



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.06.22

(21) Номер заявки
201691691

(22) Дата подачи заявки
2015.02.27

(51) Int. Cl. **C07K 14/47** (2006.01)
C12N 9/12 (2006.01)

**(54) СЛИТЫЙ БЕЛОК ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ОДНОГО ИЛИ НЕСКОЛЬКИХ СИМПТОМОВ
ДЕФИЦИТА CDKL5 И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) **61/946,280**

(32) **2014.02.28**

(33) **US**

(43) **2017.05.31**

(86) **PCT/IB2015/000999**

(87) **WO 2015/128746 2015.09.03**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**АЛЬМА МАТЕР СТУДИОРУМ-
ЮНИВЕРСИТА ДИ БОЛОНЬЯ (ИТ)**

(72) Изобретатель:
**Чани Элизабетта (ИТ), Лакконе
Франко (АТ)**

(74) Представитель:
Носырева Е.Л. (RU)

(56) Anonymous: "Bandi per Assegni di ricerca", 1 January 2013 (2013-01-01), XP55207890, Retrieved from the Internet: URL: http://bandi.miur.it/bandi.php/public/fellowship/id_fellow/67724 [retrieved on 2015-08-14], the whole document

E. SCALA: "CDKL5/STK9 is mutated in Rett syndrome variant with infantile spasms", JOURNAL OF MEDICAL GENETICS, vol. 42, no. 2, 1 February 2005 (2005-02-01), pages 103-107, XP55208896, DOI: 10.1136/jmg.2004.026237, abstract, "Results"

Qian Chen ET AL.: "CDKL5, a protein associated with rett syndrome, regulates neuronal morphogenesis via Rac1 signaling", The Journal of neuroscience : the official journal of the Society

for Neuroscience, 22 September 2010 (2010-09-22), pages 12777-12786, XP55207953, United States, DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1102-10.2010, Retrieved from the Internet: URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20861382>, abstract, page 12784 - page 12785, figures 1-7

MAE M. ET AL.: "Cell-penetrating peptides as vectors for peptide, protein and oligonucleotide delivery", CURRENT OPINION IN PHARMACOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, NL, vol. 6, no. 5, 1 October 2006 (2006-10-01), pages 509-514, XP028058465, ISSN: 1471-4892, DOI: 10.1016/J.COPH.2006.04.004 [retrieved on 2006-10-01] abstract, page 512 - page 513, figure 1, tables 1-3

MARCELLA FLINTERMAN ET AL.: "Delivery of Therapeutic Proteins as Secretable TAT Fusion Products", MOLECULAR THERAPY, vol. 17, no. 2, 2 December 2008 (2008-12-02), pages 334-342, XP55166511, ISSN: 1525-0016, DOI: 10.1038/mt.2008.256, abstract, figures 1-5, "Discussion"

Anonymous: "Gene therapy reverses Rett syndrome symptoms in mice -", 30 September 2013 (2013-09-30), XP55208894, retrieved from the Internet: URL: <http://sfari.org/news-and-opinion/news/2013/gene-therapy-reverses-rett-syndrome-symptoms-in-mice> [retrieved on 2015-08-21] the whole document

Gene: "Gene therapy for rare diseases", 1 January 1999 (1999-01-01), XP55208821, Retrieved from the Internet: URL: http://www.nature.com/ng/journal/v22/n4/pdf/ng0899_313.pdf [retrieved on 2015-08-20], the whole document

(57) Настоящее изобретение относится к слитому белку для лечения одного или нескольких симптомов дефицита CDKL5, синдрома Ретта или атипичного синдрома Ретта, вызванного мутацией или дефицитом CDKL5, причем слитый белок способен секретироваться в полной форме эукариотическими клетками, увеличивает рост, удлинение, количество ветвей или плотность ветвей аксона в головном мозге субъекта, улучшает двигательную и/или когнитивную функции у субъекта. Также изобретение относится к соответствующему фармацевтическому составу, содержащему заявленный слитый белок, и соответствующему способу, основанному на введении заявленного фармацевтического состава.

Настоящее изобретение испрашивает преимущество предварительной заявки на патент США с регистрационным номером 61/946280, поданной 28 февраля 2014 года, с заглавием "Белки слияния TATk-CDKL5, композиции, составы, а также способы их получения и способы применения", раскрытие которой включено в данный документ во всей своей полноте.

Перечень (перечни) последовательностей

Данное изобретение содержит перечень последовательностей, поданный в электронной форме в виде файла в формате ASCII.txt под названием 02158765.txt, созданного 27 февраля 2015 года и имеющего размер 84059 байт. Содержание перечня последовательностей включено в данный документ во всей своей полноте.

Предпосылки к созданию изобретения

Мутация в гене/дефицит белка, подобного циклинзависимой киназе 5 (CDKL5), также известные как атипичный синдром Ретта, представляет собой истощающее постнатальное неврологическое нарушение, которое встречается по всему миру с частотой 1 случай на 17000-38000 рожденных детей женского пола. Дети мужского пола также подвержены риску, но с меньшей вероятностью. Это нарушение не ограничено этнической или расовой принадлежностью. Симптомы мутации/дефицита CDKL5 варьируют от легких до тяжелых и представлены судорогами с ранним началом, когнитивным расстройством, гипотонией, а также расстройствами вегетативной нервной системы, нарушениями сна и желудочно-кишечными расстройствами. Симптомы заболевания являются результатом дефицита функционального белка CDKL5.

Мутации в X-сцепленном гене CDKL5 или дефицит белка CDKL5 у индивидуумов причастны к развитию атипичного или врожденного синдрома Ретта. См. Bertani et al, J. biol. Chem. 2006, 281:32048-320 56, Scala et al., J. Med. Gen., 2005. 42:103-107, и Kalscheuer et al., Am. J. Hum. Genet. 2003. 72:1401-1411. Ген CDKL5 расположен на X-хромосоме и кодирует белок, который является необходимым для нормального развития и функционирования головного мозга. Белок CDKL5 представляет собой многофункциональный белок, который оказывает множественные эффекты на нервную клетку. Например, CDKL5 может действовать как киназа и фосфорилировать MeCP2. Девочки, пораженные мутациями или дефицитом CDKL5, как правило, характеризуются нормальным пренатальным анамнезом; возбудимостью и сонливостью в перинатальном периоде; эпилепсией с ранним началом, которая проявляется до возраста 5 месяцев, признаками, характерными для синдрома Ретта, в том числе замедлением роста головы, стереотипиями, от со слабым произвольным использованием рук до отсутствия такого использования и нарушениями сна, а также тяжелой умственной отсталостью со слабым зрительным контактом и практически отсутствующей речью. См. Bahi-Buisson and Bienvenu. 2012. Mol. Syndromol. 2:137-152.

Современные способы лечения мутаций/дефицитов CDKL5 в основном сосредоточены на лечении симптомов. Однако в настоящее время не существует способов лечения, улучшающих неврологический исход у субъектов с мутациями или дефицитами CDKL5. Таким образом, существует потребность в разработке видов терапии для лечения мутаций или дефицитов CDKL5.

Краткое описание

В одном аспекте заявленное изобретение относится к слитому белку для лечения одного или нескольких симптомов дефицита CDKL5, синдрома Ретта или атипичного синдрома Ретта, вызванного мутацией или дефицитом CDKL5, содержащему полипептид CDKL5, аминокислотная последовательность которого приблизительно на 90-100% идентична последовательности SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:16, и полипептид TATk, аминокислотная последовательность которого приблизительно на 90-100% идентична последовательности SEQ ID NO: 4, причем полипептид TATk не содержит последовательностей распознавания для фурина и функционально связан с полипептидом CDKL5; при этом слитый белок способен секретироваться в полной форме эукариотическими клетками, увеличивает рост, удлинение, количество ветвей или плотность ветвей аксона в головном мозге субъекта, снижает апоптоз нейронов в головном мозге субъекта, улучшает двигательную и/или когнитивную функции у субъекта.

Согласно другому варианту изобретения предоставлен слитый белок, дополнительно содержащий лидерную последовательность Igk-цепи, которая функционально связана с полипептидом CDKL5.

Согласно еще одному варианту изобретения предоставлен слитый белок, дополнительно содержащий репортерный белок, который функционально связан с полипептидом CDKL5.

Согласно еще одному варианту изобретения предоставлен слитый белок, дополнительно содержащий белковую метку, которая функционально связана с полипептидом CDKL5.

Согласно еще одному варианту изобретения предоставлен слитый белок, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 14.

В другом аспекте заявленное изобретение относится к фармацевтическому составу для лечения одного или нескольких симптомов дефицита CDKL5, синдрома Ретта или атипичного синдрома Ретта, вызванного мутацией или дефицитом CDKL5, содержащему терапевтически эффективное количество слитого белка согласно изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

Согласно еще одному варианту изобретения предоставлен фармацевтический состав, где терапевтически эффективное количество слитого белка увеличивает рост, удлинение, количество ветвей или плотность ветвей аксона в головном мозге субъекта.

Согласно еще одному варианту изобретения предоставлен фармацевтический состав, где терапевтически эффективное количество слитого белка снижает апоптоз нейронов в головном мозге субъекта.

Согласно еще одному варианту изобретения предоставлен фармацевтический состав, где терапевтически эффективное количество слитого белка улучшает двигательную функцию у субъекта.

Согласно еще одному варианту изобретения предоставлен фармацевтический состав, где терапевтически эффективное количество слитого белка улучшает когнитивную функцию у субъекта.

Еще в одном аспекте заявленное изобретение относится к способу лечения одного или нескольких симптомов дефицита CDKL5, синдрома Ретта или атипичного синдрома Ретта, вызванного мутацией или дефицитом CDKL5, включающему введение терапевтически эффективного количества фармацевтического состава согласно изобретению.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 показан один вариант осуществления способа получения белка слияния на основе CDKL5, где белок слияния на основе CDKL5 вырабатывается культивируемой клеткой и секретируется в окружающую культуральную среду.

На фиг. 2 показан один вариант осуществления способа получения белка слияния на основе CDKL5, где белок слияния на основе CDKL5 не секретируется в культуральную среду, окружающую клетки.

На фиг. 3 показан один вариант осуществления способа доставки белка слияния на основе CDKL5 посредством аутологичной клетки.

На фиг. 4А и В показаны результаты вестерн-блот анализа экспрессии белка TATk-CDKL5 в трансфицированных клетках HEK293T. Белок слияния TATk-CDKL5 метили с помощью белка GFP для обеспечения возможности вестерн-блот анализа с применением антитела к GFP. На фиг. 4А показана экспрессия белка слияния TATk-GFP-CDKL5 в клеточных экстрактах от трансфицированных клеток HEK293T. На фиг. 4В показана очистка белка слияния TATk-GFP-CDKL5 из 20X концентрированной культуральной среды клеток от трансфицированных с помощью TATk-GFP-CDKL5 клеток HEK293T.

На фиг. 5А и В показаны результаты анализа киназной активности (фиг. 5А), демонстрирующие, что белок слияния TAT-GFP-CDKL5 сохраняет активность аутофосфорилирования CDKL5.

На фиг. 6 показан влияние времени инкубации на эффективность трансдукции одного варианта осуществления белка слияния TATk-GFP-CDKL5 в клетках HEK293 T.

На фиг. 7А и В показана локализация CDKL5 в обработанных с помощью TATk-GFP-CDKL5 клетках HEK293T (фиг. 7В). На фиг. 7А и В показана эффективность трансдукции клеток HEK293T с помощью белка слияния TATk-GFP-CDKL5 по сравнению с контролем (фиг. 7А) (панель слева). Иммунологическое обнаружение проводили с применением антитела к GFP и клетки докрашивали с помощью DAPI. Белые стрелки указывают на трансдуцированные клетки HEK293T.

Фиг. 8 представляет собой изображение, демонстрирующее серию из 12 изображений (1-12), полученных с помощью конфокальной микроскопии, демонстрирующих трансдукцию TATk-GFP-CDKL5 в клетки SH-SY5Y, обработанные с помощью очищенного белка TATk-GFP-CDKL5 в течение 30 мин. Размер серии изображений по оси Z составлял 0,4 мкм. На фиг. 8 показана эффективность трансдукции клеток SH-SY5Y с помощью белка слияния TATk-GFP-CDKL5.

На фиг. 9А и В показано влияние трансдуцированного CDKL5 в клетках нейробластомы (SH-SY5Y) на пролиферацию клеток. Наблюдали, что клетки, обработанные с помощью TATk-GFP-CDKL5 (фиг. 9В), характеризовались сниженной пролиферацией по сравнению с клетками, обработанными с помощью TATk-GFP (контрольные) (фиг. 9А). Белые стрелки указывают на митотические ядра.

На фиг. 10 показана диаграмма, демонстрирующая митотический индекс клеток SH-SY5Y, обработанных с помощью белков слияния TATk-GFP или TATk-GFP-CDKL5. На оси у показано отношение митотических клеток/общее количество клеток, и оно выражено в процентах. Данные показаны как среднее $\pm$ S.E. *** $p < 0,001$ (t-критерий).

Фиг. 11А, В представляют собой изображения, на которых показано фазово-контрастное изображение обработанных с помощью TATk-GFP (контрольных) клеток SH-SY5Y (фиг. 11А) и обработанных с помощью TATk-GFP-CDKL5 клеток SH-SY5Y (фиг. 11В). Наблюдали, что рост аксона является более сильным у обработанных с помощью TATk-GFP-CDKL5 клеток SH-SY5Y по сравнению с контрольными клетками.

На фиг. 12 показана диаграмма, демонстрирующая количественную оценку разрастания аксона у клеток SH-SY5Y, обработанных с помощью белка слияния TATk-GFP (контроль) или TATk-GFP-CDKL5. Данные показаны как среднее $\pm$ S.E. * $p < 0,05$ (t-критерий). На оси у показано отношение длина аксона/клетки в микронах.

На фиг. 13А, В показаны изображения, демонстрирующие морфологию дендритов и количество "новорожденных" гранулярных клеток гиппокампа, как показано с помощью иммуногистохимического анализа в отношении даблкортина (DCX) у мышей дикого типа (фиг. 13А) и мышей с нокаутом CDKL5 (KO) (фиг. 13В). Масштабная полоска = 50 мкм. Сокращения: GR - гранулярный слой; Н - ворота.

На фиг. 14А, В показаны изображения двойной флуоресценции дифференцированных нейрональных клеток-предшественников (NPC), демонстрирующие снижение образования и созревания новых нейронов (красные клетки) в культурах нервных клеток, полученных от мышей с нокаутом CDKL5 (-/-) (фиг. 14А), по сравнению с культурами нервных клеток дикого типа (+/+) (фиг. 14В). Клетки с нейрональным фенотипом были иммуноположительными в отношении β -тубулина III (красный), а клетки с астроцитарным фенотипом были иммуноположительными в отношении GFAP (зеленый). Клеточные ядра окрашивали с применением красителя Hoechst (синий). Масштабная полоска =25 мкм.

На фиг. 15А-С показаны типичные изображения культур нейрональных предшественников от мышей с нокаутом CDKL5 (фиг. 15В и С), трансдуцированных с помощью TATk-GFP (фигура 15В) или TATk-GFP-CDKL5 (фиг. 15С), а также культуры нейрональных предшественников от мышей дикого типа (фиг. 15А). Масштабная полоска =20 мкм.

На фиг. 16 показана диаграмма, демонстрирующая количественную оценку нейронального созревания, измеренного с помощью общей длины аксонов дифференцированных нейронов (нейроны, положительные в отношении бета-тубулина III) в культурах предшественников нейронов от мышей дикого типа и мышей CDKL5 KO, обработанных с помощью либо TATk-GFP, либо TATk-GFP-CDKL5. Значения представляют среднее $\pm$ SE. ** $p < 0,01$ в сравнении с состоянием дикого типа; # $p < 0,01$ в сравнении с необработанными КО-образцами (критерий Бонферрони после ANOVA).

На фиг. 17А-Г показаны изображения, демонстрирующие иммунологическое обнаружение CDKL5 в головном мозге мышей (7 день после рождения), которых обрабатывали с помощью системного введения (однократная инъекция) концентрированной культуральной среды (среда) (фиг. 17А и Д), TATk-GFP (фиг. 17В и Е) и TATk-GFP-CDKL5 (фиг. 17С и Г). На фиг. 17Д-Г проиллюстрировано увеличение обозначенных пунктиром прямоугольников на фиг. 17А-С соответственно. Локализацию TATk-GFP-CDKL5 и TATk-GFP в головном мозге оценивали с помощью иммуногистохимического анализа с применением антитела к GFP (красный). Изображения получали на уровне сенсорно-моторной коры. Масштабная полоска =60 мкм (малое увеличение) и 20 мкм (большое увеличение).

На фиг. 18А-Д показаны изображения срезов мозжечка, демонстрирующие иммунологическое обнаружение CDKL5 в головном мозге мышей (7 день после рождения), которых обрабатывали как на фиг. 17А-Г с помощью системного введения (однократная инъекция) концентрированной культуральной среды (среда) (фиг. 18А и В) и TATk-GFP-CDKL5 (фиг. 18С и Д). Локализацию TATk-GFP-CDKL5 в головном мозге оценивали с помощью иммуногистохимического анализа с применением антитела к GFP (фиг. 18А, В). Препараты заключали с DAPI для окрашивания клеточных ядер (фиг. 18В, С). Сокращения: EGL - внешний гранулярный слой; IGL - внутренний гранулярный слой; ML - молекулярный слой; PL - слой клеток Пуркинье. Масштабная полоска =60 мкм.

На фиг. 19 показано место размещения канюли для внутрижелудочкового введения мышам белка слияния TATk-GFP-CDKL5.

На фиг. 20 показан рисунок, изображающий имплантацию и схему инъекций белка слияния для исследований, продемонстрированных на фиг. 21-33.

На фиг. 21А-С показаны изображения срезов зубчатой извилины гиппокампа, подвергнутые им-мунному окрашиванию в отношении DCX, которые демонстрируют уменьшенную длину аксона и количества "новорожденных" гранулярных клеток у мышей с нокаутом CDKL5 по сравнению мышами дикого типа (фиг. 21В и А соответственно). При внутрижелудочковом введении белка слияния TATk-GFP-CDKL5 в течение 5 последовательных дней наблюдали увеличение длины аксона и количества "новорожденных" гранулярных клеток у мышей с нокаутом CDKL5 (фиг. 21С) до уровней, аналогичных дикому типу (фиг. 21 А). Масштабная полоска =70 мкм.

На фиг. 22А-С проиллюстрировано увеличение изображений на фиг. 21 на уровне гранулярного слоя зубчатой извилины. Масштабная полоска =25 мкм.

На фиг. 23А, В показаны примеры воссозданного дендритного дерева у "новорожденных" гранулярных клеток мышей дикого типа(+/Y) (фиг. 23А), мышей с нокаутом CDKL5 (-/Y) (фиг. 23В) и самцов мышей с нокаутом CDKL5, обработанных с помощью белка слияния TATk-GFP-CDKL5 с помощью внутрижелудочковых инъекций, вводимых один раз в день в течение 5 последовательных дней (-/Y + TATk-GFP-CDKL5) (фиг. 23С).

На фиг. 24А, В показаны диаграммы, демонстрирующие количественную оценку средней общей длины дендритов (фиг. 24А) и среднего количества сегментов дендритов (фиг. 24В) у "новорожденных" гранулярных клеток (DCX-положительные клетки) зубчатой извилины у самцов мышей дикого типа (+/Y), самцов мышей с нокаутом CDKL5 (-/Y) и самцов мышей с нокаутом CDKL5, обработанных белком слияния TATk-GFP-CDKL5 с помощью внутрижелудочковых инъекций, вводимых один раз в день в течение 5 последовательных дней (-/Y+TATk-GFP-CDKL5). Значения представляют среднее $\pm$ SE. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ по сравнению с +/Y; # $p < 0,05$ по сравнению с образцами -/Y (критерий Бонферрони после ANOVA).

На фиг. 25А, В показаны диаграммы, демонстрирующие количественную оценку средней длины (фиг. 25А) и среднего количества (фиг. 25В) ветвей разных порядков "новорожденных" гранулярных

клеток зубчатой извилины у самцов мышей дикого типа (+/Y), самцов мышей с нокаутом CDKL5 (-/Y) и самцов мышей с нокаутом CDKL5, обработанных белком слияния TATk-GFP-CDKL5 с помощью внутрижелудочковых инъекций, вводимых один раз в день в течение 5 последовательных дней (-/Y+TATk-GFP-CDKL5). Значения представляют среднее $\pm$ SE. * $p<0,05$; ** $p<0,01$ по сравнению с +/Y; # $p<0,05$ по сравнению с образцами -/Y (критерий Бонферрони после ANOVA).

На фиг. 26 показана диаграмма, демонстрирующая количественную оценку апоптических клеток (каспаза-3 положительные клетки) у самцов мышей дикого типа (+/Y), самцов мышей с нокаутом CDKL5 (-/Y) и самцов мышей с нокаутом CDKL5, обработанных белком слияния TATk-GFP-CDKL5 с помощью внутрижелудочковых инъекций, вводимых один раз в день в течение 5 последовательных дней (-/Y+TATk-GFP-CDKL5). Значения представляют среднее $\pm$ SE. * $p<0,05$ по сравнению с +/Y; # $p<0,05$ по сравнению с образцами -/Y (критерий Бонферрони после ANOVA).

На фиг. 27 показана диаграмма, демонстрирующая количественную оценку количества DCX-положительных клеток в DG у самцов мышей дикого типа (+/Y), самцов мышей с нокаутом CDKL5 (-/Y) и самцов мышей с нокаутом CDKL5, обработанных белком слияния TATk-GFP-CDKL5 с помощью внутрижелудочковых инъекций, вводимых один раз в день в течение 5 последовательных дней (-/Y+TATk-GFP-CDKL5). Данные представлены как количество клеток/мм². * $p<0,05$ по сравнению с +/Y; # $p<0,05$ по сравнению с образцами -/Y (критерий Бонферрони после ANOVA).

На фиг. 28А-С показаны типичные изображения, демонстрирующие срезы головного мозга, обработанные для иммунофлуоресцентного анализа на синаптофизин (SYN), из молекулярного слоя зубчатой извилины (DG) самца мыши дикого типа (+/Y) (фиг. 28А), самца мыши с нокаутом CDKL5 (-/Y) (фиг. 28В) и самца мыши с нокаутом CDKL5, обработанного белком слияния TATk-GFP-CDKL5 с помощью внутрижелудочковых инъекций, вводимых один раз в день в течение 5 последовательных дней (-/Y+TATk-GFP-CDKL5) (фиг. 28С). Масштабная полоска =80 мкм. Сокращения: GR - гранулярный слой; Mol - молекулярный слой.

На фиг. 29А-С показаны типичные изображения, демонстрирующие срезы головного мозга, обработанные для иммунофлуоресцентного анализа на фосфо-АКТ (Р-АКТ), из молекулярного слоя зубчатой извилины (DG) самца мыши дикого типа (+/Y) (фиг. 29А), самца мыши с нокаутом CDKL5 (-/Y) (фиг. 29В) и самца мыши с нокаутом CDKL5, обработанного белком слияния TATk-GFP-CDKL5 с помощью внутрижелудочковых инъекций, вводимых один раз в день в течение 5 последовательных дней (-/Y+TATk-GFP-CDKL5) (фиг. 29С). Масштабная полоска = 80 мкм. Сокращения: GR - гранулярный слой; Mol - молекулярный слой.

На фиг. 30А, В показаны диаграммы, демонстрирующие количественную оценку оптической плотности синаптофизина (SYN) в молекулярном слое гиппокампа (фиг. 30А) и слое III коры (фиг. 30В) у самцов мышей дикого типа (+/Y), самцов мышей с нокаутом CDKL5 (-/Y) и самцов мышей с нокаутом CDKL5, обработанных белком слияния TATk-GFP-CDKL5 с помощью внутрижелудочковых инъекций, вводимых один раз в день в течение 5 последовательных дней (-/Y+TATk-GFP-CDKL5). Данные приведены как кратное отличие в сравнении с соответствующей зоной молекулярного слоя или коры мышей дикого типа. Значения представляют среднее $\pm$ SD. ** $p<0,01$; *** $p<0,001$ по сравнению с +/Y; # $p<0,05$ по сравнению с образцами -/Y (критерий Бонферрони после ANOVA).

На фиг. 31А, В показаны диаграммы, демонстрирующие количественную оценку оптической плотности Ser437 фосфорилированной-АКТ (РАКТ) в молекулярном слое гиппокампа (фиг. 31 А) и слое V коры (фиг. 31В) у самцов мышей дикого типа (+/Y), самцов мышей с нокаутом CDKL5 (-/Y) и самцов мышей с нокаутом CDKL5, обработанных белком слияния TATk-GFP-CDKL5 с помощью внутрижелудочковых инъекций, вводимых один раз в день в течение 5 последовательных дней (-/Y+TATk-GFP-CDKL5). Данные приведены как кратное отличие в сравнении с соответствующей зоной молекулярного слоя или коры мышей дикого типа. Значения представляют среднее $\pm$ SD. ** $p<0,01$ по сравнению с +/Y; # $p<0,01$ по сравнению с образцами -/Y (критерий Бонферрони после ANOVA).

На фиг. 32 показан рисунок, изображающий имплантацию и схему инъекций белка слияния для исследований поведения, продемонстрированных на фиг. 33-34.

На фиг. 33 показан график, демонстрирующий количественную оценку фазы обучения, определяемой посредством теста в водном лабиринте Морриса, у самцов мышей дикого типа (+/Y; n=8), самцов мышей с нокаутом CDKL5 (-/Y; n=8) и самцов мышей с нокаутом CDKL5, обработанных белком слияния TATk-GFP-CDKL5 (-/Y+TATk-GFP-CDKL5; n=6). Значения представляют среднее $\pm$ SE. * $p<0,05$, ** $p<0,01$ по сравнению с необработанным состоянием дикого типа и # $p<0,01$ по сравнению с необработанным состоянием нокаута CDKL5 при тестировании с помощью критерия Фишера после ANOVA.

На фиг. 34А, В показаны диаграммы, демонстрирующие способность к запоминанию, определяемую посредством теста пассивного избегания, у самцов мышей дикого типа (+/Y; n=8), самцов мышей с нокаутом CDKL5 (-/Y; n=8) и самцов мышей с нокаутом CDKL5, обработанных белком слияния TATk-GFP-CDKL5 (-/Y+TATk-GFP-CDKL5; n=6). На диаграммах показано латентное время входа в темный отсек в первый день (фиг. 34А) и во второй день (фиг. 34В) при проведении поведенческого эксперимента. Значения представляют среднее $\pm$ SE. *** $p<0,001$ по сравнению с необработанным состоянием дикого

типа и # $p < 0,01$ по сравнению с необработанным состоянием нокаута CDKL5 при тестировании с помощью критерия Фишера после ANOVA.

На фиг. 35А, В показана диаграмма, демонстрирующая количественную оценку двигательной способности, определяемую посредством теста на прижимание, в котором измеряли общее количество времени, проведенное с прижиманием конечностей, во время 2-минутного интервала у самцов мышей дикого типа (+/Y; n=8), у самцов мышей с нокаутом CDKL5 (-/Y; n=8) и самцов мышей с нокаутом CDKL5, обработанных белком слияния TATk-GFP-CDKL5 (-/Y+TATk-CDKL5; n=8) согласно схеме инъекций на фиг. 32. Значения представляют среднее $\pm$ SD. *** $p < 0,001$ по сравнению с +/Y; # $p < 0,001$ по сравнению с образцами -/Y (критерий Бонферрони после ANOVA).

На фиг. 36 показана масса тела (в граммах) мышей дикого типа (+/Y) и мышей с нокаутом (-/Y), обработанных белком слияния TATk-GFP-CDKL5 согласно схеме обработки на фиг. 20 (+/Y; n=8) или фиг. 32 (-/Y; n=6). Мышей оставляли восстанавливаться в течение 7 дней после имплантации канюли.

Подробное описание

В данном документе предусмотрены композиции и составы белка слияния TATk-CDKL5, а также способы их применения в лечении CDKL5-опосредованных заболеваний или нарушений, в частности нарушений или заболеваний, вызванных мутациями и/или дефицитами CDKL5. Также в данном документе предусмотрены способы получения композиций и составов белка слияния TATk-CDKL5. Эти способы обеспечивают усовершенствованные экспериментальные инструменты для исследования CDKL5-опосредованных неврологических нарушений, а также улучшенные варианты лечения пациентов, страдающих нарушениями, связанными с дисфункцией CDKL5.

Определения

Термин "биосовместимый", используемый в данном документе, относится к материалу, который вместе с любыми его метаболитами или продуктами распада в целом является нетоксичным для реципиента и не вызывает каких-либо значительных отрицательных эффектов в отношении реципиента. В общем случае биосовместимые материалы представляют собой материалы, которые не вызывают значительного воспалительного или иммунного ответа при введении пациенту.

Термин "молекулярная масса", используемый в данном документе, в целом относится к массе или средней массе материала. В случае полимера или олигомера молекулярная масса может относиться к относительной средней длине цепи или относительной массе цепи блочного полимера. На практике молекулярную массу полимеров или олигомеров можно оценить или охарактеризовать различными путями, в том числе с помощью гель-проникающей хроматографии (GPC) или капиллярной вискозиметрии. Молекулярные массы по GPC приведены как средневесовая молекулярная масса (M_w), в отличие от среднечисловой молекулярной массы (M_n). Капиллярная вискозиметрия обеспечивает оценки молекулярной массы в качестве характеристической вязкости, определяемой на основании разбавленного раствора полимера с использованием определенного набора концентрации, температуры и состояний растворителя.

Используемый в данном документе термин "биоразлагаемый" в целом относится к материалу, который будет распадаться или разрушаться при физиологических условиях до более мелких единиц или химических соединений, которые могут метаболизироваться, элиминироваться или выводиться из организма субъекта. Время распада зависит от состава и морфологии. Время распада может составлять от часов до недель.

Термин "гидрофильный", используемый в данном документе, относится к веществам, которые имеют сильно полярные группы, которые легко взаимодействуют с водой.

Термин "гидрофобный", используемый в данном документе, относится к веществам, которые не обладают сродством к воде, стремятся ее оттолкнуть и не впитывают воду, а также не растворяются в воде и не смешиваются с ней.

Термин "липофильный", используемый в данном документе, относится к соединениям, обладающим сродством к липидам.

Термин "амфифильный", используемый в данном документе, относится к молекуле, сочетающей гидрофильные и липофильные (гидрофобные) свойства.

Используемые в данном документе термины "приблизительно", "примерно" и подобные, при использовании в сочетании с числовой переменной, в целом относятся к значению переменной и ко всем значениям переменной, которые находятся в пределах ошибки эксперимента (например, в пределах 95% доверительного интервала для среднего) или в пределах $\pm 10\%$ от указанного значения, в зависимости от того, что является большим.

Как используется в данном документе, термины "клетка", "клеточная линия" и "клеточная культура" включают потомство. Также понятно, что все потомство может не быть точно идентичным по содержанию ДНК вследствие преднамеренных или случайных мутаций. Также включено вариантное потомство, которое обладает такой же функцией или биологическим свойством, в отношении которых была отобрана первично трансформированная клетка.

Используемый в данном документе термин "композиция" относится к комбинации активного средства и по меньшей мере одного другого соединения или молекулы, инертного (например, детектируемое

средство или метка) или активного, такого как адъювант.

Используемый в данном документе термин "контроль" относится к альтернативному субъекту или образцу, используемым в эксперименте для целей сравнения и включаемым для минимизации или отличия эффекта переменных, не относящихся к независимой переменной.

Используемый в данном документе термин "положительный контроль" относится к "контролю", который предназначен для получения требуемого результата при условии, что все реагенты функционируют должным образом и что эксперимент проведен правильно.

Используемый в данном документе термин "отрицательный контроль" относится к "контролю", который предназначен не производить никакого эффекта или результата при условии, что все реагенты функционируют должным образом и что эксперимент проведен правильно. Другие термины, которые являются взаимозаменяемыми с "отрицательным контролем", включают "лекарство-пустышку", "плацебо" и "имитатор".

Используемый в данном документе термин "культивирование" относится к поддержанию клеток в условиях, в которых они могут размножаться и избегать старения как группа клеток. Термин "культивирование" также может включать условия, при которых клетки также или в качестве альтернативы дифференцируются.

Используемый в данном документе термин "дифференциально экспрессируемый" относится к дифференциальной выработке РНК, в том числе без ограничения mRNA, tRNA, miRNA, siRNA, snRNA и rRNA, транскрибируемой с гена, или регуляторного участка генома, или белкового продукта, кодируемого геном, по сравнению с уровнем выработки РНК с помощью того же гена или регуляторной области в нормальной или контрольной клетке. В другом контексте термин "дифференциально экспрессируемый" также относится к нуклеотидным последовательностям или белкам в клетке или ткани, которые характеризуются различными временными и/или пространственными профилями экспрессии по сравнению с нормальной или контрольной клеткой.

Используемый в данном документе термин "сверхэкспрессируемый" или "сверхэкспрессия" относится к повышенному уровню экспрессии РНК или белкового продукта, кодируемого геном, по сравнению с уровнем экспрессии РНК или белкового продукта в нормальной или контрольной клетке.

Используемый в данном документе термин "недостаточно экспрессируемый" или "недостаточная экспрессия" относится к сниженному уровню экспрессии РНК или белкового продукта, кодируемого геном, по сравнению с уровнем экспрессии РНК или белкового продукта в нормальной или контрольной клетке.

Используемый в данном документе термин "эффективное количество" представляет собой количество, достаточное для осуществления полезного или требуемого биологического, эмоционального, медицинского или клинического эффекта клетки, ткани, системы, животного или человека. Эффективное количество может вводиться за одно или несколько введений, применений или дозирования.

Термин также включает в свой объем количества, эффективные для усиления нормальной физиологической функции.

Термины "достаточный" и "эффективный", используемые в данном документе взаимозаменяемо, относятся к количеству (например, массе, объему, дозировке, концентрации и/или периоду времени), необходимому для достижения одного или нескольких требуемых результатов. Например, терапевтически эффективное количество относится к количеству, необходимому для достижения одного или нескольких терапевтических эффектов.

Используемый в данном документе термин "экспансия" или "подвергнутый экспансии" в контексте клетки относится к увеличению количества характерного типа клеток или типов клеток из исходной популяции клеток, которые могут быть или могут не быть идентичными. Исходные клетки, используемые для экспансии, не обязательно должны быть таким же, как клетки, полученные в результате экспансии. Например, подвергнутые экспансии клетки могут быть получены посредством *ex vivo* или *in vitro* выращивания и дифференцировки исходной популяции клеток.

Используемый в данном документе термин "экспрессия" относится к процессу, посредством которого полинуклеотиды транскрибируются в РНК-транскрипты. В контексте mRNA и других транслируемых видов РНК термин "экспрессия" также относится к процессу или процессам, посредством которых транскрибируемая РНК далее транслируется в пептиды, полипептиды или белки.

Используемый в данном документе термин "выделенный" означает отделенный от составляющих, клеточных или иных, с которыми полинуклеотид, пептид, полипептид, белок, антитело или их фрагменты, как правило, связаны в природе. Не встречающийся в природе полинуклеотид, пептид, полипептид, белок, антитело или их фрагменты не требует "выделения", что отличает его от его встречающегося в природе аналога.

Используемый в данном документе термин "концентрированный" относится к молекуле, в том числе без ограничения полинуклеотиду, пептиду, полипептиду, белку, антителу или их фрагментам, которая отличается от ее встречающегося в природе аналога тем, что концентрация или количество молекул на объем больше, чем у ее встречающегося в природе аналога.

Используемый в данном документе термин "разбавленный" относится к молекуле, в том числе без

ограничения полинуклеотиду, пептиду, полипептиду, белку, антителу или их фрагментам, которая отличается от ее встречающегося в природе аналога тем, что концентрация или количество молекул на объем меньше, чем у ее встречающегося в природе аналога.

Используемый в данном документе термин "отделенный" относится к состоянию физического отделения от исходного источника или популяции таким образом, что отделенное соединение, средство, частица или молекула более не может рассматриваться как часть исходного источника или популяции.

Используемый в данном документе термин "млекопитающее" в контексте способов лечения относится к любому животному, классифицируемому как млекопитающее, в том числе к человеку, домашним и сельскохозяйственным животным, приматам, не относящимся к человеку, а также животным из зоопарка, животным, используемым в спортивных соревнованиях, и домашним питомцам, а именно без ограничения собакам, лошадям, кошкам и коровам.

Используемые в данном документе взаимозаменяемо термины "субъект", "индивидуум" или "пациент" относятся к позвоночному организму.

Используемый в данном документе термин "практически чистая популяция клеток" относится к популяции клеток с определенной клеточной маркерной характеристикой и потенциалом дифференциации, составляющей приблизительно 50%, предпочтительно приблизительно 75-80%, более предпочтительно приблизительно 85-90% и более предпочтительно приблизительно 95% от общего числа клеток, составляющих общую популяцию клеток. Таким образом, термин "практически чистая популяция клеток" относится к популяции клеток, которая содержит менее приблизительно 50%, предпочтительно менее приблизительно 20-25%, более предпочтительно менее приблизительно 10-15% и более предпочтительно менее приблизительно 5% клеток, которые не проявляют определенную маркерную характеристику и потенциал дифференциации при указанных условиях анализа.

Как используется в данном документе, термин "терапевтический" относится к лечению, заживлению и/или уменьшению тяжести заболевания, нарушения, состояния или побочного эффекта или уменьшению скорости развития заболевания, нарушения, состояния или побочного эффекта. Термин также включает в свой объем усиление нормальной физиологической функции, паллиативное лечение и частичное исцеление заболевания, нарушения, состояния, побочного эффекта или их симптома. Заболевание или нарушение может представлять собой дефицит CDKL5 и/или синдром Ретта.

Термины "осуществление лечения" и "лечение", используемые в данном документе, в целом относятся к достижению требуемого фармакологического и/или физиологического эффекта. Эффект может быть профилактическим, в смысле предупреждения или частичного предупреждения заболевания, его симптома или состояния, такого как заболевание или нарушение, являющиеся результатом мутаций и/или дефицита CDKL5, CDKL5-варианта синдрома Ретта или другого CDKL5-опосредованного неврологического расстройства, и/или может быть терапевтическим в смысле частичного или полного излечения заболевания, состояния, симптома или неблагоприятного эффекта, свойственных заболеванию, нарушению или состоянию. Термин "лечение", используемый в данном документе, охватывает любое лечение CDKL5-опосредованного неврологического расстройства у млекопитающего, в частности человека, и включает: (а) предупреждение возникновения заболевания у субъекта, который может иметь предрасположенность к заболеванию, но еще не был диагностирован как имеющий его; (b) ингибирование заболевания, т.е. прекращение его развития; или (с) ослабление заболевания, т.е. облегчение или уменьшение тяжести заболевания и/или его симптомов или состояний. Термин "лечение", используемый в данном документе, относится как к терапевтическому лечению, так и профилактическим и предупреждающим мерам. Нуждающиеся в лечении включают тех, у кого уже есть нарушение, а также тех, у кого нужно предупредить развитие нарушения.

Используемый в данном документе термин "фармацевтический состав" относится к комбинации активного средства, соединения или ингредиента с фармацевтически приемлемым носителем или вспомогательным веществом, что делает композицию приемлемой для диагностического, терапевтического или профилактического применения *in vitro*, *in vivo* или *ex vivo*.

Используемый в данном документе термин "фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество" относится к носителю или вспомогательному веществу, которое применимо при получении фармацевтического состава, т.е. является в целом безопасным, нетоксичным и не является ни биологически, ни иным образом нежелательным, и включает носитель или вспомогательное вещество, которое приемлемо для применения в ветеринарии, а также в фармацевтических целях для человека. Термин "фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество", используемый в описании и формуле изобретения, включает как одно, так и более одного из таких носителей или вспомогательных веществ.

Используемый в данном документе термин "фармацевтически приемлемая соль" относится к любой соли присоединения кислоты или основания, противоионы которой являются нетоксичными для субъекта, которому их вводят в виде фармацевтических доз солей.

Используемый в данном документе термин "предупреждающий" и "предупреждать" относится к препятствованию или задержке развития заболевания или состояния до его появления, даже если оно не диагностировано или пока болезнь или состояние все еще находится в субклинической фазе.

Используемый в данном документе термин "активное средство" или "активный ингредиент" относится к веществу, соединению или молекуле, которая благодаря биологической активности или иным образом индуцирует биологический или физиологический эффект в отношении субъекта, которому его вводят. Другими словами, "активное средство" или "активный ингредиент" относится к компоненту или компонентам композиции, с которыми связан полностью или частично эффект композиции.

Используемый в данном документе термин "материальная форма выражения" относится к форме, которая является физически осязаемой и не является формой абстрактного мышления или незафиксированного сказанного слова. Материальная форма выражения включает без ограничений слова на целлюлозном или пластическом материале или данные, хранящиеся на соответствующем устройстве, например флэш-память или CD-ROM.

Используемый в данном документе термин "химиотерапевтическое средство" или "химиотерапевтический" относится к терапевтическому средству, применяемому для предупреждения или лечения ракового заболевания.

Используемый в данном документе термин "матрица" относится к материалу, в который внедрены одна или несколько специализированных структур, молекул или композиций.

Используемый в данном документе термин "аптамер" относится к одонитевым молекулам ДНК или РНК, которые могут связываться с заранее выбранными мишенями, в том числе белками, с высоким сродством и специфичностью. Их специфичность и характеристики не определяются напрямую их первичной последовательностью, а зависят от их третичной структуры.

Используемый в данном документе термин "иммуномодулятор" относится к средству, такому как терапевтическое средство, которое способно модулировать или регулировать одну или несколько иммунных функций или ответов.

Используемый в данном документе термин "антитело" относится к гликопротеину, содержащему по меньшей мере две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные между собой дисульфидными связями, а также к его антигенсвязывающему участку. Каждая тяжелая цепь состоит из переменной области тяжелой цепи (в данном документе сокращенно VH) и константной области тяжелой цепи. Каждая легкая цепь состоит из переменной области легкой цепи и константной области легкой цепи. VH- и VL-области сохраняют специфичность связывания с антигеном, и их можно дополнительно подразделять на участки гипервариабельности, называемые участками, определяющими комплементарность (CDR). CDR чередуются с участками, которые являются более консервативными и называются каркасными участками (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех каркасных участков, расположенных от аминоконца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Переменные области тяжелой и легкой цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном.

Используемые в данном документе термины "организм", "хозяин" и "субъект" относятся к любому живому объекту, состоящему по меньшей мере из одной клетки. Живой организм может быть настолько простым, как, например, одиночная выделенная эукариотическая клетка или культивируемая клетка или клеточная линия, или настолько сложным, как млекопитающее, в том числе человек и животные (например, свиньи, коровы, овцы, грызуны, кролики, белки, медведи, приматы (например, шимпанзе, гориллы и человек)). "Субъект" также может представлять собой клетку, популяцию клеток, ткань, орган или организм, предпочтительно является человеком и составляющими его частями.

Используемый в данном документе термин "пациент" относится к организму, хозяину или субъекту, нуждающемуся в лечении.

Используемый в данном документе термин "белок" относится к большой молекуле, состоящей из одной или нескольких цепей аминокислот в определенном порядке. Термин "белок" используется взаимозаменяемо с термином "полипептид". Порядок определяется последовательностью оснований нуклеотидов в гене, кодирующем белок. Белки необходимы для поддержания структуры, функции и регуляции клеток, тканей и органов организма. Каждый белок выполняет уникальную функцию.

Используемый в данном документе термин "в значительной степени чистый" означает, что целевой компонент является преобладающим присутствующим компонентом (т.е. по количеству моль он является более многочисленным, чем любой другой индивидуальный компонент в композиции), и предпочтительно в значительной степени чистая фракция представляет собой композицию, где целевой компонент составляет по меньшей мере приблизительно 50% от всех присутствующих компонентов. В целом в значительной степени чистая композиция будет составлять более приблизительно 80% от всех компонентов, присутствующих в композиции, более предпочтительно более приблизительно 85, 90, 95 и 99%. Наиболее предпочтительно целевой компонент очищают до фактической гомогенности (компоненты-примеси нельзя обнаружить в композиции при помощи традиционных способов обнаружения), где композиция состоит фактически из одного компонента.

Используемые в данном документе термины "нуклеиновая кислота" и "полинуклеотид" в целом относятся к цепочке по меньшей мере из двух комбинаций основание-сахар-фосфат и среди прочего относятся к одно- и двухнитевой ДНК, ДНК, которая является смесью одно- и двухнитевых областей, одно- и двухнитевой РНК и РНК, которая является смесью одно- и двухнитевых областей, гибридным молеку-

лам, содержащим ДНК и РНК, которые могут быть одонитевыми или, более типично, двухнитевыми, или смесью одно- и двухнитевых областей. Кроме того, полинуклеотид, используемый в данном документе, относится к трехнитевым областям, содержащим РНК или ДНК, или как РНК, так и ДНК. Нити в таких областях могут быть составлены из одной и той же или из разных молекул. Области могут включать одну или несколько молекул целиком, но более типично включают в себя только область некоторых из молекул. Одна из молекул трехспиральной области часто представляет собой олигонуклеотид. Термины "полинуклеотид" и "нуклеиновые кислоты" также охватывают определенные формы полинуклеотидов, модифицированные химически, ферментативно или метаболически, а также химические формы ДНК и РНК, характерные для вирусов и клеток, в том числе, среди прочего, простых и сложных клеток. Например, термин "полинуклеотид" включает молекулы ДНК или РНК, описываемые выше, которые содержат одно или несколько модифицированных оснований. Таким образом, молекулы ДНК или РНК, содержащие нетипичные основания, такие как инозин, или модифицированные основания, такие как тритилированные основания, при этом упомянуты только два примера, представляют собой полинуклеотиды, соответствующие термину, используемому в данном документе. Термины "полинуклеотид" и "нуклеиновая кислота" также включают РНА (пептидо-нуклеиновые кислоты), фосфоротиоаты и другие варианты фосфатного остова нативных нуклеиновых кислот. Природные нуклеиновые кислоты имеют фосфатный остов, а искусственные нуклеиновые кислоты могут содержать другие типы остовов, но содержат такие же основания. Таким образом, молекулы ДНК и РНК с остовами, модифицированными для стабильности или по другим причинам, представляют собой "нуклеиновые кислоты" или "полинуклеотид", в том смысле, как этот термин подразумевается в данном документе.

Используемые в данном документе термины "дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК)" и "рибонуклеиновая кислота (РНК)" в целом относятся к любому полирибонуклеотиду или полидезоксирибонуклеотиду, которые могут представлять собой немодифицированные РНК или ДНК или модифицированные РНК или ДНК. РНК может находиться в форме tRNA (транспортная РНК), snRNA (малая ядерная РНК), rRNA (рибосомальная РНК), mRNA (матричная РНК), анти-смысловой РНК, RNAi (конструкция для РНК-интерференции), siRNA (короткая интерферирующая РНК) или рибозимов.

Используемые в данном документе термины "последовательность нуклеиновой кислоты" и "олигонуклеотид" также охватывает нуклеиновую кислоту и полинуклеотид, как определено выше.

Используемый в данном документе термин "молекула ДНК" включает нуклеиновые кислоты/полинуклеотиды, которые состоят из ДНК.

Используемый в данном документе термин "ген" относится к единице наследственности, соответствующей последовательности ДНК, которая занимает определенное место на хромосоме и которая содержит генетическую инструкцию в отношении характеристики(характеристик) или признака(ов) организма.

Используемый в данном документе термин "рекомбинант" в целом относится к нуклеиновой кислоте, конструкции нуклеиновой кислоты или полипептида, не встречающимся в природе. Такие не встречающиеся в природе нуклеиновые кислоты могут включать природные нуклеиновые кислоты, которые были модифицированы, например, которые имеют делеции, замены, инверсии, вставки и т.д., и/или комбинации последовательностей нуклеиновых кислот различного происхождения, которые соединены посредством технологий молекулярной биологии (например, последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие белок слияния (например, белок или полипептид, образованный из комбинации двух различных белков или белковых фрагментов), комбинация нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, с промоторной последовательностью, где кодирующая последовательность и промоторная последовательность происходят из разных источников или по иным причинам, как правило, не встречаются вместе в природе (например, нуклеиновая кислота и конститутивный промотор) и т.д.). Рекомбинант также относится к полипептиду, кодируемому рекомбинантной нуклеиновой кислотой. Не встречающиеся в природе нуклеиновые кислоты или полипептиды включают нуклеиновые кислоты и полипептиды, модифицированные человеком.

Используемый в данном документе термин "белок слияния" относится к белку, образованному комбинацией по меньшей мере двух различных белков или белковых фрагментов. Белок слияния кодируется рекомбинантной молекулой ДНК. По существу, "белок слияния на основе CDKL5" относится к рекомбинантному белку, имеющему полипептид CDKL5 человека или его вариант, функционально связанный с другими полипептидными последовательностями.

Как используется в данном документе, термин "дефицит CDKL5" относится к любому дефициту в биологической функции белка. Дефицит может быть результатом любой ДНК-мутации в ДНК, кодирующей белок, или регуляторной области, связанной с ДНК, или любого изменения в функции белка вследствие любых изменений в эпигенетической модификации ДНК, в том числе без ограничений в метилировании ДНК или модификации гистонов, любого изменения во вторичной, третичной или четвертичной структуре белка CDKL5 или любого изменения способности белка CDKL5 выполнять свою биологическую функцию в сравнении субъектом дикого типа или нормальным субъектом.

Используемые в данном документе термины "вариантная форма синдрома Ретта", "вариант синдрома Ретта" и подобные относятся к атипичной форме синдрома Ретта с клиническими проявлениями, ана-

логичными синдрому Ретта, но неизвестной этиологией.

Используемый в данном документе термин "мутация CDKL5" относится к любому изменению нуклеотидной последовательности кодирующей области белка CDKL5.

Используемый в данном документе термин "трансфекция" относится к введению экзогенной и/или рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты внутрь окруженного мембраной пространства живой клетки, в том числе к введению последовательности нуклеиновой кислоты в цитозоль клетки, а также во внутреннее пространство митохондрии, ядра или хлоропласта. Нуклеиновая кислота может быть в форме "голой" ДНК или РНК, она может быть связана с различными белками или регуляторными элементами (например, промоторным и/или сигнальным элементом), или нуклеиновая кислота может быть встроена в вектор или хромосому.

Используемый в данном документе термин "трансформация" или "трансформированный" относится к введению нуклеиновой кислоты (например, ДНК или РНК) в клетки таким образом, чтобы обеспечить экспрессию кодирующих участков введенной нуклеиновой кислоты.

Используемый в данном документе термин "трансдуцированный" относится к непосредственному введению белка в клетку.

Используемый в данном документе термин "пептид" относится к цепям по меньшей мере из 2 аминокислот, которые являются короткими по сравнению с белком или полипептидом.

Используемый в данном документе термин "вариант" относится к полипептиду, который отличается от эталонного полипептида, но сохраняет необходимые свойства. Типичный вариант полипептида отличается аминокислотной последовательностью от другого, эталонного полипептида. В целом различия ограничены таким образом, что последовательности эталонного полипептида и варианта в целом очень похожи и во многих участках идентичны. Аминокислотная последовательность вариантного и эталонного полипептида могут отличаться одной или несколькими модификациями (например, заменами, добавлениями и/или делециями). Замещенный или вставленный аминокислотный остаток может быть представлять собой остаток, закодированный с помощью генетического кода, или остаток, не закодированный с помощью генетического кода. Вариант полипептида может представлять собой встречающийся в природе, такой как аллельный вариант, или это может быть вариант, который, как известно, не встречается в природе. "Вариант" включает функциональные и структурные варианты.

Используемый в данном документе термин "идентичность" подразумевает взаимосвязь между двумя или более полипептидными последовательностями, определяемую путем сравнения последовательностей. В уровне техники "идентичность" также относится к степени родства последовательностей у различных полипептидов, определяемой по совпадению между цепочками таких последовательностей. "Идентичность" можно с легкостью вычислять с помощью известных способов, в том числе без ограничения описанных в Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., Ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., Ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M. and Griffin, H.G., Eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; and Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., Eds., M Stockton Press, New York, 1991; и Carillo, K., and Lipman, D., SIAM J. Applied Math. 1988, 48: 1073. Предпочтительные способы определения идентичности разработаны для получения наибольшего числа совпадений между исследуемыми последовательностями. Способы определения идентичности зашифрованы в компьютерных программах, находящихся в публичном доступе. Процент идентичности между двумя последовательностями можно определить с помощью программного обеспечения для анализа (например, пакета программного обеспечения для анализа последовательностей от Genetics Computer Group, Мэдисон, Висконсин), которое включает алгоритм из Needleman and Wunsch, (J. Mol. Biol, 1970, 48: 443-453), например NBLAST и XBLAST. Для определения идентичности полипептидов по настоящему изобретению используют параметры по умолчанию.

Используемый в данном документе термин "плазмида", как используется в данном документе, относится к нехромосомной двухнитевой последовательности ДНК, включающей интактный "репликон", так что плазмида реплицируется в клетке-хозяине.

Используемый в данном документе термин "вектор" используется в применении к переносчику, используемому для введения экзогенной последовательности нуклеиновой кислоты в клетку. Вектор может включать молекулу ДНК, линейную или кольцевую (например, плазмиды), которая включает сегмент, кодирующий полипептид, представляющий интерес, функционально связанный с дополнительными сегментами, которые обеспечивают его транскрипцию и трансляцию при введении в клетку-хозяина или органеллы клетки-хозяина. Такие дополнительные сегменты могут включать промоторные и терминаторные последовательности и могут также включать одну или несколько точек начала репликации, один или несколько селективируемых маркеров, энхансер, сигнал полиаденилирования и т.д. Векторы экспрессии, как правило, получают из геномной или плазмидной ДНК дрожжей или бактерий или вирусной ДНК или они могут содержать элементы обеих.

Используемый в данном документе термин "функционально связанный" указывает на то, что регуляторные последовательности, применимые для экспрессии кодирующих последовательностей нуклеиновой кислоты, помещают в молекулу нуклеиновой кислоты в соответствующих положениях относитель-

тельно кодирующей последовательности так, чтобы обеспечить экспрессию кодирующей последовательности. Данное то же самое определение иногда применяется к расположению кодирующих последовательностей и элементов, регулирующих транскрипцию (например, промоторы, энхансеры и элементы терминации), и/или селективных маркеров в векторе экспрессии.

Используемый в данном документе термин "дикого типа" относится к типичной форме организма, сорта, штамма, гена, белка или характеристике, встречающейся в природе, в отличие от мутантных форм, которые могут быть результатом селекционного разведения или трансформации трансгеном.

Используемый в данном документе термин "кДНК" относится к последовательности ДНК, которая комплементарна РНК-транскрипту в клетке. Она представляет собой молекулу, созданную человеком. Как правило, кДНК получают *in vitro* с помощью фермента, называемого обратной транскриптазой, с использованием РНК-транскриптов в качестве шаблонов.

Используемый в данном документе термин "очищенный" или "очищать" используется в применении к последовательности нуклеиновой кислоты, пептида или полипептида, который характеризуется повышенной чистотой относительно природного окружения.

Используемый в данном документе термин "дифференцировать" или "дифференцировка" относится к процессу, с помощью которого клетки-предшественники или прогениторные клетки (например, нейрональные прогениторные клетки) дифференцируются в специфические типы клеток (например, нейроны).

Используемые в данном документе термины "доза", "унифицированная доза" или "дозировка" относятся к физически дискретным единицам, пригодным для использования у субъекта, при этом каждая единица содержит предварительно определенное количество белка слияния на основе CDKL5, композиции, содержащей белок слияния на основе CDKL5, и/или его фармацевтического состава, рассчитанное для получения требуемого ответа или ответов в связи с его введением.

Используемые в данном документе термины "специфический партнер по связыванию" или "партнер по связыванию" относятся к соединению или молекуле, с которыми второе соединение или молекула связываются с более высоким сродством, чем все остальные молекулы или соединения.

Используемые в данном документе термины "специфически связывает" или "специфическое связывание" относятся к связыванию, которое происходит между такими парными компонентами как фермент/субстрат, рецептор/агонист или антагонист, антитело/антиген, лектин/углевод, праймеры олигоДНК/ДНК, фермент или белок/ДНК и/или РНК-молекула с другой нуклеиновой кислотой (ДНК или РНК) или аминокислотой и которое может быть опосредовано ковалентными или нековалентными взаимодействиями или комбинацией ковалентных и нековалентных взаимодействий. Когда при взаимодействии двух компонентов образуется нековалентно связанный комплекс, связывание, которое происходит, как правило, представляет собой электростатическое взаимодействие, образование водородных связей или является результатом липофильных взаимодействий. Следовательно, "специфическое связывание" происходит между парными компонентами, при этом существует взаимодействие между этими двумя, которое приводит к связанному комплексу с характеристиками взаимодействия антитело/антиген, фермент/субстрат, ДНК/ДНК, ДНК/РНК, ДНК/белок, РНК/белок, РНК/аминокислота, рецептор/субстрат. В частности, специфическое связывание характеризуется связыванием одного члена пары с конкретным компонентом, а не с каким-либо другим компонентом в пределах семейства соединений, к которому принадлежит соответствующий член из членов связывания. Таким образом, например, антитело предпочтительно связывается с одним эпитопом, а не с каким-либо другим эпитопом в пределах семейства белков.

Используемый в данном документе термин "дезинфицирующий" относится к соединениям или молекулам, которые могут либо убить инфекционный агент, либо ингибировать его распространение. Дезинфицирующие средства включают без ограничения антибиотики, антибактериальные, противогрибковые, противовирусные и антипротозойные средства.

Используемый в данном документе термин "дикого типа" относится к типичной форме организма, сорта, штамма, гена, белка или характеристике, встречающейся в природе, в отличие от мутантных форм, которые могут быть результатом селекционного разведения или трансформации трансгеном.

Используемые в данном документе термины "индуцирует", "индуцирование" или "индуцированный" относятся к активации или стимулированию процесса или пути внутри клетки, такого как эндоцитоз, секреция и экзоцитоз.

Используемый в данном документе термин "производное" относится к любому соединению с такой же или схожей основной структурой, что и у данного соединения, но имеющему по меньшей мере одно структурное отличие, в том числе замену, удаление и/или добавление одного или нескольких атомов или функциональных групп. Термин "производное" не означает, что производное синтезировано из исходного соединения, служащего либо в качестве исходного материала, либо в качестве промежуточного продукта, хотя и это может быть частным случаем. Термин "производное" может включать пролекарства или метаболиты исходного соединения. Производные включают соединения, в которых свободные аминокислотные группы в исходном соединении были преобразованы в форму аминоксидов, партолуолсульфоамидов, бензоксикарбоамидов, трет-бутилоксикарбоамидов, производных тиюретанового типа, трифторацетиламидов, хлорацетиламидов или формамидов. Производные включают соединения, в которых карбоксильные группы в исходном соединении были преобразованы в форму метиловых и эти-

ловых сложных эфиров или других типов сложных эфиров или гидразидов. Производные включают соединения, в которых гидроксильные группы в исходном соединении были преобразованы в форму О-ацильных или О-алкильных производных. Производные включают соединения, в которых донорная группа водородной связи в исходном соединении была замещена другой донорной группой водородной связи, например OH, NH или SH. Производные включают замещение акцепторной группы водородной связи другой акцепторной группой водородной связи, такой как сложные эфиры, простые эфиры, кетоны, карбонаты, третичные амины, имины, тионы, сульфоны, третичные амиды или сульфиды. "Производные" также включают расширения посредством замены цикlopentanового кольца насыщенными или ненасыщенными циклогексановыми или другими более сложными, например азотсодержащими комплексами, а также расширение таких колец с помощью различных боковых групп.

Используемый в данном документе термин "терапевтически эффективное количество" относится к количеству белка слияния на основе CDKL5, композиции, содержащей белок слияния на основе CDKL5, его фармацевтического состава, вспомогательного средства или вторичного средства, описанного в данном документе, которое будет вызывать биологический или медицинский ответ в ткани, системе, животном или человеке, к которому стремится исследователь, ветеринар, лечащий врач или другой клиницист. "Терапевтически эффективное количество" включает такое количество белка слияния на основе CDKL5, композиции, содержащей белок слияния на основе CDKL5, его фармацевтического состава, которое при введении отдельно или совместном введении с вторичным средством является достаточным для того, чтобы предупредить развитие, уменьшить или облегчить в некоторой степени один или несколько симптомов дефицита CDKL5 и/или синдрома Ретта. "Терапевтически эффективное количество" включает такое количество белка слияния на основе CDKL5, композиции, содержащей белок слияния на основе CDKL5, его фармацевтического состава, которое при введении отдельно или совместном введении с вторичным средством является достаточным для того, чтобы увеличить выживаемость нейронов, количество нейронов, рост, удлинение и/или плотность ветвей аксона в области головного мозга субъекта по сравнению с контролем. "Терапевтически эффективное количество" включает такое количество белка слияния на основе CDKL5, композиции, содержащей белок слияния на основе CDKL5, его фармацевтического состава, которое при введении отдельно или совместном введении с вторичным средством является достаточным для того, чтобы увеличить способность к обучению у субъекта по сравнению с контролем. "Терапевтически эффективное количество" включает такое количество белка слияния на основе CDKL5, композиции, содержащей белок слияния на основе CDKL5, его фармацевтического состава, которое при введении отдельно или совместном введении с вторичным средством является достаточным для того, чтобы увеличить способность к запоминанию у субъекта по сравнению с контролем. "Терапевтически эффективное количество" включает такое количество белка слияния на основе CDKL5, композиции, содержащей белок слияния на основе CDKL5, его фармацевтического состава, которое при введении отдельно или совместном введении с вторичным средством является достаточным для того, чтобы улучшить двигательную функцию у субъекта по сравнению с контролем. "Терапевтически эффективное количество" включает такое количество белка слияния на основе CDKL5, композиции, содержащей белок слияния на основе CDKL5, его фармацевтического состава, которое при введении отдельно или совместном введении с вторичным средством является достаточным для того, чтобы восстановить способность к обучению, способность к запоминанию и/или двигательную функцию до уровней, которые по существу аналогичны уровням дикого типа или нормальным уровням. "Терапевтически эффективное количество" включает такое количество белка слияния на основе CDKL5, композиции, содержащей белок слияния на основе CDKL5, его фармацевтического состава, которое при введении отдельно или совместном введении с вторичным средством является достаточным для того, чтобы восстановить количество нейронов, выживаемость нейронов, рост аксона, удлинение аксона, количество ветвей и/или плотность ветвей аксона в области головного мозга субъекта до уровней, которые по существу аналогичны уровням дикого типа или нормальным уровням. Терапевтически эффективное количество будет варьировать в зависимости от точной химической структуры белка слияния на основе CDKL5, композиции, содержащей белок слияния на основе CDKL5, его фармацевтического состава, дефицита CDKL5, синдрома Ретта или их симптома, подлежащего лечению, пути введения, времени введения, скорости экскреции, комбинации лекарственного средства, мнения лечащего врача, лекарственной формы и возраста, веса, общего состояния здоровья, пола и/или диеты субъекта, подлежащего лечению.

Используемые в данном документе термины "синергетический эффект", "синергизм" или "синергия" относятся к эффекту, возникающему у различных двух или более молекул, соединений, веществ, факторов или композиций, который является большим или отличается от суммы их индивидуальных эффектов.

Используемый в данном документе термин "аддитивный эффект" относится к эффекту, возникающему у различных двух или более молекул, соединений, веществ, факторов или композиций, который является равным или таким же как сумма их индивидуальных эффектов.

Если в данном документе не определено иначе, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют такое же значение, как общепонятное специалисту в данной области.

Обсуждение
Гены и белки слияния TATk-CDKL5
Гены и белки слияния

В данном документе раскрыты последовательности рекомбинантной кДНК, которые кодируют различные белки слияния на основе CDKL5, содержащие модифицированную последовательность TAT (TATk). В одном варианте осуществления белок слияния содержит полипептид CDKL5 человека, функционально связанный с полипептидом TATk. Последовательность кДНК, которая кодирует белок слияния на основе CDKL5, может иметь последовательность, соответствующую любой последовательности под SEQ ID NO: 2, 7, 9, 11, 13 или ее варианту, описанному в данном документе. Белок слияния на основе CDKL5 может иметь полипептидную последовательность, соответствующую любой последовательности под SEQ ID NO: 8, 10, 12, 14 или ее варианту, описанному в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления последовательность кДНК CDKL5 человека может соответствовать последовательности под SEQ ID NO: 1 или 15. В дополнительных вариантах осуществления кДНК CDKL5 человека может быть приблизительно на 90% - приблизительно 100%, 80% - приблизительно 90% или приблизительно 50% - приблизительно 80% идентична последовательности под SEQ ID NO: 1 или 15. В некоторых вариантах осуществления последовательность кДНК CDKL5 человека может кодировать аминокислотную последовательность, соответствующую последовательности под SEQ ID NO: 2 или 16. В дополнительных вариантах осуществления последовательность кДНК CDKL5 человека может кодировать аминокислотную последовательность, которая на приблизительно 90% - приблизительно 100%, 80% - приблизительно 90% или приблизительно 50% - приблизительно 80% идентична последовательности под SEQ ID NO: 2 или 16.

В некоторых вариантах осуществления последовательность кДНК CDKL5 человека может представлять собой фрагмент по меньшей мере из 12 последовательных нуклеотидов, которые приблизительно на 90-100% идентичны 12 последовательным нуклеотидам в последовательности под SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления последовательность кДНК CDKL5 человека может представлять собой фрагмент по меньшей мере из 12 последовательных нуклеотидов, которые приблизительно на 80-90% идентичны 12 последовательным нуклеотидам в последовательности под SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления последовательность кДНК может представлять собой фрагмент по меньшей мере из 12 последовательных нуклеотидов, которые приблизительно на 50-80% идентичны 12 последовательным нуклеотидам в последовательности под SEQ ID NO: 1.

Белок слияния на основе CDKL5 содержит модифицированный домен белковой трансдукции (PTD) транс-действующего активатора транскрипции (TAT) (далее называемого в данном документе TATk), функционально связанный с полипептидом CDKL5 человека. TATk может иметь последовательность кДНК, соответствующую последовательности под SEQ ID NO: 3, и аминокислотную последовательность, соответствующую последовательности под SEQ ID NO 4. TATk представляет собой модифицированный TAT-PTD. Немодифицированный TAT-PTD опосредует трансдукции пептидов или белков в клетки. Однако немодифицированный TAT-PTD не обеспечивает возможность белкам слияния с TAT-PTD секретироваться клеткой. Немодифицированный TAT-PTD отщепляется от белка слияния посредством фурина-эндопротеазы в последовательностях распознавания для фурина, расположенных в пределах немодифицированного TAT-PTD. В отличие от этого, TATk модифицирован таким образом, что он не содержит последовательностей распознавания для фурина. По существу, белки слияния на основе CDKL5, описанные в данном документе, содержащие TATk, могут секретироваться эукариотическими клетками в своей полной форме.

В некоторых вариантах осуществления последовательность кДНК TATk может быть приблизительно на 90-100% или приблизительно 80% - приблизительно 90% идентична последовательности под SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления кДНК TATk может кодировать полипептидную последовательность, которая приблизительно на 90-100% или приблизительно 80% - приблизительно 90% идентична последовательности под SEQ ID NO:4.

Белок слияния на основе CDKL5 может необязательно содержать лидерную последовательность IgK-цепи для направления полипептида далее по пути секреции во время выработки клеткой. В некоторых вариантах осуществления лидерная последовательность IgK-цепи может быть функционально связана на N-конце полипептида CDKL5 человека. Лидерная последовательность IgK-цепи может иметь последовательность кДНК, соответствующую последовательности под SEQ ID NO: 5 или ее варианту, описанному в данном документе, и может иметь аминокислотную последовательность, соответствующую последовательности под SEQ ID NO: 6 или ее варианту, описанному в данном документе.

В других вариантах осуществления кДНК лидерной последовательности IgK-цепи может быть приблизительно на 90-100%, приблизительно 80% - приблизительно 90% или приблизительно 80-90% идентична последовательности под SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления лидерная последовательность IgK-цепи может иметь аминокислотную последовательность, которая приблизительно на 90% - приблизительно 100%, приблизительно 80% - приблизительно 90% или приблизительно 50% - приблизительно 80% идентична последовательности под SEQ ID NO: 6.

Белок слияния на основе CDKL5 может необязательно содержать одну или несколько белковых ме-

ток, функционально связанных с белком слияния на основе CDKL5. Эти типы меток представляют собой аминокислотные последовательности, которые обеспечивают возможность аффинной очистки, солюбилизации, хроматографического разделения и/или иммунологического обнаружения белка слияния. Подходящие белковые метки включают без ограничения хитин-связывающий белок (CBP), мальтоза-связывающий белок (MBP), глутатион-S-трансферазу (GST), поли(His), тиоредоксин (TRX), поли(NANP), FLAG-метку (в том числе любой вариант FLAG-метки, например 3x FLAG), V5-метку, Мус-метку, HA-метку, S-метку, SBP-метку, Sftag 1, Softag 3, Тс-метку, Xpress-метку, Strep-метку, Isoreptag, Spy-метку, Ту-метку, белок-переносчик биотин-карбоксила (BCCP) и Nus-метку. кДНК белка слияния на основе CDKL5 согласно последовательности под SEQ ID NO: 7, 9 или 11, что соответствует аминокислотной последовательности согласно последовательности под SEQ ID NO: 8, 10 или 12 соответственно, демонстрируют неограничивающие варианты осуществления белка слияния на основе CDKL5, содержащего TATk, а также Мус-метку и поли(HIS) метку. кДНК белка слияния на основе CDKL5 согласно последовательности под SEQ ID NO: 13, что соответствует аминокислотной последовательности согласно последовательности под SEQ ID NO: 14, демонстрируют неограничивающий вариант осуществления белка слияния на основе CDKL5 с FLAG-меткой.

Белок слияния на основе CDKL5 может необязательно содержать один или несколько репортерных белков, функционально связанных с полипептидом CDKL5. Подходящие репортерные гены включают без ограничения флуоресцентные белки (например, зеленый флуоресцентный белок (GFP), красный флуоресцентный белок (RFP), желтый флуоресцентный белок (YFP), голубой флуоресцентный белок (BFP) и синий флуоресцентный белок (CFP)), бета-галактозидазу, люциферазу (бактериальную, светлячка и люциферазу *genilla*), гены устойчивости к антибиотикам (например, хлорамфеникол-ацетилтрансфераза, неомицин-фосфотрансфераза и NPT-II), п-глюкуронидазу и щелочную фосфатазу. Включение репортерного белка позволяет, среди прочего, напрямую и/или опосредованно определять характеристики белка слияния и функцию белка слияния, а также осуществлять аффинную очистку белка. Репортерный белок может быть функционально связанным с N-концом и/или C-концом полипептида CDKL5 человека. В других вариантах осуществления репортерный белок может быть функционально связанным с N-концом и/или C-концом белка слияния на основе CDKL5. кДНК белка слияния на основе CDKL5 согласно последовательности под SEQ ID NO: 9 или 11 и соответствующая аминокислотной последовательности согласно последовательности под SEQ ID NO: 8 или 10 соответственно демонстрирует неограничивающие варианты осуществления белка слияния на основе CDKL5, содержащего флуоресцентный репортерный белок.

Рекомбинантные векторы

Последовательность кДНК слияния на основе CDKL5 может быть внедрена в подходящий вектор экспрессии. Вектор экспрессии может содержать одну или несколько регуляторных последовательностей или одну или несколько других последовательностей, используемых для облегчения экспрессии кДНК слияния на основе CDKL5. Вектор экспрессии может содержать одну или несколько регуляторных последовательностей или одну или несколько других последовательностей, используемых для облегчения репликации вектора экспрессии слияния на основе CDKL5. Вектор экспрессии может подходить для экспрессии белка слияния на основе CDKL5 в бактериальной клетке. В других вариантах осуществления вектор экспрессии может подходить для экспрессии белка слияния на основе CDKL5 в дрожжевой клетке. В дополнительных вариантах осуществления вектор экспрессии может подходить для экспрессии белка слияния на основе CDKL5 в растительной клетке. В других вариантах осуществления вектор экспрессии может подходить для экспрессии белка слияния на основе CDKL5 в клетке млекопитающего. В другом варианте осуществления вектор может подходить для экспрессии белка слияния на основе CDKL5 в грибной клетке. Подходящие векторы экспрессии, как правило, известны из уровня техники.

Получение белка TATk-CDKL5

В некоторых вариантах осуществления белок слияния на основе CDKL5 получают *in vitro* в системе клеточной культуры. Система клеточной культуры может содержать одну или несколько бактериальных, дрожжевых, грибных, растительных клеток или клеток млекопитающих. В некоторых вариантах осуществления белок слияния на основе CDKL5 секретируется культивируемой клеткой(клетками) в среду клеточной культуры. В других вариантах осуществления белок слияния на основе CDKL5 содержится в пределах цитоплазмы или мембраны культивируемой клетки(клеток).

С учетом сказанного следует обратить внимание на фиг. 1, на которой показан один вариант осуществления способа получения белка слияния на основе CDKL5, где белок слияния на основе CDKL5 вырабатывается культивируемой клеткой и секретируется в окружающую культуральную среду. Способ начинается при помощи трансфекции или иного способа доставки подходящего вектора, содержащего последовательность кДНК белка слияния на основе CDKL5, в клетку или клетки в культуре (6000). Затем клетки культивируют (6010) с применением общеизвестных способов для обеспечения возможности трансфицированным клеткам вырабатывать белок слияния на основе CDKL5 с помощью вектора и секретировать белок слияния на основе CDKL5 в культуральную среду, окружающую клетки. По истечении соответствующего промежутка времени культуральную среду, которая содержит секретированный белок слияния на основе CDKL5, собирают (6020). В некоторых вариантах осуществления клетки культивиру-

ют от приблизительно 12 ч до приблизительно 96 ч. На этом этапе определяют, необходимо ли белок слияния на основе CDKL5 дополнительно очищать от культуральной среды (6030). В некоторых вариантах осуществления среду, содержащую белок слияния на основе CDKL5, не подвергают дополнительной очистке и используют непосредственно для трансдукции одной или нескольких клеток (6050). В других вариантах осуществления белок слияния на основе CDKL5 дополнительно очищают от в культуральной среде и/или концентрируют в ней. В некоторых вариантах осуществления белок слияния на основе CDKL5 очищают и/или концентрируют с применением подходящего способа. Подходящие способы включают без ограничения аффинную очистку, эксклюзионное разделение и хроматографические способы разделения.

Имея в виду и понимая секреторный способ получения, следует обратить внимание на фиг. 2, на которой показан один вариант осуществления способа получения белка слияния на основе CDKL5, где белок слияния на основе CDKL5 не секретируется в культуральную среду, окружающую клетки. Способ начинается при помощи трансфекции или иного способа доставки подходящего вектора, содержащего последовательность кДНК белка слияния на основе CDKL5, в клетку или клетки в культуре (6000). Затем клетки культивируют (6010) с применением общеизвестных способов для обеспечения возможности трансфицированным клеткам вырабатывать белок слияния на основе CDKL5 с помощью вектора. По истечении соответствующего промежутка времени клетки лизируют с применением стандартных способов (7000). В некоторых вариантах осуществления клетки культивируют от 12 до 96 ч, прежде чем подвергнуть лизису.

Далее определяют, интегрирован ли белок слияния на основе CDKL5 в клеточную мембрану или находится в цитоплазме (7010). Если белок слияния на основе CDKL5 находится в мембранной фракции, то собирают мембранную фракцию (7020). После сбора мембранной фракции (7020) белок слияния на основе CDKL5 отделяют от мембранной фракции с применением подходящего способа (6040) для очистки и/или концентрирования белка слияния на основе CDKL5.

В вариантах осуществления, в которых белок слияния на основе CDKL5 присутствует в цитоплазме, супернатант, содержащий белок слияния CDKL5, собирают (7030). После сбора супернатанта (7030) определяют, необходимо ли белок слияния на основе CDKL5 дополнительно очищать и/или концентрировать.

Если определено, что белок слияния на основе CDKL5 необходимо дополнительно очистить и/или концентрировать, белок слияния на основе CDKL5 очищают и/или концентрируют с применением подходящего способа (6040). Подходящие способы включают без ограничения аффинную очистку, эксклюзионное разделение и хроматографические способы разделения. В других вариантах осуществления, если определено, что CDKL5 не нуждается в дополнительной очистке и/или концентрировании из супернатанта, супернатант, содержащий белок слияния на основе CDKL5, используют непосредственно для трансдукции клеток (6050).

Композиции и составы, содержащие белок слияния TATU-CDKL5

Также в пределах настоящего раскрытия предусмотрены композиции и составы, содержащие белок слияния на основе CDKL5, описываемый в данном документе. Композиция может представлять собой среду или супернатант, содержащие белок слияния на основе CDKL5, которые могут быть получены в соответствии со способом, описанным в данном документе.

Белки слияния на основе CDKL5, описанные в данном документе, можно предоставлять субъекту, нуждающемуся в этом, отдельно или в качестве активного ингредиента, в фармацевтическом составе. Таким образом, в данном документе также описаны фармацевтические составы, содержащие некоторое количество белка слияния на основе CDKL5. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические составы содержат терапевтически эффективное количество белка слияния на основе CDKL5. Фармацевтические составы, описанные в данном документе, можно вводить субъекту, нуждающемуся в этом. Субъект, нуждающийся в этом, может иметь дефицит CDKL5, синдром Ретта и/или их симптом. В других вариантах осуществления белок слияния на основе CDKL5 можно применять для производства лекарственного препарата для лечения или предупреждения дефицита CDKL5, синдрома Ретта и/или их симптома.

Фармацевтически приемлемые носители и вспомогательные ингредиенты и средства

Фармацевтические составы, содержащие терапевтически эффективное количество белка слияния на основе CDKL5, описанного в данном документе, могут дополнительно содержать фармацевтически приемлемый носитель. Подходящие фармацевтически приемлемые носители включают без ограничения воду, солевые растворы, спирты, гуммиарабик, растительные масла, бензиловые спирты, полиэтиленгликоли, желатин, углеводы, такие как лактоза, амилоза или крахмал, стеарат магния, тальк, кремниевую кислоту, вязкий парафин, парфюмерное масло, эфиры жирных кислот, гидроксиметилцеллюлозу и поливинилпирролидон, которые не оказывают вредного действия на активную композицию.

Фармацевтические составы можно стерилизовать и в случае необходимости смешивать со вспомогательными средствами, такими как смазывающие вещества, консерванты, стабилизаторы, смачивающие средства, эмульгаторы, соли, влияющие на осмотическое давление, буферы, красители, вкусовые и/или ароматические вещества и тому подобное, которые не оказывают вредного дей-

ствия на активную композицию.

В дополнение к терапевтически эффективному количеству белка слияния на основе CDKL5, описанного в данном документе, фармацевтический состав может также включать эффективное количество вспомогательного активного средства, в том числе без ограничения ДНК, РНК, аминокислот, пептидов, полипептидов, антител, аптамеров, рибозимов, направляющих последовательностей для рибозимов, которые ингибируют трансляцию или транскрипцию важнейших опухолевых белков и генов, гормонов, иммуномодуляторов, жаропонижающих средств, анксиолитиков, антипсихотических препаратов, анальгетиков, спазмолитиков, противовоспалительных, антигистаминных, дезинфицирующих и химиотерапевтических средств.

Подходящие гормоны включают без ограничения гормоны-производные аминокислот (например, мелатонин и тироксин), небольшие пептидные гормоны и белковые гормоны (например, тиреотропин-рилизинг-гормон, вазопрессин, инсулин, гормон роста, лютеинизирующий гормон, фолликулостимулирующий гормон и тиреотропный гормон), эйкозаноиды (например, арахидоновая кислота, липоксины и простагландины) и стероидные гормоны (например, эстрадиол, тестостерон, тетрагидротестостерон, кортизол).

Подходящие иммуномодуляторы включают без ограничения преднизон, азатиоприн, 6-МР, циклоспорин, такролимус, метотрексат, интерлейкины (например, IL-2, IL-7 и IL-12), цитокины (например, интерфероны (например, IFN- α , IFN- β , IFN- ϵ , IFN- κ , IFN- ω и IFN- γ), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор и имиквимод), хемокины (например, CCL3, CCL26 и CXCL7), цитозин-фосфатгуанозин, олигодезоксинуклеотиды, глюкоканы, антитела и аптамеры).

Подходящие жаропонижающие средства включают без ограничения нестероидные противовоспалительные средства (например, ибупрофен, напроксен, кетопрофен и нимесулид), аспирин и родственные салицилаты (например, холин салицилат, салицилат магния и салицилат натрия), парацетамол/ацетаминофен, метамизол, набуметон, феназон и хинин.

Подходящие анксиолитики включают без ограничения бензодиазепины (например, алпразолам, бромазепам, хлордiazепоксид, клоназепам, клоразепат, диазепам, флуразепам, лоразепам, оксазепам, темазепам, триазолам и тофизопам), серотонинергические антидепрессанты (например, селективные ингибиторы обратного захвата серотонина, трициклические антидепрессанты и ингибиторы моноаминоксидазы), мебикар, афобазол, селанк, бромантан, эмоксипин, азапироны, барбитураты, гидроксизин, прегабалин, валидол и бета-блокаторы.

Подходящие антипсихотические средства включают без ограничения бенперидол, бромперидол, дроперидол, галоперидол, моперон, пипамперон, тимиперон, флуспирилен, пенфлуридол, пимозид, ацепромазин, хлорпромазин, циаемеазин, диксиразин, флуфеназин, левомепромазин, мезоридазин, перазин, перициазин, перфеназин, пипотиазин, прохлорперазин, промазин, прометазин, протипендил, тиопроперазин, тиоридазин, трифторперазин, трифлуопромазин, хлорпротиксен, клопентиксол, флупентиксол, тиотиксен, зуклопентиксол, клотиапин, локсапин, протипендил, карпипрамин, клокапрамин, молиндон, мозапрамин, сульпирид, вералиприд, амисульприд, амоксапин, арипиразол, азеналин, клозапин, блонансерин, илоперидон, луразидон, мелперон, немонаприд, оланзапин, палиперидон, пероспирон, кветиапин, ремоксиприд, рисперидон, сертиндол, тримипрамин, zipрасидон, зотепин, альстонин, бифепрунокс, битопертин, брекспипразол, каннабидиол, карипразин, пимавансерин, помаглуметад метионил, вабикасерин, ксаномелин и зикронапин.

Подходящие анальгетики включают без ограничения парацетамол/ацетаминофен, нестероидные противовоспалительные средства (например, ибупрофен, напроксен, кетопрофен и нимесулид), ингибиторы СОХ-2 (например, рофекоксиб, целекоксиб и эторикоксиб), опиоиды (например, морфин, кодеин, оксикодон, гидрокодон, дигидроморфин, петидин, бупренорфин), трамадол, норэпинефрин, флупиртин, нефопам, орфенадрин, прегабалин, габапентин, циклобензаприн, скополамин, метадон, кетобемидон, пиритрамид, а также аспирин и родственные салицилаты (например, холин салицилат, салицилат магния и салицилат натрия).

Подходящие спазмолитики включают без ограничения мебеверин, папаверин, циклобензаприн, карисопродол, орфенадрин, тизанидин, метаксалон, метокарбамол, хлорзоксазон, баклофен, дантролен, баклофен, тизанидин и дантролен.

Подходящие противовоспалительные средства включают без ограничения преднизон, нестероидные противовоспалительные средства (например, ибупрофен, напроксен, кетопрофен и нимесулид), ингибиторы СОХ-2 (например, рофекоксиб, целекоксиб и эторикоксиб) и иммуноселективные противовоспалительные производные (например, пептид-Т поднижнечелюстной железы и его производные).

Подходящие антигистаминные средства включают без ограничения антагонисты H₁-рецептора (например, акривастин, азеластин, биластин, бромфенирамин, буклизин, бромодифенгидрамин, карбиноксамин, цетиризин, хлорпромазин, циклизин, хлорфенирамин, клемастин, ципрогептадин, деслоратадин, дексбромафенирамин, дексхлорфенирамин, дименгидрилат, диметинден, дифенгидрамин, доксиламин, эбастин, эмбрамин, фексофенадин, гидроксизин, левоцетиризин, лоратадин, меклозин, миртазапин, олопатадин, орфенадрин, фениндамин, фенирамин, фенилтолоксамин, прометазин, пириламид, кветиапин, рупатадин, трипеленнамин и трипролидин), антагонисты H₂-рецептора (например, циметидин, фамоти-

дин, лафутидин, низатидин, рафитидин и роксатидин), тритоквалин, катехин, кромогликат, недокромил и β 2-адреностимуляторы.

Подходящие дезинфицирующие средства включают без ограничения амебоциды (например, нитазоксанид, паромомицин, метронидазол, тинидазол, хлорохин, милтефозин, амфотерицин В и йодхинол), аминогликозиды (например, паромомицин, тобрамицин, гентамицин, амикацин, канамицин и неомицин), антигельминтные средства (например, пирантел, мебендазол, ивермектин, празиквантел, абендазол, тиабендазол, оксамниквин), противогрибковые средства (например, азоловые противогрибковые средства (например, итраконазол, флуконазол, позаконазол, кетоконазол, клотримазол, миконазол и вориконазол), эхинокандины (например, каспофунгин, анидулафунгин и микафунгин), гризеофульвин, тербинафин, флуцитозин и полиены (например, нистатин и амфотерицин В), антималярийные средства (например, пириметамин/сульфадоксин, артемизинин/люмефантрин, атоваквон/прогуанил, хинин, гидроксихлорохин, мефлохин, хлорохин, доксициклин, пириметамин и галофантрин), противотуберкулезные средства (например, аминосалицилаты (например, аминосалициловая кислота), изониазид/рифампин, изониазид/пиразинамид/рифампин, бедаквилин, изониазид, этамбутол, рифампин, рифабутин, рифапентин, капреомицин и циклосерин), противовирусные средства (например, амантадин, римантадин, абакавир/ламивудин, эмтрицитабин/тенофовир, кобицистат/эвмтригравир/эмтрицит абин/тенофовир, эфавиренз/эмтрицитабин/тенофовир, абакавир/ламивудин/зидовудин, ламивудин/зидовудин, эмтрицитабин/тенофовир, эмтрицитабин/опинавир/ритонавир/авир/тенофовир, интерферон альфа-2v/рибавирин, пэгинтерферон альфа-2b, маравирок, ралтегравир, долутегравир, энфувиртид, фоскарнет, фомивирсен, осельтамивир, занамивир, невирапин, эфавиренз, этравирин, рилпивириин, делавиридин, невирапин, энтекавир, ламивудин, адефовир, софосбувир, диданозин, тенофовир, абакавир, зидовудин, ставудин, эмтрицитабин, зальцитабин, телбивудин, симепревир, боцепревир, телапревир, лопинавир/ритонавир, фосампренавир, дарунавир, ритонавир, типранавир, атазанавир, нелфинавир, ампренавир, индинавир, саквинавир, рибавирин, валацикловир, ацикловир, фамцикловир, ганцикловир и валганцикловир), карбапенемы (например, дорипенем, меропенем, эртапенем и циластатин/имипенем), цефалоспорины (например, цефадроксил, цефрадин, цефазолин, цефалексин, цефепим, цефтаролин, лоракарбеф, цефотетан, цефутоксим, цефпрозил, лоракарбеф, цефокситин, цефаклор, цефтибутен, цефтриаксон, цефотаксим, цефподоксим, цефдинир, цефиксим, цефдиторен, цефтизоксим и цефтазидим), гликопептидные антибиотики (например, ванкомицин, далбаванцин, оритаванцин и телаванцин), глицилциклины (например, тигециклин), лепростатические средства (например, клофазимин и талидомид), линкомицин и его производные (например, клиндамицин и линкомицин), макролиды и их производные (например, телитромицин, фидаксомицин, эритромицин, азитромицин, кларитромицин, диритромицин и тролеандомицин), линезолид, сульфаметоксазол/триметоприм, рифаксимин, хлорамфеникол, фосфомицин, метронидазол, азтреонам, бацитрацин, пенициллины (амоксациллин, ампициллин, бакампициллин, карбенициллин, пиперациллин, тикарциллин, амоксициллин/клавуланат, ампициллин/сульбактам, пиперациллин/тазобактам, клавуланат/тикарциллин, пенициллин, прокаин-пенициллин, оксациллин, диклоксациллин и нафциллин), хинолоны (например, ломефлоксацин, норфлоксацин, офлоксацин, гатифлоксацин, моксифлоксацин, ципрофлоксацин, левофлоксацин, гемифлоксацин, моксифлоксацин, циноксацин, налидиксовая кислота, эноксацин, грепафлоксацин, гатифлоксацин, trovafloксацин и спарфлоксацин), сульфонамиды (например, сульфаметоксазол/триметоприм, сульфасалазин и сульфазоксазол), тетрациклины (например, доксициклин, демеклоциклин, миноциклин, доксициклин/салициловая кислота, доксициклин/омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты и тетрациклин) и противоинфекционное средство при инфекциях мочевыводящих путей (например, нитрофурантоин, метенамин, фосфомицин, циноксацин, налидиксовая кислота, триметоприм и метиленовый синий).

Подходящие химиотерапевтические средства включают без ограничения паклитаксел, брентуксимаб ведотин, доксорубицин, 5-FU (фторурацил), эверолимус, пеметрексед, мелфалан, памидронат, анастрозол, эксеместан, неларабин, офатумумаб, бевацизумаб, белиностан, тозитумумаб, кармустин, блеомицин, босутиниб, бусульфан, алемтузумаб, иринотекан, вандетаниб, бикалутамид, ломустин, даунорубицин, клофарабин, кабозантиниб, дактиномицин, рамуцирумаб, цитарабин, цитоксан, циклофосфамид, децитабин, дексаметазон, доцетаксел, гидроксимочевина, декарбазин, леупролид, эпирубицин, оксалиплатин, аспарагиназа, эстрамустин, цетуксимаб, висмодегид, аспарагиназа Egrwinia chrysanthemi, амифостин, этопозид, флутамид, торемифен, фулвестрант, летрозол, дегареликс, пралатрексад, метотрексат, флоксурин, обинутузумаб, гемцитабин, афатиниб, иматиниб мезилат, кармустин, эрибулин, трастузумаб, алтретамин, топотекан, понатиниб, идарубицин, ифосфамид, ибрутиниб, акситиниб, интерферон альфа-2a, гефинитиб, ромидеписин, иксабепилон, руксолитиниб, кабазитаксел, адо-трастузумаб эмтанзин, карфилзомиб, хлорамбуцил, сарграмостим, кладрибин, митотан, винкристин, прокарбазин, мегестрол, траметиниб, месна, хлористый стронций-89, мехлорэтамин, митомицин, бусульфан, гемтузумаб озогамин, винорелбин, филграстин, пэгфилграстин, сорафениб, нилутамид, пентостатин, тамоксифен, митоксантрон, пэгаспаргаза, денилейкин дифтитокс, алитретиноин, карбоплатин, пертузумаб, цисплатин, помалидомид, преднизон, альдеслейкин, меркаптопурин, золедроновая кислота, леналидомид, ритуксимаб, октреотид, дазатиниб, регорафениб, хистрелин, сунитиниб, силтуксимаб, омацетаксин, тиогуанин (тиогуанин), дабрафениб, эрлотиниб, бексаротен, темозоломид, тиотепа, талидомид, BCG, темсиролимус,

бендамустин гидрохлорид, трипторелин, триоксид мышьяка, лапатиниб, валрубицин, панитумумаб, винбластин, бортезомиб, третиноин, азацитидин, пазопаниб, тенипозид, лейковорин, кризотиниб, капецитабин, энзалутамид, ипилимумаб, гозерелин, вориностат, идеалалисиб, церитиниб, абиратерон, эпотилон, тафлупозид, азатиоприн, доксифлуридин, виндезин и полностью транс-ретиноевую кислоту.

Эффективные количества белка слияния на основе CDKL5 и вспомогательных средств

Фармацевтические составы могут содержать терапевтически эффективное количество белка слияния на основе CDKL5 и необязательно терапевтически эффективное количество вспомогательного средства. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество белка слияния на основе CDKL5 может варьировать от приблизительно 1 мкг/кг до приблизительно 10 мг/кг. В дополнительных вариантах осуществления терапевтически эффективное количество белка слияния на основе CDKL5 может варьировать от 1 нг/г массы тела до приблизительно 0,1 мг/г массы тела. Терапевтически эффективное количество белка слияния на основе CDKL5 может варьировать от приблизительно 1 пг до приблизительно 10 г. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество белка слияния на основе CDKL5 или фармацевтической композиции, содержащей белок слияния на основе CDKL5, может варьировать от приблизительно 10 нл до приблизительно 10 мл.

В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество может составлять от приблизительно 20 до приблизительно 50 нг на инъекцию, например в случае внутрижелудочковой инъекции. В других вариантах осуществления терапевтически эффективное количество может составлять приблизительно 10 мкл на инъекцию, например в случае внутрижелудочковой инъекции. В дополнительных вариантах осуществления терапевтически эффективное количество может составлять приблизительно 5 нг/мкл, например в случае внутрижелудочковой инъекции. В дополнительных вариантах осуществления терапевтически эффективное количество может составлять приблизительно 1,9 мкг/кг массы тела в случае внутрижелудочковой инъекции.

В других вариантах осуществления терапевтически эффективное количество может составлять от приблизительно 1 до приблизительно 2 мкг на инъекцию, например в случае системно вводимой инъекции. В дополнительных вариантах осуществления терапевтически эффективное количество может составлять от приблизительно 200 до приблизительно 300 мкл на инъекцию, например в случае системно вводимой инъекции. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество может составлять приблизительно 5 нг/мкл, например в случае системных инъекций. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество может составлять от приблизительно 1 до приблизительно 1,5 мкг на 5 г массы тела. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество может составлять от приблизительно 200 до приблизительно 300 мкг/кг массы тела.

В вариантах осуществления, где фармацевтический состав, помимо белка слияния на основе CDKL5, содержит вспомогательное активное средство, терапевтически эффективное количество вспомогательного активного средства будет варьировать в зависимости от вспомогательного активного средства. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество вспомогательного активного средства варьирует в диапазоне от 0,001 мкг до приблизительно 1 мг. В других вариантах осуществления эффективное количество вспомогательного активного средства варьирует в диапазоне от приблизительно 0,01 до приблизительно 1000 МЕ. В дополнительных вариантах осуществления эффективное количество вспомогательного активного средства варьирует в диапазоне от 0,001 до приблизительно 1 мл. В других вариантах осуществления эффективное количество вспомогательного активного средства варьирует в диапазоне от приблизительно 1 до приблизительно 50% вес./вес. от общего фармацевтического состава. В дополнительных вариантах осуществления эффективное количество вспомогательного активного средства варьирует в диапазоне от приблизительно 1 до приблизительно 50% об./об. от общего фармацевтического состава. В еще одних вариантах осуществления эффективное количество вспомогательного активного средства варьирует в диапазоне от приблизительно 1 до приблизительно 50% вес./об. от общего фармацевтического состава.

Лекарственные формы

В некоторых вариантах осуществления фармацевтические составы, описанные в данном документе, могут находиться в виде лекарственной формы. Лекарственные формы можно адаптировать для введения любым подходящим путем. Подходящие пути включают без ограничения пероральный (в том числе буккальный или сублингвальный), ректальный, эпидуральный, внутривенный, внутриглазной, ингаляционный, интраназальный, местный (в том числе буккальный, сублингвальный или трансдермальный), вагинальный, интрауретальный, парентеральный, внутривенный, подкожный, внутримышечный, внутривенный, внутрибрюшинный, интрадермальный, внутрикостный, внутрисердечный, внутрисуставной, интракавернозный, интракестальный, интравитреальный, интрацеребральный, а также интрацеребровентрикулярный и интрадермальный. Такие составы можно получать с помощью любого способа, известного из уровня техники.

Лекарственные формы, адаптированные для перорального введения, могут представлять собой дискретные единицы дозирования, такие как капсулы, пилюли или таблетки, порошки или гранулы, растворы или суспензии в водной или неводной жидкостях; съедобные пены или взбитые составы, или в виде жидких эмульсий типа масло-в-воде, или жидких эмульсий типа вода-в-масле. В некоторых вариантах

осуществления фармацевтические составы, адаптированные для перорального введения, также включают одно или несколько средств, которые обеспечивают запах, сохранность, цвет или способствуют растворению фармацевтического состава. Лекарственные формы, полученные для перорального введения, также могут находиться в форме жидкого раствора, который можно доставлять в виде пены, спрея или жидкого раствора. В некоторых вариантах осуществления лекарственная форма для перорального применения может содержать от приблизительно 1 нг до 1000 г фармацевтического состава, содержащего терапевтически эффективное количество или соответствующую долю белка слияния на основе CDKL5 или композиции, содержащей белок слияния на основе CDKL5. Лекарственную форму для перорального применения можно вводить субъекту, нуждающемуся в этом.

При необходимости лекарственные формы, описанные в данном документе, могут быть микроинкапсулированными. Лекарственную форму также можно получать с возможностью пролонгированного или замедленного высвобождения любого ингредиента. В некоторых вариантах осуществления белок слияния на основе CDKL5 является ингредиентом, высвобождение которого происходит с отсрочкой. В других вариантах осуществления высвобождение необязательно включенного вспомогательного ингредиента происходит с отсрочкой. Подходящие способы для отсрочки высвобождения ингредиента включают без ограничения нанесение покрытия или заключение ингредиентов в материал из полимеров, воска, гелей и тому подобное. Дозированные составы с отсроченным высвобождением можно получать, как описано в стандартных источниках, таких как "Pharmaceutical dosage form tablets," eds. Liberman et. al. (New York, Marcel Dekker, Inc., 1989), "Remington - The science and practice of pharmacy", 20th ed., Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2000, и "Pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems", 6th Edition, Ansel et al., (Media, PA: Williams and Wilkins, 1995). Эти источники предоставляют информацию о вспомогательных веществах, материалах, оборудовании и способах получения таблеток и капсул, а также лекарственных форм с отсроченным высвобождением в виде таблеток и пилюль, капсул и гранул.

Отсроченное высвобождение может составлять в пределах от приблизительно 1 ч до приблизительно 3 месяцев или более.

Примеры подходящих материалов покрытия включают без ограничения целлюлозные полимеры, такие как ацетатфталат целлюлозы, гидроксипропилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, фталат гидроксипропилметилцеллюлозы и ацетатсукцинат гидроксипропилметилцеллюлозы; поливинилацетатфталат, полимеры и сополимеры акриловой кислоты, а также метакриловые смолы, которые коммерчески доступны под торговым названием EUDRAGIT® (Roth Pharma, Вестерштадт, Германия), зеин, шеллак и полисахариды.

Для получения требуемого профиля высвобождения покрытия можно формировать с различным соотношением водорастворимого полимера, водонерастворимых полимеров и/или pH-зависимых полимеров, с наличием водонерастворимого/водорастворимого неполимерного вспомогательного средства или без него. Покрытие выполняют либо на лекарственной форме (матричной или простой), которая включает без ограничения таблетки (прессованные с покрытыми гранулами или без них), капсулы (с покрытыми гранулами или без них), гранулы, композиции из частиц, либо на "ингредиент как есть", составленный без ограничений в виде суспензионной формы или в виде лекарственной формы, представляющей собой капсулу с гранулами, которую вскрывают и принимают ее содержимое вместе с пищей.

Лекарственные формы, адаптированные для местного введения, можно составлять в виде мазей, кремов, суспензий, лосьонов, порошков, растворов, паст, гелей, спреев, аэрозолей или масел. В некоторых вариантах осуществления для лечения глаз или других внешних тканей, например рта или кожи, фармацевтические составы наносят в виде местной мази или крема. При составлении в виде мази белок слияния на основе CDKL5, вспомогательный активный ингредиент и/или его фармацевтически приемлемую соль можно составлять с парафиновой или смешивающейся с водой мазевой основой. В других вариантах осуществления активный ингредиент можно составлять в виде крема на кремовой основе масло-в-воде или основе вода-в масле. Лекарственные формы, адаптированные для местного введения в рот, включают таблетки для рассасывания, пастилки и жидкости для полоскания рта.

Лекарственные формы, адаптированные для назального или ингаляционного введения, включают аэрозоли, растворы, суспензионные капли, гели или сухие порошки. В некоторых вариантах осуществления белок слияния на основе CDKL5, композиция, содержащая белок слияния на основе CDKL5, вспомогательный активный ингредиент и/или его фармацевтически приемлемая соль в лекарственной форме, адаптированной для ингаляции, находятся в форме с уменьшенным размером частиц, которую получают или можно получить посредством микронизации. В некоторых вариантах осуществления размер частиц соединения с уменьшенным размером частиц (например, подвергнутых микронизации), или его соли, или сольвата определяется значением D50, составляющим от приблизительно 0,5 до приблизительно 10 мкм, измеренным подходящим способом, известным из уровня техники. Лекарственные формы, адаптированные для ингаляционного введения, также включают препараты из порошковидных частиц или аэрозоли. Подходящие лекарственные формы, где носитель или вспомогательное вещество представляет собой жидкость для введения, как, например, назальный спрей или капли, включают водные или масляные растворы/суспензии активного ингредиента, которые можно получать с помощью различных типов аэрозольных балончиков, небулайзеров или инсуффляторов для распыления отмеренной дозы под давлением.

В некоторых вариантах осуществления лекарственные формы представляют собой аэрозольные составы, подходящие для введения посредством ингаляции. В некоторых таких вариантах осуществления аэрозольный состав содержит раствор или тонкодисперсную суспензию белка слияния на основе CDKL5, композиции, содержащей белок слияния на основе CDKL5, и/или его фармацевтически приемлемой соли и фармацевтически приемлемый водный или неводный растворитель. Аэрозольные составы могут быть представлены в однодозовых или многодозовых количествах в стерильной форме в герметичном контейнере. Для некоторых из этих вариантов осуществления герметичный контейнер представляет собой однодозовый или многодозовый назальный или аэрозольный распылитель, снабженный дозирующим клапаном (например, ингалятор для отмеренной дозы), рассчитанный на утилизацию после того, как содержимое контейнера будет исчерпано.

В случае когда аэрозольная лекарственная форма содержится в аэрозольном распылителе, распылитель содержит подходящий пропеллент под давлением, такой как сжатый воздух, углекислый газ или органический пропеллент, в том числе без ограничения гидрофторуглерод. В других вариантах осуществления лекарственные формы в виде аэрозольного состава содержатся в помповом атомызаторе. Аэрозольный состав под давлением может также содержать раствор или суспензию белка слияния на основе CDKL5, композицию, содержащую белок слияния на основе CDKL5, или его фармацевтический состав. В дополнительных вариантах осуществления аэрозольный состав также содержит сорастворители и/или модификаторы, включенные для улучшения, например, стабильности, и/или вкуса, и/или характеристик массы тонкодисперсных частиц (количество и/или профиль) состава. Введение аэрозольного препарата может происходить один раз в день или несколько раз в день, например 2, 3, 4 или 8 раз в день, при этом каждый раз вводится 1, 2 или 3 дозы.

В случае некоторых лекарственных форм, пригодных и/или адаптированных для ингаляционного введения, фармацевтический состав представляет собой состав из сухого порошка, применимого для ингаляции. В дополнение к белку слияния на основе CDKL5, композиции, содержащей белок слияния на основе CDKL5, вспомогательному активному ингредиенту и/или его фармацевтически приемлемой соли, такая лекарственная форма может содержать порошковую основу, такую как лактоза, глюкоза, трегалоза, маннит и/или крахмал. В некоторых из таких вариантов осуществления белок слияния на основе CDKL5, композиция, содержащая белок слияния на основе CDKL5, вспомогательный активный ингредиент и/или его фармацевтически приемлемая соль находятся в форме с уменьшенным размером частиц. В дополнительных вариантах осуществления модификатор характеристик представляет собой L-лейцин или другую аминокислоту, октаацетат целлобиозы и/или соли стеариновой кислоты и металлов, такие как стеарат магния или кальция.

В некоторых вариантах осуществления аэрозольные составы сконструированы таким образом, что каждая отмеренная доза аэрозоля содержит предварительно заданное количество активного ингредиента, такого как один или несколько из белков слияния на основе CDKL5 или композиций, содержащих белок слияния на основе CDKL5, описанный в данном документе.

Лекарственные формы, адаптированные для вагинального введения, могут быть представлены в виде pessaries, тампонов, кремов, гелей, пен или составов для распыления. Лекарственные формы, адаптированные для ректального введения, включают суппозитории или клизмы.

Лекарственные формы, адаптированные для парентерального введения и/или адаптированные для любого типа инъекции (например, внутривенной, внутрибрюшной, подкожной, внутримышечной, интрадермальной, внутрикостной, эпидуральной, внутрисердечной, внутрисуставной, интракавернозной, интратекальной, интравитреальной, интрацеребральной и интрацеребровентрикулярной), могут включать водные и/или неводные стерильные инъекционные растворы, которые могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостатические средства, осмолиты, которые придают композиции изотоничность с кровью субъекта, и водные и неводные стерильные суспензии, которые могут включать суспендирующие средства и загущающие средства. Лекарственные формы, адаптированные для парентерального введения, могут быть представлены в форме контейнеров с единичной стандартной дозой или несколькими стандартными дозами, в том числе без ограничения в виде герметичных ампул или флаконов. Дозы можно лиофилизировать и ресуспендировать в стерильном носителе для восстановления дозы перед введением. В некоторых вариантах осуществления приготовляемые для немедленного приема инъекционные растворы и суспензии можно получать из стерильных порошков, гранул и таблеток.

Лекарственные формы, адаптированные для глазного введения, могут включать водные и/или неводные стерильные растворы, которые необязательно могут быть адаптированы для инъекции и которые необязательно могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостатические средства, осмолиты, которые придают композиции изотоничность с глазом или жидкостью, содержащейся в нем или окружающей глаз субъекта, а также водные и неводные стерильные суспензии, которые могут включать суспендирующие средства и загущающие средства.

Для некоторых вариантов осуществления лекарственная форма содержит предварительно заданное количество белка слияния на основе CDKL5 или композиции, содержащей белок слияния на основе CDKL5, на стандартную дозу. В одном варианте осуществления предварительно заданное количество белка слияния на основе CDKL5 или композиции, содержащей белок слияния на основе CDKL5, пред-

ставляет собой терапевтически эффективное количество белка слияния на основе CDKL5 или композиции, содержащей белок слияния на основе CDKL5, для лечения и предупреждения дефицита CDKL5, синдрома Ретта и/или их симптома. В других вариантах осуществления предварительно заданное количество белка слияния на основе CDKL5 или композиции, содержащей белок слияния на основе CDKL5, может представлять собой соответствующую долю терапевтически эффективного количества активного ингредиента. Такие стандартные дозы, следовательно, можно вводить один или более одного раза в день. Такие фармацевтические составы можно с помощью получать любого способа, известного из уровня техники.

Лечение неврологических нарушений с помощью композиций и составов с TATk-CDKL5

Белок слияния на основе CDKL5 и его фармацевтические составы, описанные в данном документе, можно применять для лечения и/или предупреждения заболевания, нарушения, синдрома или их симптома у субъекта. В некоторых вариантах осуществления белок слияния на основе CDKL5 и его фармацевтические составы можно применять для лечения и/или предупреждения дефицита CDKL5, синдрома Ретта, вариантов синдрома Ретта и/или их симптома. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет дефицит CDKL5, синдром Ретта, варианты синдрома Ретта и/или их симптом.

Некоторое количество белка слияния на основе CDKL5, композиций и его фармацевтических составов, описанных в данном документе, можно вводить субъекту, нуждающемуся в этом, один или несколько раз в день, неделю, месяц или год. В некоторых вариантах осуществления вводимое количество может представлять собой терапевтически эффективное количество белка слияния на основе CDKL5, композиций и его фармацевтических составов. Например, белок слияния на основе CDKL5, композиции и его фармацевтические составы можно вводить в виде суточной дозы. Данное количество можно давать в виде однократной дозы в сутки. В других вариантах осуществления суточную дозу можно вводить посредством нескольких доз в день, при этом каждая содержит долю общей суточной дозы, подлежащей введению (субдозы). В некоторых вариантах осуществления количество доз, вводимых за сутки, составляет 2, 3, 4, 5 или 6. В дополнительных вариантах осуществления соединения составы или их соли вводят один или несколько раз в неделю, например, 1, 2, 3, 4, 5 или 6 раз в неделю. В других вариантах осуществления белок слияния на основе CDKL5, композиции и его фармацевтические составы можно вводить один или несколько раз в месяц, например 1-5 раз в месяц. В еще одних вариантах осуществления белок слияния на основе CDKL5, композиции и его фармацевтические составы можно вводить один или несколько раз в год, например, 1-11 раз в год.

Белки слияния на основе CDKL5, композиции и их фармацевтические составы можно вводить совместно с вторичным средством любым удобным путем. Вторичное средство представляет собой отдельное соединение и/или состав относительно белков слияния на основе CDKL5, композиций и их фармацевтических составов. Вторичное средство можно вводить одновременно с белками слияния на основе CDKL5, композициями и их фармацевтическими составами. Вторичное средство можно вводить последовательно с белками слияния на основе CDKL5, композициями и их фармацевтическими составами. Вторичное средство может оказывать аддитивный или синергетический эффект в отношении белков слияния на основе CDKL5, композиций и их фармацевтических составов. Подходящие вторичные средства включают без ограничения ДНК, РНК, аминокислоты, пептиды, полипептиды, антитела, аптамеры, рибозимы, направляющие последовательности для рибозимов, которые ингибируют трансляцию или транскрипцию важнейших опухолевых белков и генов, гормоны, иммуномодуляторы, жаропонижающие средства, анксиолитики, антипсихотические препараты, анальгетики, спазмолитики, противовоспалительные, антигистаминные, дезинфицирующие и химиотерапевтические средства. В некоторых вариантах осуществления вторичное средство представляет собой DCA.

Подходящие гормоны включают без ограничения гормоны-производные аминокислот (например, мелатонин и тироксин), небольшие пептидные гормоны и белковые гормоны (например, тиреотропин-рилизинг-гормон, вазопрессин, инсулин, гормон роста, лютеинизирующий гормон, фолликулостимулирующий гормон и тиреотропный гормон), эйкозаноиды (например, арахидоновая кислота, липоксины и простагландины) и стероидные гормоны (например, эстрадиол, тестостерон, тетрагидротестостерон, кортизол).

Подходящие иммуномодуляторы включают без ограничения преднизон, азатиоприн, 6-МР, циклоспорин, такролимус, метотрексат, интерлейкины (например, IL-2, IL-7 и IL-12), цитокины (например, интерфероны, например, IFN- α , IFN- β , IFN- ϵ , IFN- κ , IFN- ω и IFN- γ , гранулоцитарный колониестимулирующий фактор и имиквимод), хемокины (например, CCL3, CCL26 и CXCL7), цитозин-фосфатгуанозин, олигодезоксинуклеотиды, глюкоканы, антитела и аптамеры).

Подходящие жаропонижающие средства включают без ограничения нестероидные противовоспалительные средства (например, ибупрофен, напроксен, кетопрофен и нимесулид), аспирин и родственные салицилаты (например, холин салицилат, салицилат магния и салицилат натрия), парацетамол/ацетаминофен, метамизол, набуметон, феназон и хинин.

Подходящие анксиолитики включают без ограничения бензодиазепины (например, алпразолам, бромазепам, хлордиазепоксид, клоназепам, клоразепат, диазепам, флуразепам, лоразепам, оксазепам, темазепам, триазолам и тофизопам), серотонинергические антидепрессанты (например, селективные ин-

динир, цефиксим, цефдиторен, цефтизоксим и цефтазидим), гликопептидные антибиотики (например, ванкомицин, далбаванцин, оритавагин и телаванцин), глицилциклины (например, тигециклин), лепростатические средства (например, клофазимин и талидомид), линкомицин и его производные (например, клиндамицин и линкомицин), макролиды и их производные (например, телитромицин, фидаксомицин, эритромицин, азитромицин, кларитромицин, диритромицин и тролеандомицин), линезолид, сульфаметоксазол/триметоприм, рифаксимин, хлорамфеникол, фосфомицин, метронидазол, азтреонам, бацитрацин, пенициллины (амоксикаллин, ампициллин, бакампикаллин, карбенициллин, пиперациллин, тикарциллин, амоксициллин/клавуланат, ампициллин/сульбактам, пиперациллин/тазобактам, клавуланат/тикарциллин, пенициллин, прокаин-пенициллин, оксикаллин, диклоксикаллин и нафциллин), хинолоны (например, ломефлоксацин, норфлоксацин, офлоксацин, гатифлоксацин, моксифлоксацин, ципрофлоксацин, левофлоксацин, гемифлоксацин, моксифлоксацин, циноксацин, налидиксовая кислота, эноксацин, грепафлоксацин, гатифлоксацин, тровафлоксацин и спарфлоксацин), сульфонамиды (например, сульфаметоксазол/триметоприм, сульфасалазин и сульфазоксазол), тетрациклины (например, доксициклин, демеклоциклин, миноциклин, доксициклин/салициловая кислота, доксициклин/омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты и тетрациклин) и противомикробное средство при инфекциях мочевыводящих путей (например, нитрофурантоин, метенамин, фосфомицин, циноксацин, налидиксовая кислота, триметоприм и метиленовый синий).

Подходящие химиотерапевтические средства включают без ограничения паклитаксел, брентуксимаб ведотин, доксорубин, 5-FU (фторурацил), эверолимус, пеметрексед, мелфалан, памидронат, анастрозол, эксеместан, неларабин, офатумумаб, бевацизумаб, белиностан, тозитумумаб, кармустин, блеомицин, босутиниб, бусульфан, алемтузумаб, иринотекан, вандетаниб, бикалутамид, ломустин, даунорубин, клофарабин, кабозантиниб, дактиномицин, рамуцирумаб, цитарабин, цитоксан, циклофосфамид, децитабин, дексаметазон, доцетаксел, гидроксимочевина, декарбазин, леупролид, эпирубицин, оксалиплатин, аспарагиназа, эстрамустин, цетуксимаб, висмодегид, аспарагиназа *Erwinia chrysanthemi*, амифостин, этопозид, флутамид, торемифен, фулвестрант, летрозол, дегареликс, пралатрексад, метотрексат, флоксурин, обинутузумаб, гемцитабин, афатиниб, иматиниб мезилат, кармустин, эрибулин, трастузумаб, алтретамин, топотекан, понатиниб, идарубин, ифосфамид, ибрутиниб, акситиниб, интерферон альфа-2а, гефинитиб, ромидеписин, иксабепилон, руксолитиниб, кабазитаксел, адо-трастузумаб эмтанзин, карфилзомиб, хлорамбуцил, сарграмостим, кладрибин, митотан, винкристин, прокарабазин, мегестрол, траметиниб, месна, хлористый стронций-89, мехлорэтамин, митомицин, бусульфан, гемтузумаб озогамин, винорелбин, филграстин, пэгфилграстин, сорафениб, нилутамид, пентостатин, тамоксифен, митоксантрон, пэгаспаргаза, денилейкин дифтитокс, алитретиноин, карбоплатин, пертузумаб, цисплатин, помалидомид, преднизон, альдеслейкин, меркаптопурин, золедроновая кислота, леналидомид, ритуксимаб, октреотид, дазатиниб, регорафениб, хистрелин, сунитиниб, силтуксимаб, омацетаксин, тиогуанин (тиогуанин), дабрафениб, эрлотиниб, бексаротен, темозоломид, тиотепа, талидомид, BCG, темсиrolimus, бендамустин гидрохлорид, трипторелин, триоксид мышьяка, лапатиниб, валрубицин, панитумумаб, винбластин, бортезомиб, третиноин, азацитидин, пазопаниб, тенипозид, лейковорин, кризотиниб, капецитабин, энзалутамид, ипилимумаб, гозерелин, вориностат, идеалисид, церитиниб, абиратерон, эпотилон, тафлупозид, азатиоприн, доксифлуридин, виндезин и полностью транс-ретиноевую кислоту.

В вариантах осуществления, где белки слияния на основе CDKL5, композиции и их фармацевтические составы вводят одновременно при совместном введении с вторичным средством, белки слияния на основе CDKL5, композиции и их фармацевтические составы можно вводить практически в то же самое время, что и вторичное средство. Используемый в данном контексте термин "практически то же самое время" относится к введению белков слияния на основе CDKL5, композиций и их фармацевтических составов, а также вторичного средства, при котором период времени между введением белка слияния на основе CDKL5, композиции или его фармацевтического состава и вторичного средства составляет от 0 до 10 мин.

В вариантах осуществления, где белок слияния на основе CDKL5, композицию или его фармацевтические составы вводят последовательно при совместном введении с вторичным средством, белок слияния на основе CDKL5, композицию или его фармацевтические составы можно вводить первым, а также спустя определенный период времени после введения вторичного средства. В других вариантах осуществления, где белок слияния на основе CDKL5, композицию или его фармацевтические составы вводят последовательно при совместном введении с вторичным средством, вторичное средство можно вводить первым, а также спустя определенный период времени после введения белка слияния на основе CDKL5, композиции или его фармацевтических составов. В любом варианте осуществления период времени между введением белка слияния на основе CDKL5, композиции или его фармацевтических составов и вторичного средства может варьировать в диапазоне от 10 мин до приблизительно 96 ч. В некоторых вариантах осуществления период времени может составлять приблизительно 10 мин, приблизительно 30 мин, приблизительно 1 ч, приблизительно 2 ч, приблизительно 4 ч, приблизительно 6 ч, приблизительно 8 ч, приблизительно 10 ч или приблизительно 12 ч. Последовательное введение можно повторять по мере необходимости в ходе периода лечения.

Количество белков слияния на основе CDKL5, композиций, их фармацевтических составов, кото-

рые можно вводить, описано в других частях данного документа. Количество вторичного средства будет варьировать в зависимости от вторичного средства. Количество вторичного средства может представлять собой терапевтически эффективное количество. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество вторичного средства варьирует в диапазоне от 0,001 мкг до приблизительно 1 мг. В других вариантах осуществления количество вторичного средства варьирует в диапазоне от приблизительно 0,01 до приблизительно 1000 МЕ. В дополнительных вариантах осуществления количество вторичного средства варьирует в диапазоне от 0,001 до приблизительно 1 мл. В других вариантах осуществления количество вторичного средства варьирует в диапазоне от приблизительно 1 до приблизительно 50% вес./вес. от общего фармацевтического состава. В дополнительных вариантах осуществления количество вторичного средства варьирует в диапазоне от приблизительно 1 до приблизительно 50% об./об. от общего фармацевтического состава. В еще одних вариантах осуществления количество вторичного средства варьирует в диапазоне от приблизительно 1 до приблизительно 50% вес./об. от общей композиции или фармацевтического состава.

В некоторых вариантах осуществления композиция или состав, содержащие белок слияния на основе CDKL5, вводят пациенту посредством инъекции. Подходящие инъекции включают без ограничения внутривенную, внутривенную, подкожную, внутримышечную, интрадермальную, интратканевую, эпидуральную, внутрисердечную, внутрисуставную, интракавернозную, интратекальную, интравитреальную, интрацеребральную и интрацеребровентрикулярную инъекцию. Другие подходящие способы введения композиции или состава, содержащих белок слияния на основе CDKL5, включают без ограничения местную, трансдермальную, назальную или пероральную доставку. В некоторых вариантах осуществления дозировка белка слияния на основе CDKL5 варьирует в диапазоне от приблизительно 0,01 мкг/г массы тела до приблизительно 10 мг/г массы тела.

В других вариантах осуществления белок слияния на основе CDKL5 можно доставлять пациенту, нуждающемуся в лечении, посредством клеточной терапии. В связи с этим следует обратить внимание на фиг. 3, на которой показан вариант осуществления способа доставки белка слияния на основе CDKL5 посредством аутологичной клетки. Способ начинается с культивирования клеток *in vitro* (8000). Предпочтительно клетки представляют собой аутологичные клетки. В одном варианте осуществления аутологичные клетки представляют собой нейроны или нейрональные клетки-предшественники, такие как нейральные стволовые клетки. В некоторых вариантах осуществления аутологичные клетки представляют собой нейроны, полученные из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток. В других вариантах осуществления аутологичные клетки представляют собой нейроны, полученные из стволовых клеток пуповинной крови.

Далее культивируемые клетки трансдуцируют с помощью белка слияния на основе CDKL5 (8010). В других вариантах осуществления культивируемые клетки трансдуцируют посредством воздействия на клеточные культуры средой, содержащей белок слияния на основе CDKL5, как описано ранее. В дополнительных вариантах осуществления культивируемые клетки трансфицируют с помощью подходящего вектора, содержащего кДНК белка слияния на основе CDKL5. Затем клетки культивируют в течение соответствующего промежутка времени для обеспечения экспрессии белка слияния на основе CDKL5 (8020). В некоторых вариантах осуществления клетки культивируют в течение от приблизительно 6 до приблизительно 96 ч. После культивирования клеток пациенту вводят одну или несколько трансдуцированных клеток.

В одном варианте осуществления трансдуцированные аутологичные нейроны доставляют в головной мозг с помощью хирургических техник. В некоторых вариантах осуществления одну или несколько трансдуцированных клеток вводят пациенту посредством инъекции. В некоторых вариантах осуществления одну или несколько трансдуцированных клеток включают в состав. В одном варианте осуществления состав, содержащий одну или несколько трансдуцированных клеток, также содержит фармацевтически приемлемый носитель и/или активное средство. В некоторых вариантах осуществления состав, содержащий одну или несколько трансдуцированных клеток, вводят пациенту посредством инъекции или с применением хирургической техники.

Наборы, содержащие белок слияния на основе CDKL5 и его составы

Белок слияния на основе CDKL5, композиции, содержащие белок слияния на основе CDKL5, и его фармацевтические составы, описанные в данном документе, могут быть представлены в виде комбинированного набора. Используемые в данном документе термины "комбинированный набор" или "составной набор" относятся к белку слияния на основе CDKL5, композициям, содержащим белок слияния на основе CDKL5, и его фармацевтическим составам, описанным в данном документе, а также дополнительным компонентам, которые применяют для упаковки, продажи, сбыта, доставки и/или введения комбинации элементов или одиночного элемента, такого как активный ингредиент, содержащегося в нем. Такие дополнительные компоненты включают без ограничения упаковку, шприцы, блистерные упаковки, бутылки и т.п. При одновременном введении одного или нескольких компонентов (например, активных средств), содержащихся в наборе, комбинированный набор может содержать активные средства в одном фармацевтическом составе (например, таблетка) или в отдельных фармацевтических составах.

Комбинированный набор может содержать каждое средство, соединение, фармацевтический состав

или его компонент в отдельных композициях или фармацевтических составах. Отдельные композиции или фармацевтические составы могут содержаться в единой упаковке или в отдельных упаковках в пределах набора. Также в некоторых вариантах осуществления предусмотрены буферы, растворители, солибилизирующие реагенты, культуральная среда клеток и другие реагенты. Такие дополнительные компоненты составы могут содержаться в единой упаковке или в отдельных упаковках в пределах набора.

В некоторых вариантах осуществления комбинированный набор также включает инструкции, напечатанные или иным образом содержащиеся в материальной форме выражения. Инструкции могут предоставлять информацию, касающуюся содержания белка слияния на основе CDKL5, композиций, содержащих белок слияния на основе CDKL5, и его фармацевтических составов и/или другого вспомогательного и/или вторичного средства, содержащегося там, информацию по безопасности, касающуюся содержания белка слияния на основе CDKL5, композиций, содержащих белок слияния на основе CDKL5, и его фармацевтических составов и/или другого вспомогательного и/или вторичного средства, содержащегося там, информацию, касающуюся дозировок, показаний к применению и/или рекомендуемой схемы(схем) лечения с помощью белка слияния на основе CDKL5, композиций, содержащих белок слияния на основе CDKL5, и его фармацевтических составов и/или другого вспомогательного и/или вторичного средства, содержащегося там. В некоторых вариантах осуществления инструкции могут содержать указания по введению белка слияния на основе CDKL5, композиций, содержащих белок слияния на основе CDKL5, и его фармацевтических композиций и/или другого вспомогательного и/или вторичного средства для субъекта, имеющего дефицит CDKL5, синдром Ретта и/или их симптом.

Без дополнительных уточнений полагают, что специалист в данной области на основании описания в данном документе может использовать настоящее раскрытие в его самом полном объеме. Следует подчеркнуть, что варианты осуществления настоящего изобретения, в частности любые "предпочтительные" варианты осуществления, являются лишь возможными примерами реализаций, изложенными исключительно для ясного понимания принципов настоящего раскрытия. Множество вариаций и модификаций можно осуществлять в раскрытом варианте(ах) осуществления настоящего раскрытия, не отступая фактически от сущности и принципов настоящего раскрытия. Все такие модификации и вариации находятся в пределах объема настоящего раскрытия.

Все публикации и патенты, цитируемые в данном описании, включены в данный документ посредством ссылки, как если бы каждая отдельная публикация или патент были конкретно и отдельно указаны как включенные посредством ссылки, и они включены в данный документ посредством ссылки для раскрытия и описания способов и/или материалов, в связи с которыми данные публикации цитируются. Цитирование любой публикации обозначает ее раскрытие до даты подачи, и его не следует толковать как признание того, что настоящее изобретение не имеет предшествовать такой публикации в силу действия предыдущего раскрытия. Кроме того, представленные даты публикации могут отличаться от фактических дат публикации, которые могут нуждаться в независимом подтверждении.

Как будет очевидно специалистам в данной области при прочтении данного описания, каждый отдельный вариант осуществления, описанный и проиллюстрированный в данном документе, имеет дискретные компоненты и признаки, которые могут быть легко выделены или объединены с признаками любого из других некоторых вариантов осуществления без отступления от объема или сущности настоящего раскрытия. Любой из перечисленных способов можно осуществлять в порядке перечисленных событий или в любом другом порядке, который логически возможен.

В вариантах осуществления настоящего изобретения можно использовать, если не указано иное, методики молекулярной биологии, микробиологии, нанотехнологии, органической химии, биохимии, ботаники и т.п., которые находятся в пределах компетенции специалиста в данной области. Такие методики в полном объеме объясняются в литературе.

Примеры

Следующие примеры изложены для того, чтобы обеспечить обычных специалистов в данной области полным раскрытием и описанием порядка выполнения способов и применения композиций и соединений, описанных и заявленных в данном документе. Конкретные примеры, приведенные ниже, следует рассматривать как исключительно иллюстративные, а не ограничивающие остальную часть настоящего раскрытия каким-либо образом. Были приложены усилия для обеспечения точности в отношении чисел (например, количества, температура и т.п.), однако необходимо учитывать некоторые ошибки и отклонения. Если не указано иное, то части являются частями по массе, температура представлена в °C, а давление является атмосферным или близким к атмосферному. Стандартная температура и давление определены как 20°C и 1 атмосфера.

Пример 1. Получение и очистка белка TATk-CDKL5.

Для получения пригодного к доставке белка слияния TAT-CDKL5 применяли синтетический TATk-PTD, в котором мутация последовательностей распознавания для фурина в домене TAT обеспечивает возможность секреции рекомбинантных белков. Наблюдали, что целевые клетки успешно захватывали секретированный белок. Ген слияния TATk-CDKL5, содержащий CDKL5 человека, клонировали плазмиду для экспрессии pSecTag2 (Life Technologies). Данная плазида разработана для обеспечения экс-

прессии генов у хозяев-млекопитающих и высоких уровней экспрессии целевых белков. Для секретиции белка в культуральную среду белки, экспрессируемые с помощью pSecTag2, сливали на N-конце с лидерной последовательностью Igk-цепи мыши. Белок слияния TATk-CDKL5 метили с помощью белка GFP для обеспечения возможности вестерн-блот анализа с применением антитела к GFP. Для облегчения очистки белка белок слияния TATk-CDKL5 выполняли с возможностью включения тус-метки и 6xHis-метки в С-концевой области гена TATk-GFP-CDKL5. Клетки HEK 293T трансфицировали с помощью плазмиды для экспрессии TATk-GFP-CDKL5 с применением стандартных способов доставки плазмиды. После трансфекции клетки оставляли расти на бессывороточной среде (среда Игла в модификации Дульбекко с высоким содержанием глюкозы). Через 48 ч среду собирали, подвергали диафильтрации и концентрировали с помощью фильтров для ультрацентрифугирования Amicon (предельное значение 50 кДа). Этот способ обеспечивает возможность замены буфера и обогащения секретированного белка.

На фиг. 4А и В показаны результаты вестерн-блот анализа экспрессии белка TATk-GFP-CDKL5 в трансфицированных клетках HEK293T. На фиг. 4А показана экспрессия белка слияния TATk-GFP-CDKL5 в клеточных гомогенатах от трансфицированных клеток HEK293T. На фиг. 4В показано накопление белка слияния TATk-GFP-CDKL5 в концентрированной (20X) культуральной среде клеток от трансфицированных клеток HEK293T.

Пример 2. Подтверждение киназной активности TATk-CDKL5.

Для очистки белка TATk-GFP-CDKL5 к С-концевой области гена TATk-GFP-CDKL5 добавляли тус-метку и 6xHis-метку. Белок слияния TATk-GFP-CDKL5 очищали из культуральной среды при помощи смолы Ni-NTA. Было показано, что киназа CDKL5 обладает высокой активностью аутофосфорилирования. Как показано на фиг. 5А и В, на которых продемонстрированы результаты анализа киназной активности *in vitro*, очищенный белок TATk-GFP-CDKL5 сохраняет свою активность аутофосфорилирования. Это показывает, что очищенный белок слияния сохраняет свою киназную активность.

Пример 3. Интернетизация TATk-CDKL5 клетками HEK293T.

Для оценки эффективности трансдукции белка слияния TATk-GFP-CDKL5 клетки HEK293T инкубировали с очищенным/концентрированным белком слияния. Вкратце, белок слияния TATk-GFP-CDKL5 получали и очищали, как описано в примере 1. Клетки HEK293 инкубировали в концентрированной среде, содержащей белок слияния. После различного времени инкубации клетки лизировали и общие белковые экстракты переносили на нитроцеллюлозную мембрану для иммуоблоттинга в отношении количественной оценки белка TATk-GFP-CDKL5. Как показано на фиг. 6, TATk-GFP-CDKL5 интернализовался клетками только после приблизительно 30 мин инкубации. Остальные культуры обрабатывали параллельно, а также фиксировали и проводили иммунное окрашивание при помощи специфического антитела к GFP для визуализации трансдуцированного белка TATk-GFP-CDKL5. Как показано на фиг. 7А, В, белок TATk-GFP-CDKL5 эффективно перемещался в клетки. Интернализацию в целевые клетки подтверждали при помощи конфокальной микроскопии (фиг. 8). Клетки нейробластомы SH-SY5Y инкубировали в концентрированной среде, содержащей белок слияния, в течение 30 мин. На фиг. 8 показано изображение полученных с помощью конфокального микроскопа серийных изображений (1-12) клеток SH-SY5Y, трансдуцированных с помощью TATk-GFP-CDKL5, где демонстрируется, что белок TATk-GFP-CDKL5 интернализуется целевыми клетками и локализуется как в ядре, так и цитоплазме клеток SH-SY5Y (фиг. 8).

Пример 4. TATk-CDKL5 индуцирует дифференциацию и ингибирует пролиферацию клеточной линии нейробластомы SHSY5Y.

Несмотря на не вызывающую сомнений важность CDKL5 для центральной нервной системы, биологические функции данной киназы остаются в значительной степени неизвестными. Ген CDKL5 влияет как на пролиферацию, так и на дифференциацию нервных клеток (см., например, Valli et al., 2012. *Biochim Biophys Acta*. 1819:1173-1185, и Rizzi et al., 2011. *Bram Res*. 1415:23-33). Клетки нейробластомы имеют некоторые общие признаки с нормальными нейронами и, таким образом, считаются хорошей *in vitro* моделью для изучения биохимических и функциональных свойств нервных клеток, в частности при индукции их дифференциации в процессе обработки средствами, такими как ретиноевая кислота (RA) (см., например, Singh, 2007 *Bram Res*. 1154 p 8-21; Melmo, 1997 *J. Neurooncol*. 31 pp. 65-83). В силу вышеизложенного клетки нейробластомы использовали для изучения функции CDKL5 *in vitro*.

Клетки SH-SY5Y обрабатывали очищенным TATk-GFP-CDKL5 аналогично обработке, описанной в примере 3. В данном случае клетки SH-SY5Y инкубировали с концентрированной средой, содержащей очищенный белок TATk-GFP-CDKL5 в течение приблизительно 24 ч. Пролиферацию клеток оценивали как митотический индекс (отношение количества клеток в популяции, в которых проходит митоз, к количеству клеток, в которых не проходит митоз) с применением окрашивания ядер с помощью красителя Hoechst. Дифференциацию оценивали путем исследования роста аксона, который свидетельствует о нейрональной дифференциации. Для анализа роста аксона клетки выращивали в течение дополнительных 1-2 дней в присутствии или в отсутствие средства продифференциации, RA. Разрастание аксона измеряли с применением системы анализа фотографий.

Индукция экспрессии CDKL5 (с помощью белка TATk-GFP-CDKL5) вызывала сильное ингибирование пролиферации клеток (например, фиг. 9А, В и 10) без увеличения апоптической гибели клеток

(данные не показаны) по сравнению с контролями. Кроме того, как показано на фиг. 11А, В и 12, TATk-GFP-CDKL5 стимулирует дифференциацию клеток нейробластомы, на что указывает разрастание аксона в клетках SH-SY5Y. Эти результаты демонстрируют, что TATk-CDKL5 является функциональным в модели нервных клеток *in vitro*.

Пример 5. Характеристика мышинной модели CDKL5-KO.

Мышиная модель с нокаутом CDKL5 была создана недавно EMBL в Монтеротондо, Италия, группой, которую возглавляет Dr. Cornelius Gross (Amendola, 2014 PLoS One. 9(5):e91613). Для доказательства влияния потери функции CDKL5 на развитие дендритов у "новорожденных" нейронов изучали морфологию дендритов "новорожденных" гранулярных клеток гиппокампа, полученных от мыши CDKL5 KO. Морфологию дендритов "новорожденных" нейронов анализировали с помощью иммуногистохимического анализа в отношении даблкортина (DCX), воспользовавшись экспрессией этого белка в цитоплазме незрелых нейронов во время периода удлинения аксона. Как показано на фиг. 13А, В, DCX-положительные клетки от мышей с нокаутом CDKL5 (-/-) демонстрируют дендритное дерево с очень неразвитой структурой (фиг. 13В) по сравнению с аналогами дикого типа (+/+) (фиг. 13А). Об очень неразвитой структуре может свидетельствовать слабое разветвление и удлинение. Отсутствие CDKL5 приводило к уменьшению количества DCX-положительных клеток (фиг. 13В) из-за увеличения апоптической гибели клеток (данные не показаны), которая, как наблюдали, воздействовала на постмитотические незрелые гранулярные нейроны (DCX-позитивные клетки) (Fuchs, 2014 Neurobiol Dis. 70 p53-68). Эти данные позволяют предположить, что CDKL5 играет фундаментальную роль в постнатальном нейрогенезе путем воздействия на выживание предшественников нейронов и созревание "новорожденных" нейронов. Наблюдали, что культуры нейрональных клеток-предшественников (NPC) из субвентрикулярной зоны (SVZ) мышей с нокаутом Cdkl5 демонстрируют дефекты, аналогичные наблюдаемым *in vivo* у предшественников гранулярных клеток мозжечка. А именно, в культурах нейрональных клеток-предшественников, полученных от мышей дикого типа (+/+), было больше нейронов (β-тубулин III-положительные клетки, красные клетки), чем в культурах нейрональных клеток-предшественников, полученных от мышей CDKL5 KO (-/-) (фиг. 14А и В). Это позволяет предположить, что потеря CDKL5 снижает выживаемость постмитотических нейронов. Оценка разрастания аксона у Р-тубулин III-положительных клеток демонстрировала, что нейроны, полученные из NPC от мышей с нокаутом CDKL5, были менее дифференцированными по сравнению с нейронами дикого типа (фиг. 14А и В). Эти результаты позволяют предположить, что постмитотические NPC, полученные от мышей с нокаутом CDKL5, имеют врожденный дефект, связанный не только с выживаемостью клеток, но и с нейрональным созреванием.

Пример 6. Белок TATk-CDKL5 восстанавливает развитие аксона нейрональных клеток-предшественников, полученных из мыши CDKL5 KO.

Культуры нейрональных клеток-предшественников из мыши CDKL5 KO (-/-) и мыши дикого типа (+/+) обрабатывали при помощи TATk-GFP-CDKL5 или TATk-GFP. Нейрональное созревание оценивали путем измерения общей длины аксона у дифференцированных нейронов (β-тубулин III-позитивные). Оценку длины аксона выполняли с применением системы анализа изображений Image Pro Plus (Media Cybernetics, Силвер-Спринг, Мэриленд 20910, США). Среднюю длину аксона на клетку рассчитывали путем деления общей длины аксонов на количество клеток, подсчитанных в областях. Как показано на фиг. 15А-С и 16, отсутствие CDKL5 вызывает снижение созревания новых нейронов, а обработка с помощью TATk-CDKL5 восстанавливает развитие аксонов.

Пример 7. Доставка TATU-CDKL5 в головной мозг мыши.

Семидневным мышатам подкожно инъецировали однократную дозу культуральной среды клеток НЕК293Т, трансфицированных с помощью TATk-GFP-CDKL5, TATk-GFP, или среды от нетрансфицированных клеток (среда) (однократная доза соответствовала приблизительно 200 мкл 200х концентрированной среды; которая содержала приблизительно 1-1,5 мкг белка слияния). Культуральную среду собирали через 48 ч после трансфекции и подвергали диафильтрации и концентрировали с помощью фильтров для ультрацентрифугирования Amicon (предельное значение 50 кДа). Мышей умерщвляли через 4 ч после введения обработки. Головной мозг мышей помещали в фиксатор на 24 ч, разрезали вдоль срединной линии и выдерживали в 20% сахарозе в фосфатном буфере в течение дополнительных 24 ч. Полушария замораживали и хранили при -80°C. Правое полушарие нарезали с помощью замораживающего микротомы на срезы в корональной плоскости толщиной 30 мкм. Иммуногистохимический анализ проводили на свободноплавающих срезах. Локализацию TATk-GFP-CDKL5 и TATk-GFP в головном мозге оценивали посредством иммуногистохимического анализа с применением антитела к GFP и набора для усиления сигнала TSA. Изображения получали на уровне сенсорно-моторной коры и мозжечка. Клетки докрашивали с применением 4',6-диамидино-2-фенилиндоло (DAPI). Типичные изображения, демонстрирующие присутствие белка TATk-GFP-CDKL5 в сенсорно-моторной коре и мозжечке мышей, показаны на фиг. 17А-Е и фиг. 18А-Д соответственно. С учетом того, что белок TATk-GFP-CDKL5 вводили подкожно, эти данные демонстрируют, что белок TATk-GFP-CDKL5 эффективно транспортировался через гематоэнцефалический барьер и попал в клетки головного мозга.

Пример 8. Влияние белка слияния TATk-CDKL5 на нейрональное созревание, выживаемость и межнейрональные связи *in vivo*.

Взрослым мышам (4-6-месячного возраста) внутримышечно инъецировали (фиг. 19) TATk-GFP-CDKL5 или TATk-GFP в течение 5 последовательных дней (см., например, фиг. 20 относительно схемы эксперимента). Вкратце, мышам анестезировали при помощи кетамина (100-125 мг/кг) и ксилазина (10-12,5 мг/кг). Канюли (диаметром 0,31 мм, Brain Infusion Kit III; Alzet, Купертино, Калифорния) стереотаксически имплантировали в боковые желудочки (A/P -0,4 мм каудально, M/L 1,0 мм, D/V -2,0 мм; фиг. 19). Через семь дней после имплантации мышам проводили инфузию 10 мкл (приблизительно 50 нг) TATk-GFP-CDKL5 или TATk-GFP в PBS в течение 5 последовательных дней с помощью шприца Hamilton, соединенного с автоматическим наноинжектором (при скорости 0,5 мкл/мин). Через 4 ч после последней инъекции животных умерщвляли и морфологию дендритов "новорожденных" гранулярных клеток гиппокампа анализировали с помощью иммуногистохимического анализа в отношении DCX. На фиг. 21 и 22 показано, что DCX-положительные нейроны мышей CDKL5 KO характеризовались более короткими отростками, чем их аналоги дикого типа (фиг. 21A, B и 22A, B). При внутримышечном введении белка слияния TATk-GFP-CDKL5 в течение 5 последовательных дней наблюдали увеличение длины и количества ветвей аксона у мышей с нокаутом CDKL5 (фиг. 22C) до уровней, аналогичных дикому типу (фиг. 22A). На фиг. 23A, B показаны примеры воссозданного дендритного дерева у "новорожденных" гранулярных клеток мышей дикого типа (+/Y) (фиг. 23A), гемизиготных мышей с нокаутом CDKL5 (-/Y) (фиг. 23B) и гемизиготных самцов мышей с нокаутом CDKL5, обработанных с помощью белка слияния TATk-GFP-CDKL5.

Количественная оценка размера дендритов DCX-положительных клеток показывает, что мыши с нокаутом CDKL5 (-/Y) имели меньшую длину дендритов (фиг. 24A) и уменьшенное количество сегментов (фиг. 24B) по сравнению с мышами дикого типа (фиг. 24A и B). У мышей с нокаутом CDKL5 (-/Y), обработанных с помощью TATk-GFP-CDKL5, наблюдали увеличение обоих параметров, которые становились даже более выраженными, чем у мышей +/Y (фиг. 24A, B). Влияние обработки с помощью TATk-GFP-CDKL5 на мелкие подробности организации дендритов исследовали путем оценки каждого дендритного порядка в отдельности. Специфической особенностью мышей CDKL5 KO было отсутствие ветвей высшего порядка (фиг. 25A, B; красные стрелки). В то время как для мышей дикого типа (+/Y) было характерно до 10 порядков ветвей, у мышей с нокаутом CDKL5 (-/Y) отсутствовали ветви 8-10 порядков (фиг. 25A, стрелки). Кроме того, у мышей с нокаутом CDKL5 (-/Y) наблюдали уменьшение длины ветвей 5-8 порядков (фиг. 25A) и уменьшение количества ветвей 6-8 порядков (фиг. 25B). Совместно эти данные указывают на то, что у мышей CDKL5 KO дендритное дерево "новорожденных" гранулярных клеток является гипотрофическим и что данный дефект обусловлен уменьшением количества и длины ветвей промежуточного порядка и отсутствием ветвей высшего порядка. Как наблюдалось, все эти дефекты можно было полностью устранить путем обработки с помощью TATk-GFP-CDKL5 (фиг. 25A, B).

Для оценки влияния обработки с помощью TATk-GFP-CDKL5 в отношении апоптотической гибели клеток подсчитывали количество апоптотических клеток, экспрессирующих расщепленную каспазу-3, в зубчатой извилине гиппокампа (фиг. 26). Количественная оценка клеток с расщепленной каспазой-3 показала, что обработка с помощью TATk-GFP-CDKL5 полностью возвращает к норме апоптотическую гибель клеток у мышей с нокаутом CDKL5 (-/Y) (фиг. 26). Наблюдали, что мыши с нокаутом CDKL5 (-/Y) характеризовались меньшим числом постмитотических нейронов (DCX-положительные клетки) в зубчатой извилине гиппокампа, чем мыши дикого типа (+/Y) (фиг. 27). У мышей с нокаутом CDKL5, обработанных с помощью TATk-GFP-CDKL5, происходило увеличение количества постмитотических нейронов, которые становились схожими с таковыми у мышей дикого типа (+/Y) (фиг. 27). Это указывает на то, что повышенную гибель постмитотических незрелых гранулярных клеток, характерную для мышей с нокаутом CDKL5, можно устранить путем обработки с помощью TATk-GFP-CDKL5. Совместно эти данные показывают, что обработка с помощью TATk-GFP-CDKL5 у мышей с нокаутом CDKL5 увеличивала длину аксонов и выживаемость "новорожденных" клеток в гиппокампе, что указывает на то, что инъецированный TATk-CDKL5 диффундировал из бокового желудочка в гиппокамп и восстанавливал созревание и выживание постмитотических гранулярных клеток.

Не будучи связанным какой-либо теорией, уменьшение межнейрональных связей может быть обратной стороной гипотрофии дендритов, характерной для "новорожденных" гранулярных клеток мышей CDKL5 KO. Синаптофизин (SYN; также известный как p38) представляет собой гликопротеин синаптических везикул, который является специфическим маркером пресинаптических окончаний. В данном случае наблюдали, что оптическая плотность SYN у мышей с нокаутом CDKL5 (-/Y) была значительно ниже, чем у мышей дикого типа (+/Y) в молекулярном слое гиппокампа (фиг. 28 и 30A), что позволяет предположить, что мыши CDKL5 KO имеют меньшее количество синаптических контактов в зубчатой извилине. На фиг. 28A-C показаны типичные изображения, демонстрирующие срезы головного мозга, обработанные для иммунофлуоресцентного анализа на синаптофизин (SYN), из молекулярного слоя (Mol) зубчатой извилины (DG) самца мыши дикого типа (+/Y) (фиг. 28A), гемизиготного самца мыши с нокаутом CDKL5 (-/Y) (фиг. 28B) и гемизиготного самца мыши с нокаутом CDKL5, обработанного белком слияния TATk-GFP-CDKL5 с помощью внутримышечных инъекций, вводимых один раз в день в

течение 5 последовательных дней (-/Y + TATk-GFP-CDKL5) (фиг. 28C). Один из шести срезов в корональной плоскости толщиной 30 мкм из DG животных обрабатывали для иммуногистохимического анализа. Иммуногистохимический анализ проводили на свободноплавающих срезах замороженных тканей головного мозга. Для иммуногистохимического анализа на синаптофизин срезы инкубировали в течение 48 ч при 4°C с моноклональным антителом мыши к SYN (SY38) (1:1000, MAB 5258, Millipore Bioscience Research Reagents) и в течение 2 ч с Cy3-конъюгированным вторичным антителом к IgG мыши (1:200; Jackson Immunoresearch). Интенсивность иммунореактивности (IR) определяли посредством определения оптической плотности иммуногистохимически окрашенных срезов. Изображения флуоресценции получали с помощью микроскопа Nikon Eclipse E600, оснащенного цифровой фотокамерой Nikon DXM1200 (система АТИ). Денситометрический анализ в молекулярном слое и коре проводили с применением программного обеспечения Nis-Elements 3.21.03 (Nikon). Для каждой фотографии пороговое значение интенсивности оценивали путем анализа распределения интенсивности пикселей в областях фотографии, которые не содержали IR. Это значение затем вычитали для расчета IR каждой области образца. Значения приведены в виде процентной доли оптической плотности у контрольных мышей CDKL5 +/-Y (среднее $\pm$ стандартная ошибка).

Дендритное разветвление было значительно уменьшено в кортикальных пирамидальных нейронах мышей с нокаутом CDKL5 по сравнению с мышами дикого типа (Amendola, 2014 PLoS One. 9(5):e91613). Подобный низкий уровень иммунореактивности в отношении SYN наблюдали в слоях III неокортекса (фиг. 30B). У мышей с нокаутом CDKL5 (-/Y), обработанных с помощью TATk-GFP-CDKL5, удавалось полностью устранить такие дефекты (фиг. 28 и фиг. 30A и B), что позволяет предположить, что положительное влияние обработки с помощью TATk-GFP-CDKL5 на структуру дендритов сопровождалось восстановлением ввода в нейроны.

Пример 9. Влияние белка слияния TATU-CDKL5 на P-AKT *in vivo*.

АКТ представляет собой центральную сигнальную киназу, ассоциированную с множественными клеточными путями. Уровень фосфорилированной АКТ (P-AKT) значительно снижен у животных с нокаутом CDKL5, дефицитом CDKL5 и синдромом Ретта. На фиг. 29A-C показаны типичные изображения, демонстрирующие срезы головного мозга, обработанные для иммунофлуоресцентного анализа на P-AKT, из молекулярного слоя (Mol) зубчатой извилины (DG) самца мыши дикого типа (+/Y) (фиг. 29A), самца мыши с нокаутом CDKL5 (-/Y) (фиг. 29B) и самца мыши с нокаутом CDKL5, обработанного белком слияния TATk-GFP-CDKL5 с помощью внутрижелудочковых инъекций, вводимых один раз в день в течение 5 последовательных дней (-/Y+TATk-GFP-CDKL5) (фиг. 29C). Для иммуногистохимического анализа на фосфо-АКТ срезы инкубировали в течение 24 ч при 4°C с моноклональным антителом мыши к фосфо-АКТ-Ser473 (1:1000, Cell Signaling Technology) и в течение 2 ч с Cy3-конъюгированным вторичным антителом к IgG мыши (1:200; Jackson Immunoresearch). Интенсивность иммунореактивности (IR) определяли посредством определения оптической плотности иммуногистохимически окрашенных срезов. Изображения флуоресценции получали с помощью микроскопа Nikon Eclipse E600, оснащенного цифровой фотокамерой Nikon DXM1200 (система АТИ).

У самцов мышей с нокаутом CDKL5 (-/Y) оптическая плотность P-AKT в молекулярном слое DG (фиг. 31 A) и в слое V коры (фиг. 31B) была значительно ниже, чем у мышей +/-Y. У самцов мышей с нокаутом CDKL5 (-/Y), которым проводили внутрижелудочковую инъекцию TATk-GFP-CDKL5 в течение пяти последовательных дней, удавалось полностью устранить этот дефект (фиг. 31A и B), что демонстрирует, что обработка с помощью TATk-GFP-CDKL5 мышей с нокаутом CDKL5 восстанавливает активность АКТ.

Пример 10. Влияние белка слияния TATU-CDKL5 на обучение и способность к запоминанию.

Мыши с нокаутом CDKL5 проявляли нарушение запоминания и обучения по сравнению с мышами дикого типа (см., например, фиг. 33 и 34A, B).

Для проверки способности к запоминанию и обучению мышам с нокаутом CDKL5 ежедневно вводили при помощи внутрижелудочковых инъекций белок слияния TATk-GFP-CDKL5 в течение 10 последовательных дней (см., например, фиг. 32 относительно схемы эксперимента). После двухдневного периода отдыха по завершении 10 дней инъекций все группы мышей подвергали тестированию в водном лабиринте Морриса (MWM) (фиг. 33). С помощью MWM можно измерить способность обнаружить и вспомнить положение платформы, погруженной в воду. Мышей обучали в задании с применением MWM определять местоположение скрытой запасной платформы в круглом бассейне. Устройство состоит из большой круглой емкости для воды (диаметром 1,00 м, 50 см высотой) с прозрачной круглой скрытой платформой (10 см²). Бассейн виртуально разделили на четыре равных квадранта, обозначенных как северо-восточный, северо-западный, юго-восточный и юго-западный. Резервуар заполняли водопроводной водой при температуре 22°C до 0,5 см выше верхней части платформы и воду делали непрозрачной с помощью молока. Платформу помещали в резервуар в фиксированном положении (в середине северо-западного квадранта). Бассейн помещали в большую комнату с рядом зрительных ориентиров (квадраты, треугольники, круги и звезды) внутри и снаружи лабиринта. После тренировки каждую мышь тестировали в течение 5 последовательных дней по два сеанса из 4 испытаний каждое в день с интервалом между

сеансами 40 мин (фаза приобретения навыка). Видеокамеру помещали над центром бассейна и подключали к системе видеослежения (Ethovision 3.1; Noldus Information Technology B.V., Вагенинген, Нидерланды). Мышей выпускали в положении мордочкой к стене бассейна из одной из следующих отправных точек: Север, Восток, Юг или Запад и позволяли искать платформу в течение не более 60 с. Если мышь не находила платформу, ее мягко направляли к ней и позволяли оставаться там в течение 15 с. В период времени между испытаниями (15 с) мышей помещали в пустую клетку. Латентное время обнаружения скрытой платформы применяли как меру обучения. Все экспериментальные сеансы проводили в период 9.00-15.00.

Результаты этого теста представлены на фиг. 33. На фиг. 33 показан график, демонстрирующий количественную оценку фазы обучения, определяемой посредством теста в водном лабиринте Морриса, у самцов мышей дикого типа (+/Y), самцов мышей с нокаутом CDKL5 (-/Y) и самцов мышей с нокаутом CDKL5, обработанных белком слияния TATk-GFP-CDKL5 (-/Y+TATk-GFP-CDKL5). Мыши дикого типа научились находить платформу на второй день, а у мышей с нокаутом CDKL5 не наблюдали убедительных признаков обучения. У мышей с нокаутом CDKL5, обработанных белком слияния TATk-CDKL5, способность к обучению начала восстанавливаться в день 4 и продолжала улучшаться в день 5.

Память и способность к обучению дополнительно изучали по ответу на обработку с помощью белка слияния TATk-GFP-CDKL5 с применением теста пассивного избегания. После 10 последовательных дней обработки и двухдневного периода отдыха мышей из различных групп подвергали тесту пассивного избегания (фиг. 34). В эксперименте использовали тестовую клетку с двумя камерами (светлая и темная). В день один (период выработки условного рефлекса) животных помещали в светлую камеру и они инстинктивно двигались в темную камеру, где у них вырабатывали условный рефлекс с помощью условный одиночного нежелательного события (электроболевое раздражение лап животных). Для теста пассивного избегания авторы применяли коробку с поворотным дном (47×18×26 см), разделенную на два отсека раздвижной дверью, и блок управления, включающий электрошокер (Ugo Basile, Италия). Этот классический прибор для выработки павловского условного рефлекса использует тенденцию у мышей убегать из освещенного пространство в темное (способ step-through). В первый день мышей индивидуально помещали в освещенный отсек. По истечении 60 с периода привыкания соединительную дверь между камерами открывали. В целом мыши быстро переступают через ворота и входят в темный отсек, поскольку мыши предпочитают находиться в темноте. После входа в темный отсек мыши получали короткое электроболевое раздражение лап (0,7 мА в течение 3 с) и удалялись из камеры после 15 с латентного времени. Если мышь оставалась в светлом отсеке на протяжении всего испытания (358 с), дверь закрывали и мышь удаляли из светлого отсека. Камеры очищали 70% этанолом перед тестированием каждой отдельной мыши. После 24-часового периода сохранения в памяти мышей помещали обратно в светлый отсек и время, которое требовалось им, чтобы вновь войти в темный отсек (латентный период), измеряли до 358 с.

На фиг. 34А, В показаны результаты теста пассивного избегания. Фиг. 34А указывает на то, что латентное время входа в темную камеру было аналогичным у всех групп. В день два (период тестирования) (фиг. 34В) животных снова помещали в светлую камеру. Память о неблагоприятном событии измеряли по латентному времени входа в темную камеру. Мыши с нокаутом CDKL5 (-/Y) очень плохо справлялись с выполнением данного задания, что выражалось в уменьшенном латентном периоде входа в темную камеру по сравнению с показателями мышей дикого типа (+/Y). Мыши с нокаутом, обработанные с помощью TATk-GFP-CDKL5, проявляли латентное время, аналогичное таковому у мышей дикого типа.

Подводя итог вышесказанному, данные показывают, что TATk-CDKL5 может увеличивать и восстанавливать способность к обучению и запоминанию у мышей с нокаутом CDKL5 до уровней, аналогичных наблюдаемым у необработанных мышей дикого типа.

Пример 11. Влияние белка слияния TATk-CDKL5 на двигательную функцию.

Мыши с нокаутом CDKL5 проявляли продолжительное прижатие конечностей при подвешивании (см., например, фиг. 35А, В).

Для изучения влияния белка слияния TATk-GFP-CDKL5 на двигательную функцию мышам ежедневно вводили TATk-GFP-CDKL5 посредством внутривенных инъекций в течение 10 последовательных дней (фиг. 35). Через 10 дней после завершения протокола дозирования животных подвешивали в воздухе за хвост (фиг. 35А и В). Всех животных подвешивали в течение приблизительно 2 мин и измеряли общее время прижатия конечностей. Результаты этого эксперимента показаны на фиг. 35А, В.

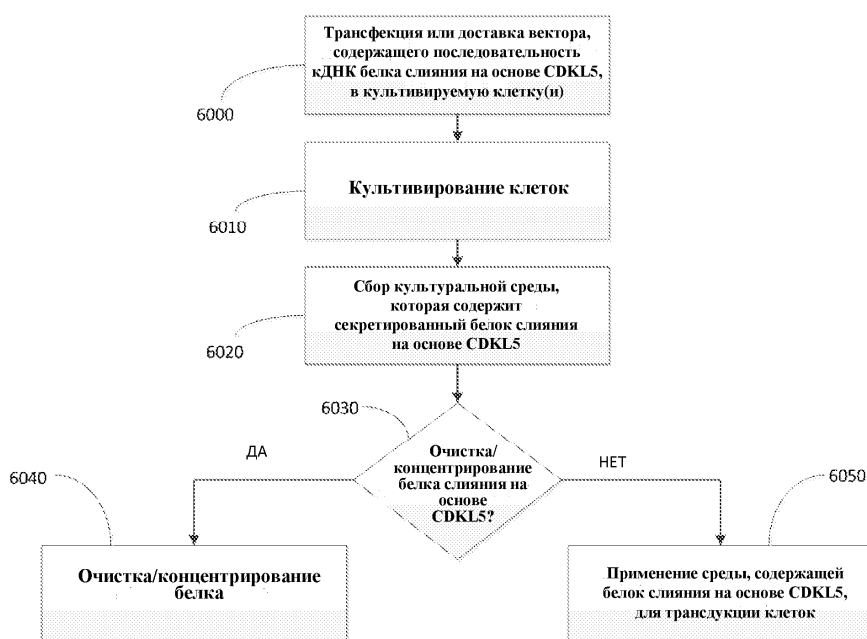
На фиг. 35А показана диаграмма, демонстрирующая количественную оценку двигательной способности, определяемую посредством теста на прижатие, в котором измеряли общее количество времени, проведенное с прижатием конечностей, во время 2-минутного интервала у самцов мышей дикого типа (+/Y), у самцов мышей с нокаутом CDKL5 (-/Y) и самцов мышей с нокаутом CDKL5, обработанных белком слияния TATk-GFP-CDKL5 (-/Y + TATk-GFP-CDKL5) согласно схеме инъекций на фиг. 32.

Измеряли массу тела самцов мышей дикого типа (+/Y) и самцов мышей CDKL5 KO (-/Y), которым инъецировали в течение 5 (+/Y) или 10 (-/Y) дней белок TAT-GFP-CDKL5, и результаты представлены на фиг. 36. Значительных изменений в массе тела в течение периода инъекций не наблюдали, что позволяет предположить, что не имелось никаких побочных эффектов, вызванных введением белка TAT-GFP-CDKL5.

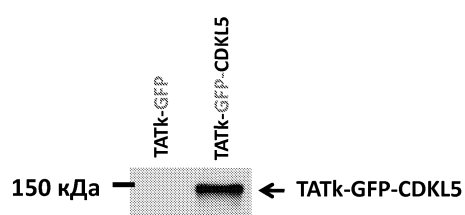
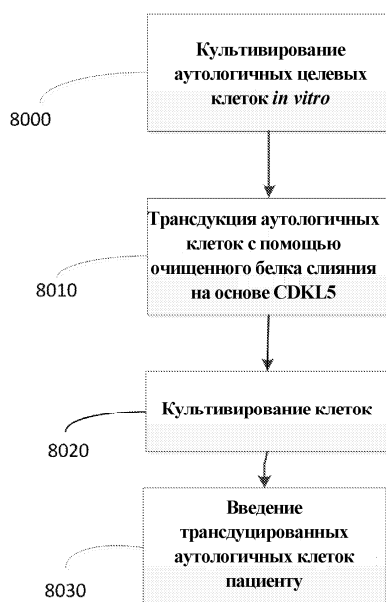
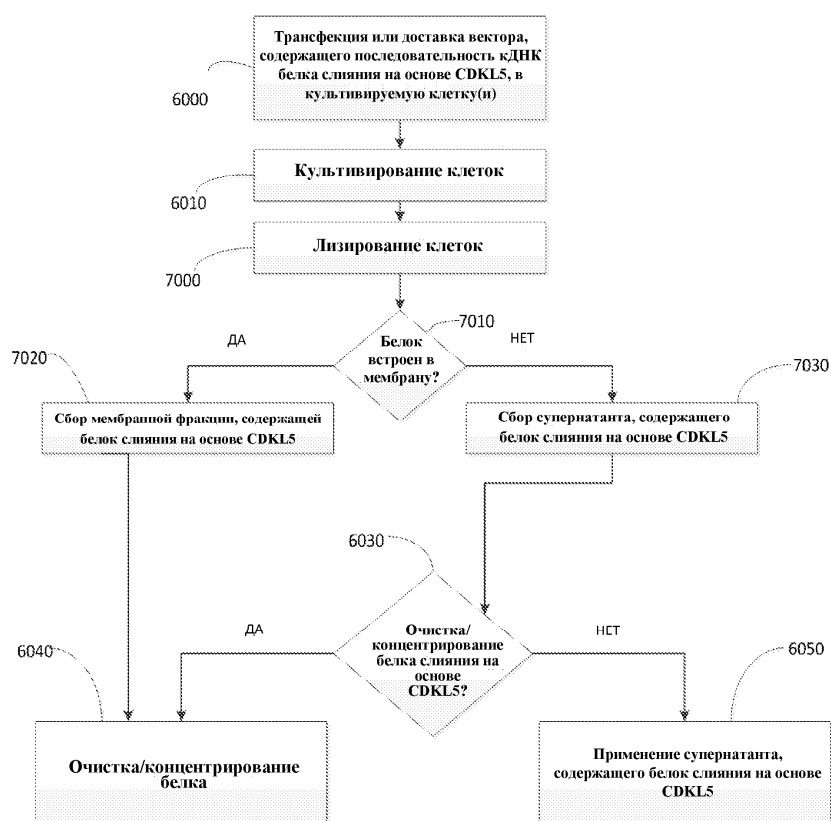
Подводя итог вышесказанному, данные показывают, что обработка с помощью TATk-CDKL5 улучшала двигательную функцию у мышей с нокаутом CDKL5.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Слитый белок для лечения одного или нескольких симптомов дефицита CDKL5, синдрома Ретта или атипичного синдрома Ретта, вызванного мутацией или дефицитом CDKL5, содержащий полипептид CDKL5, аминокислотная последовательность которого приблизительно на 90-100% идентична последовательности SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO: 16, и полипептид TATk, аминокислотная последовательность которого приблизительно на 90-100% идентична последовательности SEQ ID NO: 4, причем полипептид TATk не содержит последовательностей распознавания для фурина и функционально связан с полипептидом CDKL5; при этом слитый белок способен секретироваться в полной форме эукариотическими клетками, увеличивает рост, удлинение, количество ветвей или плотность ветвей аксона в головном мозге субъекта, снижает апоптоз нейронов в головном мозге субъекта, улучшает двигательную и/или когнитивную функции у субъекта.
2. Слитый белок по п.1, дополнительно содержащий лидерную последовательность Igk-цепи, которая функционально связана с полипептидом CDKL5.
3. Слитый белок по п.1, дополнительно содержащий репортерный белок, который функционально связан с полипептидом CDKL5.
4. Слитый белок по п.1, дополнительно содержащий белковую метку, которая функционально связана с полипептидом CDKL5.
5. Слитый белок по п.1, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 14.
6. Фармацевтический состав для лечения одного или нескольких симптомов дефицита CDKL5, синдрома Ретта или атипичного синдрома Ретта, вызванного мутацией или дефицитом CDKL5, содержащий терапевтически эффективное количество слитого белка по любому из пп.1-5 и фармацевтически приемлемый носитель.
7. Фармацевтический состав по п.6, где терапевтически эффективное количество слитого белка увеличивает рост, удлинение, количество ветвей или плотность ветвей аксона в головном мозге субъекта.
8. Фармацевтический состав по п.6, где терапевтически эффективное количество слитого белка снижает апоптоз нейронов в головном мозге субъекта.
9. Фармацевтический состав по п.6, где терапевтически эффективное количество слитого белка улучшает двигательную функцию у субъекта.
10. Фармацевтический состав по п.6, где терапевтически эффективное количество слитого белка улучшает когнитивную функцию у субъекта.
11. Способ лечения одного или нескольких симптомов дефицита CDKL5, синдрома Ретта или атипичного синдрома Ретта, вызванного мутацией или дефицитом CDKL5, включающий введение терапевтически эффективного количества фармацевтического состава по п.6.

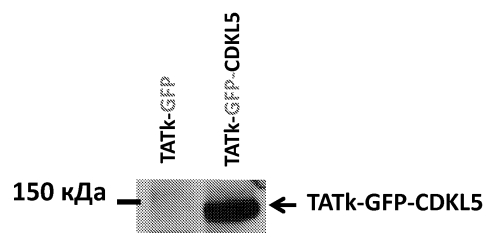


Фиг. 1



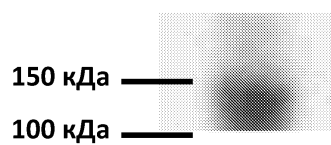
Фиг. 4А

038000



Фиг. 4В

Анализ
аутофосфорилирования
TATk-GFP-CDKL5



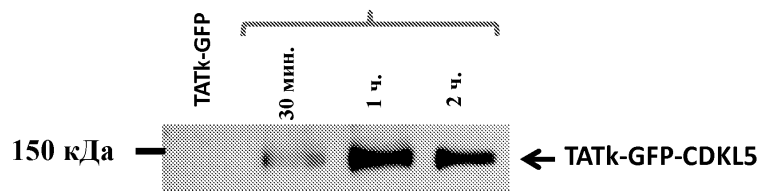
Фиг. 5А

Антитело к
CDKL5



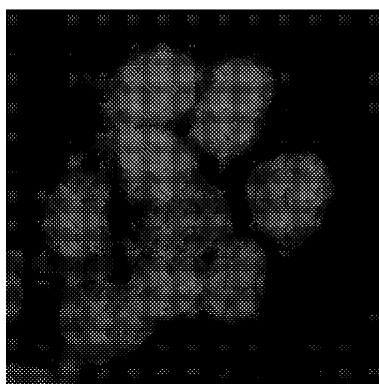
Фиг. 5В

TATk-GFP-CDKL5 при различной
продолжительности обработки



Фиг. 6

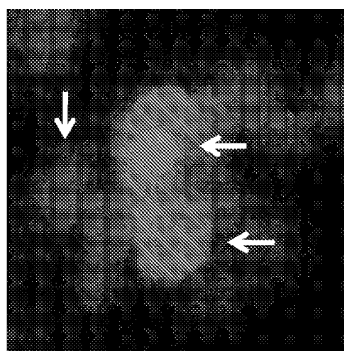
Необработанные 293Т



Фиг. 7А

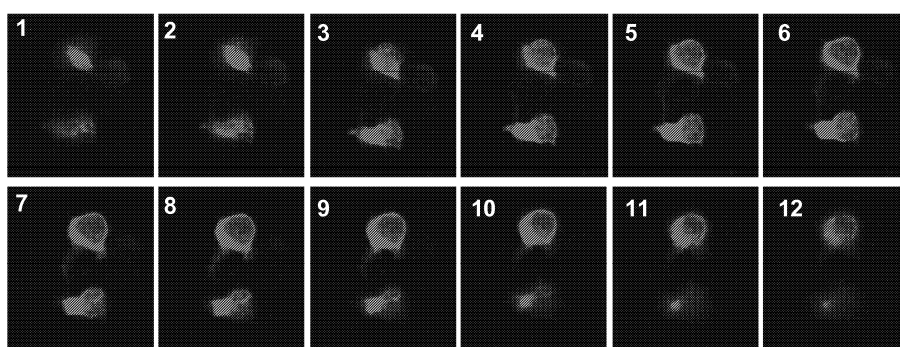
038000

293Т, обработанные с
помощью TATk-GFP-CDKL5



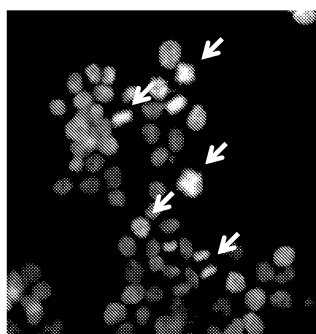
Фиг. 7В

TATk-GFP-CDKL5



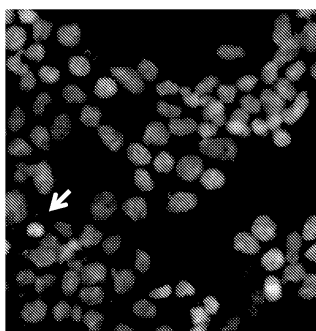
Фиг. 8

SH-SY5Y, обработанные с
помощью TATk-GFP



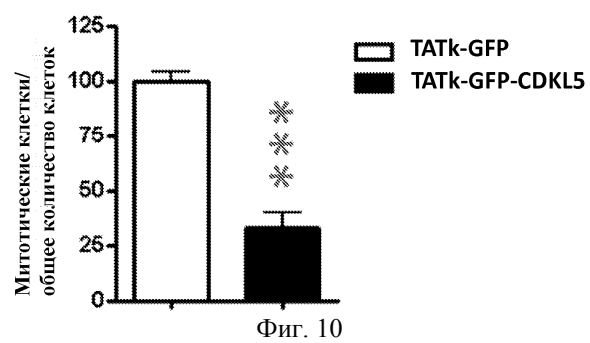
Фиг. 9А

SH-SY5Y, обработанные с
помощью TATk-GFP-CDKL5



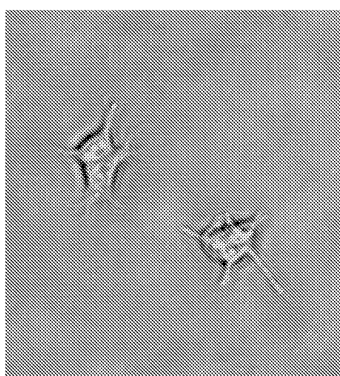
Фиг. 9В

МИТОТИЧЕСКИЙ ИНДЕКС



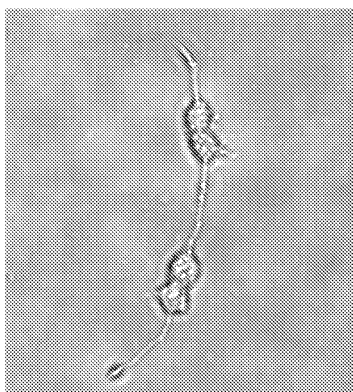
Фиг. 10

SH-SY5Y, обработанные с помощью TATk-GFP

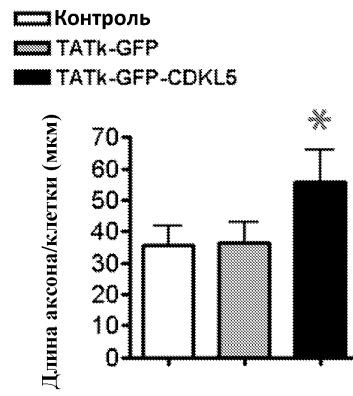


Фиг. 11А

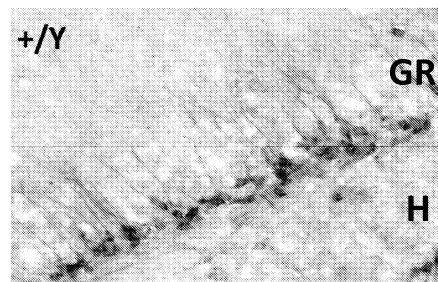
SH-SY5Y, обработанные с помощью TATk-GFP-CDKL5



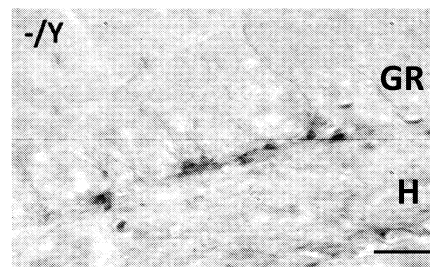
Фиг. 11В



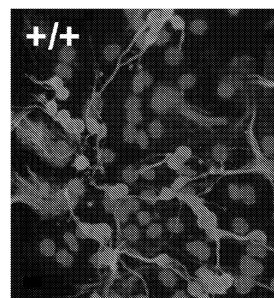
Фиг. 12



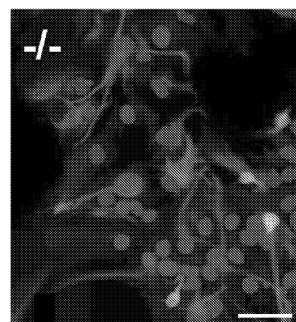
Фиг. 13А



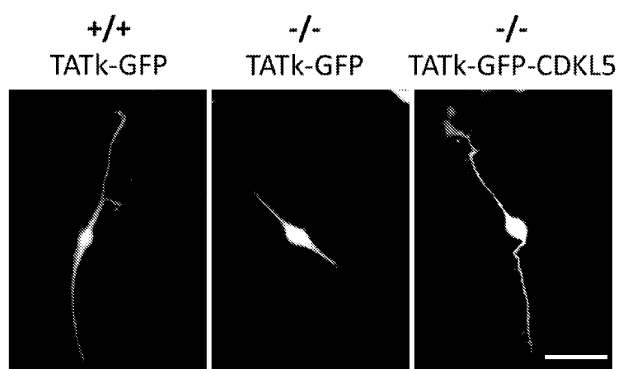
Фиг. 13В



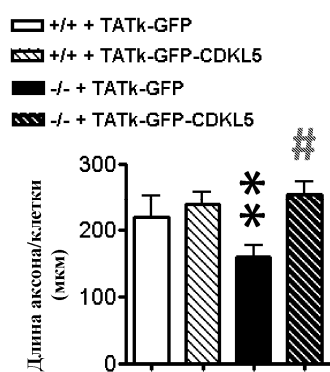
Фиг. 14А



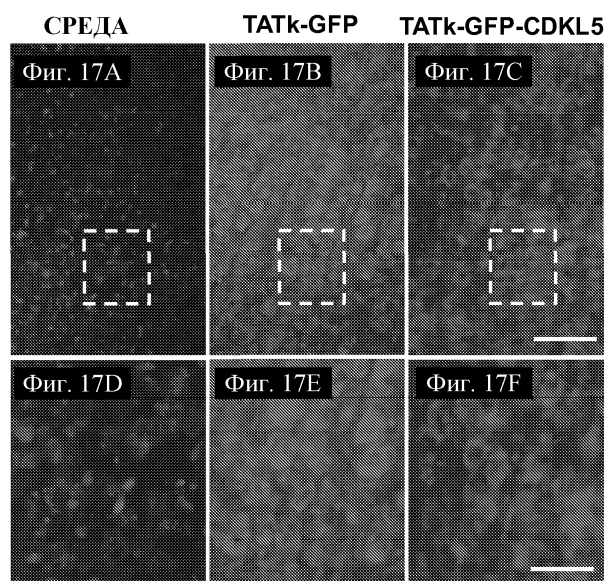
Фиг. 14В



Фиг. 15А-С

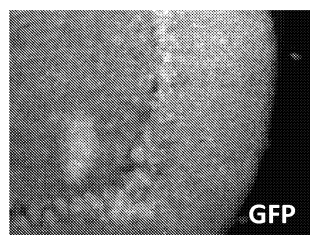


Фиг. 16

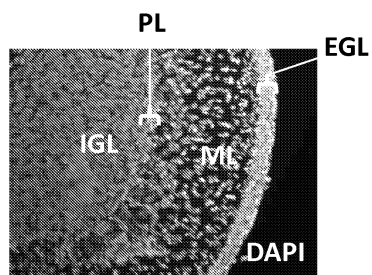


Фиг. 17А-Ф

СРЕДА

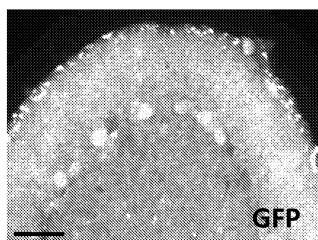


Фиг. 18А

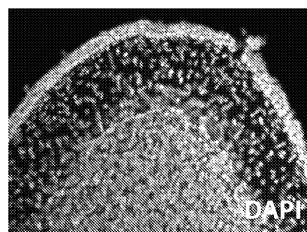


Фиг. 18B

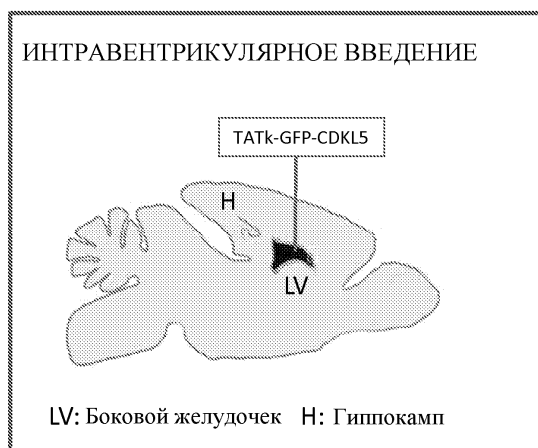
TATk-GFP-CDKL5



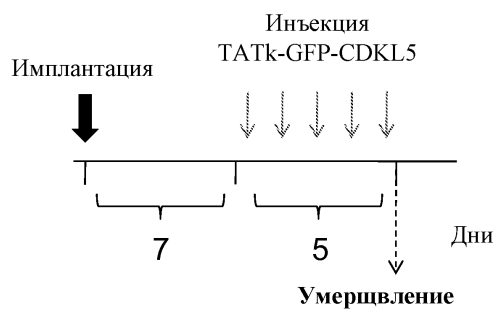
Фиг. 18C



Фиг. 18D



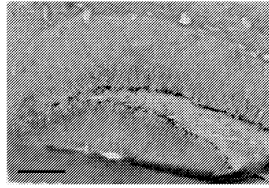
Фиг. 19



Фиг. 20

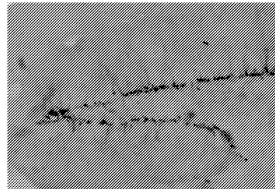
038000

+/ γ



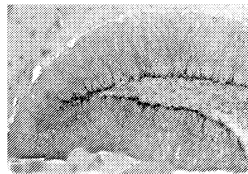
Фиг. 21А

-/ γ



Фиг. 21В

-/ γ + TAT-CDKL5

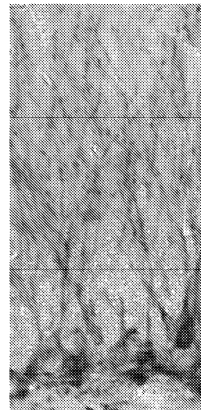
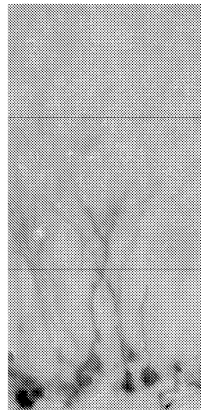
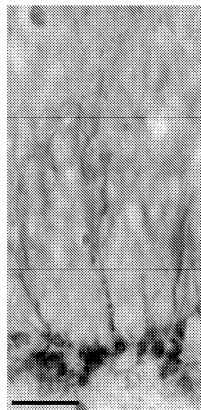


Фиг. 21С

+/ γ

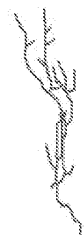
-/ γ

-/ γ + TATk-GFP-CDKL5



Фиг. 22А-С

+/ γ



Фиг. 23А

-/ γ 

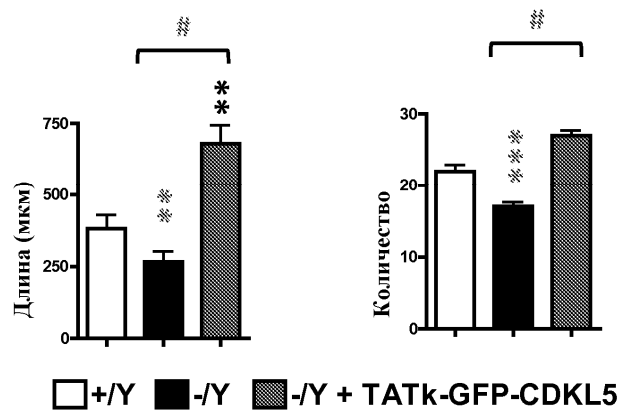
Фиг. 23В

-/ γ + TATk-GFP-CDKL5

Фиг. 23С

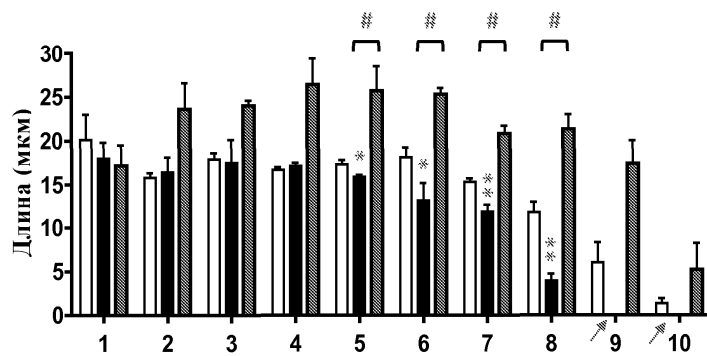
Общая длина

Количество сегментов

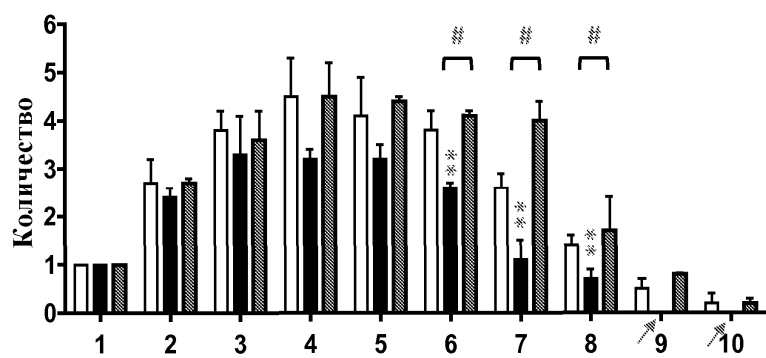


Фиг. 24А, В

□ +/γ ■ -/γ ▨ -/γ + TATk-GFP-CDKL5



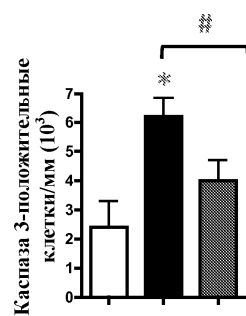
Фиг. 25А



Фиг. 25B

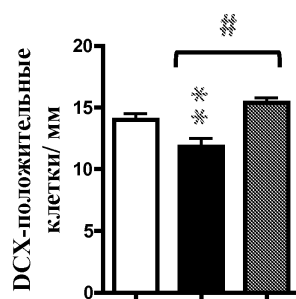
□ +/Y ■ -/Y ▨ -/Y + TATk-GFP-CDKL5

**Расщепленная каспаза
3-положительные клетки**



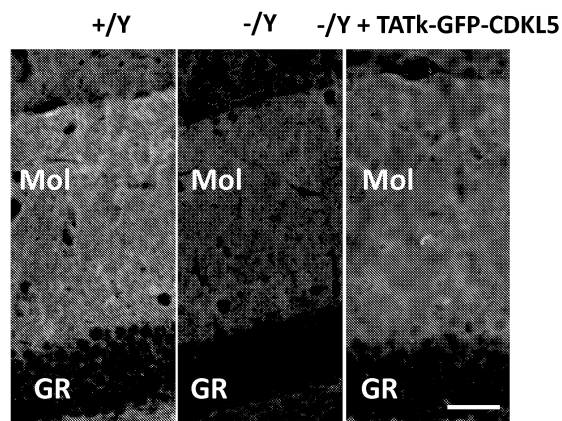
Фиг. 26

DCX-положительные клетки



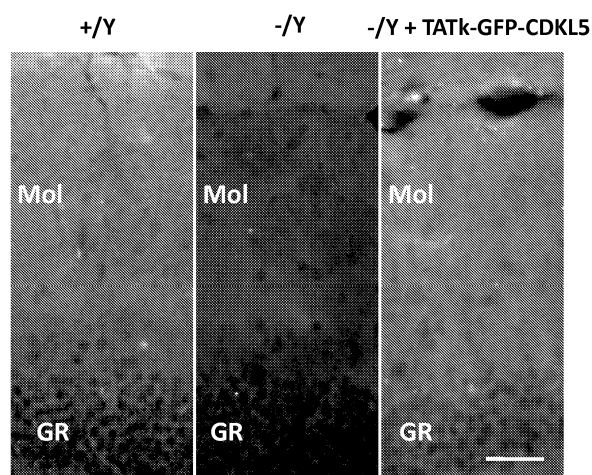
Фиг. 27

SYN



Фиг. 28А-С

P-AKT

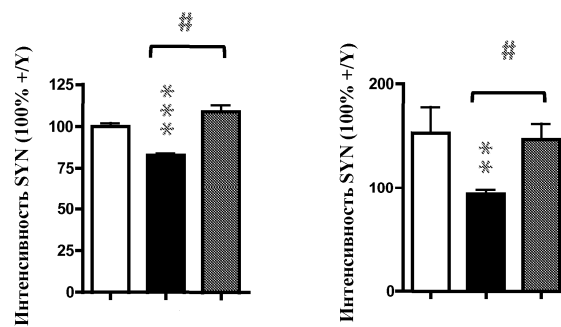


Фиг. 29А-С

□ +/Y ■ -/Y ▨ -/Y + TATk-GFP-CDKL5

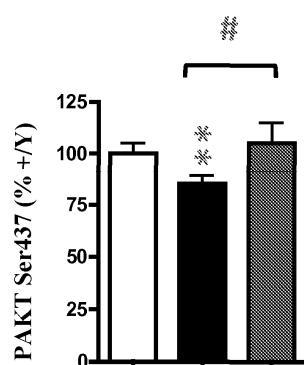
Гиппокамп (молекулярный слой)

Кора (слой III)



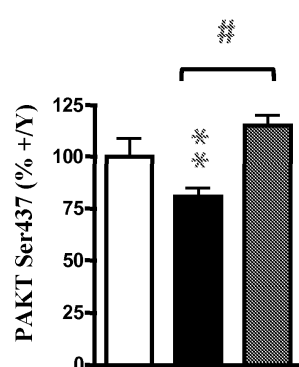
Фиг. 30А, В

Гиппокамп (молекулярный слой)

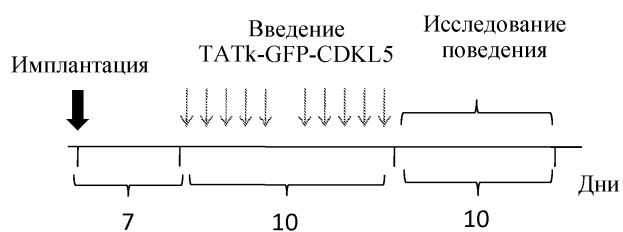


Фиг. 31А

Кора (слой V)



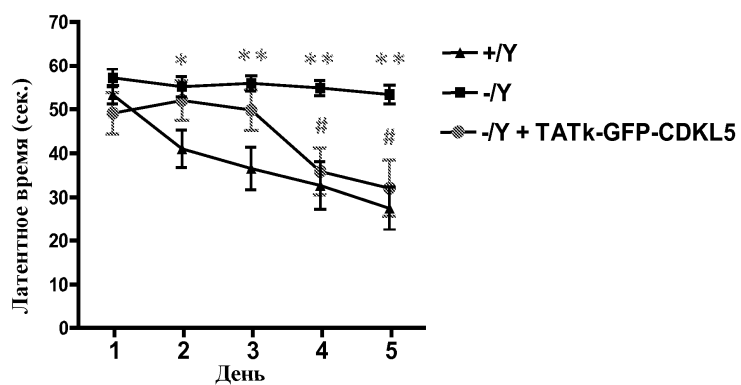
Фиг. 31В



Фиг. 32

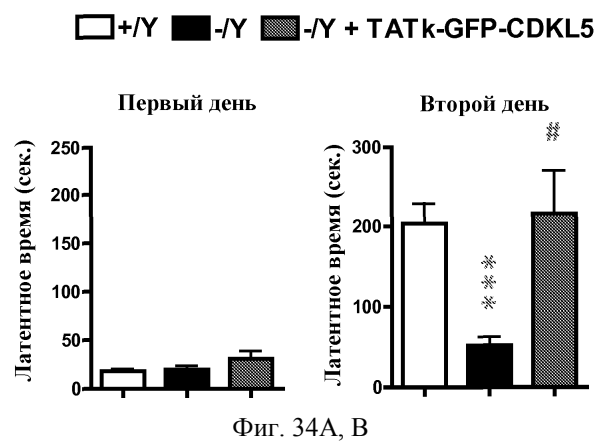
Тест в водном лабиринте Морриса

Фаза обучения

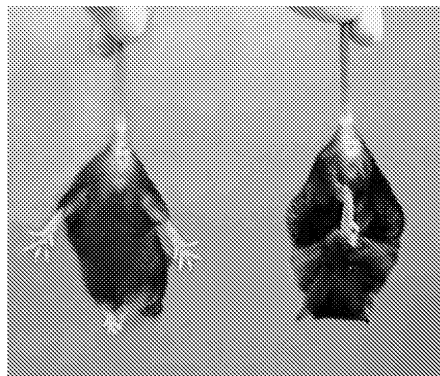
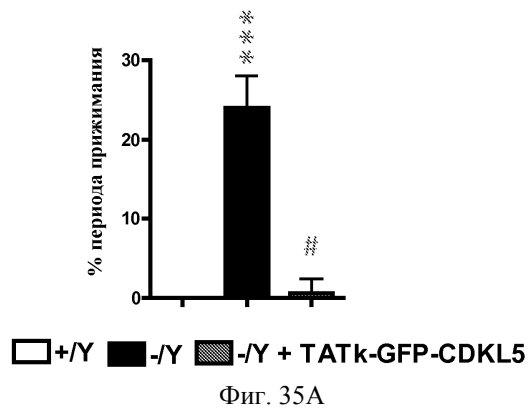


Фиг. 33

Тест пассивного избегания

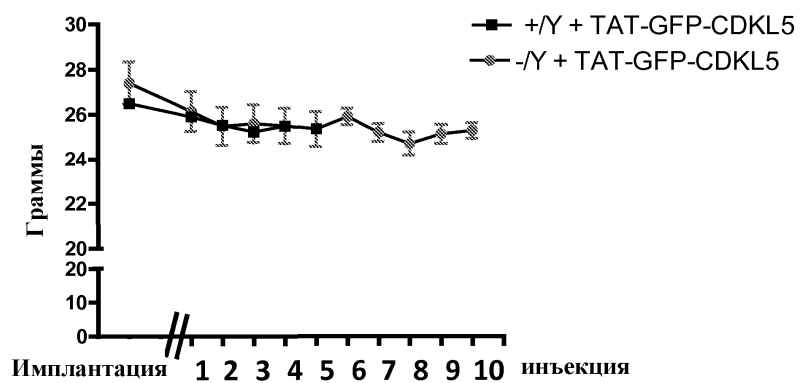


Тест прижимания конечностей



Фиг. 35В

Масса тела у экспериментальных групп



Фиг. 36

