, в котором ДНК-связывающий белок содержит последовательность: (i) SEQ ID NO: 22-26, 29-32, 84-93, 112, 131-135, 165-171, 371-372, 376-409 или 412-416; (ii) ее вариант или функциональный фрагмент; или (iii) последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности

(или по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с любой из (i) или (ii).

60. Вектор по любому из предшествующих пунктов, в котором ДНК-связывающий белок содержит последовательность: (i) SEQ ID NO: 6-9, 13-15, 44-45, 48-49, 54-55, 58-62, 67-77, 103, 112, 114, 268-282, 305-325, 337-350, 364, 295-299 или 365-366; (ii) ее вариант или функциональный фрагмент; или (iii) последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности (или по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с любой из (i) или (ii).

61. Вектор по любому из пп.50-60, в котором идентичность последовательности относится к локальной идентичности последовательности ДНК-связывающего домена в ДНК-связывающем белке и EGR1 или EGR3.

62. Вектор по п.61, в котором ДНК-связывающий белок содержит домен эффектора транскрипции, полученный из CITED2 или CITED4.

63. Вектор по любому из пп.50-62, в котором идентичность последовательности относится к глобальной идентичности последовательности ДНК-связывающего белка по сравнению с человеческим EGR1 или EGR3.

64. Вектор по п.63, в котором ДНК-связывающий белок содержит домен эффектора транскрипции, полученный из EGR1 или EGR3.

65. Вектор по п.62 или п.64, в котором домен эффектора расположен на С-конце ДНК-связывающего домена в ДНК-связывающем белке.

66. Вектор по п.62 или п.64, в котором домен эффектора расположен на N-конце ДНК-связывающего домена в ДНК-связывающем белке.

67. Вектор по любому из пп.50-66, в котором ДНК-связывающий белок содержит ДНК-связывающий домен, имеющий последовательность: (i) SEQ ID NO: 22-26, 29-32, 84-93, 112, 131-135, 165-171, 371-372, 376-409 или 412-416; (ii) ее вариант или функциональный фрагмент; или (iii) последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности (или по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с любой из (i) или (ii).

68. Вектор по любому из пп.50-67, в котором домен эффектора имеет последовательность: (i) SEQ ID NO: 95-100 или 114, (ii) ее вариант или функциональный фрагмент; или (iii) последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности (или по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с любой из (i) или (ii).

69. Вектор по любому из пп.50-68, в котором цинковые пальцы содержат по меньшей мере одну аминокислотную замену в положении -1, 2, 3 или 6 спирали распознавания цинковых пальцев.

70. Вектор по любому из пп.50-69, в котором ДНК-связывающий белок имеет иммуногенность, сравнимую с человеческим EGR1 или EGR3 согласно результатам анализа elispot (например, где сравнимый относится к уровню в пределах 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9% или 10% иммунного ответа, генерируемого природным человеческим

белком).

71. Вектор по любому из пп.50-70, в котором идентичность последовательности измеряют с помощью BLAST или ClustalW.

72. Вектор по любому из пп.70-72, где вектор представляет собой вирусный вектор.

73. Вектор по п.72, где вирусный вектор представляет собой AAV.

74. Вектор по п.73, где AAV представляет собой AAV9.

75. Кассета нуклеиновой кислоты, кодирующая не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок, имеющий 90% или более идентичности последовательности с природным человеческим белком или по меньшей мере, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% локальной идентичности последовательности с соответствующим доменом встречающегося в природе человеческого белка (например, внутри ДНК-связывающего домена или домена эффектора транскрипции между двумя белками) или по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% глобальной идентичности последовательности с природным человеческим белком (например, EGR1 или EGR3), причем ДНК-связывающий белок способен модулировать экспрессию SCN1A.

76. Кассета нуклеиновой кислоты по п.75, в которой не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок селективно связывается с областью, имеющей любую из SEQ ID NO: 35-38, 105-111, 113, 136, 195-211, 224-238, 240-267 или 330-336 или с областью в пределах 5 п.о., 10 п.о., 50 п.о., 100 п.о., 200 п.о. или 500 п.о. любой из них.

77. Кассета нуклеиновой кислоты по любому из пп.75-76, в которой не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок способен увеличивать экспрессию SCN1A по меньшей мере в 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 50 или 100 раз по сравнению с контролем.

78. Кассета нуклеиновой кислоты по любому из пп.75-77, в которой не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок содержит ДНК-связывающий домен, имеющий последовательность: (i) SEQ ID NO: 22-26, 29-32, 84-93, 112, 131-135, 165-171, 371-372, 376-409 или 412-416; (ii) ее вариант или функциональный фрагмент; или (iii) последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности (или по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с любой из (i) или (ii).

79. Кассета нуклеиновой кислоты по любому из пп.75-78, представляющая собой вирусный вектор.

80. Кассета нуклеиновой кислоты по любому из пп.75-79, представляющая собой вектор AAV, такой как AAV9.

81. Кассета нуклеиновой кислоты, кодирующая не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок, имеющий по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 96%, 97%, 98%, или 99% локальной идентичности последовательности с соответствующим доменом природного человеческого белка (например, внутри ДНК-связывающего домена или домена

эффектора транскрипции между двумя белками) или по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% глобальной идентичности последовательности с природным человеческим белком (например, EGR1 или EGR3), причем ДНК-связывающий белок способен модулировать экспрессию GRN.

82. Кассета нуклеиновой кислоты по п.81, в которой не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок селективно связывается с областью, имеющей SEQ ID NO: 35-38, 105-111, 113, 136, 195-211, 224-238, 240-267 или 330-336, или с областью в пределах 5 п.о., 10 п.о., 50 п.о., 100 п.о., 200 п.о. или 500 п.о. любой из них.

83. Кассета нуклеиновой кислоты по любому из пп.81-82, в которой не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок способен увеличить экспрессию GRN по меньшей мере в 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 50, или 100 раз по сравнению с контролем.

84. Кассета нуклеиновой кислоты по любому из пп.81-83, в которой не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок содержит ДНК-связывающий домен, имеющий последовательность: (i) SEQ ID NO: 22-26, 29-32, 84-93, 112, 131-135, 165-171, 371-372, 376-409 или 412-416; (ii) ее вариант или функциональный фрагмент; или (iii) последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности (или по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентичности последовательности) с любой из (i) или (ii).

85. Кассета нуклеиновой кислоты по любому из пп.81-84, в которой не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок содержит последовательность: (i) SEQ ID NO: 6-9, 13-15, 44-45, 48-49, 54-55, 58-62, 67-77, 103, 112, 114, 268-282, 305-325, 337-350, 364, 295-299, 365-366; (ii) ее вариант или функциональный фрагмент; или (iii) последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности (или по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с любой из (i) или (ii).

86. Кассета нуклеиновой кислоты по любому из пп.81-86, представляющая собой вирусный вектор.

87. Кассета нуклеиновой кислоты по любому из пп.81-85, представляющая собой вектор AAV.

88. Вектор, кодирующий белок, который модулирует SCN1A, причем белок имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6-9, 13, 15, 57, 58, 61-62, 67-71, 74-75, 268-282, 295-299, 305-325, или 366.

89. Вектор, кодирующий белок, который модулирует SCN1A, причем белок содержит ДНК-связывающий домен, имеющий последовательность SEQ ID NO: 22-25, 29-31, 84-85, 88, 90-92, 131-135, 371-372, 376, или 391-409.

90. Вектор по любому из пп.88-89, в котором белок распознает целевую связывающую последовательность, включающую последовательность SEQ ID NO: 35-37, 101, 105-111, 136, 195-211, 224-238 или 240-267.

91. Вектор, кодирующий белок, который модулирует GRN, причем белок имеет

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, 16, 59-60, 63-64, 72-73, 76-77, 112 или 337-350.

92. Вектор, кодирующий белок, который модулирует GRN, причем белок содержит ДНК-связывающий домен, имеющий последовательность SEQ ID NO: 26, 32, 86-89, 93, 165-171, 112 или 377-390.

93. Вектор по любому из пп.91-92, в котором белок распознает целевую связывающую последовательность, содержащую последовательность SEQ ID NO: 38, 113 или 330-336.

94. Вектор по любому из пп.91-93, в котором ДНК-связывающий домен слит с областью транскрипции CITED2 или CITED4.

95. Способ лечения заболевания или состояния, включающий контактирование субъекта с клеткой или композицией, содержащей любое из по пп.1-94.

96. Способ по п.95, в котором субъект является животным, млекопитающим или человеком.

97. Способ лечения заболевания или состояния, включающий предоставление генной терапии, содержащей кассету нуклеиновой кислоты, кодирующей не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок, содержащий ДНК-связывающий домен, причем не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок модулирует экспрессию эндогенного гена с по меньшей мере 5-кратным коэффициентом, и причем не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок имеет по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% локальной идентичности последовательности с соответствующим доменом природного человеческого белка (например, внутри ДНК-связывающего домена или домена эффектора транскрипции между двумя белками) или глобальной идентичности последовательности с природным человеческим белком (например, EGR1 или EGR3).

98. Способ по п.97, в котором не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок вызывает пониженный или минимальный иммунный ответ при экспрессии в клетке или *in vivo*.

99. Способ по п.98, в котором не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок вызывает иммунный ответ, сравнимый с ответом на природный человеческий белок, причем сравнимый относится к уровню в пределах 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9% или 10% иммунного ответа, генерируемого природным человеческим белком (например, EGR1 или EGR3).

100. Способ по любому из пп.92-99, в котором иммунный ответ измеряют с помощью анализа Elispot.

101. Способ по любому из пп.97-100, в котором заболевание или состояние представляет собой синдром Драве.

102. Способ по любому из пп.97-100, в котром заболевание или состояние представляет собой лобно-височную деменцию или слабоумие.

103. Способ по любому из пп.97-100, в котором заболевание или состояние

выбирают из группы, состоящей из: синдрома Драве, болезни Паркинсона, болезни Альцгеймера, ГАМК-эргической гиподисфункции, нейрональной гиперактивности, эпилепсии и судорог.

104. Способ по любому из пп.97-100, в котором заболевание или состояние выбирают из группы, состоящей из нейродегенерации, нейровоспаления, лобно-височной лобарной дегенерации, лобно-височной деменции, деменции, болезни Паркинсона, болезни Альцгеймера и атеросклероза.

105. Способ по любому одному из пп.97-104, в котором ДНК-связывающий белок имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6-9, 13-15, 44-45, 48-49, 54-55, 58-62, 67-77, 103, 112, 114, 268-282, 305-325, 337-350, 364, 295-299, 365-366.

106. Способ по любому из пп.97-105, в котором ДНК-связывающий белок имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22-26, 29-32, 84-93, 112, 131-135, 165-171, 371-372, 376-409 или 412-416.

107. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором ДНК-связывающий белок содержит ДНК-связывающий домен, имеющий последовательность SEQ ID NO: 22-26, 29-32, 84-93, 112, 131-135, 165-171, 371-372, 376-409 или 412-416.

108. Способ по любому одному из пп.97-107, в котором ДНК-связывающий белок распознает целевую связывающую последовательность, содержащую последовательность SEQ ID NO: 35-38, 105-111, 113, 136, 195-211, 224-238, 240-267 или 330-336.

109. Способ по любому одному из предшествующих пунктов, в котором эндогенным геном является SCN1A или GRN.

110. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором генной терапией является AAV.

111. Способ модуляции экспрессии эндогенного гена, включающий введение кассеты нуклеиновой кислоты, кодирующей не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок, содержащий несколько ДНК-связывающих доменов, которые в совокупности связываются с целевым участком связывания, имеющим по меньшей мере 21 основание в геноме человека и имеющим по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% локальной идентичности последовательности с соответствующим доменом природного человеческого белка (например, внутри ДНК-связывающего домена или домена эффектора транскрипции между двумя белками), или глобальной идентичности последовательности с природным человеческим белком (например, EGR1 или EGR3).

112. Способ по п.111, в котором природный белок представляет собой человеческий EGR1 или EGR3.

113. Способ по любому одному из пп.111-112, в котором ДНК-связывающий белок содержит домен CITED2 или CITED4.

114. Способ лечения заболевания или состояния, включающий введение вектора AAV, содержащего не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок, имеющий по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%,

94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% локальной идентичности последовательности с соответствующим доменом природного человеческого белка (например, внутри ДНК-связывающего домена или домена эффектора транскрипции между двумя белками) или глобальной идентичности последовательности с природным человеческим белком (например, EGR1 или EGR3) и содержащий по меньшей мере 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 цинковых пальцев или ДНК-связывающих доменов.

115. Способ по п.114, в котором человеческий белок представляет собой EGR1 или EGR3.

116. Способ по любому из пп.114-115, в котором заболевание или состояние представляет собой заболевание или состояние ЦНС.

117. Способ по п.116, в котором заболевание или состояние представляет собой синдром Драве.

118. Способ по п.116, в котором заболевание или состояние представляет собой деменцию или лобно-височную деменцию.

119. Способ по любому из пп.114-115, в котором идентичность последовательности измеряют с помощью алгоритма Нидлмана-Вунша для получения глобальной идентичности последовательности.

120. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором идентичность последовательности измеряют с помощью алгоритма Смита-Ватермана для получения локальной идентичности последовательности.

121. Способ лечения синдрома Драве, включающий введение вектора, кодирующего не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок, имеющий по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% локальной идентичности последовательности с соответствующим доменом природного человеческого белка (например, внутри ДНК-связывающего домена или домена эффектора транскрипции между двумя белками) или глобальной идентичности последовательности с природным человеческим белком (например, EGR1 или EGR3), причем ДНК-связывающий белок способен активировать или увеличивать экспрессию эндогенного SCN1A.

122. Способ по п.121, в котором не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок селективно связывается с областью, имеющей любую из SEQ ID NO: 35-38, 105-111, 113, 136, 195-211, 224-238, 240-267 или 330-336 или с областью в пределах 5 п.о., 10 п.о., 50 п.о., 100 п.о., 200 п.о. или 500 п.о. любой из них.

123. Способ по любому из пп.121-122, в котором не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок способен увеличивать экспрессию SCN1A по меньшей мере в 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 50 или 100 раз по сравнению с контролем.

124. Способ по любому одному из пп.121-123, в котором не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок содержит ДНК-связывающий домен, имеющий последовательность: (i) SEQ ID NO: 22-26, 29-32, 84-93, 112, 131-135, 165-171, 371-372, 376-409 или 412-416; (ii) ее вариант или функциональный фрагмент; или (iii)

последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности (или по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с любой из (i) или (ii).

125. Способ по любому из пп.121-124, в котором вектор представляет собой вирусный вектор.

126. Способ по п.125, в котором вектор представляет собой вектор AAV.

127. Способ лечения лобно-височной деменции или деменции, включающий введение вектора, кодирующего не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок, имеющий по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% локальной идентичности последовательности с соответствующим доменом природного человеческого белка (например, внутри ДНК-связывающего домена или домена эффектора транскрипции между двумя белками) или глобальной идентичности последовательности с природным человеческим белком (например, EGR1 или EGR3), причем ДНК-связывающий белок способен активировать или увеличивать экспрессию эндогенного GRN или его изоформы.

128. Способ по п. 127, в котором не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок селективно связывается с областью, имеющей SEQ ID NO: 38, 113 или 330-336, или с областью в пределах 5 п.о., 10 п.о., 50 п.о., 100 п.о., 200 п.о. или 500 п.о. любой из них.

129. Способ по любому из пп.127-128, в котором не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок способен увеличивать экспрессию GRN по меньшей мере в 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 50 или 100 раз по сравнению с контролем.

130. Способ по любому из пп.127-129, в котором не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок содержит ДНК-связывающий домен, имеющий последовательность: (i) SEQ ID NO: 26, 32, 86-89, 93, 165-171, 165-171 или 377-390; (ii) ее вариант или функциональный фрагмент; или (iii) последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности (или по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с любой из (i) или (ii).

131. Способ по любому из пп.127-130, в котором ДНК-связывающий белок содержит последовательность: (i) SEQ ID NO: 10, 16, 59-60, 63-64, 72-73, 76, 77, 112 или 337-350; (ii) ее вариант или функциональный фрагмент; или (iii) последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности (или по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности) с любой из (i) или (ii).

132. Способ по любому из пп.127-131, в котором вектор представляет собой вирусный вектор.

133. Способ по п. 133, в котором вектор представляет собой вектор AAV.

[0410] Настоящее изобретение относится к экспрессионным кассетам, содержащим не встречающийся в природе модулятор транскрипции, таким как экспрессионные кассеты, которые увеличивают экспрессию гена SCN1A, и способам их применения при

лечения состояния, связанного с геном SCN1A. Также представлены не встречающиеся в природе ДНК-связывающие белки, которые модулируют экспрессию связанного с неврологическими состояниями белка, такого как SCN1A.

[0411] Различные варианты осуществления этого изобретения определены со ссылкой на следующие пронумерованные пункты:

1. Экспрессионная кассета, содержащая не встречающийся в природе модулятор транскрипции, который увеличивает экспрессию гена SCN1A.

2. Экспрессионная кассета по п.1, в которой не встречающийся в природе модулятор транскрипции связывается с геномной областью, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 35-37, 101, 105-111, 136, 195-211, 224-238 или 240-267 или с областью в пределах по меньшей мере 200 п.о. любой из них.

3. Экспрессионная кассета по пп.1-2, в которой не встречающийся в природе модулятор транскрипции связывается с геномной областью, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 35-37, 101, 105-111, 136, 195-211, 224-238 или 240-267 или с областью в пределах по меньшей мере 100 п.о. любой из них.

4. Экспрессионная кассета по п.1-2, в которой не встречающийся в природе модулятор транскрипции связывается с геномной областью, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 35-37, 101, 105-111, 136, 195-211, 224-238 или 240-267, или с областью в пределах по меньшей мере 50 п.о. любой из них.

5. Экспрессионная кассета по п.1-2, в которой не встречающийся в природе модулятор транскрипции связывается с геномной областью, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 35-37, 101, 105-111, 136, 195-211, 224-238 или 240-267, или с областью в пределах по меньшей мере 10 п.о. любой из них.

6. Экспрессионная кассета по п.1-2, в которой не встречающийся в природе модулятор транскрипции связывается с геномной областью, соответствующей области hg19, которая соответствует последовательности, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 35-37, 101, 105-111, 136, 195-211, 224-238 или 240-267.

7. Экспрессионная кассета по любому из предшествующих пунктов, являющаяся частью вирусного вектора.

8. Экспрессионная кассета по п.7, где вирусный вектор представляет собой вирус AAV.

9. Экспрессионная кассета по п.8, где вирус AAV представляет собой вирус AAV9 или вирус scAAV9.

10. Экспрессионная кассета по любому из предшествующих пунктов, в которой модулятор транскрипции содержит ДНК-связывающий домен и домен активации транскрипции.

11. Экспрессионная кассета по любому из предшествующих пунктов, в которой домен активации транскрипции содержит часть по меньшей мере одного белка, выбранного из списка, состоящего из: VPR, VP64, VP16, VP128 и p300.

12. Экспрессионная кассета по любому из предшествующих пунктов, в которой

домен активации транскрипции содержит 95-100 или 114, или домен, идентичный им на по меньшей мере 80%.

13. Экспрессионная кассета по любому из предшествующих пунктов, в которой ДНК-связывающий домен представляет собой домен цинкового пальца.

14. Экспрессионная кассета по любому из предшествующих пунктов, в которой ДНК-связывающий домен представляет собой белок Cas.

15. Экспрессионная кассета по любому из предшествующих пунктов, дополнительно содержащая гРНК.

16. Экспрессионная кассета по любому из предшествующих пунктов, в которой гРНК содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 35-38, 105-111, 113, 136, 195-211, 224-238, 240-267 или 330-336, или последовательности, идентичной им на по меньшей мере 80%.

17. Экспрессионная кассета по п.16, в которой рРНК содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 35-38, 105-111, 113, 136, 195-211, 224-238, 240-267 или 330-336, или последовательности, идентичной им на по меньшей мере 90%, на по меньшей мере 95% или на по меньшей мере 99%.

18. Экспрессионная кассета по любому из предшествующих пунктов, в которой белок Cas является инактивированным нуклеазой белком Cas.

19. Экспрессионная кассета по п.18, в которой инактивированный нуклеазой белок Cas представляет собой инактивированный нуклеазой Cas9.

20. Экспрессионная кассета по п.19, в которой инактивированный нуклеазой белок Cas представляет собой инактивированный нуклеазой Cas3.

21. Экспрессионная кассета по любому из пп.1-4, в которой ДНК-связывающий домен представляет собой ДНК-связывающий домен TAL-эффектора.

22. Экспрессионная кассета по любому из предшествующих пунктов, дополнительно содержащая регуляторный элемент, который управляет экспрессией не встречающегося в природе модулятора транскрипции в ГАМК-эргических нейронах на более высоком уровне, чем в клетках других типов.

23. Экспрессионная кассета по любому из предшествующих пунктов, дополнительно содержащая регуляторный элемент, который составляет менее 100 п.о. и обеспечивает высокий уровень экспрессии не встречающегося в природе модулятора транскрипции.

24. Экспрессионная кассета по любому из предшествующих пунктов, дополнительно содержащая по меньшей мере один регуляторный элемент, выбранный из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 178-179, 182-185 или 417, или последовательности, идентичной им на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%.

25. Экспрессионная кассета по любому из предшествующих пунктов, в которой не встречающийся в природе модулятор транскрипции выбирают из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6-9, 13-15, 44-45, 48-49, 54-55, 58-62, 67-77, 103, 112, 114, 268-282, 305-325,

337-350, 364, 295-299, 365-366, или последовательности, идентичной им на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%.

26. Экспрессионная кассета по любому из предшествующих пунктов, в которой не встречающийся в природе модулятор транскрипции выбирают из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22-26, 29-32, 84-93, 112, 131-135, 165-171, 371-372, 376-409 или 412-416.

27. Не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок, который связывается с по меньшей мере одним местоположением в геноме, выбранным из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 35-38, 105-111, 113, 136, 195-211, 224-238, 240-267 или 330-336, или местоположением в геноме в пределах 200 п.о., 100 п.о. или 50 п.о. любой из них.

28. Не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок по любому из предшествующих пунктов, который связывается с по меньшей мере одним местоположением в геноме, выбранным из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 35-38, 105-111, 113, 136, 195-211, 224-238, 240-267 или 330-336.

29. Не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок по любому из предшествующих пунктов, дополнительно содержащий домен модуляции транскрипции.

30. Не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок по п.29, в котором домен модуляции транскрипции представляет собой домен активации транскрипции.

31. Не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок по пп.29-30, в котором домен активации транскрипции представляет собой домен активации транскрипции фактора транскрипции.

32. Не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок по любому из предшествующих пунктов, в котором домен активации транскрипции содержит домен активации транскрипции фактора транскрипции цинкового пальца.

33. Не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок по любому из предшествующих пунктов, в котором домен активации транскрипции содержит часть по меньшей мере одного белка, выбранного из списка, состоящего из: VPR, VP64, VP16 и VP128 или гомологичного им белка.

34. Не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок по любому из предшествующих пунктов, в котором домен активации транскрипции содержит любую из SEQ ID NO: 95-100 или 114, или домен с последовательностью, идентичной им на по меньшей мере 80%.

35. Не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок по любому из предшествующих пунктов, в котором домен активации транскрипции содержит любую из SEQ ID NO: 95-100 или 114, или домен с последовательностью, идентичной им на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%.

36. Не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок по любому из предшествующих пунктов, в котором домен модуляции транскрипции содержит коактивирующий транскрипцию белок, или домен коактивирующего транскрипцию домена.

37. Не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок по п.36, в котором

коактивирующий транскрипцию домен содержит весь или часть р300.

38. Не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок по любому из предшествующих пунктов, содержащий домен цинкового пальца.

39. Не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок по любому из предшествующих пунктов, в котором домен цинкового пальца содержит четыре цинковых пальцев.

40. Не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок по любому из предшествующих пунктов, в котором домен цинкового пальца содержит пять цинковых пальцев.

41. Не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок по любому из предшествующих пунктов, в котором домен цинкового пальца содержит шесть цинковых пальцев.

42. Не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок по любому из предшествующих пунктов, в котором домен цинкового пальца содержит семь цинковых пальцев.

43. Не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок по любому из предшествующих пунктов, в котором домен цинкового пальца содержит восемь цинковых пальцев.

44. Не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок по любому из предшествующих пунктов, в котором домен цинкового пальца содержит девять цинковых пальцев.

45. Не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок по любому из предшествующих пунктов, содержащий белок Cas.

46. Не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок по п.45, в котором белок Cas представляет собой инактивированный нуклеазой белок Cas.

47. Не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок по п.46, в котором инактивированный нуклеазой белок Cas представляет собой инактивированный нуклеазой Cas9.

48. Не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок по п.46, в котором инактивированный нуклеазой белок Cas представляет собой инактивированный нуклеазой Cas3.

49. Не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок по любому из предшествующих пунктов, содержащий ДНК-связывающий домен TAL-эффектора.

50. Не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок по любому из предшествующих пунктов, который выбирают из группы, состоящей из SEQ ID NO: 22-26, 29-32, 84 -93, 112, 131-135, 165-171, 371-372, 376-409 или 412-416 или который имеет последовательность, идентичную им на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%.

51. Не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок по любому из предшествующих пунктов, который модулирует экспрессию SCN1A, когда

трансфицирован в клетку.

52. Способ модуляции экспрессии SCN1A в клетке путем введения не встречающегося в природе модулятора транскрипции, который связывается по меньшей мере с одним местоположением в геноме, выбранным из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 35-37, 101, 105-111, 136, 195-211, 224-238, или 240-267, или местоположением в геноме в пределах 200 п.о., в пределах 100 п.о. или в пределах 20 п.о. любой из них.

53. Способ по п.52, в котором не встречающийся в природе модулятор транскрипции связывается по меньшей мере с одним местоположением в геноме, выбранным из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 35-37, 101, 105-111, 136, 195-211, 224-238 или 240-267.

54. Способ по пп.52-53, в котором не встречающийся в природе модулятор транскрипции связывается с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 35-37, 101, 105-111, 136, 195-211, 224-238 или 240-267.

55. Способ модуляции экспрессии SCN1A в клетке путем введения экспрессионной кассеты, кодирующей не встречающийся в природе модулятор транскрипции.

56. Способ по п.55, в котором экспрессионная кассета является частью вирусного вектора.

57. Способ по п.56, в котором вирусный вектор представляет собой вирус AAV.

58. Способ по п.57, в котором вирус AAV представляет собой вирус AAV9 или вирус scAAV9.

59. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором клетка является парвальбумин (PV)-положительной клеткой.

60. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором клетка находится в организме.

61. Способ по п.60, в котором организм представляет собой организм млекопитающего.

62. Способ по п.60, в котором организм представляет собой организм человека.

63. Способ по п. 60, в котором модуляция экспрессии SCN1A обеспечивает лечение заболевание или расстройство.

64. Способ по п.60, в котором расстройство представляет собой расстройство центральной нервной системы.

65. Способ по п.60, в котором расстройство представляет собой болезнь Паркинсона.

66. Способ по п.60, в котором расстройство представляет собой синдром Драве.

67. Способ по п.60, в котором расстройство представляет собой болезнь Альцгеймера.

68. Способ по п.60, в котором симптом расстройства центральной нервной системы представляет собой ГАМК-эргическую гипофункцию.

69. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором лечение расстройства центральной нервной системы включает усиление функции

фотоэлектрических клеток.

70. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором симптом расстройства центральной нервной системы представляет собой нейрональную гиперактивность.

71. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором лечение расстройства центральной нервной системы включает снижение нейрональной гиперактивности.

72. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором симптом расстройства центральной нервной системы представляет собой судороги.

73. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором лечение расстройства центральной нервной системы включает уменьшение частоты судорог.

74. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором лечение расстройства центральной нервной системы включает уменьшение тяжести судорог.

75. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором модулятор транскрипции содержит ДНК-связывающий домен и домен активации транскрипции.

76. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором домен активации транскрипции содержит домен активации транскрипции фактора транскрипции.

77. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором домен активации транскрипции содержит домен активации транскрипции фактора транскрипции цинкового пальца.

78. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором домен активации транскрипции содержит часть по меньшей мере одного белка, выбранного из списка, состоящего из: VPR, VP64, VP16 и VP128.

79. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором домен активации транскрипции содержит 95-100 или 114, или домен, идентичный им на по меньшей мере 80%.

80. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором домен активации транскрипции содержит коактивирующий транскрипцию белок или домен коактивирующего транскрипцию домена.

81. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором домен активации транскрипции содержит p300.

82. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором ДНК-связывающий домен представляет собой домен цинкового пальца.

83. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором ДНК-связывающий домен представляет собой белок Cas.

84. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором экспрессионная кассета дополнительно содержит гРНК.

85. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором гРНК содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 105-111 или 113, или последовательность, идентичную им на по меньшей мере на 80%.

86. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором белок Cas представляет собой инактивированный нуклеазой белок Cas.

87. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором инактивированный нуклеазой белок Cas представляет собой инактивированный нуклеазой Cas9.

88. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором инактивированный нуклеазой белок Cas представляет собой инактивированный нуклеазой Cas3.

89. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором ДНК-связывающий домен представляет собой ДНК-связывающий домен TAL-эффектора.

90. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором экспрессионная кассета дополнительно содержит регуляторный элемент, специфический к парвальбумин-положительным клеткам.

91. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором экспрессионная кассета дополнительно содержит регуляторный элемент, который составляет менее 100 п.о. и обеспечивает высокий уровень экспрессии.

92. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором экспрессионная кассета дополнительно содержит по меньшей мере один регуляторный элемент, выбранный из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 178-179, 182-185 или 417, или последовательности, идентичной им на по меньшей мере 80%.

93. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором модуляция экспрессии SCN1A включает увеличение экспрессии гена SCN1A или белка Nav1.1.

94. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором увеличение экспрессии гена SCN1A или белка Nav1.1 происходит конкретно в парвальбумин-положительных клетках.

95. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором увеличение экспрессии гена SCN1A или белка Nav1.1 происходит конкретно в парвальбумин-положительных нейронах.

96. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором не встречающийся в природе модулятор транскрипции выбирают из группы, состоящей из SEQ ID NO: 95-100 или 114, или последовательности, идентичной им на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%.

[0412] Настоящее изобретение относится к экспрессионным кассетам, содержащим не встречающийся в природе модулятор транскрипции, который увеличивает экспрессию програнулина (GRN) или его функционального фрагмента или варианта, и способам применения таких композиций для лечения состояния или заболевания, связанного с геном GRN. Также представлены не встречающиеся в природе ДНК-связывающие белки, которые модулируют экспрессию GRN в клетке.

[0413] Различные варианты осуществления этого изобретения определены со ссылкой на следующие пронумерованные пункты:

1. Экспрессионная кассета, содержащая не встречающийся в природе модулятор транскрипции, который увеличивает экспрессию гена GRN.

2. Экспрессионная кассета по п.1, в которой не встречающийся в природе модулятор транскрипции связывается с геномной областью, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 38, 113 или 330-336, или с областью в пределах по меньшей мере 200 п.о., в пределах по меньшей мере 100 п.о., в пределах по меньшей мере 50 п.о. или в пределах по меньшей мере 10 п.о. любой из них.

3. Экспрессионная кассета по любому из предшествующих пунктов, в которой не встречающийся в природе модулятор транскрипции связывается с геномной областью, соответствующей области hg19, которая соответствует последовательности, выбранной из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 38, 113, или 330-336.

4. Экспрессионная кассета по любому из предшествующих пунктов, которая является частью вирусного вектора.

5. Экспрессионная кассета по п.4, где вирусный вектор представляет собой вирус AAV.

6. Экспрессионная кассета по п.5, где вирус AAV представляет собой вирус AAV9 или вирус scAAV9.

7. Экспрессионная кассета по любому из предшествующих пунктов, в которой модулятор транскрипции содержит ДНК-связывающий домен и домен активации транскрипции.

8. Экспрессионная кассета по любому из предшествующих пунктов, в которой домен активации транскрипции содержит часть по меньшей мере одного белка, выбранного из списка, состоящего из: VPR, VP64, VP16, VP128, p65 и p300.

9. Экспрессионная кассета по любому из предшествующих пунктов, в которой домен активации транскрипции содержит SEQ ID NO: 95-100 или 114, или домен с последовательностью, идентичной им на по меньшей мере 80%.

10. Экспрессионная кассета по любому из предшествующих пунктов, в которой ДНК-связывающий домен представляет собой домен цинкового пальца.

11. Экспрессионная кассета по любому из предшествующих пунктов, в которой ДНК-связывающий домен представляет собой белок Cas.

12. Экспрессионная кассета по любому из предшествующих пунктов, в которой экспрессионная кассета дополнительно содержит гРНК.

13. Экспрессионная кассета по любому из предшествующих пунктов, в которой гРНК содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 113, или последовательности, идентичной ей на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%.

14. Экспрессионная кассета по любому из предшествующих пунктов, в которой белок Cas представляет собой инактивированный нуклеазой белок Cas (dCas).

15. Экспрессионная кассета по любому из предшествующих пунктов, в которой инактивированный нуклеазой белок Cas представляет собой инактивированный нуклеазой Cas9 (dCas9) или dSaCas9.

16. Экспрессионная кассета по любому из предшествующих пунктов, в которой

ДНК-связывающий домен представляет собой ДНК-связывающий домен TAL-эффектора.

17. Экспрессионная кассета по любому из предшествующих пунктов, дополнительно содержащая регуляторный элемент, который управляет экспрессией не встречающегося в природе модулятора транскрипции на более высоком уровне в клетках, выбранных из группы, состоящей из клеток центральной нервной системы, клеток лобной коры головного мозга, глиальных клеток, клеток микроглиалии и клетки стриатума, по сравнению с клетками других типов.

18. Экспрессионная кассета по любому из предшествующих пунктов, дополнительно содержащая регуляторный элемент, который составляет менее 100 п.о. или менее 50 п.о. и обеспечивает высокий уровень экспрессии не встречающегося в природе модулятора транскрипции.

19. Экспрессионная кассета по любому из предшествующих пунктов, дополнительно содержащая последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 178-179, 182-185 или 417, или последовательность, идентичную им на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%.

20. Экспрессионная кассета по любому из предшествующих пунктов, в которой не встречающийся в природе модулятор транскрипции выбирают из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 16, 59-60, 63-64, 72-73, 76-77, 112 или 337-335 или последовательности, идентичной им на меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%.

21. Не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок, который связывается с по меньшей мере одним местоположением в геноме, выбранным из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 38, 113 или 330-336, или местоположением в геноме в пределах 200 п.о., в пределах 100 п.о. или в пределах 50 п.о., или в пределах 10 п.о. любой из них.

22. Не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок по любому из предшествующих пунктов, который связывается с по меньшей мере одним местоположением в геноме, выбранным из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 38, 113 или 330-336.

23. Не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок по любому из предшествующих пунктов, дополнительно содержащий домен модуляции транскрипции.

24. Не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок по любому из предшествующих пунктов, представляющий собой домен активации транскрипции.

25. Не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок по любому из предшествующих пунктов, представляющий собой домен активации транскрипции фактора транскрипции.

26. Не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок по любому из предшествующих пунктов, содержащий домен активации транскрипции фактора транскрипции цинкового пальца.

27. Не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок по любому из предшествующих пунктов, содержащий часть по меньшей мере одного белка, выбранного

из списка, состоящего из: VPR, VP64, VP16 и VP128 или гомологичного им белка.

28. Не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок по любому из предшествующих пунктов, содержащий SEQ ID NO: 95-100 или 114, или домен с последовательностью, идентичной им на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%.

29. Не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок по любому из предшествующих пунктов, содержащий коактивирующий транскрипцию белок или домен коактивирующего транскрипцию домена.

30. Не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок по п.29, в котором коактивирующий транскрипцию домен включает весь или часть р300.

31. Не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок по любому из предшествующих пунктов, содержащий домен цинкового пальца.

32. Не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок по любому из предшествующих пунктов, в котором домен цинкового пальца содержит четыре цинковых пальца.

33. Не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок по любому из предшествующих пунктов, в котором домен цинкового пальца содержит пять цинковых пальцев.

34. Не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок по любому из предшествующих пунктов, в котором домен цинкового пальца содержит шесть цинковых пальцев.

35. Не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок по любому из предшествующих пунктов, в котором домен цинкового пальца содержит семь цинковых пальцев.

36. Не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок по любому из предшествующих пунктов, в котором домен цинкового пальца содержит восемь цинковых пальцев.

37. Не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок по любому из предшествующих пунктов, в котором домен цинкового пальца содержит девять цинковых пальцев.

38. Не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок по любому из предшествующих пунктов, содержащий белок Cas.

39. Не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок по любому из предшествующих пунктов, в котором белок Cas представляет собой инактивированный нуклеазой белок Cas.

40. Не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок по любому из предшествующих пунктов, в котором инактивированный нуклеазой белок Cas представляет собой инактивированный нуклеазой Cas9.

41. Не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок по любому из предшествующих пунктов, содержащий ДНК-связывающий домен TAL-эффектора.

42. Не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок по любому из предшествующих пунктов, который выбирают из группы, содержащей SEQ ID NO: 26, 32, 86-89, 93, 165-171, 112 или 377-390, или последовательности, идентичной им на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%.

43. Не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок по любому из предшествующих пунктов, который модулирует экспрессию GRN при трансфекции в клетку.

44. Способ модуляции экспрессии GRN в клетке путем введения не встречающегося в природе модулятора транскрипции, который связывается с по меньшей мере одним местоположением в геноме, выбранным из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 38, 113 или 330-336, или местоположением в геноме в пределах 200 п.о., в пределах 100 п.о. или в пределах 20 п.о. любой из них.

45. Способ по п.44, в котором не встречающийся в природе модулятор транскрипции связывается с последовательностью, состоящую из: SEQ ID NO: 38, 113, или 330-336.

46. Способ модуляции экспрессии GRN в клетке путем введения экспрессионной кассеты, кодирующей не встречающийся в природе модулятор транскрипции.

47. Способ по п.46, в котором экспрессионная кассета является частью вирусного вектора.

48. Способ по п.47, в котором вирусный вектор представляет собой вирус AAV.

49. Способ по п.48, в котором вирус AAV представляет собой вирус AAV9 или вирус scAAV9.

50. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором клетку выбирают из группы, состоящей из клеток центральной нервной системы, клеток лобной коры, глиальных клеток, клеток микроглии и клеток стриатума.

51. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором клетка находится в организме.

52. Способ по п.51, в котором организм представляет собой организм млекопитающего.

53. Способ по п.52, в котором организм представляет собой организм человека.

54. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором модуляция экспрессии GRN позволяет лечить заболевание или расстройство.

55. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором расстройство представляет собой расстройство центральной нервной системы.

56. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором расстройство представляет собой лобно-височную дегенерацию (FTD).

57. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором расстройство представляет собой болезнь Паркинсона.

58. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором расстройство представляет собой болезнь Альцгеймера.

59. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором расстройство представляет собой атеросклероз.

60. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором симптом расстройства центральной нервной системы представляет собой присутствие телец Леви.

61. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором симптом расстройства центральной нервной системы представляет собой гаплонедостаточность програнулина (GRN).

62. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором симптом расстройства центральной нервной системы представляет собой социальный дефицит.

63. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором симптом расстройства центральной нервной системы представляет собой лизосомную аномалию.

64. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором симптом расстройства центральной нервной системы представляет собой потерю памяти.

65. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором симптом расстройства центральной нервной системы представляет собой потерю координации движений.

66. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором симптом расстройства центральной нервной системы представляет собой мышечный тремор.

67. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором лечение расстройства центральной нервной системы включает уменьшение частоты тремора мышц.

68. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором лечение расстройства центральной нервной системы включает уменьшение тяжести мышечного тремора.

69. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором модулятор транскрипции содержит ДНК-связывающий домен и домен активации транскрипции.

70. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором домен активации транскрипции содержит домен активации транскрипции фактора транскрипции.

71. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором домен активации транскрипции содержит домен активации транскрипции фактора транскрипции цинкового пальца.

72. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором домен активации транскрипции содержит часть по меньшей мере одного белка, выбранного из списка, состоящего из: VPR, VP64, VP16 и VP128.

73. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором домен активации транскрипции содержит SEQ ID NO: 95-100 или 114, или домен, идентичный им на по меньшей мере 80%.

74. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором домен активации транскрипции содержит коактивирующий транскрипцию белок или домен коактивирующего транскрипцию домена.

75. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором активирующий транскрипцию домен содержит р300.

76. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором ДНК-связывающий домен представляет собой домен цинкового пальца.

77. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором ДНК-связывающий домен представляет собой белок Cas.

78. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором экспрессионная кассета дополнительно содержит гРНК.

79. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором гРНК содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 113, или последовательность, идентичную им на по меньшей мере 80%.

80. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором белок Cas представляет собой инактивированный нуклеазой белок Cas.

81. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором инактивированный нуклеазой белок Cas представляет собой инактивированный нуклеазой Cas9.

82. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором ДНК-связывающий домен представляет собой ДНК-связывающий домен TAL-эффектора.

83. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором экспрессионная кассета дополнительно содержит не специфический для клетки регуляторный элемент.

84. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором экспрессионная кассета дополнительно содержит регуляторный элемент, который составляет менее 100 п.о. и обеспечивает высокий уровень экспрессии.

85. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором экспрессионная кассета дополнительно содержит регуляторный элемент, содержащий последовательность согласно SEQ ID NO: 178-179, 182-185 или 417, или последовательность, идентичную им на по меньшей мере на 80%.

86. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором модуляция экспрессии GRN включает увеличение экспрессии гена GRN или белка програнулина.

87. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором увеличение экспрессии гена GRN или белка програнулина происходит в нескольких типах клеток.

88. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором увеличение экспрессии гена GRN или белка програнулина происходит конкретно в клетках, выбранных из группы, состоящей из клеток центральной нервной системы, клеток лобной коры, глиальных клеток, клеток микроглии и клеток стриатума, в отличие от других типов клеток.

89. Способ по любому из предшествующих пунктов, в котором не встречающийся в природе модулятор транскрипции выбирают из группы, состоящей из SEQ ID NO: 10, 16, 59-60, 72-72, 76-77, 112 или 337-350, или последовательности, идентичной им на по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Экспрессионная кассета, содержащая последовательность, кодирующую не встречающийся в природе фактор транскрипции, который увеличивает экспрессию гена SCN1A в клетке, причем фактор транскрипции связывается с целевым участком, который способен увеличивать экспрессию SCN1A на по меньшей мере 20% в анализе активации транскрипции, и причем фактор транскрипции способен уменьшать частоту судорог в мышечной модели синдрома Драве на по меньшей мере 20% в анализе гипертермических судорог.
2. Экспрессионная кассета по п.1, в которой фактор транскрипции связывается с геномной областью, имеющей 18-27 нуклеотидов.
3. Экспрессионная кассета по любому из п.1 или п.2, в которой фактор транскрипции содержит ДНК-связывающий домен.
4. Экспрессионная кассета по любому из пп.1-3, в которой фактор транскрипции содержит ДНК-связывающий домен и домен активации транскрипции.
5. Экспрессионная кассета по любому из п.3 или п.4, в которой ДНК-связывающий домен имеет по меньшей мере 80% идентичности последовательности со своим ближайшим человеческим аналогом.
6. Экспрессионная кассета по п.5, в которой ДНК-связывающий домен содержит по меньшей мере 90% идентичности последовательности со своим ближайшим человеческим аналогом.
7. Экспрессионная кассета по любому из п.4 или п.5, в которой ДНК-связывающий домен и домен активации транскрипции имеют по меньшей мере 80% идентичности последовательности со своим ближайшими человеческими аналогами.
8. Экспрессионная кассета по п.7, в которой ДНК-связывающий домен и домен активации транскрипции имеют по меньшей мере 90% идентичности последовательности со своими ближайшими человеческими аналогами.
9. Экспрессионная кассета по любому из п.3 или п.4, в которой ДНК-связывающий домен содержит гидовую РНК и инактивированный нуклеазой белок Cas.
10. Экспрессионная кассета по п.9, в которой инактивированный нуклеазой белок Cas представляет собой инактивированный нуклеазой белок Cas9.
11. Экспрессионная кассета по любому из пп.3-8, в которой ДНК-связывающий домен содержит домен цинкового пальца.
12. Экспрессионная кассета по п.11, в которой ДНК-связывающий домен содержит от шести до девяти доменов цинкового пальца.
13. Экспрессионная кассета по п.12, в которой ДНК-связывающий домен содержит шесть цинковых пальцев.
14. Экспрессионная кассета по п.13, в которой ДНК-связывающий домен связывается с геномной областью, имеющей 18 нуклеотидов.
15. Экспрессионная кассета по п.12, в которой ДНК-связывающий домен содержит девять цинковых пальцев.

16. Экспрессионная кассета по п.15, в которой ДНК-связывающий домен связывается с геномной областью, имеющей 27 нуклеотидов.
17. Экспрессионная кассета по любому из пп.3-8 или пп.11-12, в которой ДНК-связывающий домен содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 135, 371, 372 или 376.
18. Экспрессионная кассета по п.17, в которой ДНК-связывающий домен содержит последовательность, имеющую любую из SEQ ID NO: 135, 371, 372 или 376.
19. Экспрессионная кассета по любому из пп.3-8 или пп.11-18, в которой ДНК-связывающий домен получают из человеческого EGR1 или человеческого EGR3.
20. Экспрессионная кассета по любому из пп.4-8 или пп.11-19, в которой домен активации транскрипции содержит последовательность VPR, VP64, CITED2 или CITED4 или их функциональный фрагмент.
21. Экспрессионная кассета по любому из пп.4-8 или пп.11-20, в которой домен активации транскрипции содержит последовательность человеческого CITED2 или CITED4 или его функциональный фрагмент.
22. Экспрессионная кассета по любому из пп.1-21, дополнительно содержащая регуляторный элемент, который управляет экспрессией фактора транскрипции в PV-нейронах на более высоком уровне, чем в клетках других типов.
23. Экспрессионная кассета по п.22, в которой регуляторный элемент содержит последовательность, имеющую любую из SEQ ID NO: 183, 184, 185 или 417.
24. Экспрессионная кассета по п.23, в которой регуляторный элемент содержит последовательность, имеющую SEQ ID NO: 183 или 185.
25. Экспрессионная кассета по п.1, являющаяся частью вирусного вектора.
26. Экспрессионная кассета по п.25, где вирусный вектор представляет собой вирус AAV.
27. Экспрессионная кассета по п.26, где вирус AAV представляет собой вирус AAV9 или вирус scAAV9.
28. Способ увеличения экспрессии SCN1A в клетке путем введения экспрессионной кассеты по любому из пп.1-27.
29. Способ по п.28, в котором клетка представляет собой PV-нейрон.
30. Способ по любому из п.28 или п.29, в котором клетка находится в организме субъекта.
31. Способ по п.30, в котором субъект представляет собой млекопитающее.
32. Способ по п.31, в котором субъект представляет собой человека.
33. Способ по любому из пп.28-32, в котором увеличение экспрессии SCN1A позволяет лечить заболевание, расстройство или симптом.
34. Способ по п.33, в котором расстройство представляет собой расстройство центральной нервной системы.
35. Способ по п.34, в котором расстройство представляет собой синдром Драве.
36. Способ по любому из п.34 или п.35, в котором симптомом расстройства

центральной нервной системы представляет собой нейрональную гиперактивность.

37. Способ по п.36, в котором лечение расстройства центральной нервной системы включает снижение нейрональной гиперактивности.

38. Способ по любому из п.34 или п.35, в котором симптом расстройства центральной нервной системы представляет собой судороги.

39. Способ по п.38, в котором лечение расстройства центральной нервной системы включает уменьшение частоты судорог.

40. Способ по любому из п.38 или п.39, в котором лечение расстройства центральной нервной системы включает уменьшение тяжести судорог.

41. Экспрессионная кассета, содержащая последовательность, кодирующую не встречающийся в природе фактор транскрипции, который увеличивает экспрессию гена GRN в клетке.

42. Экспрессионная кассета по п.41, в которой фактор транскрипции связывается с геномной областью, имеющей 18-27 нуклеотидов.

43. Экспрессионная кассета по любому из п.41 или п.42, в которой фактор транскрипции содержит ДНК-связывающий домен.

44. Экспрессионная кассета по любому из пп.41-43, в которой фактор транскрипции включает ДНК-связывающий домен и домен активации транскрипции.

45. Экспрессионная кассета по п.43 или п.44, в которой ДНК-связывающий домен содержит гидовую РНК и инактивированный нуклеазой белок Cas.

46. Экспрессионная кассета по п.45, в которой инактивированный нуклеазой белок Cas представляет собой инактивированный нуклеазой белок Cas9.

47. Экспрессионная кассета по п.43 или п.44, в которой ДНК-связывающий домен содержит домен цинкового пальца.

48. Экспрессионная кассета по п.47, в которой ДНК-связывающий домен содержит от шести до девяти доменов цинкового пальца.

49. Экспрессионная кассета по п.48, в которой ДНК-связывающий домен содержит шесть цинковых пальцев.

50. Экспрессионная кассета по п.49, в которой ДНК-связывающий домен связывается с геномной областью, имеющей 18 нуклеотидов.

51. Экспрессионная кассета по п.48, в которой ДНК-связывающий домен содержит девять цинковых пальцев.

52. Экспрессионная кассета по п.51, в которой ДНК-связывающий домен связывается с геномной областью, имеющей 27 нуклеотидов.

53. Экспрессионная кассета по любому из пп.43-44 или пп.47-48, в которой ДНК-связывающий домен содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности последовательности с любой из SEQ ID NO: 171 или 412-416.

54. Экспрессионная кассета по п.53, в которой ДНК-связывающий домен содержит последовательность, имеющую любую из SEQ ID NO: 171 или 412-416.

55. Экспрессионная кассета по любому из пп.43-44 или пп.47-54, в которой ДНК-

связывающий домен получают из человеческого EGR1 или человеческого EGR3.

56. Экспрессионная кассета по любому из п.44 или пп.47-55, в которой домен активации транскрипции содержит последовательность VPR, VP64, CITED2 или CITED4 или их функциональный фрагмент.

57. Экспрессионная кассета по любому из пп.41-56, дополнительно содержащая регуляторный элемент, который управляет экспрессией фактора транскрипции.

58. Экспрессионная кассета по п.57, в которой регуляторный элемент является регуляторным элементом, селективным по отношению к типу клеток.

59. Экспрессионная кассета по любому из пп.41-58, являющаяся частью вирусного вектора.

60. Экспрессионная кассета по п.59, где вирусный вектор представляет собой вирус AAV.

61. Экспрессионная кассета по п.60, в которой вирус AAV представляет собой вирус AAV9 или вирус scAAV9.

62. Способ увеличения экспрессии GRN в клетке путем введения экспрессионной кассеты по любому из пп.41-61.

63. Экспрессионная кассета, кодирующая не встречающийся в природе ДНК-связывающий белок, содержащий ДНК-связывающий домен, содержащий три или более доменов цинкового пальца, причем ДНК-связывающий белок увеличивает или подавляет экспрессию эндогенного гена, отличного от SCN1A, по меньшей мере в 5 раз, и причем ДНК-связывающий белок имеет 90% или более идентичности последовательности со своим ближайшим человеческим аналогом.

64. Экспрессионная кассета по п.63, в которой ДНК-связывающий белок связывается с целевым участком в геноме человека, с которым человеческий белок-аналог не связывается в естественных условиях.

65. Экспрессионная кассета по п.63 или п.64, в которой человеческим аналогом является EGR1.

66. Экспрессионная кассета по п.63 или п.64, в которой человеческим аналогом является EGR3.

67. Экспрессионная кассета по любому из пп.63-66, в которой ДНК-связывающий белок содержит по меньшей мере 6 доменов цинкового пальца.

68. Экспрессионная кассета по п.67, в которой ДНК-связывающий белок содержит 9 доменов цинкового пальца.

69. Экспрессионная кассета по любому из пп.63-68, в которой ДНК-связывающий домен содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену в положении -1, 2, 3 или 6 спирали распознавания одного или более доменов цинкового пальца.

70. Экспрессионная кассета по любому из пп.63-69, в которой ДНК-связывающий белок содержит один или более доменов цинкового пальца, полученных из EGR1 или EGR3.

71. Экспрессионная кассета по любому из пп.63-70, в которой ДНК-связывающий

белок дополнительно содержит домен эффектора транскрипции.

72. Экспрессионная кассета по п.71, в которой домен эффектора транскрипции происходит от CITED2 или CITED4.

73. Экспрессионная кассета по п.71 или п.72, в которой домен эффектора транскрипции расположен на С-конце ДНК-связывающего домена в ДНК-связывающем белке.

74. Экспрессионная кассета по п.71 или п.72, в которой домен эффектора расположен на N-конце ДНК-связывающего домена в ДНК-связывающем белке.

75. Экспрессионная кассета по п.71 или п.72, в которой ДНК-связывающий белок содержит домен эффектора, расположенный на N-конце ДНК-связывающего домена в ДНК-связывающем белке, и домен эффектора, расположенный на С-конце ДНК-связывающего домена в ДНК-связывающем белке.

76. Экспрессионная кассета по любому из пп.63-75, в которой ДНК-связывающий белок распознает целевой участок связывания размером 18 п.о. или более.

77. Экспрессионная кассета по п.76, в которой ДНК-связывающий белок распознает целевой участок связывания размером 27 п.о.

78. Экспрессионная кассета по любому из пп.63-77, дополнительно содержащая регуляторный элемент, селективный по отношению к типу клеток.

79. Экспрессионная кассета по любому из пп.63-78, находящаяся в вирусном векторе.

80. Экспрессионная кассета по п.79, где вирусный вектор представляет собой AAV.

81. Экспрессионная кассета по п.80, где AAV представляет собой AAV9 или scAAV9.

82. Способ лечения заболевания или состояния, включающий предоставление генной терапии, содержащей экспрессионную кассету по любому из пп.63-81.

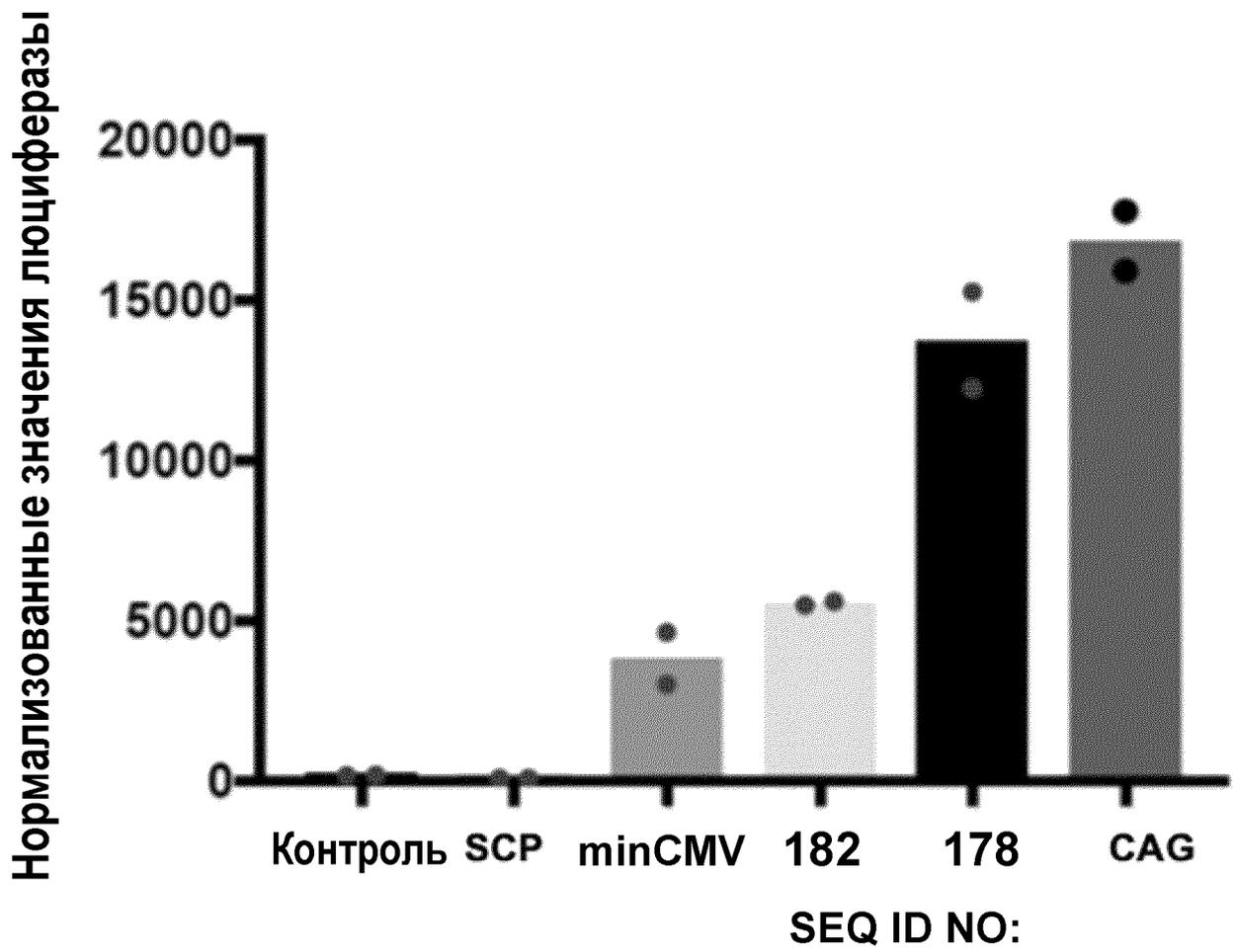
83. Способ по п.82, в котором ДНК-связывающий белок вызывает сниженный или минимальный иммунный ответ при экспрессии в клетке или *in vivo*.

84. Способ по любому из п.82 или п.83, в котором клетка находится в организме субъекта.

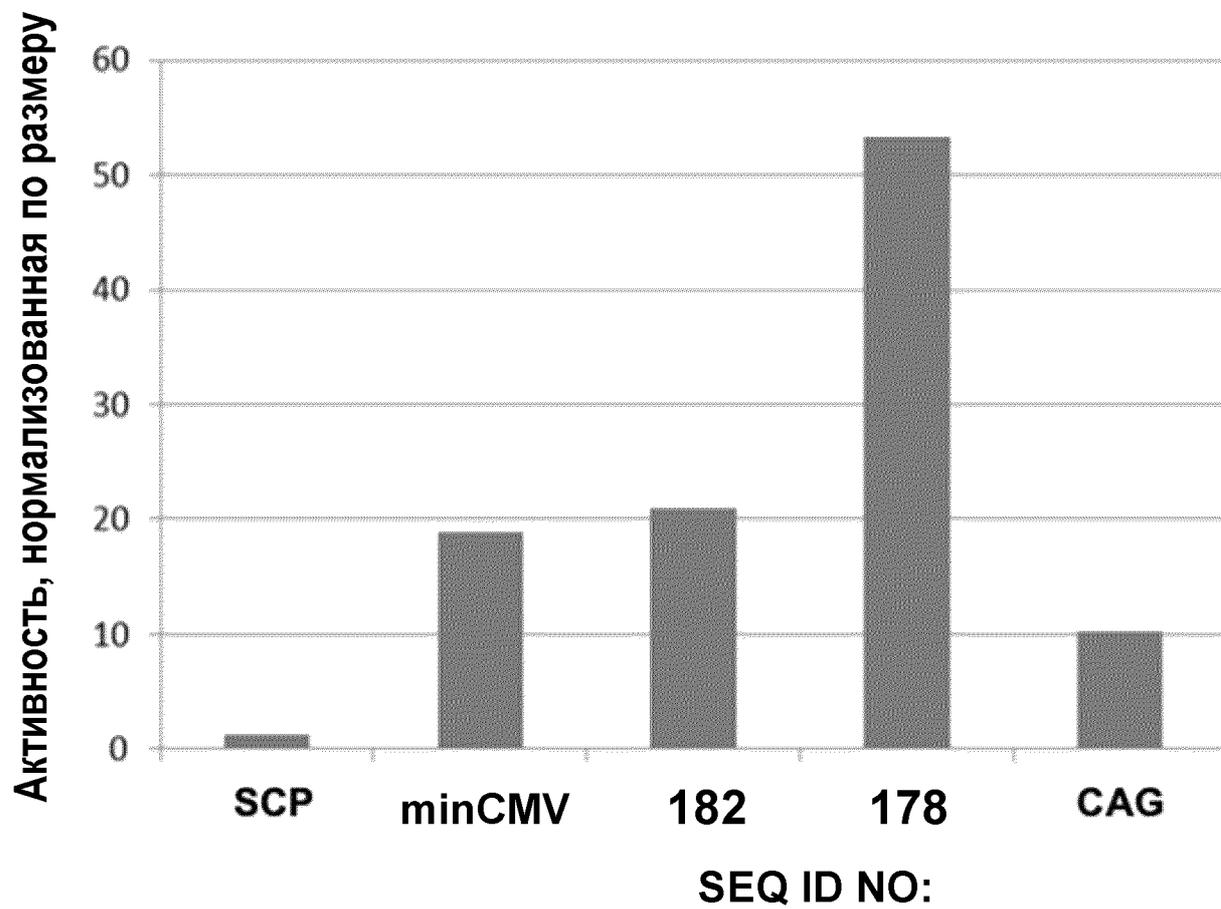
85. Способ по п.84, в котором субъект представляет собой млекопитающее.

86. Способ по п.85, в котором субъект представляет собой человека.

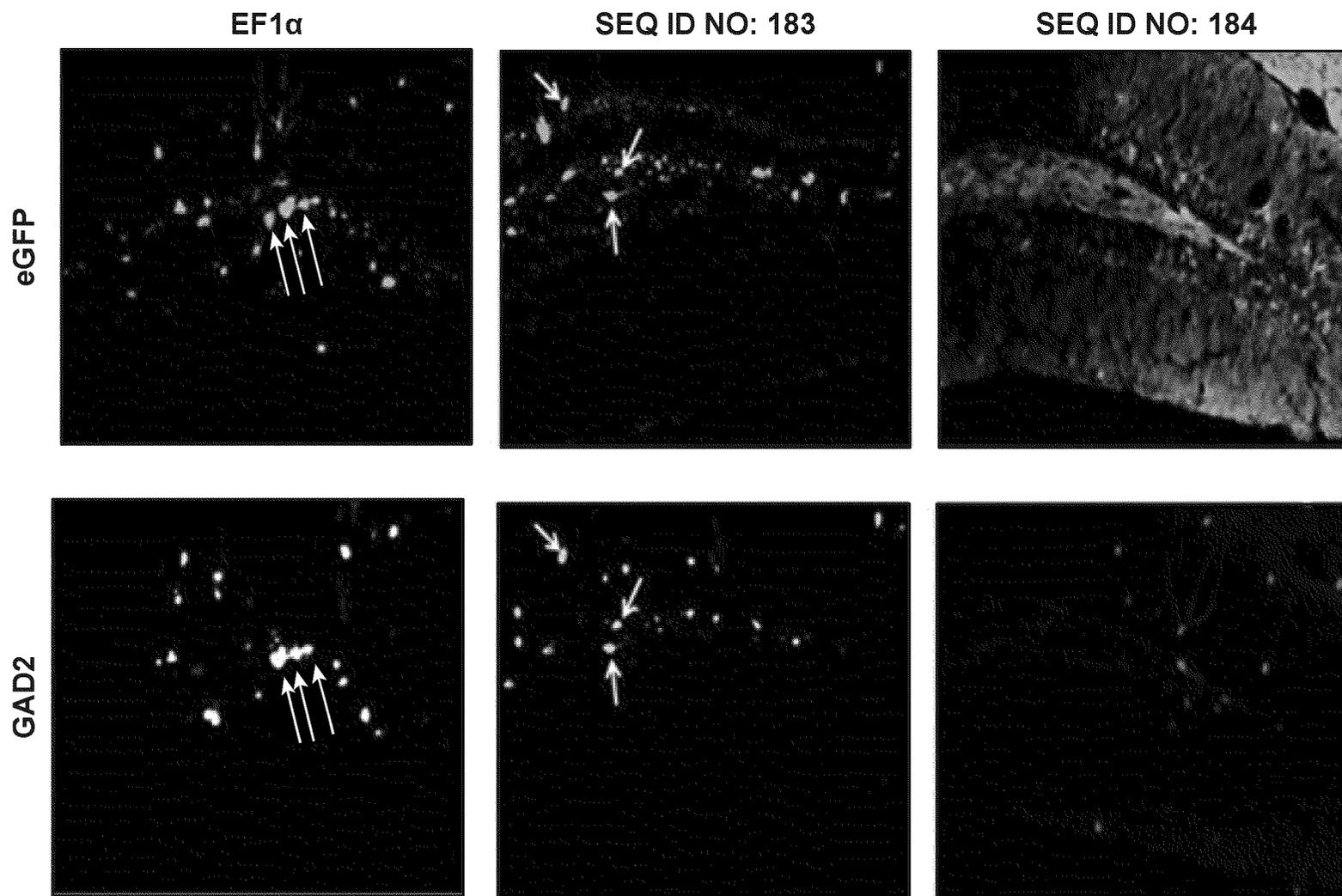
ФИГ.1



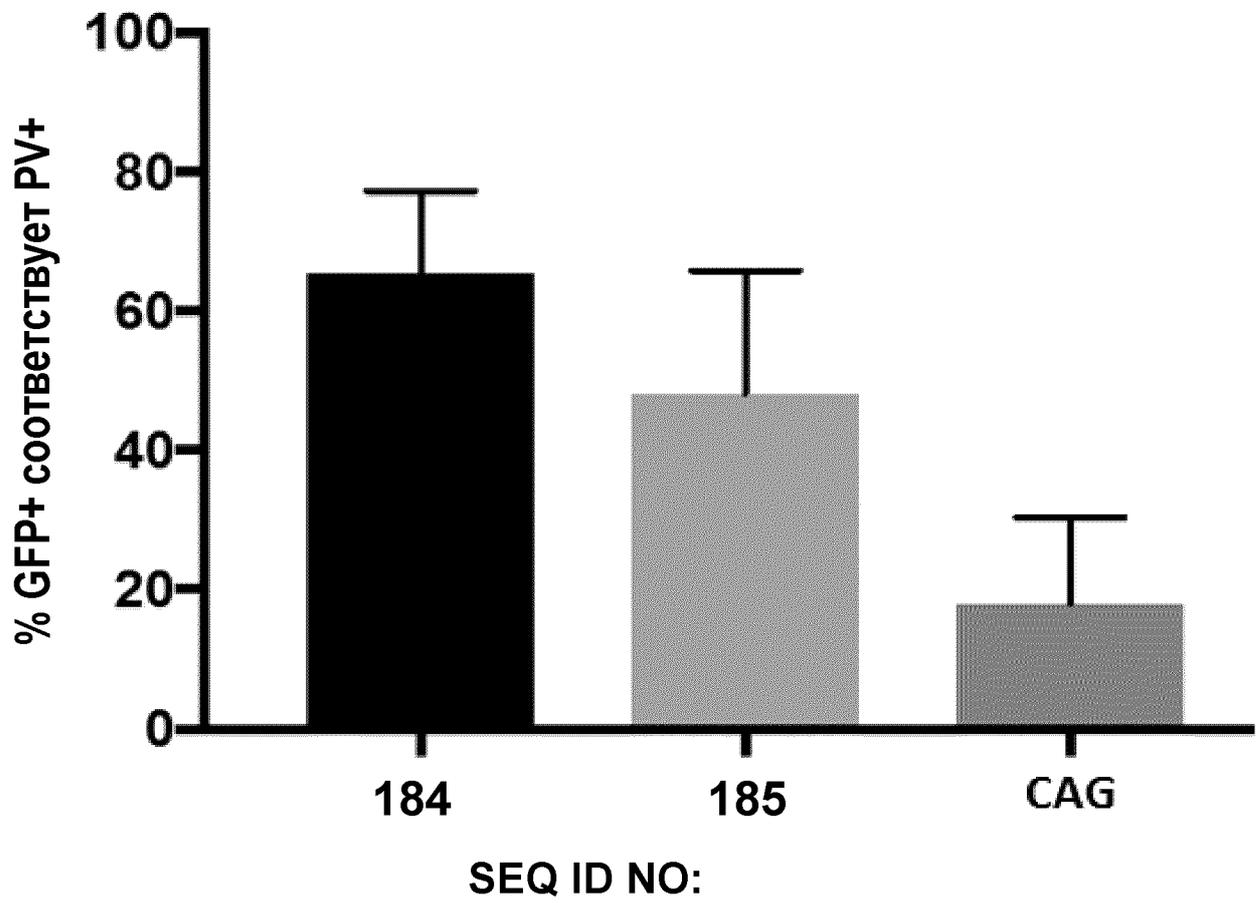
ФИГ.2



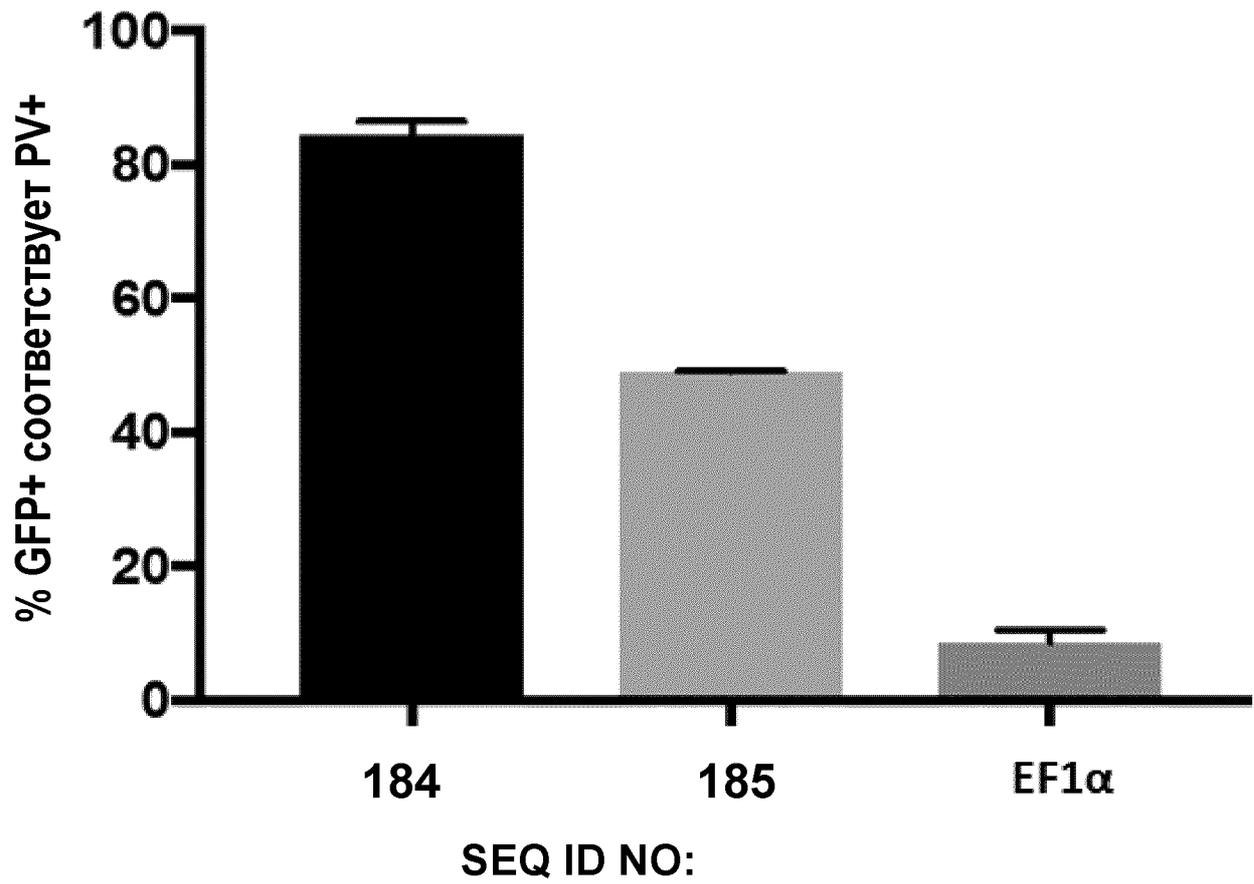
ФИГ.3



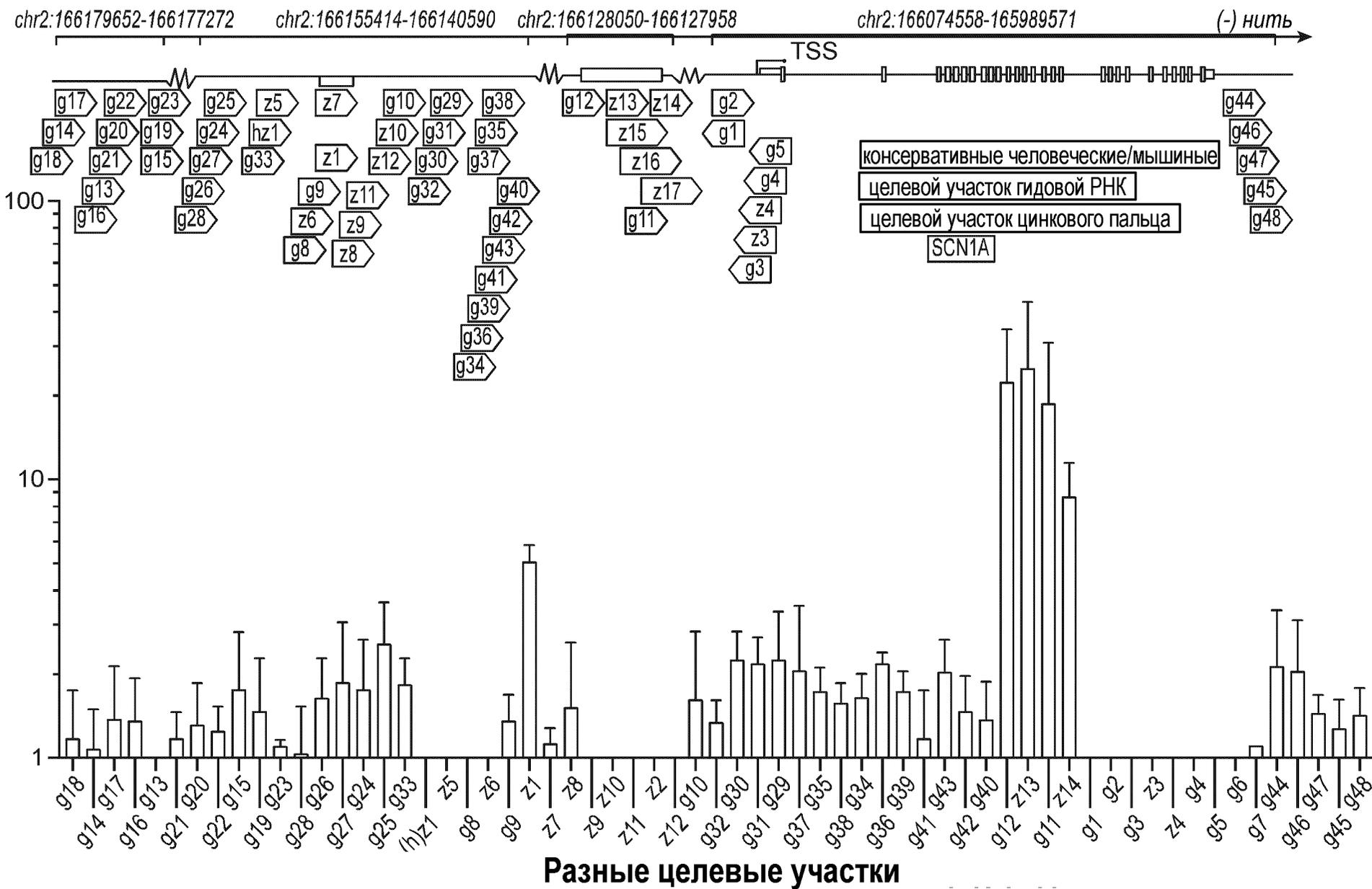
ФИГ.4



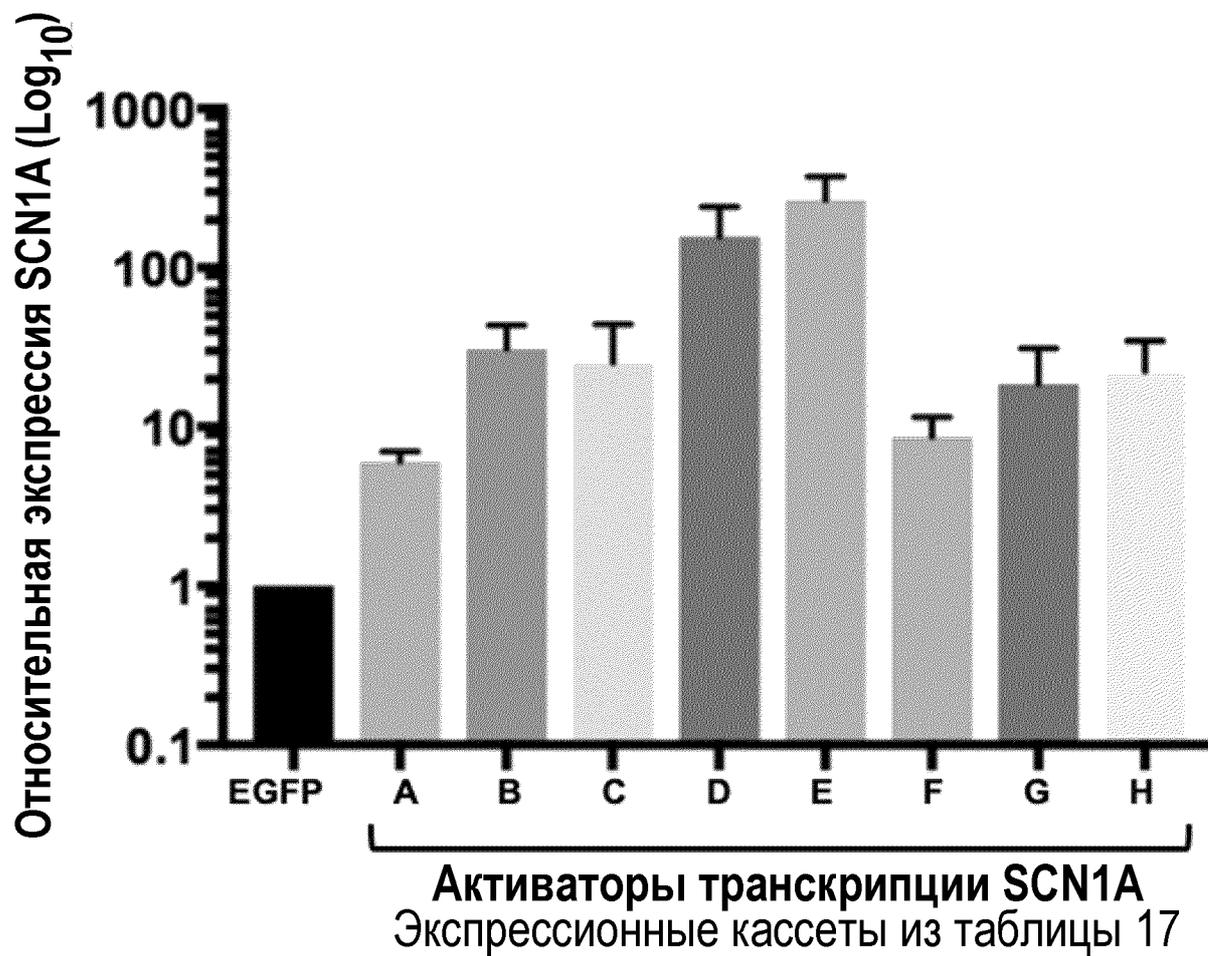
ФИГ.5



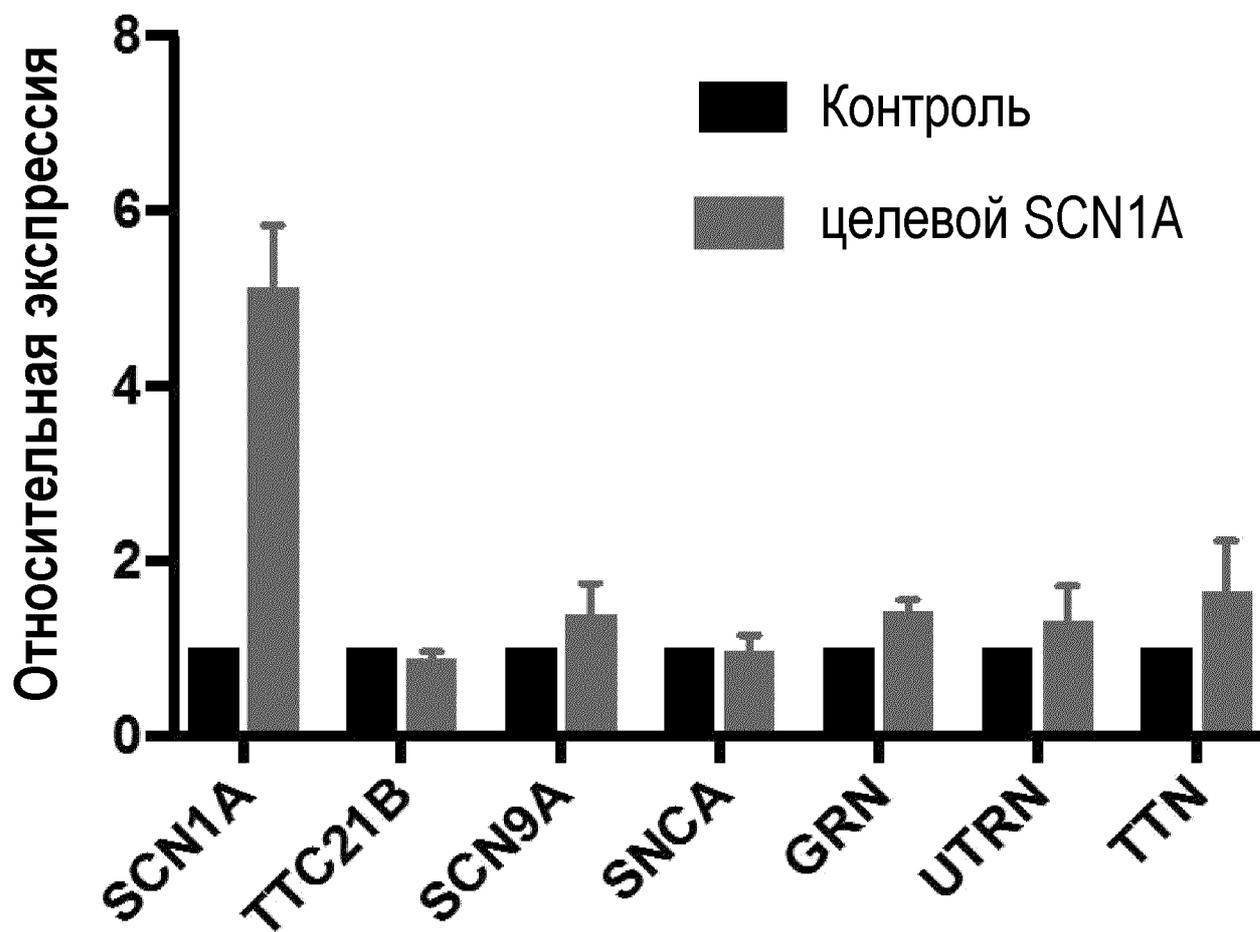
ФИГ.6



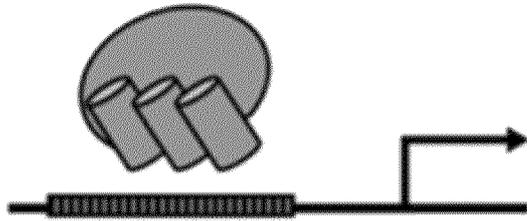
ФИГ.7



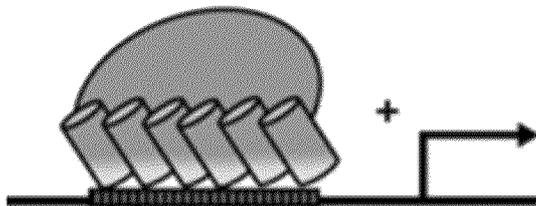
ФИГ.8



ФИГ.9А

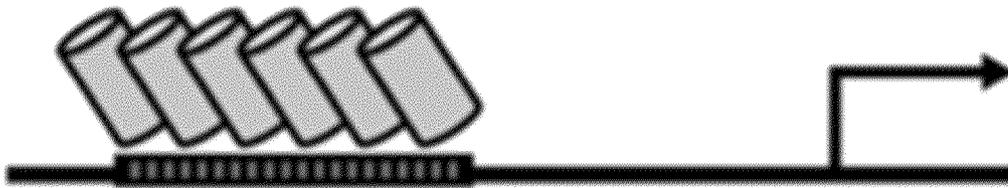


Немодифицированный TF
или TF дикого типа

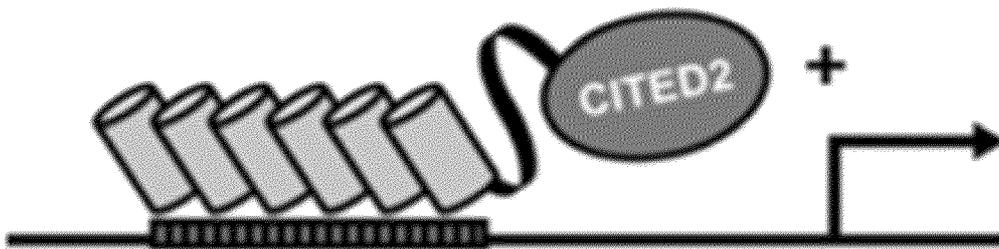


eTF с перепрограммированным
или сконструированным DBD

ФИГ.9В

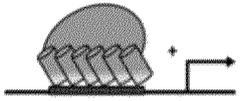
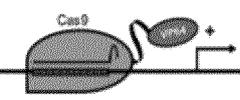


DBD природного человеческого TF



DBD, слитый с доменом активатора транскрипции человека

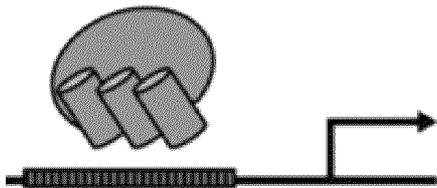
ФИГ.10

		Процент консервативности	Размер (п.о.)
eTF		>90%	1,000-1,800
dCas9		0%	3,900
ZFP		55%	800-900

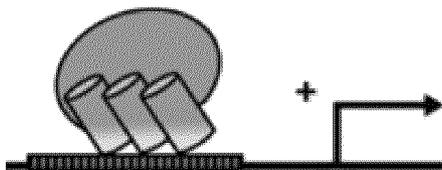
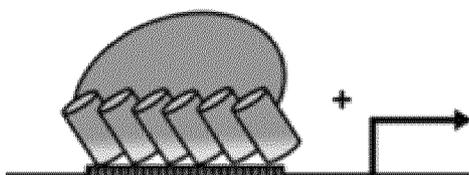
ФИГ.11



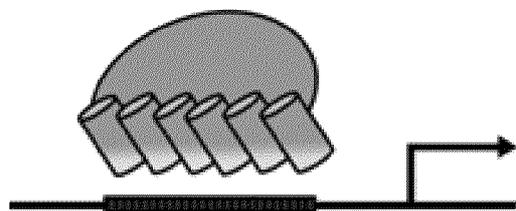
Синтетический активатор ZF



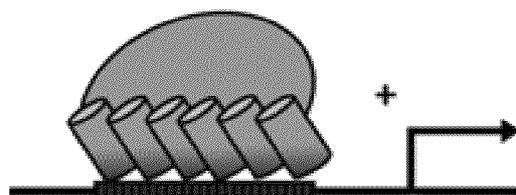
TF дикого типа

eTF1
(мишень размером 18 нуклеотидов)eTF2
(мишень размером 9 нуклеотидов)eTF3
(мишень размером 18 нуклеотидов)

ФИГ.12А

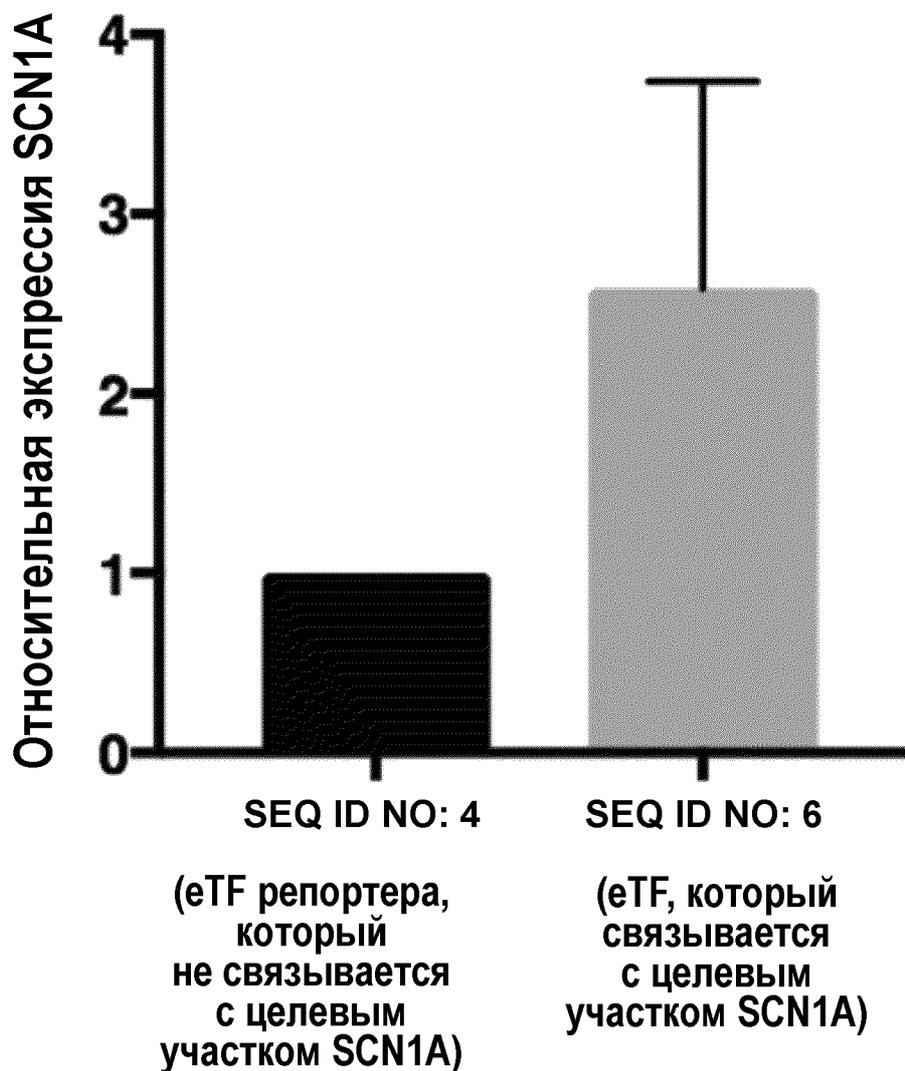


eTF3,
нацеленный на репортер,
96% идентичности

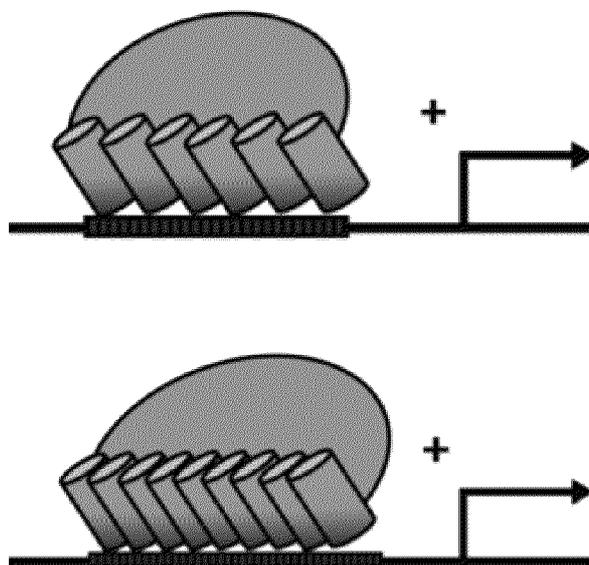


eTF4,
нацеленный на SCN1A
(18 нуклеотидов),
98% идентичности

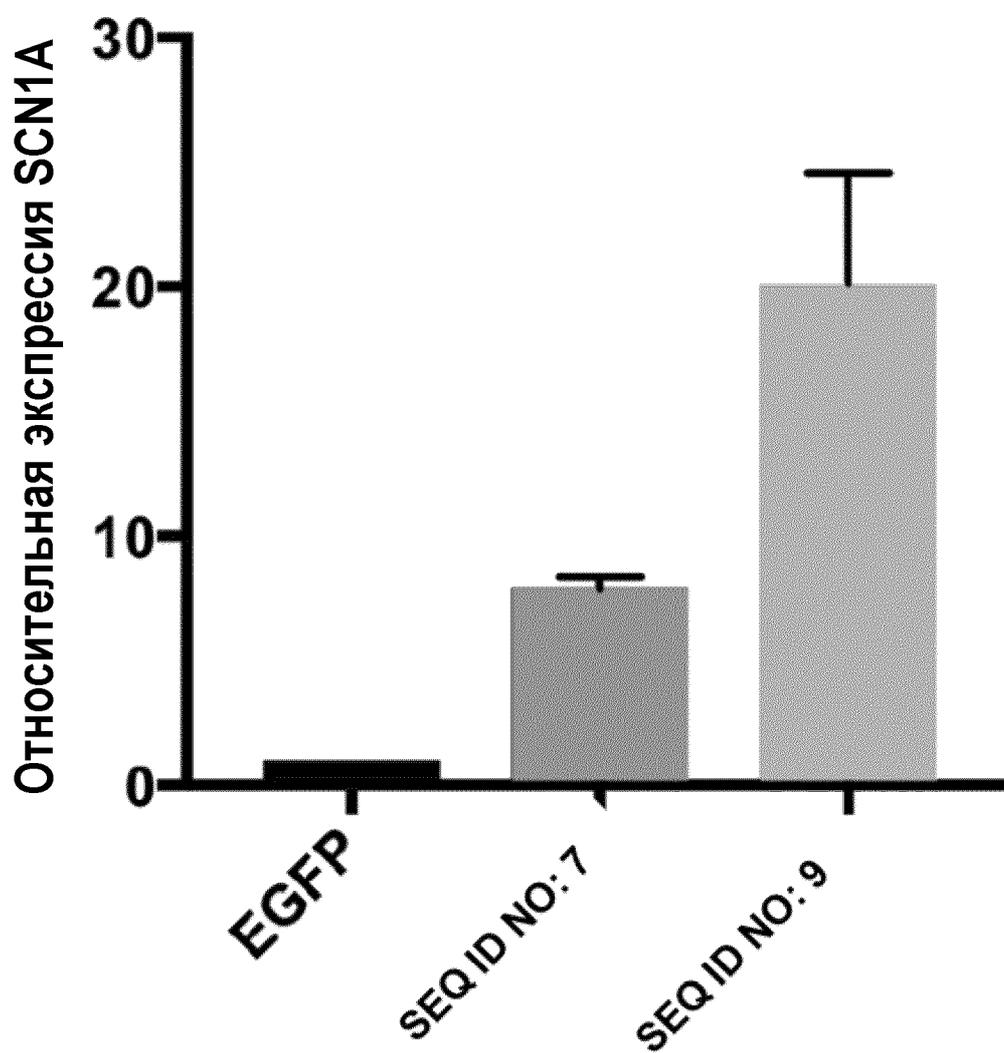
ФИГ.12В



ФИГ.13А



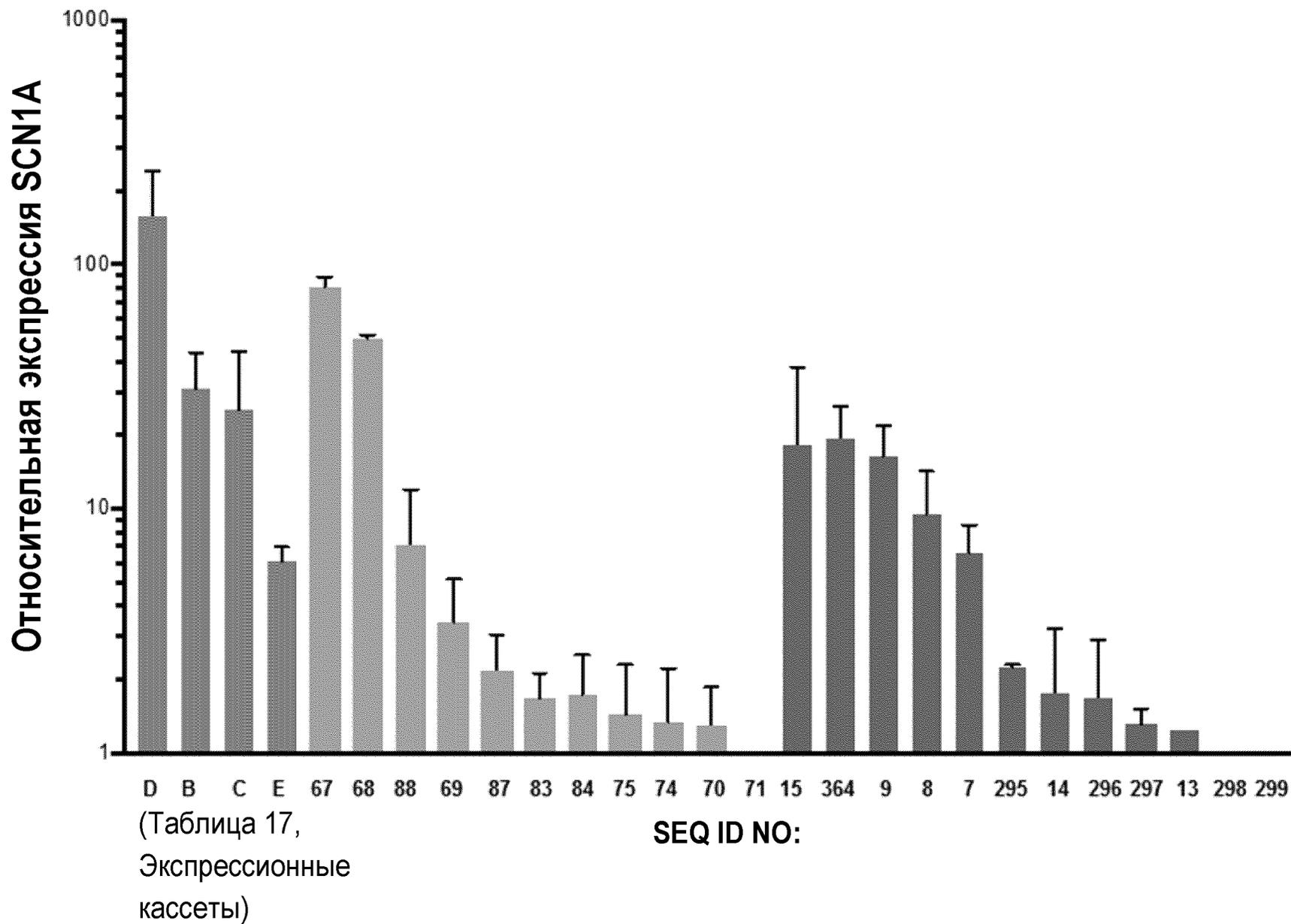
ФИГ.13В



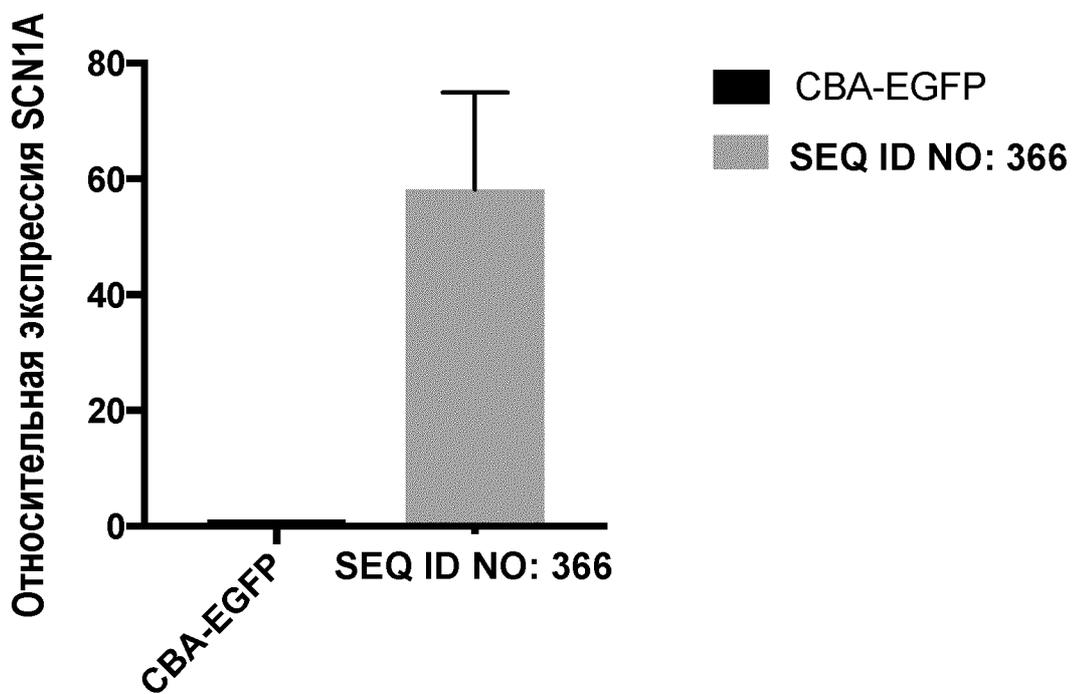
ФИГ.14

		ДНК-связывающий домен	Домен активации
<p>Человеческий ДНК-связывающий домен</p> <p>Домен активации отсутствует</p>		85%	N/A
<p>Человеческий ДНК-связывающий домен</p> <p>Вирусный домен активации</p>		85%	0%
<p>Человеческий ДНК-связывающий домен</p> <p>Человеческий домен активации</p>		85%	100%

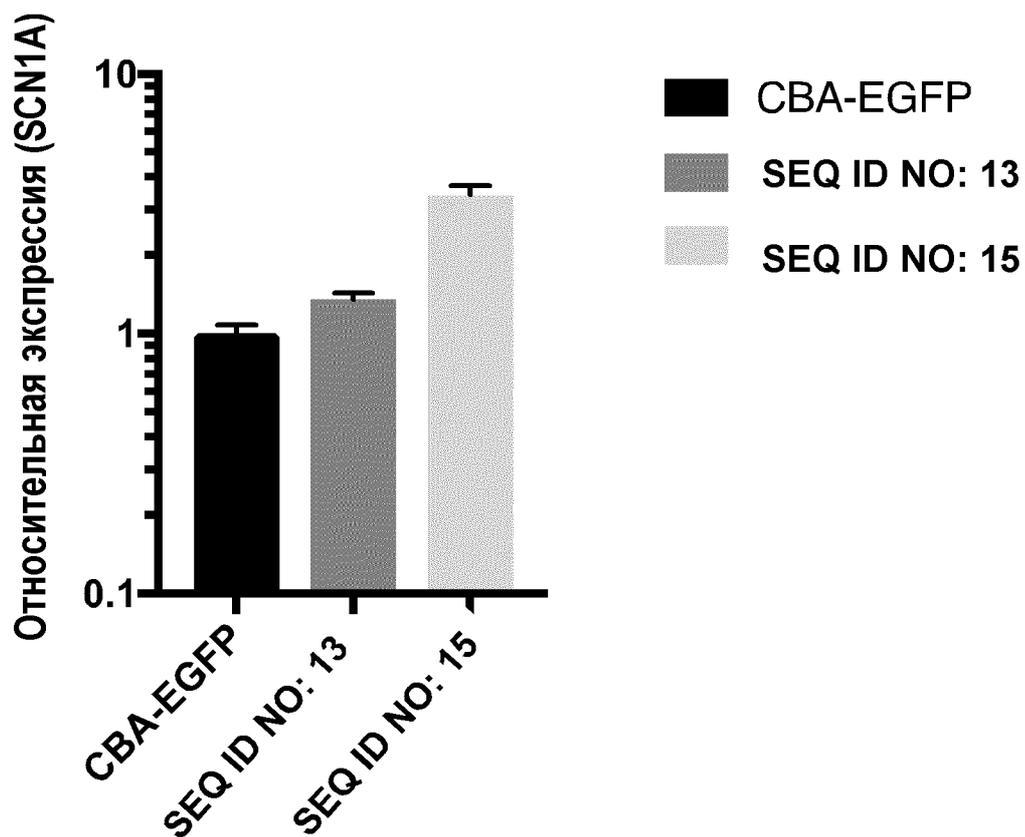
ФИГ.15



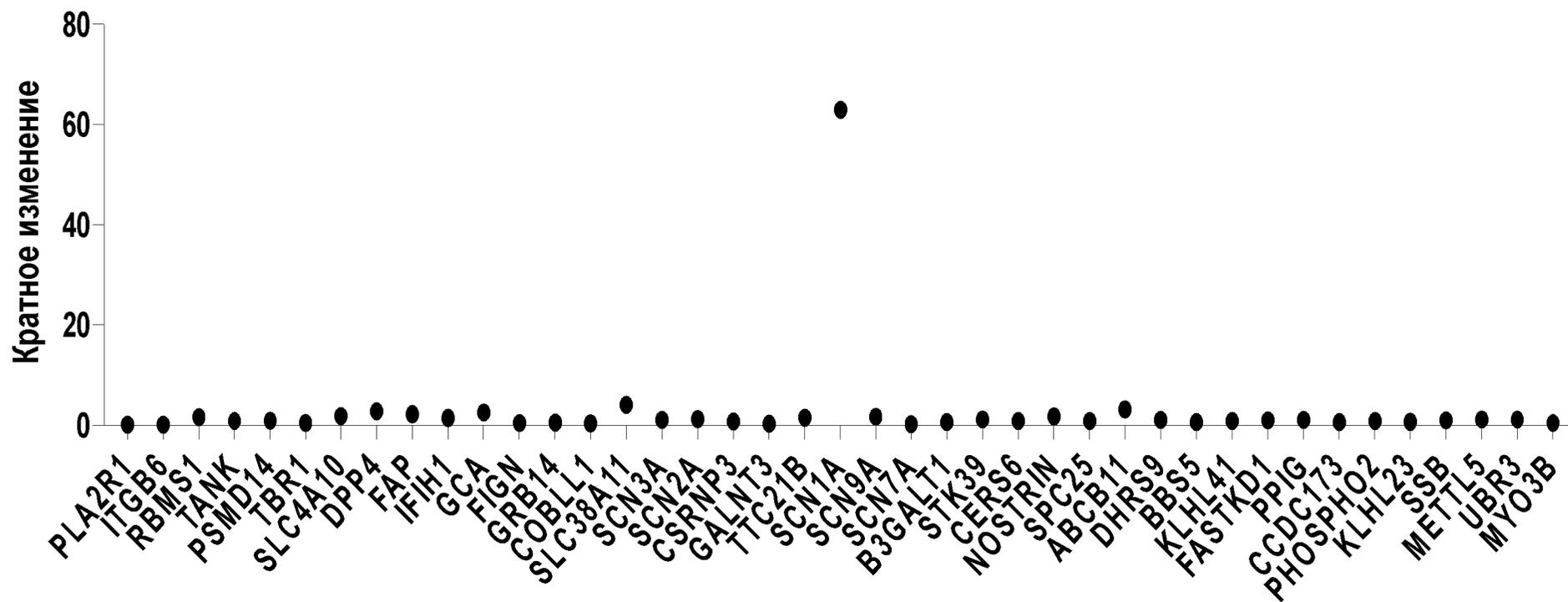
ФИГ.16А



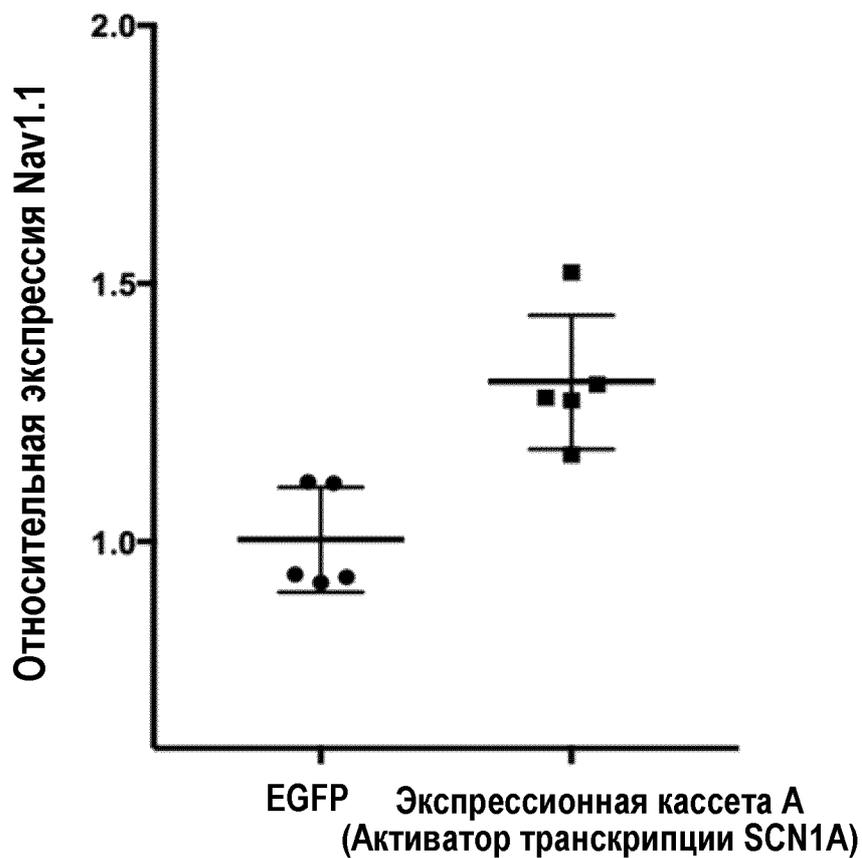
ФИГ.16В



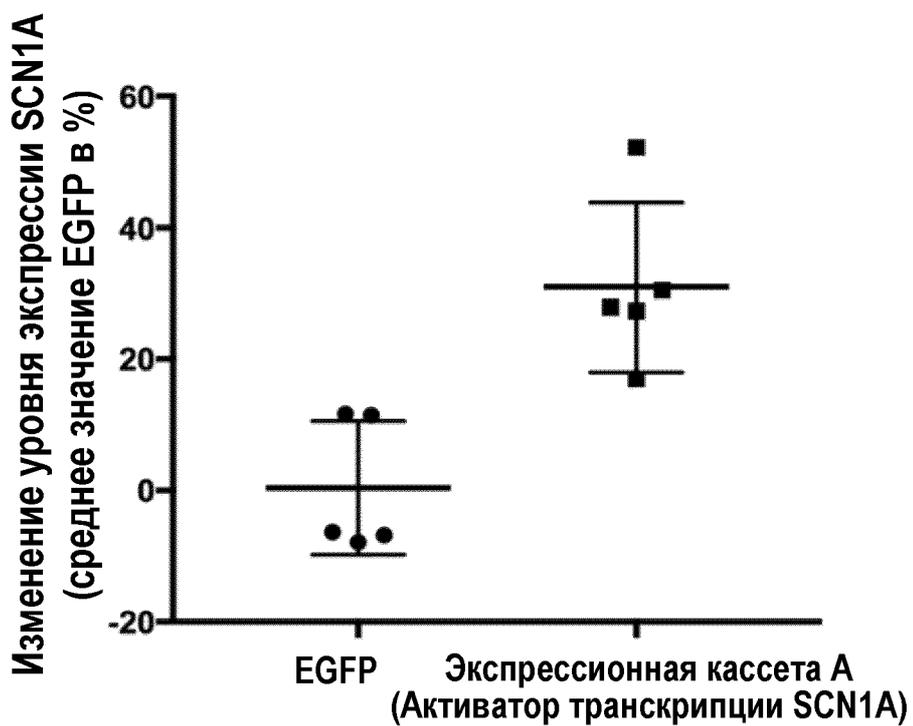
ФИГ.17



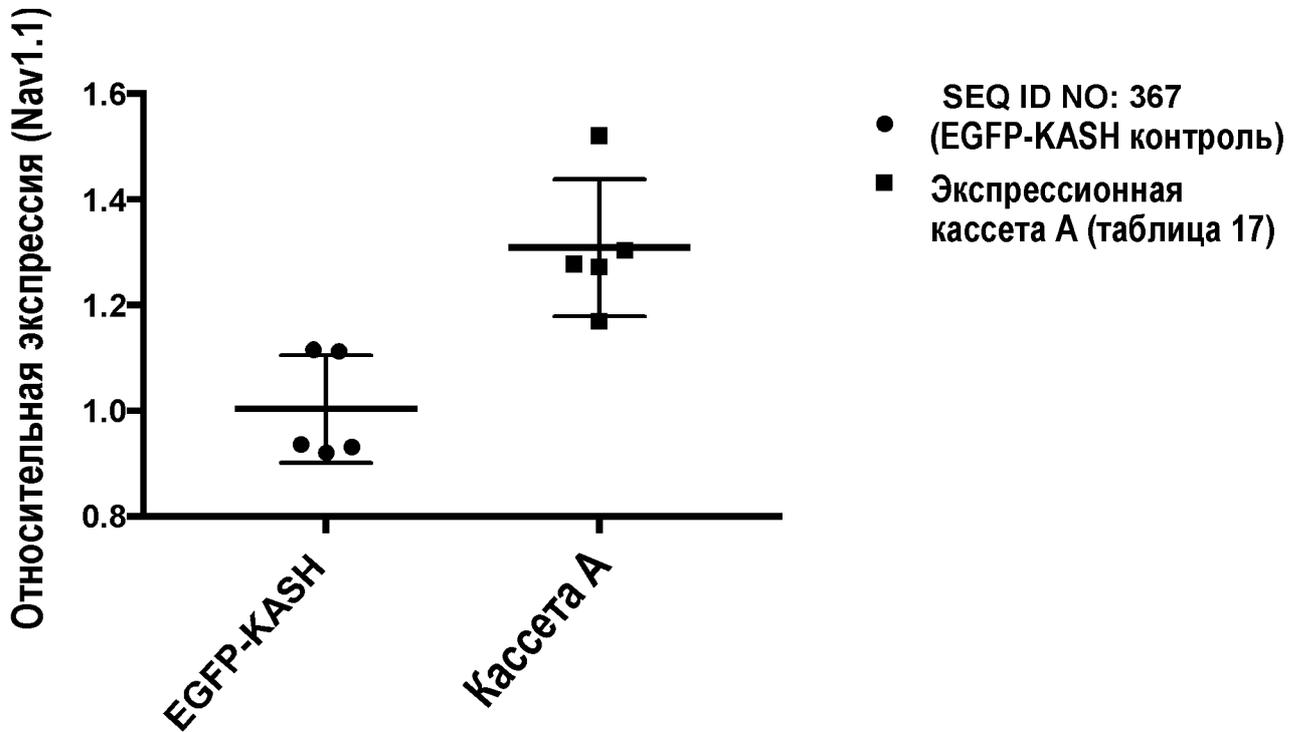
ФИГ.18А



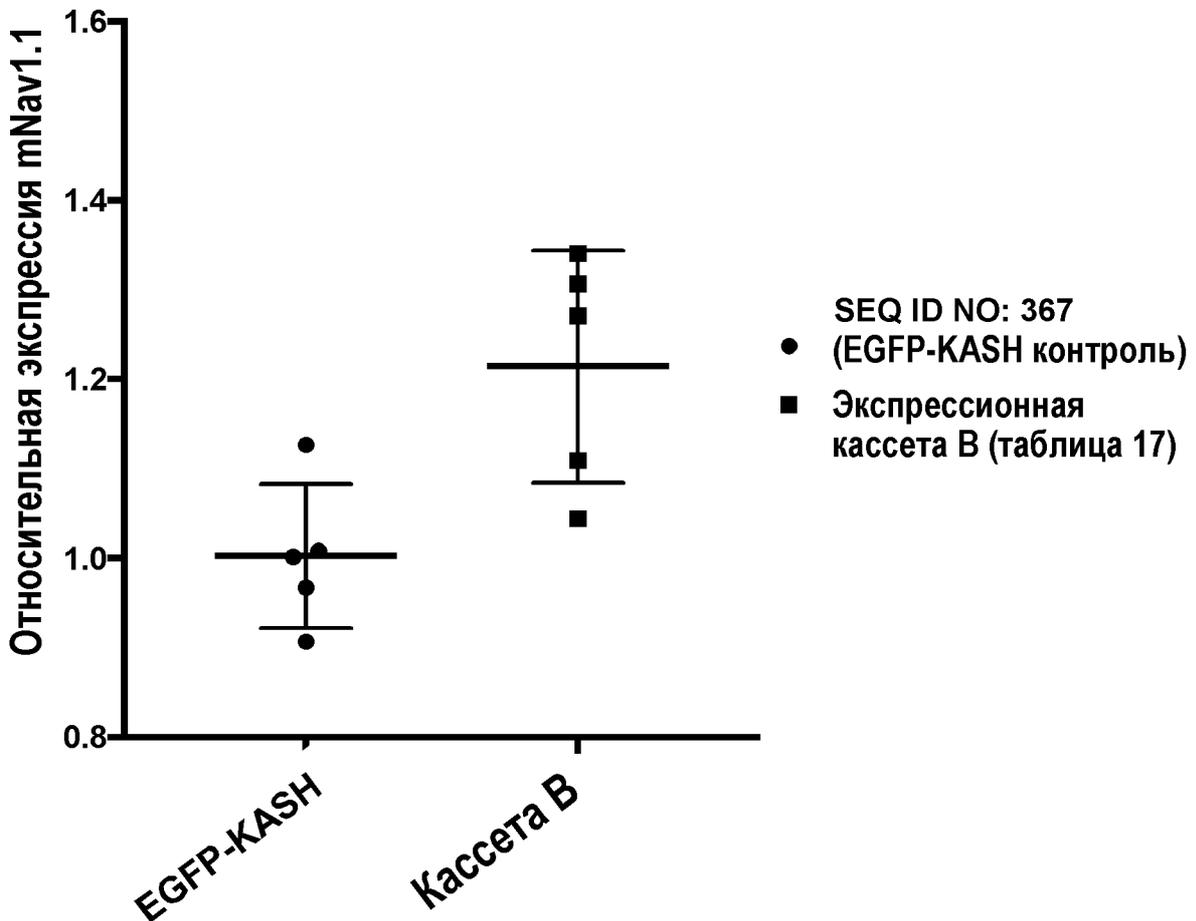
ФИГ.18В



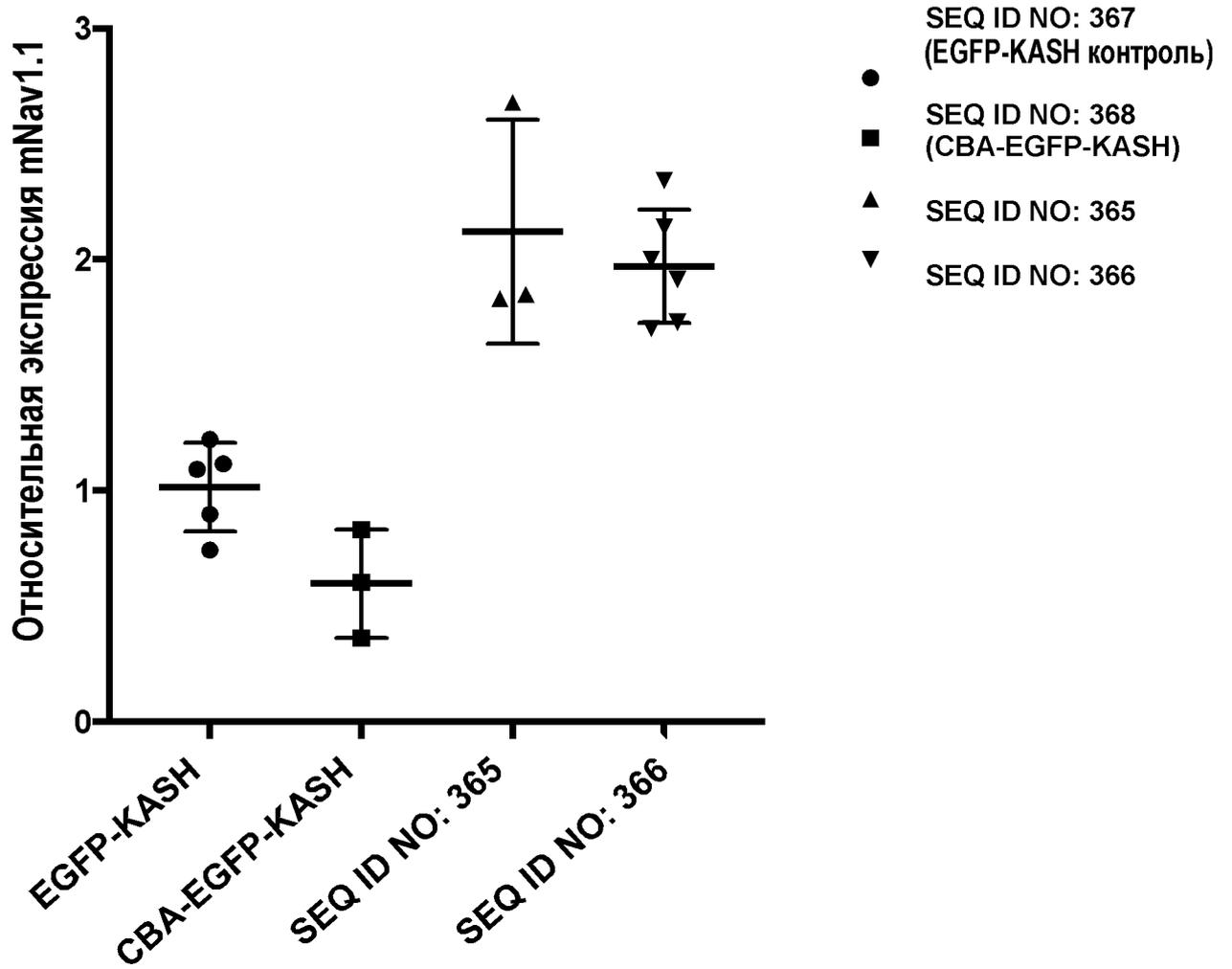
ФИГ.19А



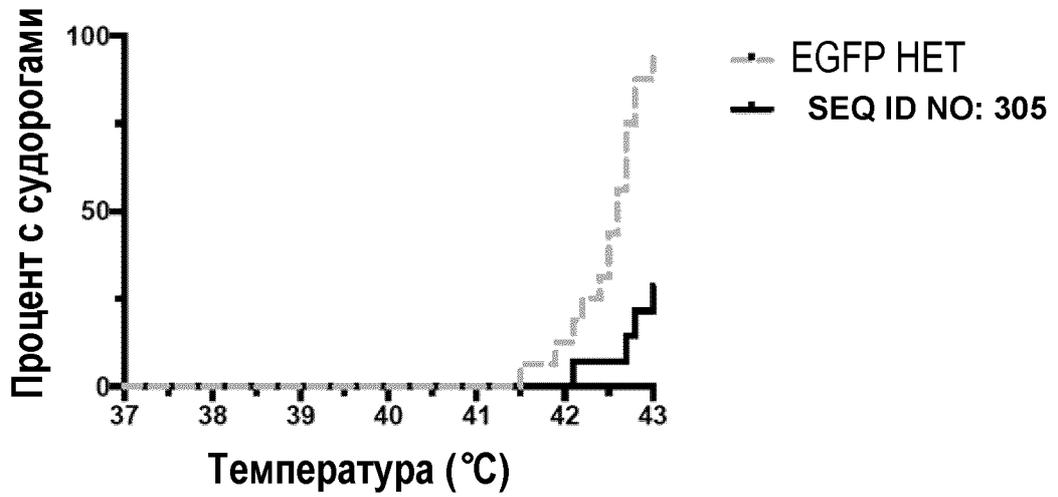
ФИГ.19В



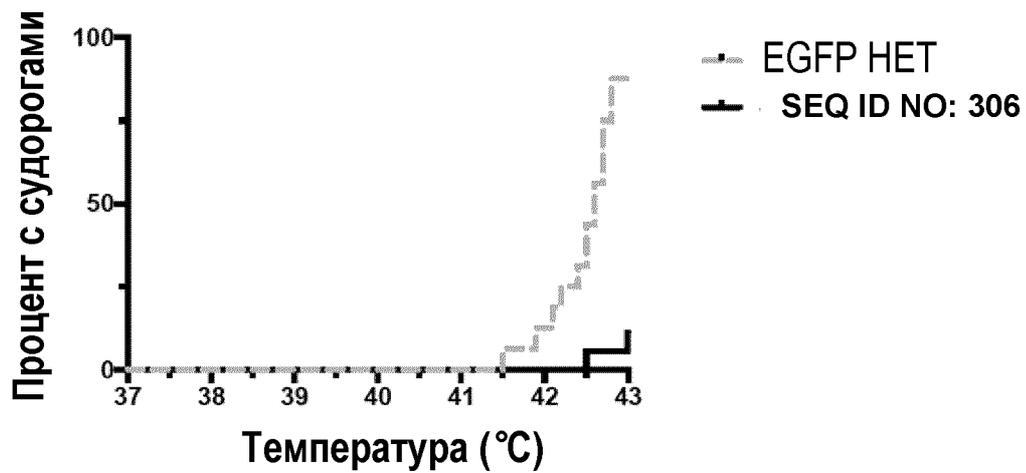
ФИГ.19С



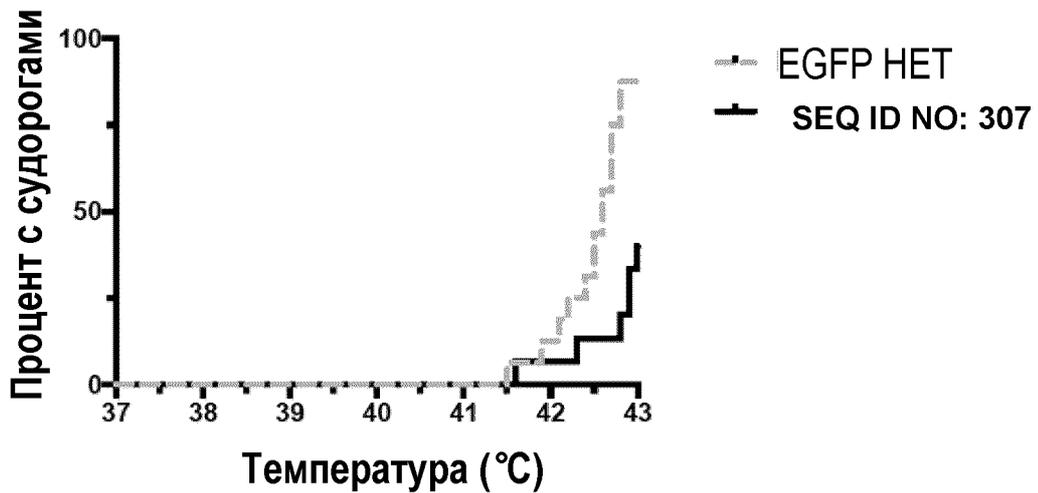
ФИГ.20А



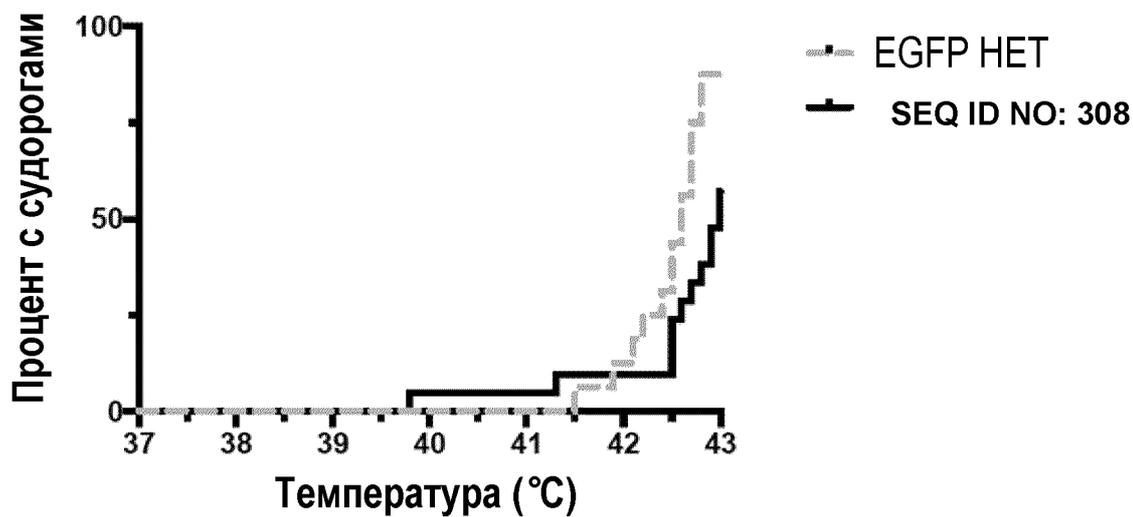
ФИГ.20В



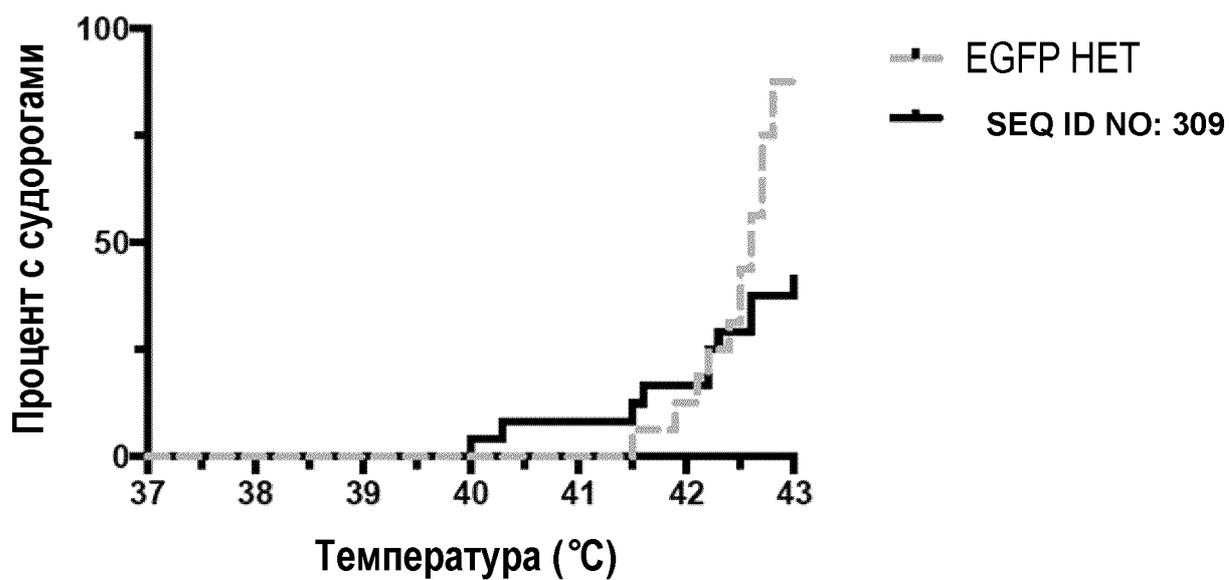
ФИГ.20С



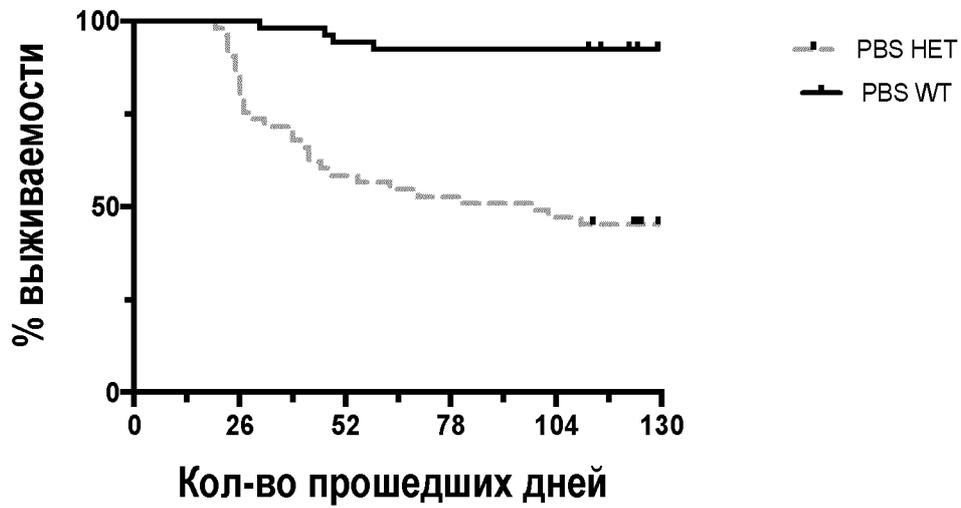
ФИГ.20D



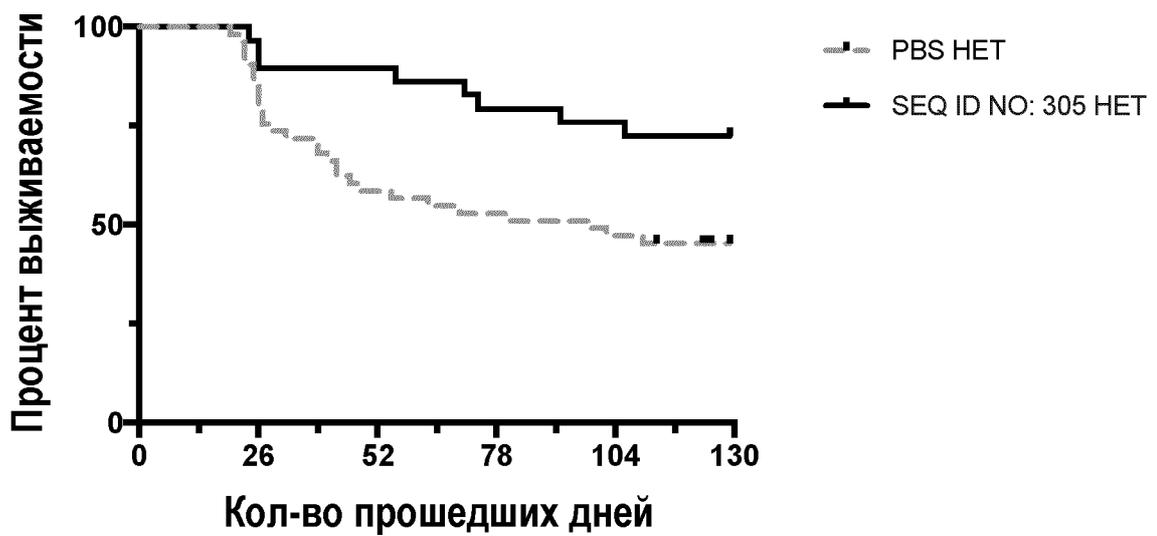
ФИГ.20E



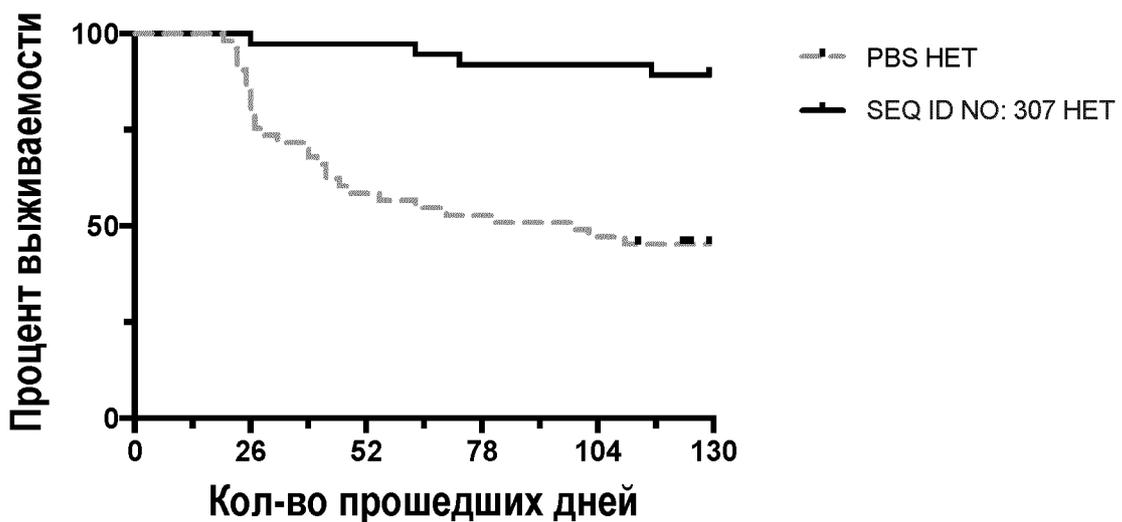
ФИГ.21А



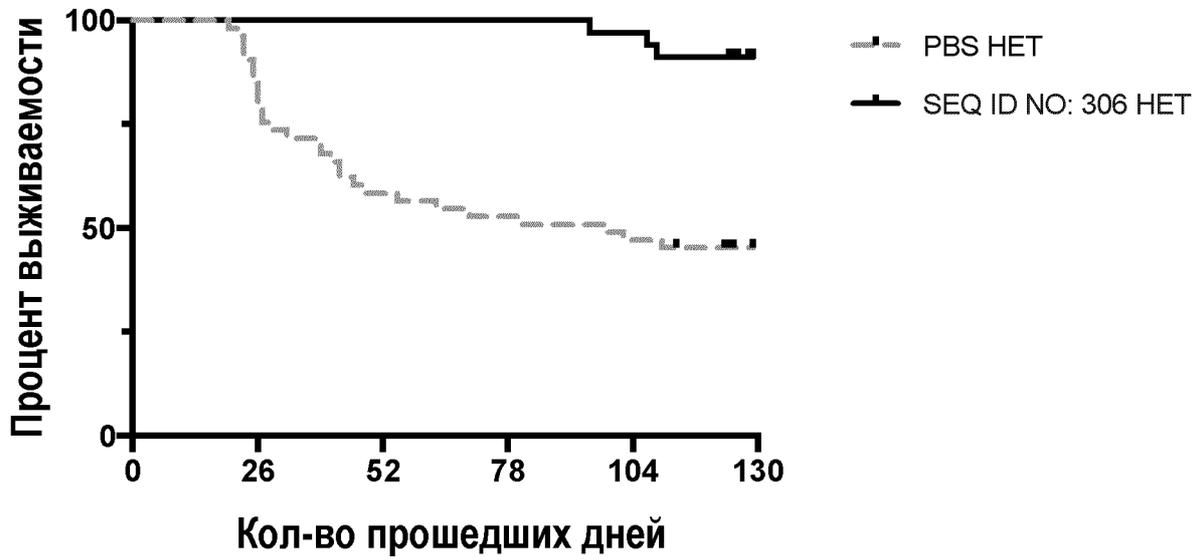
ФИГ.21В



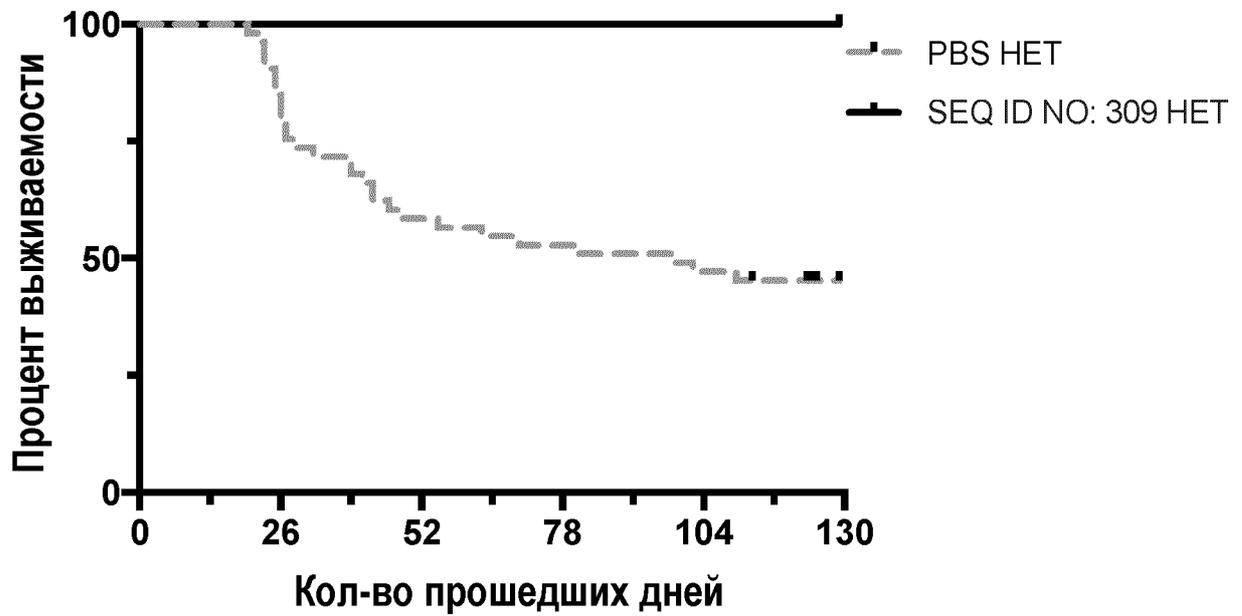
ФИГ.21С



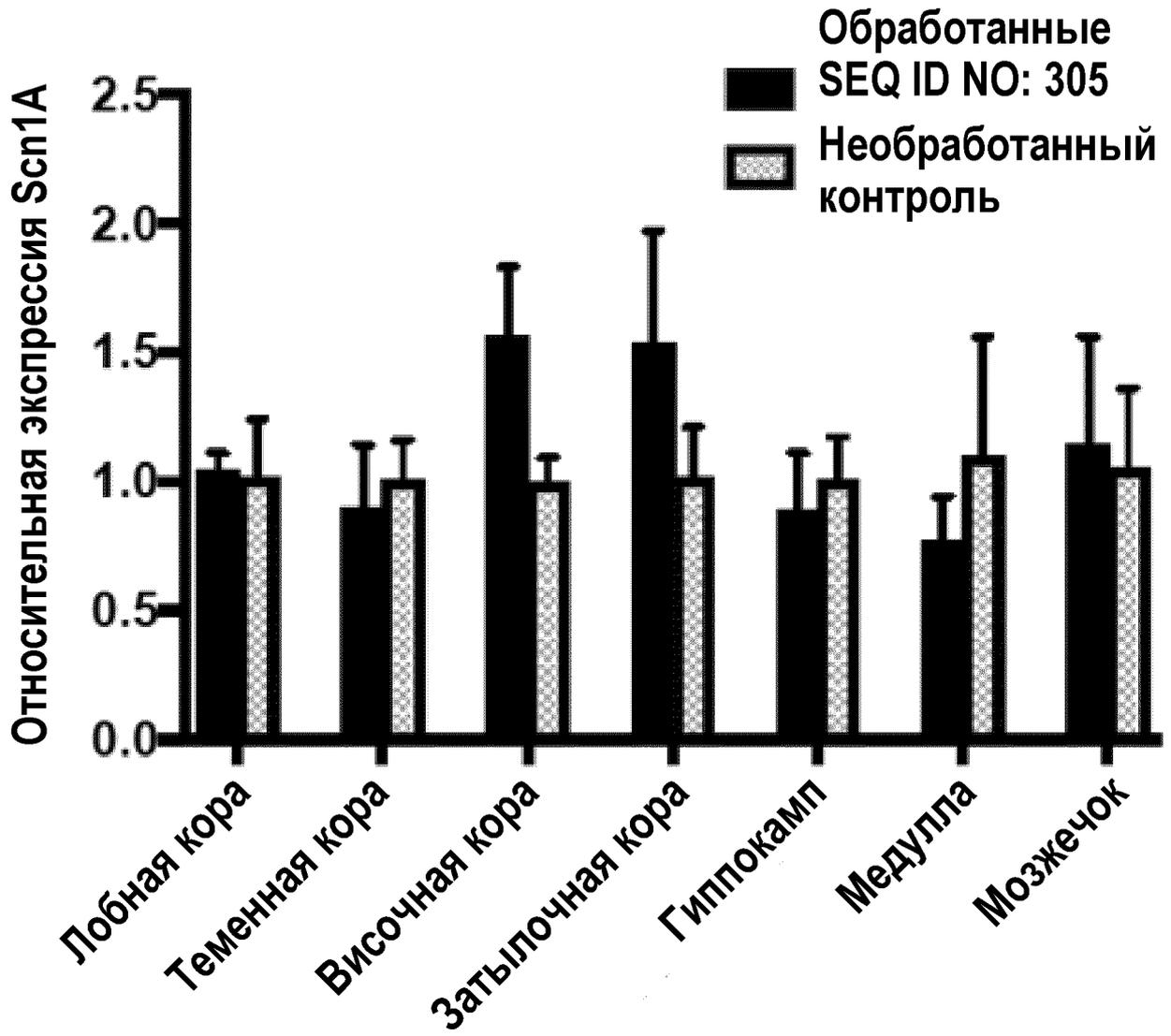
ФИГ.21D



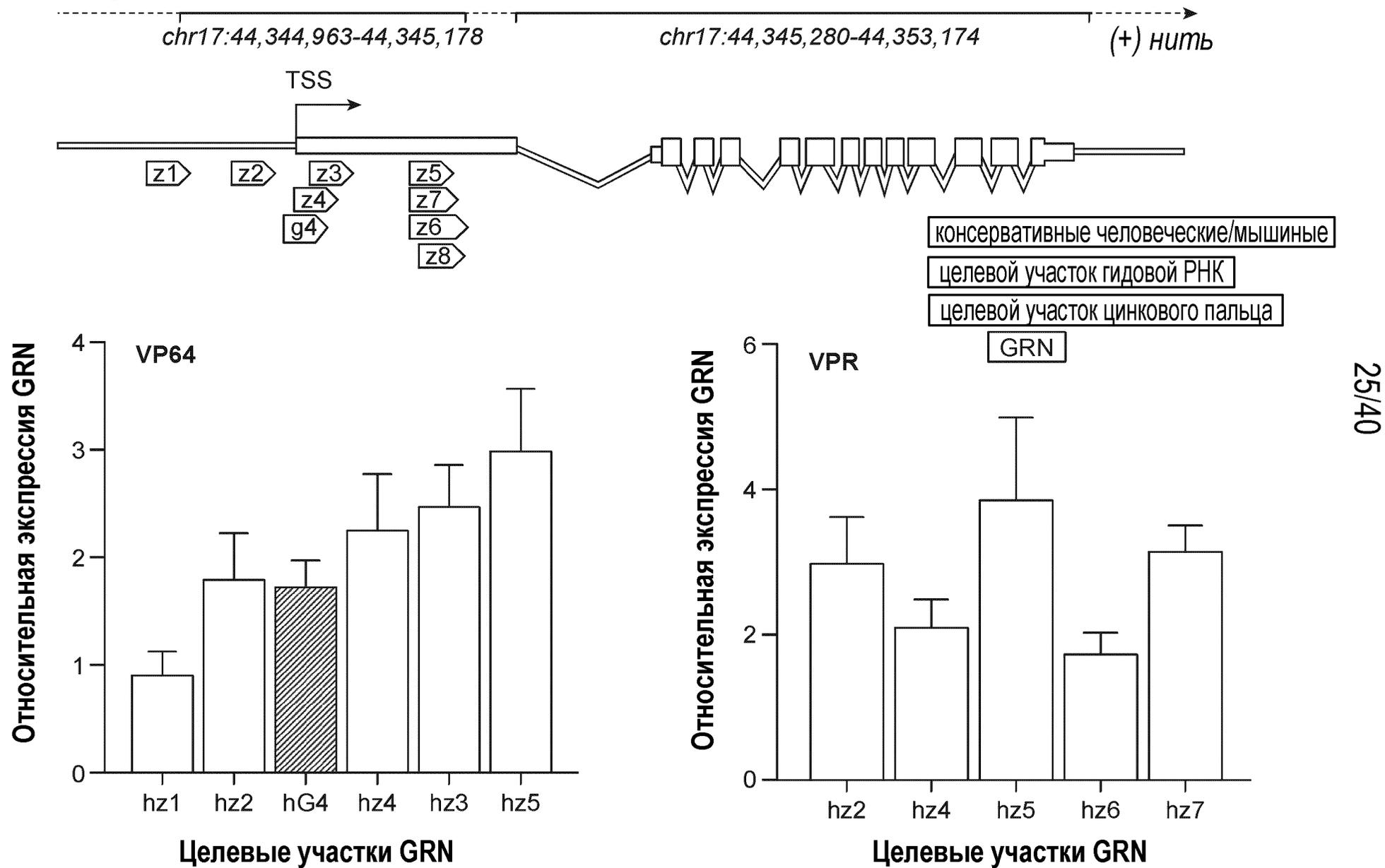
ФИГ.21E



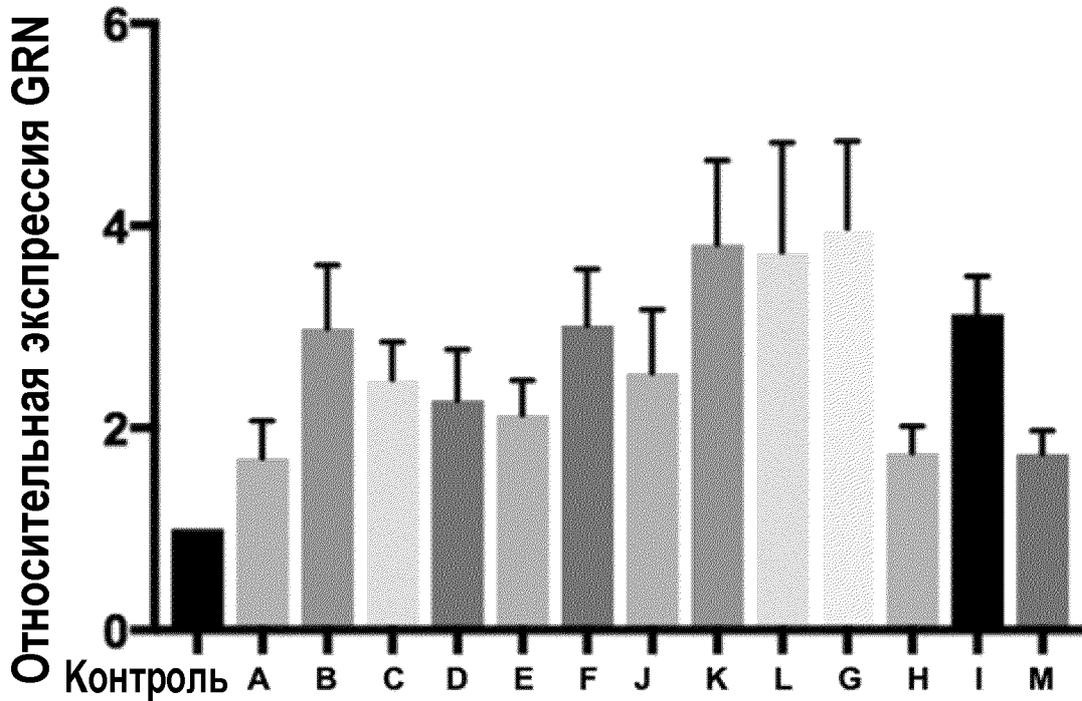
ФИГ.22



ФИГ.23

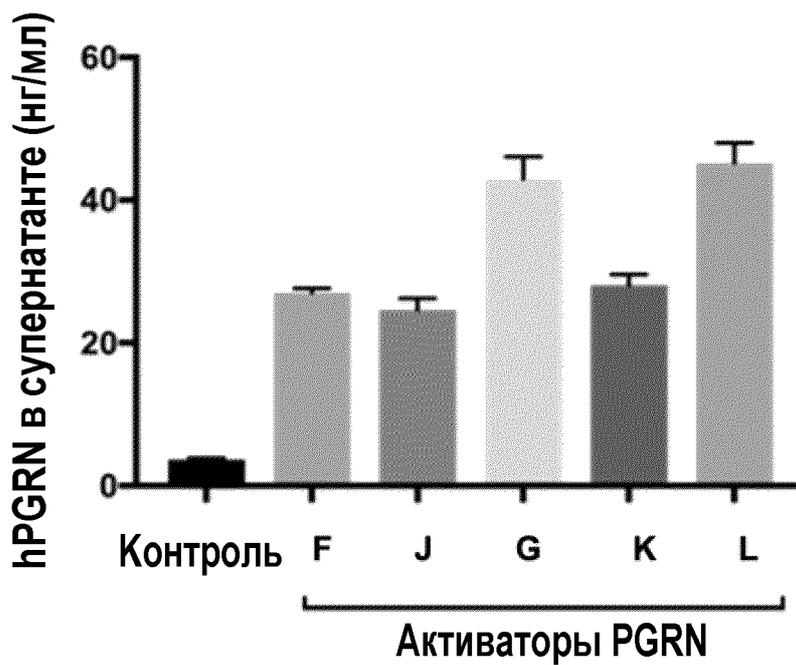


ФИГ.24А



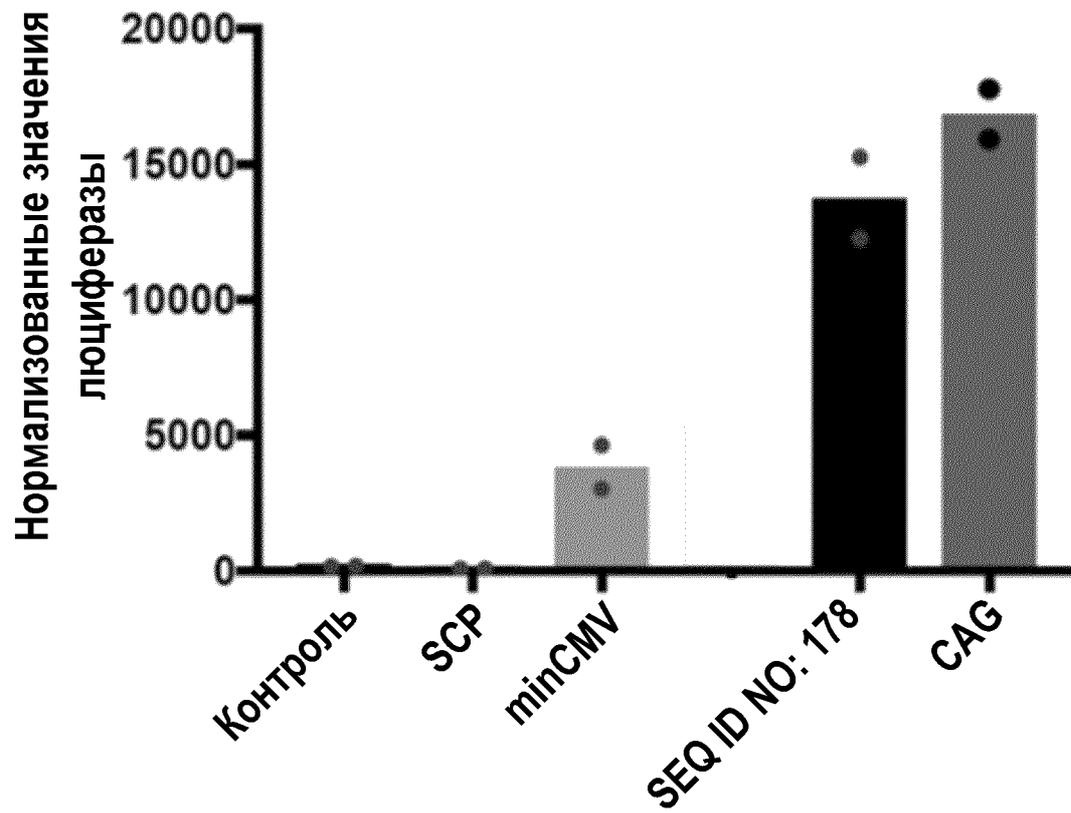
Экспрессионная кассета в таблице 23

ФИГ.24В

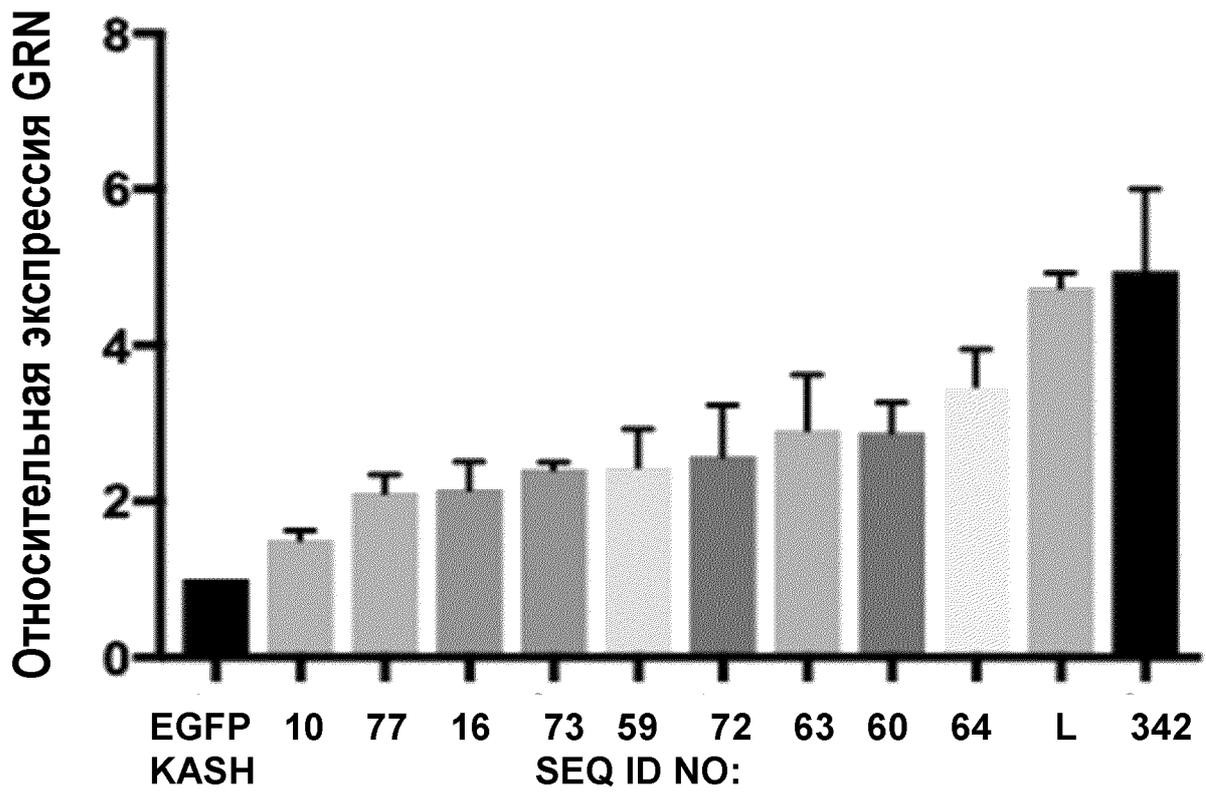


Среды, собранные через 2 дня
после трансфекции для ELISA

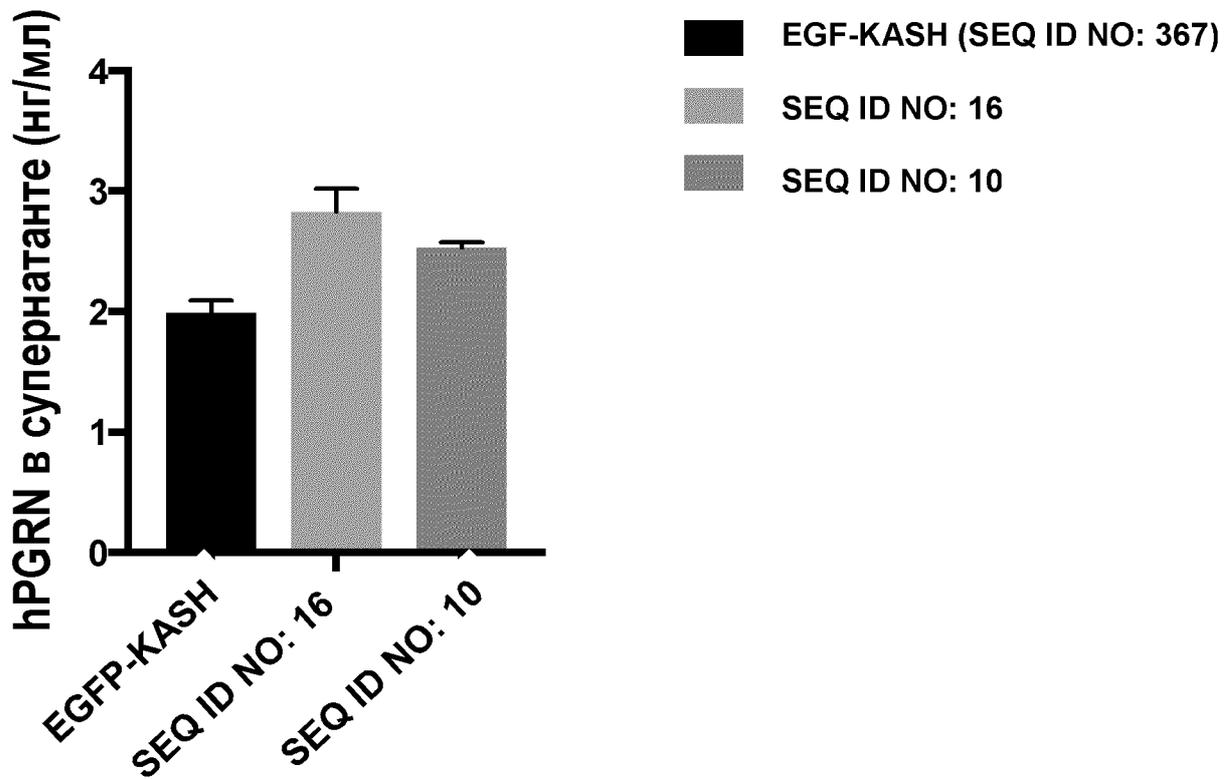
ФИГ.25



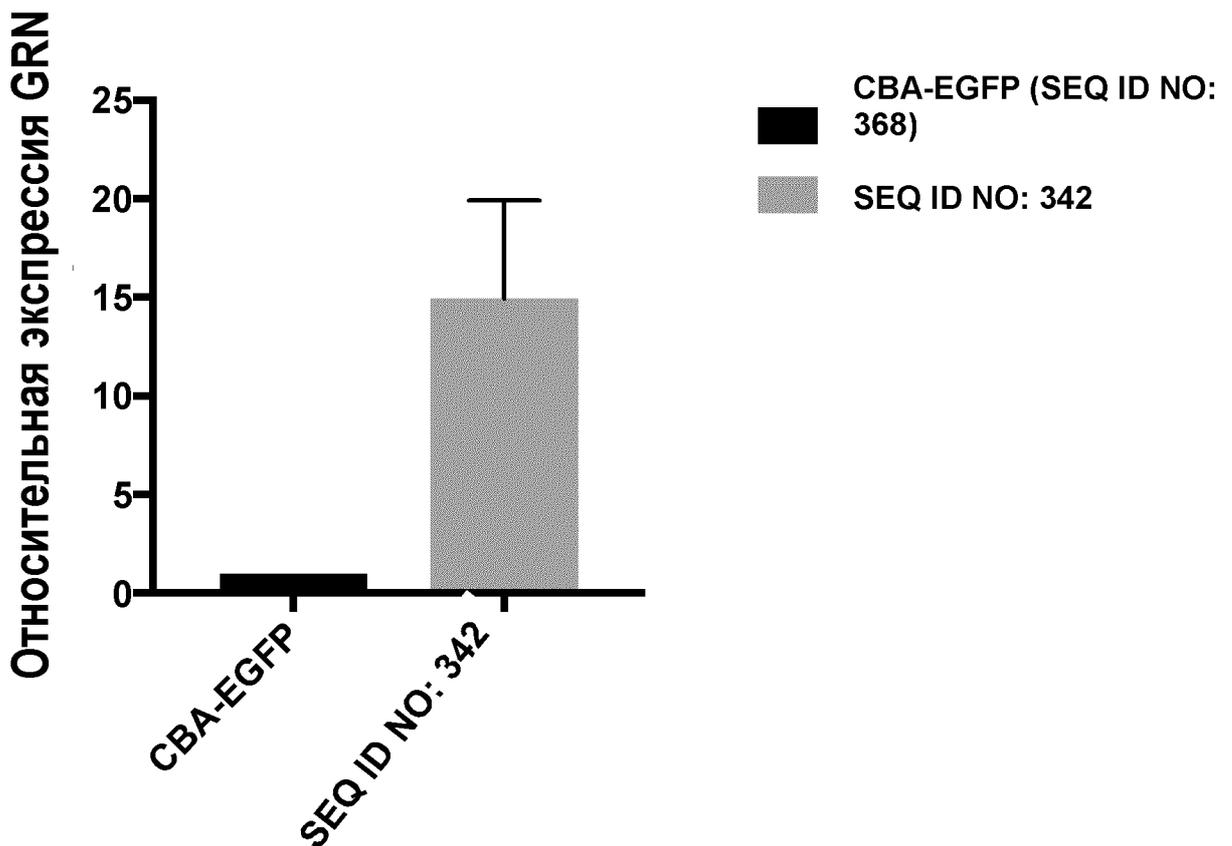
ФИГ.26



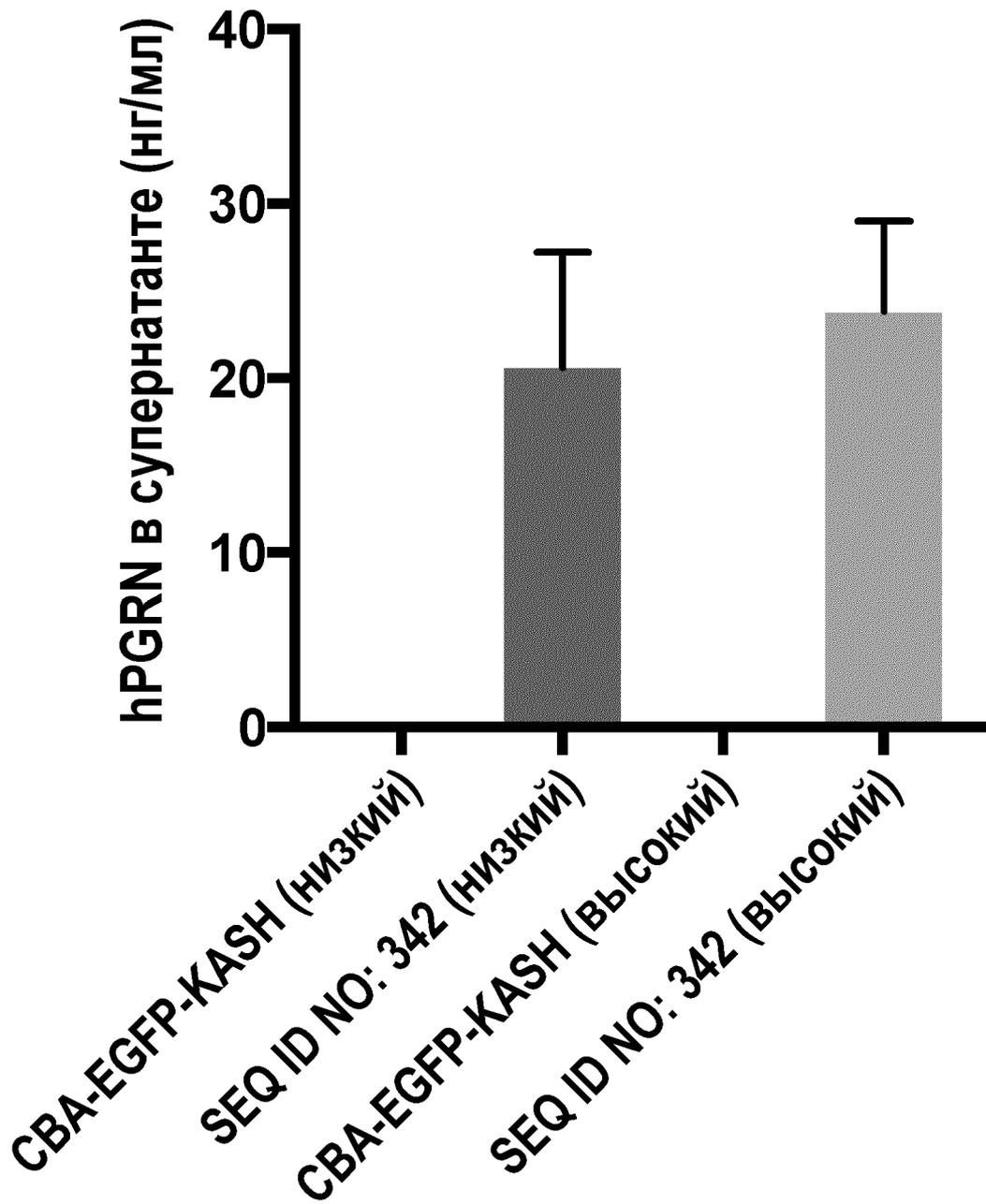
ФИГ.27



ФИГ.28

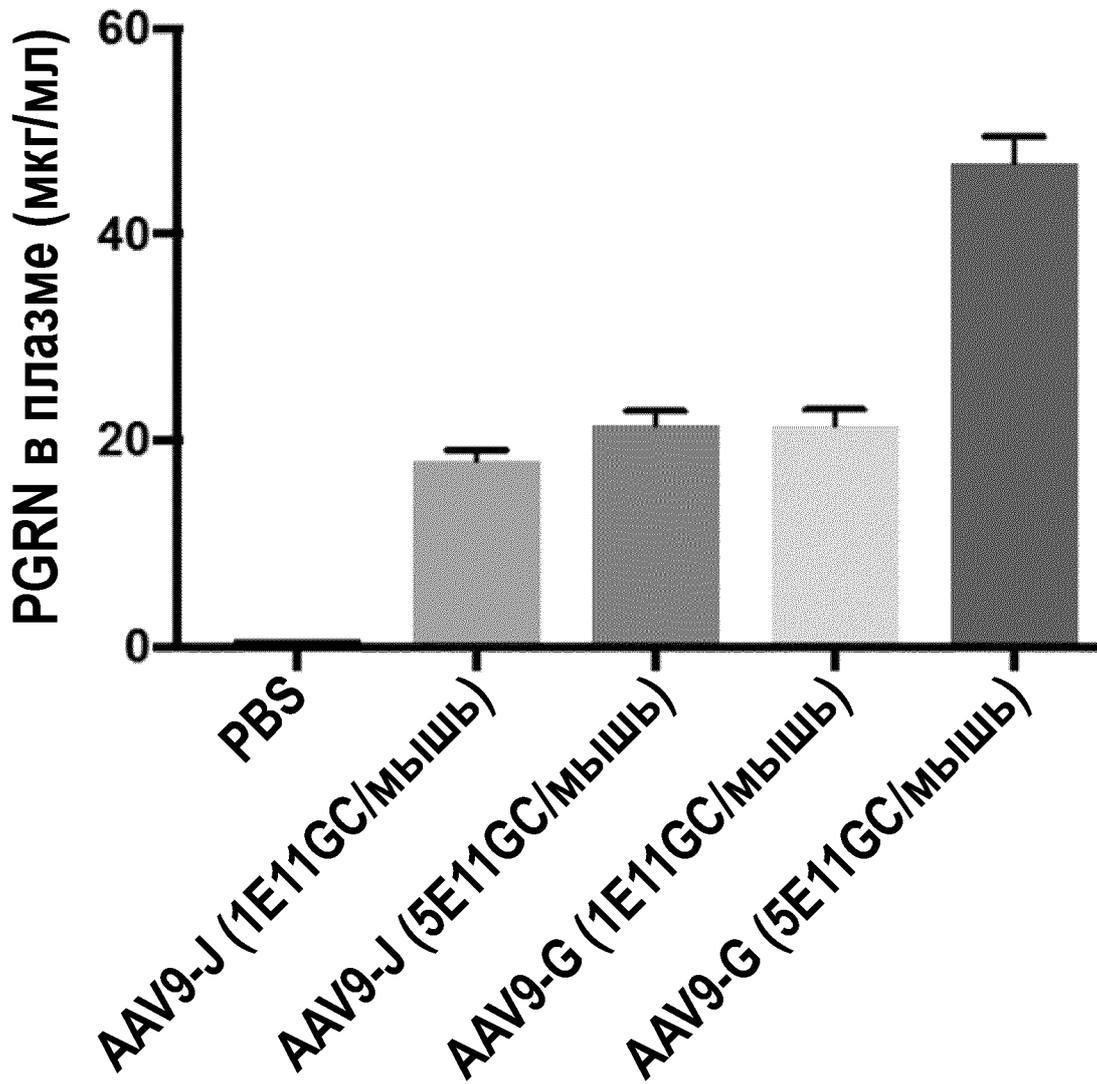


ФИГ.29

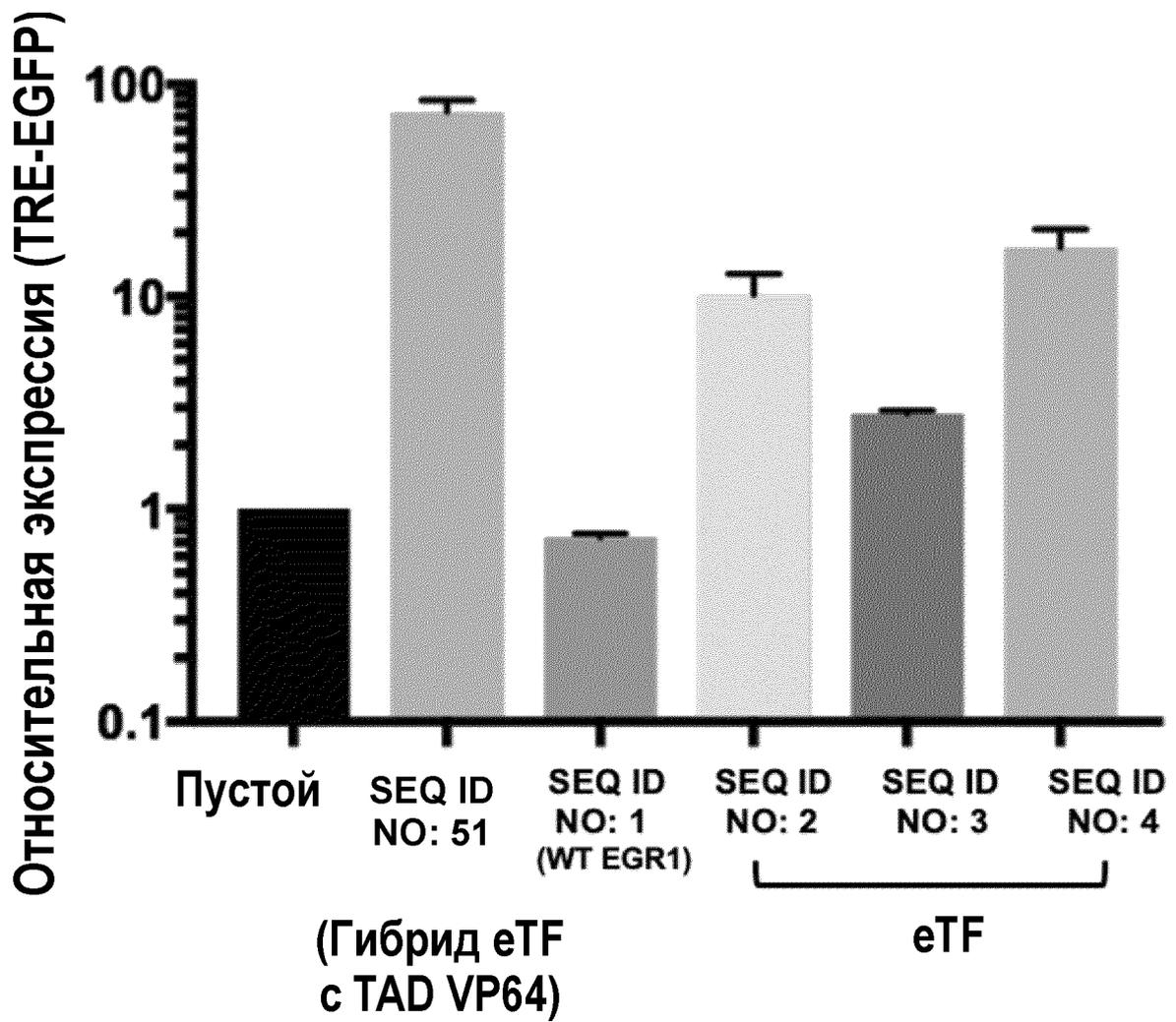


ФИГ.30

Через 1 неделю после инъекции
в хвостовую вену



ФИГ.31А

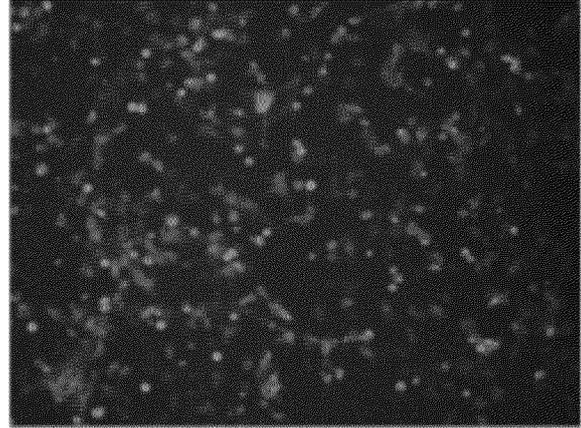


ФИГ.31В

Только репортер



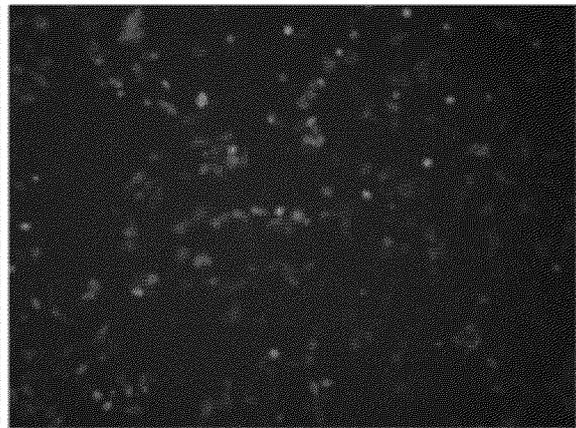
SEQ ID NO: 51



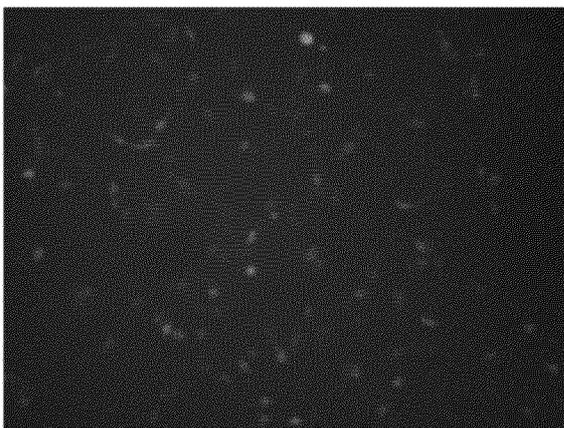
SEQ ID NO: 1



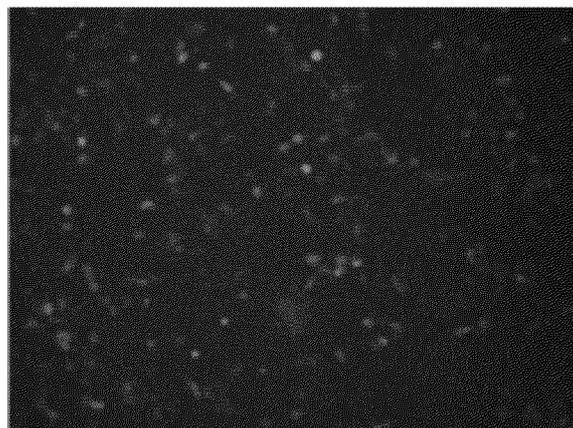
SEQ ID NO: 2



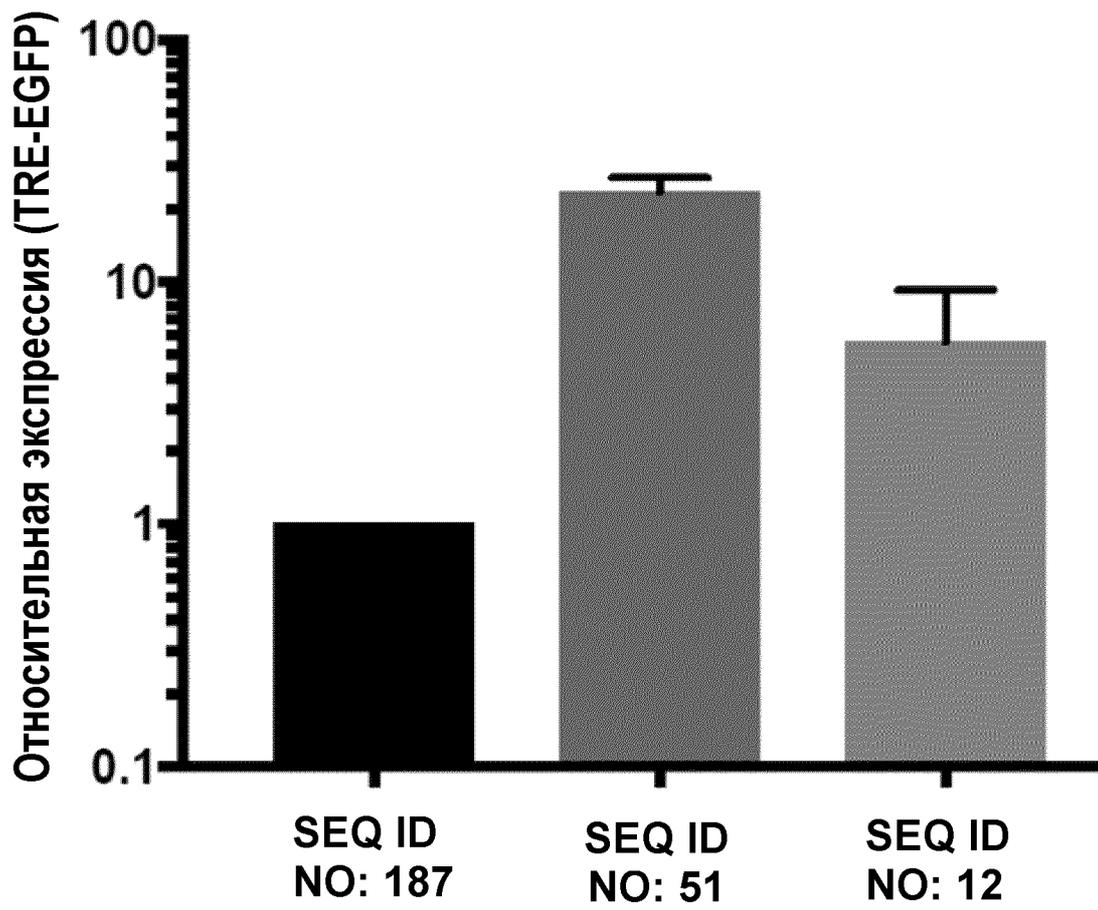
SEQ ID NO: 3



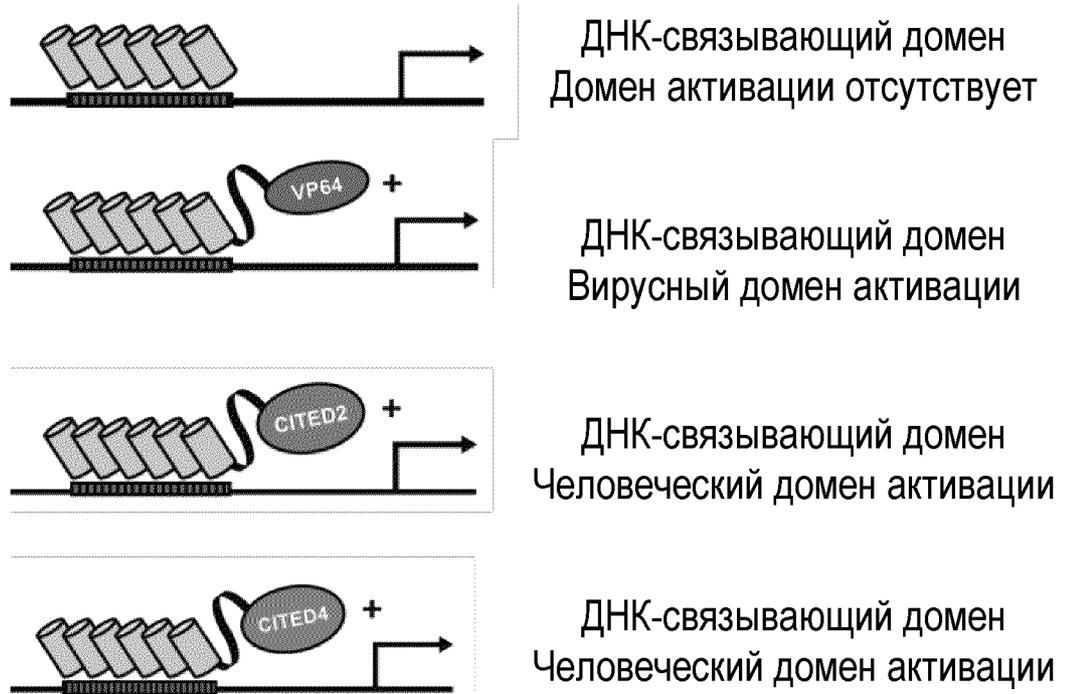
SEQ ID NO: 4



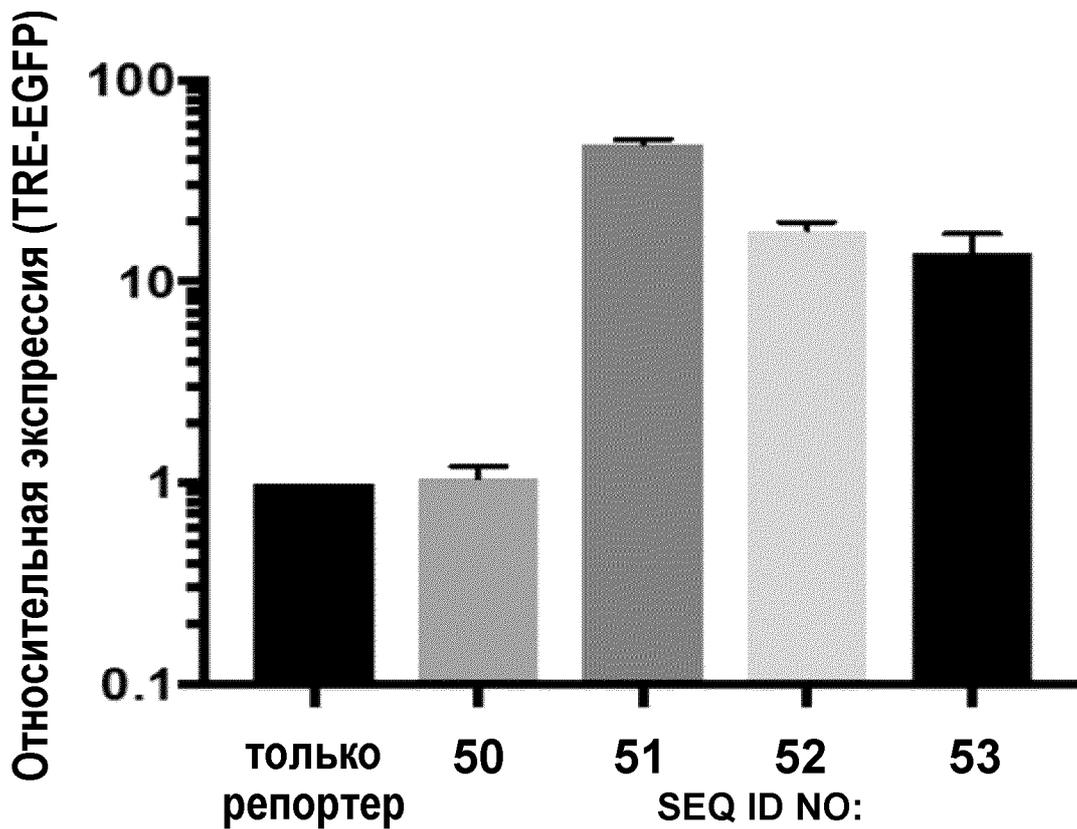
ФИГ.32



ФИГ.33А



ФИГ.33В

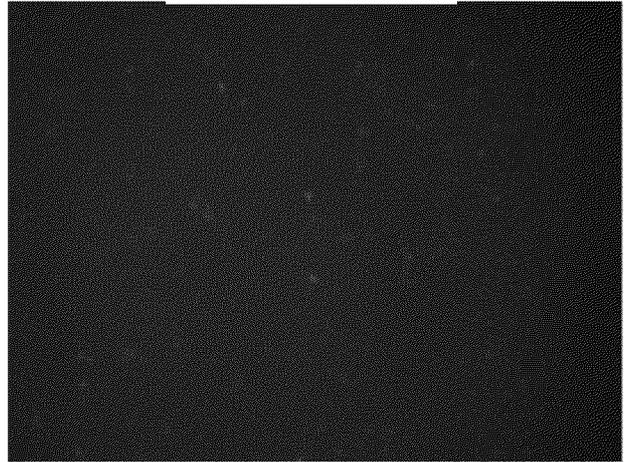


ФИГ.33С

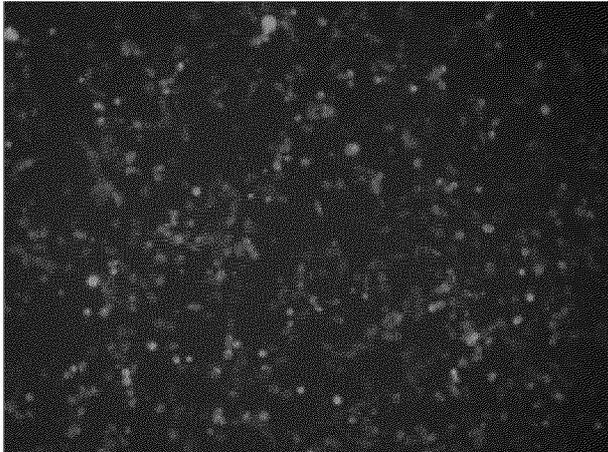
Только репортер



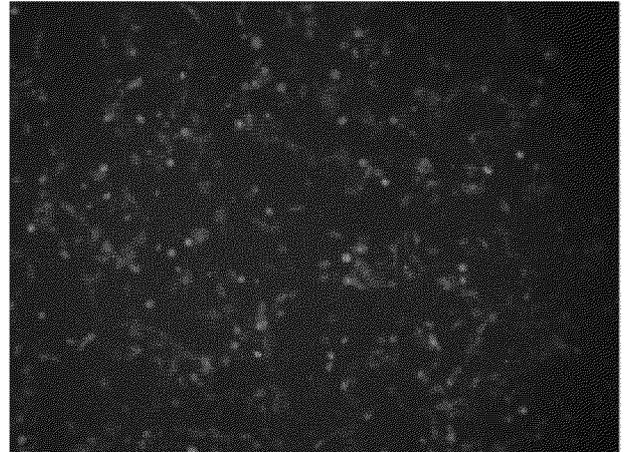
SEQ ID: 50



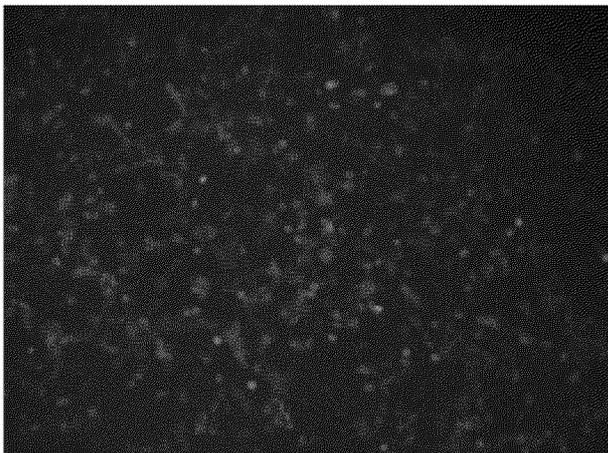
SEQ ID: 51



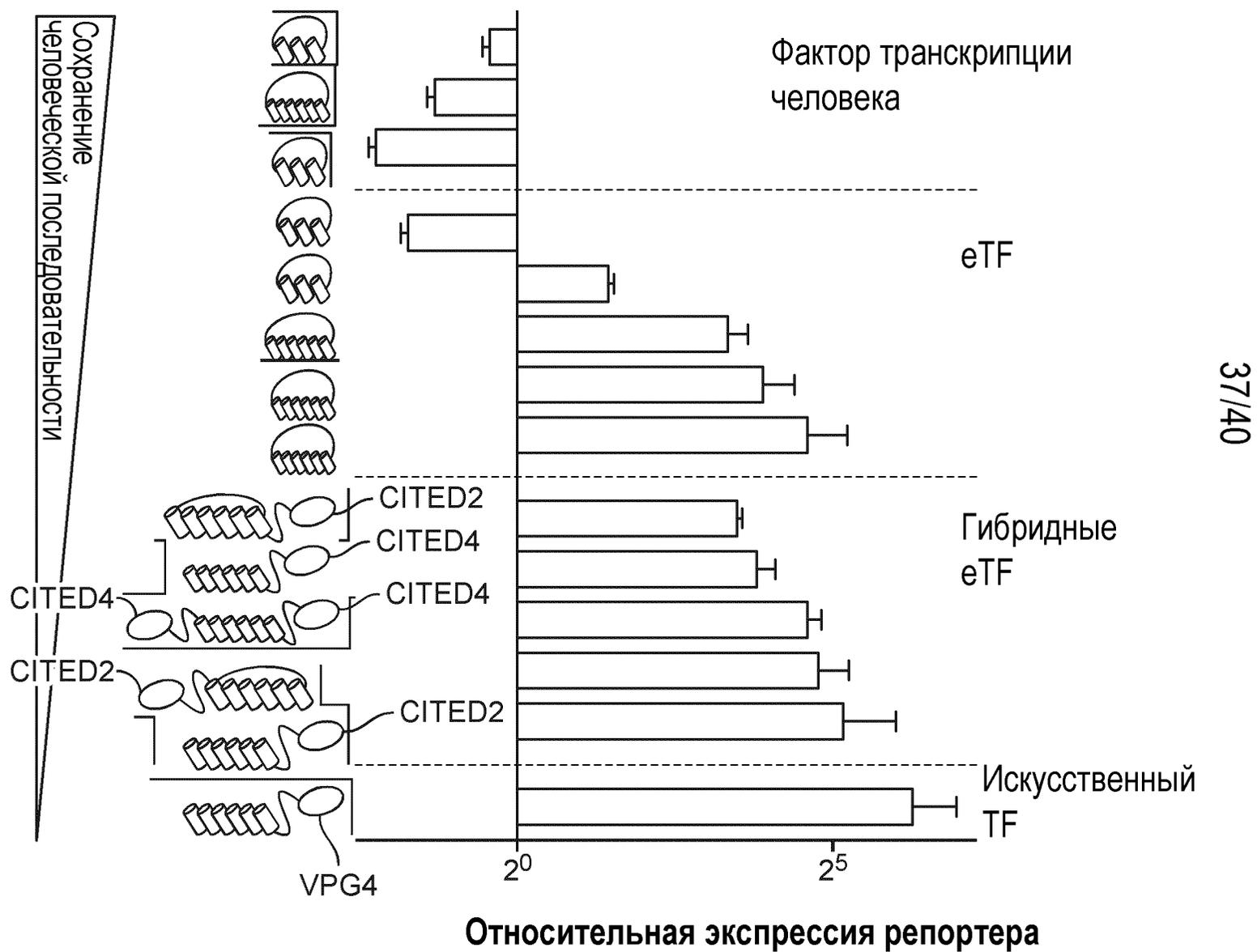
SEQ ID: 52



SEQ ID: 53

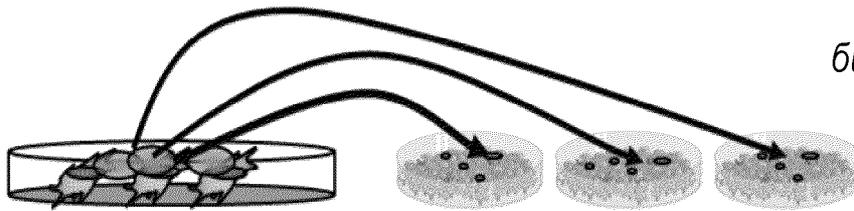


ФИГ.34

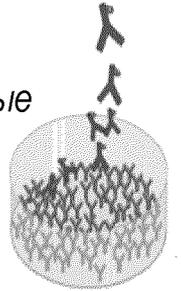


ФИГ.35А

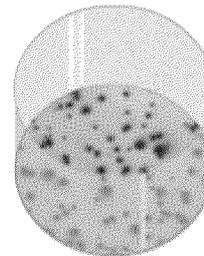
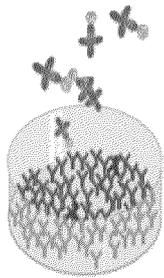
1. Клетки, стимулированные антигеном, переносят на предварительно покрытые планшеты



2. Добавляют биотинилированные антитела к цитокинам

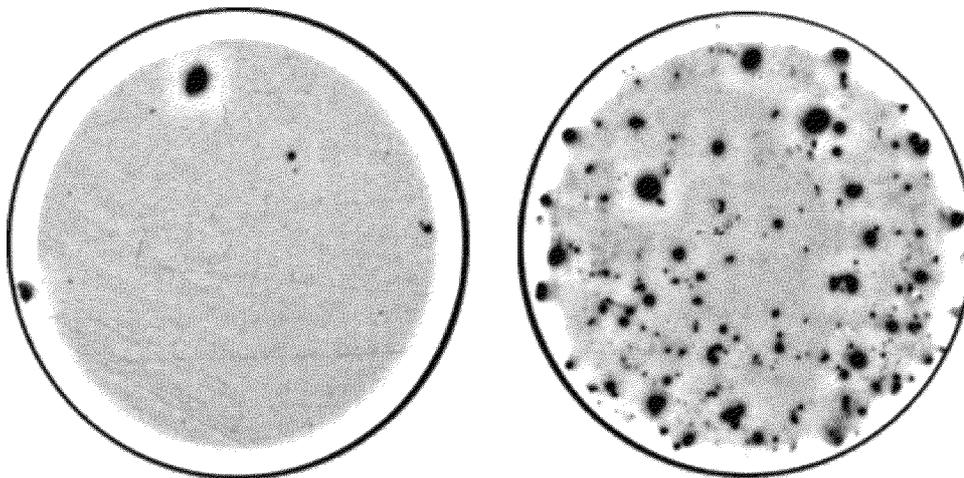


3. Добавляют реагенты для проявления красителя

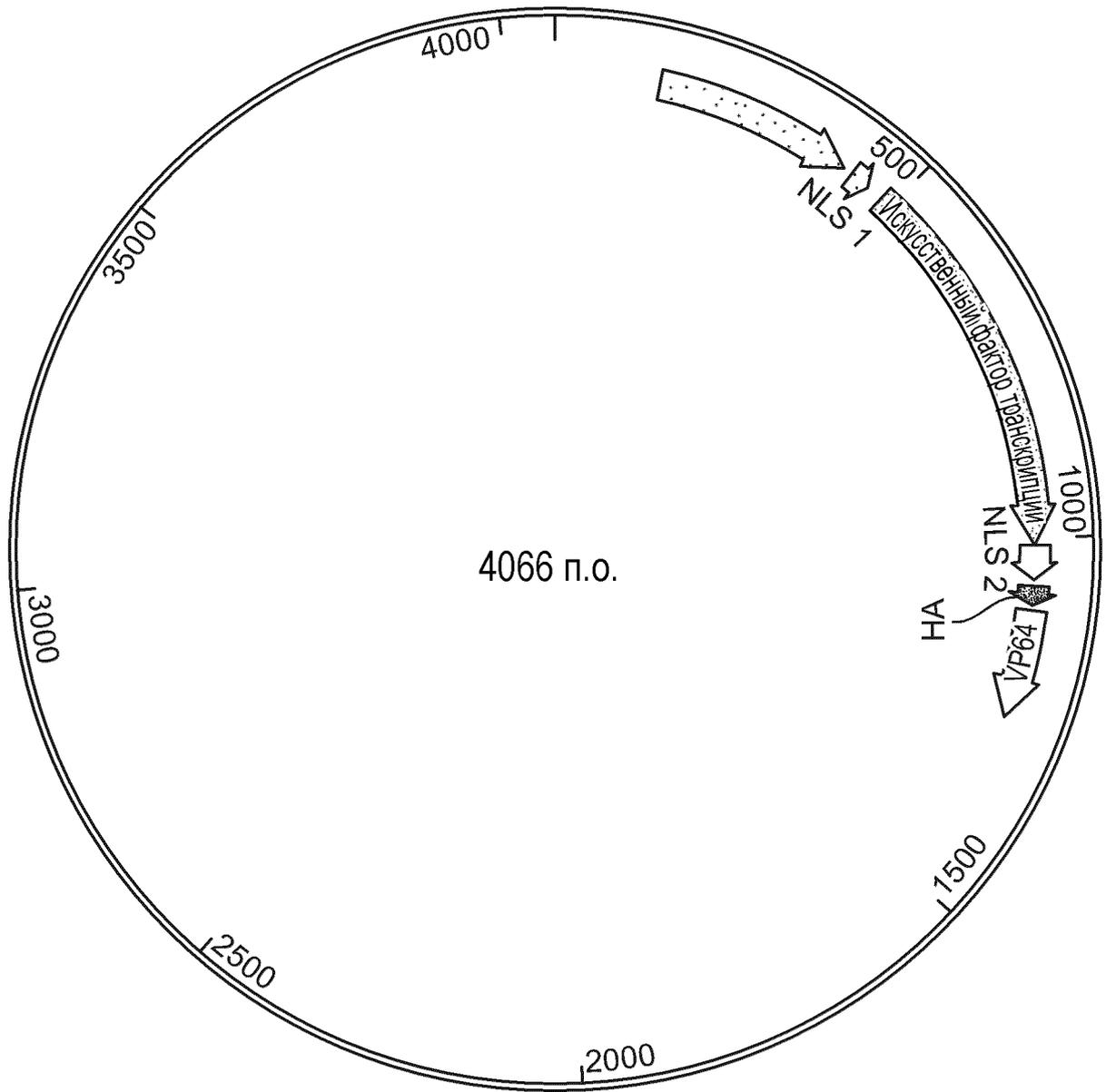


4. Образование пятен, т.е. секреция цитокинов

ФИГ.35В



ФИГ.36



ФИГ.37

