

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202191208** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2021.08.04

(22) Дата подачи заявки
2020.03.16

(51) Int. Cl. **C12N 15/85** (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)
C12N 5/0793 (2010.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

(54) **ВЕКТОРЫ, СОДЕРЖАЩИЕ AIMP2-DX2 И ЦЕЛЕВЫЕ НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ
ДЛЯ miR-142, И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) **10-2019-0030126**

(32) **2019.03.15**

(33) **KR**

(86) **PCT/IB2020/052395**

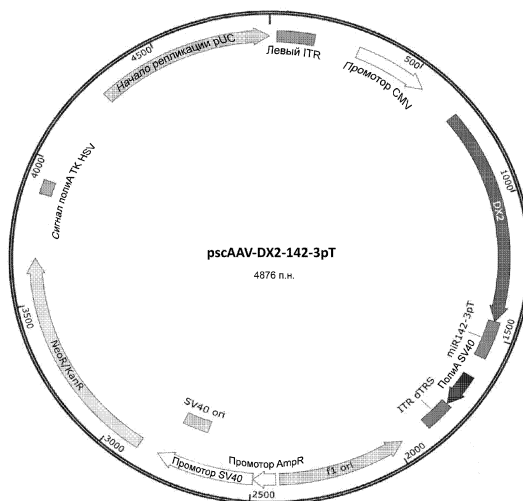
(87) **WO 2020/188472 2020.09.24**

(71) Заявитель:
ДЖЕНЕРОУТ КО., ЛТД. (KR)

(72) Изобретатель:
Чхве Чин У (KR)

(74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)

(57) Изобретение относится к рекомбинантным векторам, содержащим сплайс-вариант AIMP2 и целевую нуклеиновую кислоту для miR-142, а также к различным их применениям. Вариант AIMP2 может с пользой применяться в соответствующих отраслях, так как он может специфически экспрессироваться в нервных клетках и тканях мозга.



A1

202191208

202191208

A1

ВЕКТОРЫ, СОДЕРЖАЩИЕ AIMP2-DX2 И ЦЕЛЕВЫЕ НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ ДЛЯ miR-142, И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

Поданный в электронном виде перечень последовательностей

Содержание представленного в электронном виде перечня последовательностей в текстовом ASCII-файле (название: 2493-0003WO01-Sequence Listing_ST25.txt; размер: 6 КБ; дата создания: 16 марта 2020 г.), поданном вместе с заявкой, включено сюда путем ссылки во всей полноте.

Область техники, к которой относится изобретение

Представлены векторы, содержащие AIMP2-DX2 и целевые последовательности для miR-142, а также их применение.

Уровень техники

Головной мозг млекопитающих может выполнять сложные функции за счет установления системной нейронной сети после того, как он пройдет через ряд процессов, включая деление, дифференцировку, выживание и смерть нейрональных стволовых клеток, а также образование синапсов и т.д. Нейроны в мозге животных непрерывно вырабатывают целый ряд веществ, необходимых для роста нервов даже в их зрелом состоянии, тем самым вызывая рост аксонов и дендритов. Более того, можно сказать, что они постоянно подвергаются дифференцировке, так как происходит непрерывное синаптическая перестройка нейронной сети и синаптических связей всякий раз, когда выполняется новое обучение и запоминание. Нейроны подвергаются апоптозу, если они в процессе дифференцировки клеток и образования синапсов не могут получить от мишени такие факторы выживания, как фактор роста нервов, и апоптоз вследствие стресса и цитотоксических агентов становится главной причиной дегенеративных церебральных расстройств. При повреждении периферической нервной системы животных, в отличие от центральной нервной системы, аксоны регенерируются в течение длительного периода времени. Аксоны у основания поврежденных нервов подвергаются дегенерации под действием процесса, известного как валлеровское перерождение, и клеточное тело нерва возобновляет рост аксонов, тогда как шванновские клетки регенерируются после прохождения процесса регенерации, включая определение целевого нерва посредством выживания и отмирания после деления, а затем опять дифференцировки и т.д.

Во всем мире наблюдается тенденция к постоянному возрастанию проявлений нейродегенеративных заболеваний каждый год наряду с быстрым увеличением пожилого населения. Поскольку окончательные способы профилактики и лечения пока еще не открыты, до сих пор нет лекарства с выдающейся эффективностью при лечении таких

заболеваний. Кроме того, существующие препараты и способы лечения, используемые для таких заболеваний, зачастую проявляют побочные эффекты и токсичность при длительном применении. Более того, поскольку они дают лишь временное уменьшение степени симптомов или замедление развития симптомов, а не полное излечение заболеваний, то необходимо открыть и разработать материалы с убедительным лечебным действием при снижении при этом побочных эффектов и токсичности.

С самого начала клинических испытаний в 1990 г. и вплоть до 2002 г. было проведено около 600 клинических испытаний по генной терапии на людях. На основании полного анализа последовательности генома человека в 2003 г. будет ускоряться разработка новых методов генной терапии в будущем за счет открытия целого ряда генов. Однако 75% одобренных до сих пор методов генной терапии нацелены на моногенные заболевания типа рака, муковисцидоза и т.д., и не ведется активной разработки препаратов для генной терапии нервных заболеваний или регенерации (Recombinant DNA consultation paper of NIH, USA (2002); Gene Therapy Clinical Trials, J. Gene Med. (2002), www.wiley.co.uk/genmed). Тем не менее, уже предпринимаются попытки разработки генной терапии с использованием фактора роста нервов типа NT-3 и глиального нейротропического фактора (GDNF) для лечения и регенерации сенсорных нейронов при болезни Паркинсона (лиганды семейства GDNF активируют многие события во время роста аксонов в зрелых сенсорных нейронах: Mol. Cell. Neurosci. 25: 4453-4459 (2004)). Поскольку в целом в нейробиологических исследованиях церебральных функций в связи с нарушениями нервной системы наблюдается медленный прогресс, то разработка препаратов для лечения различных хронических заболеваний нервной системы также сталкивается с трудностями.

Известно, что AIMP2-DX2 как альтернативный сплайс-вариант AIMP2, который является супрессором опухолей, различными путями связанного с апоптозом, подавляет апоптоз путем нарушения функций AIMP2. Это происходит путем сдерживания индуцированного TNF- α апоптоза посредством опосредованного AIMP2/p38 убиквитинирования TRAF2, а AIMP2-DX2, который является сплайс-вариантом AIMP2/p38, действует как конкурентный ингибитор AIMP2, способствуя образованию опухолей путем подавления индуцированного TNF- α апоптоза за счет подавления убиквитинирования TRAF2 и подавления экспрессии Cox-2, маркера воспаления. Кроме того, сообщалось, что AIMP2-DX2 действительно является фактором, вызывающим рак легких, и в существующих исследованиях было установлено, что AIMP2-DX2, который является вариантом AIMP2, широко экспрессируется в раковых клетках и вызывает рак путем нарушения функций подавляющего рак AIMP2. Кроме того, было обнаружено, что

экспрессия AIMP2-DX2 в нормальных клетках способствует раковому перерождению клеток, тогда как подавление экспрессии AIMP2-DX2, с другой стороны, подавляет развитие рака, тем самым проявляется лечебное действие.

Также было установлено, что AIMP2-DX2 может быть полезным при лечении нервных заболеваний (KR10-2015-0140723 (2017) и US2019/0298858 (опубл. 23 октября 2019 г.)).

Сущность изобретения

Рекомбинантные векторы, содержащие последовательность, нацеленной на miR-142 типа нуклеиновых кислот мишеней для miR-142-3p и/или miR-142-5p, могут избирательно контролировать экспрессию сплайс-варианта AIMP2 в нервных тканях и тканях мозга.

В настоящем документе предусмотрены рекомбинантные векторы, содержащие ген варианта AIMP2 с делецией экзона 2 (AIMP2-DX2) и целевую нуклеиновую кислоту для miR-142.

Векторы также могут содержать промотор, функционально связанный с AIMP2-DX2. Промотор может представлять собой ретровирусный промотор (LTR), цитомегаловирусный (CMV) промотор, промотор вируса саркомы Рауса (RSV), промотор МТ, промотор α -EF-1, промотор UB6, промотор β -актина курицы, промотор CAG, промотор RPE65 или промотор опсина.

Целевая нуклеиновая кислота для miR-142 может находиться с 3'-стороны от гена AIMP2-DX2. Целевая нуклеиновая кислота для miR-142 может находиться с 5'-стороны от гена AIMP2-DX2.

Ген AIMP2-DX2 может иметь нуклеотидную последовательность, кодирующую такую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 2. Ген AIMP2-DX2 может иметь нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность по SEQ ID NO: 2.

Ген AIMP2-DX2 может иметь такую нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 1. Ген AIMP2-DX2 может иметь нуклеотидную последовательность по SEQ ID NO: 1.

Целевая нуклеиновая кислота для miR-142 может иметь нуклеотидную последовательность, содержащую ACACTA. Целевая нуклеиновая кислота для miR-142 может иметь нуклеотидную последовательность, содержащую ACACTA и 1-17 дополнительных смежных нуклеотидов по SEQ ID NO: 5.

Целевая нуклеиновая кислота для miR-142 может иметь такую нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 50% идентична нуклеотидной

последовательности по SEQ ID NO: 5 (TCCATAAAGTAGGAAACACTACA; miR-142-3p). Целевая нуклеиновая кислота для miR-142 может иметь нуклеотидную последовательность по SEQ ID NO: 5.

Целевая нуклеиновая кислота для miR-142 может иметь нуклеотидную последовательность, содержащую ACASTA. Целевая нуклеиновая кислота для miR-142 может иметь нуклеотидную последовательность, содержащую ACASTA и 1-15 дополнительных смежных нуклеотидов по SEQ ID NO: 7.

Целевая нуклеиновая кислота для miR-142 может иметь такую нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 50% идентична нуклеотидной последовательности по SEQ ID NO: 7 (AGTAGTGCTTTCTACTTTATG; miR-142-5p). Целевая нуклеиновая кислота для miR-142 может иметь нуклеотидную последовательность по SEQ ID NO: 7.

Целевая нуклеиновая кислота для miR-142 может повторяться 2-10 раз.

Вектор может быть вирусным вектором. Вирусный вектор может быть вектором из аденовируса, аденоассоциированного вируса, лентивируса, ретровируса, вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), MLV (вируса лейкемии мышей), ASLV (вируса саркомы/лейкоза птиц), SNV (вируса некроза селезенки), RSV (вируса саркомы Рауса), MMTV (вируса опухолей молочной железы мыши) или вируса простого герпеса. Вирусный вектор может быть вектором аденоассоциированного вируса (AAV), аденовируса, лентивируса, ретровируса, вируса коровьей оспы или вируса простого герпеса.

Также в настоящем документе предусмотрены способы лечения нервных заболеваний у нуждающихся в этом субъектов, включающие введение любого из описанных здесь векторов.

Нервное заболевание может представлять собой боковой амиотрофический склероз (ALS), болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, дегенерацию сетчатки, легкое когнитивное нарушение, мультиинфарктную деменцию, лобно-височную деменцию, деменцию с тельцами Леви, болезнь Хантингтона, дегенеративное нервное заболевание, метаболическое церебральное расстройство, депрессию, эпилепсию, рассеянный склероз, кортико-базальную дегенерацию, множественную системную атрофию, прогрессирующий супрануклеарный парез, дентаторубропаллидолуисную атрофию, спиноцеребеллярную атаксию, первичный боковой склероз, спинальную мышечную атрофию или инсульт. Нервное заболевание может представлять собой боковой латеральный амиотрофический склероз (ALS).

Лечение может улучшить двигательную активность или увеличить

продолжительность жизни субъекта.

Векторы можно вводить в головной или спинной мозг. Векторы можно вводить в мозг посредством стереотаксической инъекции.

Целью изобретения является получение рекомбинантного вектора, содержащего целевую последовательность для miR-142-3p.

Кроме того, изобретением предусмотрены переносчики генов, в том числе рекомбинантные векторы, содержащие целевую последовательность для miR-142-3p.

Кроме того, изобретением предусмотрен способ доставки и экспрессии гетерологичных генов в нейронах, который включает стадию введения рекомбинантного вектора субъектам.

Кроме того, изобретением предусмотрены: 1) промоторы; 2) последовательности оснований, кодирующие целевой белок, связанный с промотором для обеспечения работы; и 3) экспрессионные кассеты, содержащие последовательности оснований мишени для miR-142-3p, вставленные в 3'-UTR первой последовательности оснований.

Кроме того, изобретением предусмотрены профилактические или терапевтические препараты для нейродегенеративных заболеваний, которые включают последовательность оснований, кодирующую сплайс-вариант AIMP-2 с делецией экзона 2, и последовательность оснований мишени для miR-142-3p, связанную с 3'-UTR первой последовательности оснований.

Для осуществления вышеуказанных целей изобретением предусмотрены рекомбинантные векторы, содержащие целевую последовательность для miR-142-3p.

Кроме того, изобретением предусмотрены переносчики генов, в том числе рекомбинантные векторы, содержащие целевую последовательность для miR-142-3p.

Кроме того, изобретением предусмотрен способ доставки и экспрессии гетерологичных генов в нейронах, который включает стадию введения рекомбинантного вектора субъектам.

Кроме того, изобретением предусмотрены: 1) промоторы; 2) последовательности оснований, кодирующие целевой белок, связанный с промотором для обеспечения работы; и 3) экспрессионные кассеты, содержащие последовательности оснований мишени для miR-142-3p, вставленные в 3'-UTR первой последовательности оснований.

Кроме того, изобретением предусмотрены препараты для профилактики или терапии нейродегенеративных заболеваний, которые включают последовательность оснований, кодирующую сплайс-вариант AIMP-2 с делецией экзона 2, и последовательность оснований мишени для miR-142-3p, связанную с 3'-UTR первой последовательности оснований.

Рекомбинантные векторы по изобретению обладают эффектом контролирования побочных эффектов гиперэкспрессии сплайс-варианта AIMP2 в опухолях путем введения miR-142-3p в целевую последовательность на терминальном конце AIMP2 и контролировать подавление его экспрессии в продуцирующих CD45 клетках, в частности, в клетках лимфатической системы и лейкоцитах. Следовательно, они могут с пользой применяться в данной области, так как сплайс-вариант AIMP2 может специфически экспрессироваться только в нейронах и избирательно экспрессируется только в тканях мозга среди различных тканей организма.

Краткое описание фигур

На фиг. 1 представлен рекомбинантный вектор по изобретению.

На фиг. 2 представлен эффект специфичной для нервных клеток экспрессии рекомбинантного вектора по изобретению в условиях *in vitro*.

На фиг. 3 представлен эффект специфичной для нервных клеток экспрессии рекомбинантного вектора по изобретению в условиях *in vivo*.

На фиг. 4 представлена последовательность miR142-3pT (целевая) с 4-мя повторами miR142-3pT (подчеркнуты).

На фиг. 5А представлена схема miR142-3pT с 1, 2 и 3-мя повторами и мутанта. На фиг. 5В представлено ингибирование miR142-3p экспрессии DX2 при 1, 2 и 3-х повторах miR-142-3pT.

На фиг. 6 показано, что для ингибирования DX2 важна основная последовательность связывания. В качестве контроля использовали вектор с 3-мя повторами Tseq, который проявлял значительное ингибирование DX2 (фиг. 5В), и конструкцию с DX2. Обработка 100 пмоль miR-142-3p существенно ингибировала вектор с 3-мя Tseq, но DX2 и мутантная последовательность не ингибировались.

На фиг. 7 представлена суммарная РНК, экстрагированная из спинного мозга после интратекальной инъекции scAAV2-DX2-miR142-3p. Проводили qRT-PCR.

На фиг. 8 представлен эффект специфичной для нервных клеток экспрессии экспрессирующего вектора по изобретению в условиях *in vitro*.

Раскрытие сущности изобретения

AIMP2-DX2 является альтернативным сплайс-вариантом AIMP2 – супрессора опухолей, связанного с апоптозом. Известно, что AIMP2-DX2 ингибирует апоптоз опухолей путем подавления функции AIMP2.

В KR 10-1067816 (2011) описано, что ингибитором AIMP2-DX2 можно лечить воспалительные заболевания. В KR 10-1067816 (2011) также описано, что AIMP2/p38 усиливает убиквитинирование TRAF2 для регуляции индуцированного TNF- α апоптоза, а

AIMP2-DX2, сплайс-вариант AIMP2/p38, служит конкурентным ингибитором AIMP2, ингибируя убиквитинирование TRAF2 и при этом ингибируя индуцированный TNF- α апоптоз, тем самым способствуя образованию опухолей и ингибированию экспрессии Cox-2, маркера воспаления.

Кроме того, AIMP2-DX2 ранее был идентифицирован как фактор, вызывающий рак легких. В этом исследовании оказалось, что AIMP2-DX2, который является вариантом AIMP2, часто встречается в раковых клетках и нарушает ингибирующую рак функцию AIMP2, тем самым вызывая рак. Также оказалось, что экспрессия AIMP2-DX2 в нормальных клетках ведет к раковому перерождению клеток, тогда как ингибирование экспрессии AIMP2-DX2 подавляет рост раковых клеток, что дает эффект лечения рака. Также это исследование показало на модели у животных, что ингибирование мишеней AIMP2-DX2 может привести к лечению рака яичников, не поддающегося лечению обычными противораковыми препаратами типа таксола и цисплатина. Однако сам AIMP2-DX2 не обладает онкогенной способностью трансформировать нормальные клетки.

Также было установлено, что с помощью AIMP2-DX2 можно лечить нервные заболевания (US2019/0298858 A1).

В настоящем документе предусмотрены рекомбинантные векторы, содержащие ген варианта AIMP2 с делецией экзона 2 (AIMP2-DX2) и целевую нуклеиновую кислоту для miR-142. Описанные здесь векторы могут специфически экспрессировать DX2 в нервных клетках, но не в гемопоэтических клетках, таких как лейкоциты и лимфоидные клетки. Таким образом, описанные здесь векторы могут быть полезными для специфического воздействия на нервные клетки при лечении нервных заболеваний.

Полипептид AIMP2-DX2 (SEQ ID NO: 2) является сплайс-вариантом AIMP2 (SEQ ID NO: 3), в котором отсутствует второй экзон (SEQ ID NO: 4) AIMP2. В частности, ген AIMP2-DX2 имеет последовательность оснований, приведенную в SEQ ID NO: 1, а полипептид AIMP2-DX2 имеет аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2.

В некоторых воплощениях ген AIMP2-DX2 может иметь нуклеотидную последовательность, кодирующую такую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, на 93%, на 95%, на 96%, на 97%, на 98%, на 99% идентична SEQ ID NO: 2 или в любом диапазоне или на любой % идентична ей. Ген AIMP2-DX2 может иметь нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность.

Ген AIMP2-DX2 может иметь такую нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, на 93%, на 95%, на 96%, на 97%, на 98%, на 99% идентична

нуклеотидной последовательности SEQ ID NO: 1 или в любом диапазоне или на любой % идентична ей. Ген AIMP2-DX2 может иметь нуклеотидную последовательность по SEQ ID NO: 1.

Целевая нуклеиновая кислота для miR-142 может иметь нуклеотидную последовательность, содержащую АСАСТА. Целевая нуклеиновая кислота для miR-142 может иметь нуклеотидную последовательность, содержащую АСАСТА и 1-17 дополнительных смежных нуклеотидов по SEQ ID NO: 5. Например, нуклеиновая кислота мишени для miR-142 может иметь нуклеотидную последовательность, содержащую АСАСТА и всего 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 или 17 дополнительных нуклеотидов, примыкающих с 5'- или 3'-стороны к АСАСТА, как показано в SEQ ID NO: 5.

Целевая нуклеиновая кислота для miR-142 может иметь такую нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 50%, на 60%, на 70%, на 80%, на 90% или на 95% идентична нуклеотидной последовательности по SEQ ID NO: 5 (TCCATAAAGTAGGAAACACTACA; miR-142-3p). Целевая нуклеиновая кислота для miR-142 может иметь нуклеотидную последовательность по SEQ ID NO: 5.

Целевая нуклеиновая кислота для miR-142 может иметь нуклеотидную последовательность, содержащую АСТТТА. Целевая нуклеиновая кислота для miR-142 может иметь нуклеотидную последовательность, содержащую АСТТТА и 1-15 дополнительных смежных нуклеотидов по SEQ ID NO: 7. Например, целевая нуклеиновая кислота для miR-142 может иметь нуклеотидную последовательность, содержащую АСАСТА и всего 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 дополнительных нуклеотидов, примыкающих с 5'- или 3'-стороны к АСАСТА, как показано в SEQ ID NO: 7.

Целевая нуклеиновая кислота для miR-142 может иметь такую нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 50%, на 60%, на 70%, на 80%, на 90% или на 95% идентична нуклеотидной последовательности по SEQ ID NO: 7 (AGTAGTGCTTTCTACTTTATG; miR-142-5p). Целевая нуклеиновая кислота для miR-142 может иметь нуклеотидную последовательность по SEQ ID NO: 7.

МикроРНК (миРНК) представляет собой некодирующую молекулу РНК, которая служит для контроля экспрессии генов. миРНК действует посредством спаривания оснований с комплементарными последовательностями в молекулах мРНК. миРНК может связываться с транскриптами целевой матричной РНК (мРНК) генов, кодирующих белки, и отрицательно контролировать их трансляцию или вызывать деградацию мРНК. В настоящее время идентифицировано более 2000 миРНК человека, а базы данных miRbase

общедоступны. Многие миРНК экспрессируются тканеспецифичным образом и играют важную роль в поддержании тканеспецифичных функций и дифференцировки.

Здесь предусмотрены рекомбинантные векторы, которые могут контролировать побочные эффекты гиперэкспрессии варианта AIMP2-DX2 в опухолях путем введения miR-142-3p и/или miR-142-5p в целевую последовательность на терминальном конце AIMP2-DX2 и контролировать подавление экспрессии AIMP2-DX2 в производящих CD45 клетках, в частности, клетках лимфатической системы и лейкоцитах. Таким образом, вариант AIMP2-DX2 может экспрессироваться только в нервных клетках или избирательно экспрессироваться в тканях мозга, но не в других типах клеток или тканей.

Изобретением предусмотрены рекомбинантные векторы, содержащие последовательности мишени для miR-142-3p и/или miR-142-5p. Предусмотрены рекомбинантные векторы, содержащие ген варианта AIMP2 с делецией экзона 2 (AIMP2-DX2) и нуклеиновые кислоты мишени для miR-142-3p и/или miR-142-5p.

Термин “рекомбинантный вектор” относится к векторам, которые могут экспрессироваться в виде целевого белка или РНК в соответствующих клетках хозяина, и к генным конструкциям, содержащим необходимый функционально связанный фактор контроля, позволяющий встроенному гену экспрессироваться надлежащим образом.

Термин “функционально связанный” относится к функциональной связи между контролирующей экспрессию последовательностью нуклеиновой кислоты и последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей целевой белок и РНК для выполнения общих функций. Например, это может означать экспрессию последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей промотор и белок или РНК, которые были связаны для обеспечения работоспособности последовательности нуклеиновой кислоты. Функциональная связь с рекомбинантным вектором может быть образована по технологии рекомбинантных генов, которая хорошо известна в соответствующей области техники, с использованием общеизвестных ферментов в соответствующей области для разрезания и соединения ДНК на конкретных участках.

Рекомбинантные векторы могут дополнительно содержать промотор, функционально связанный с AIMP2-DX2. В некоторых воплощениях промотор представляет собой ретровирусный промотор (LTR), цитомегаловирусный (CMV) промотор, промотор вируса саркомы Рауса (RSV), промотор МТ, промотор α -EF-1, промотор UB6, промотор β -актина курицы, промотор CAG, промотор RPE65 или промотор опсина.

Термин “микроРНК (миРНК)” означает неcodирующую молекулу РНК, состоящую из 20, 21, 22, 23 или 24 нуклеотидов и играющую роль в контроле экспрессии

генов. миРНК действует на стадии после транскрипции гена, причем в случае млекопитающих известно, что примерно 60% экспрессии генов контролируется миРНК. миРНК играет важную роль в целом ряде процессов в живом организме, причем оказалось, что она имеет корреляции с раком, сердечными заболеваниями и нервными расстройствами. миРНК представляет собой одноцепочечную РНК, а целевые последовательности для миРНК можно использовать, только если они могут подавлять экспрессию целевого гена среди двухцепочечной незрелой РНК. Например, miR-142 существует в виде miR-142-3p и miR-142-5p, причем любые из нуклеиновых кислот для их мишеней можно использовать в изобретении. “miR-142” означает как miR-142-3p, так и miR-142-5p, а перед почтительно это miR-142-3p.

Целевая нуклеиновая кислота для miR-142 может находиться с 5'- или 3'-стороны от гена AIMP2-DX2.

“miR-142-3p” может находиться там, где происходит транслокация его гена при агрессивной В-клеточной лейкемии, и экспрессируется в гемопоэтических тканях (костном мозге, селезенке, тимусе и т.д.). Кроме того, известно, что miR-142-3p участвует в дифференцировке гемопоэтической системы с подтвержденной экспрессией в печени эмбрионов мыши (гемопоэтической ткани мыши).

В некоторых воплощениях целевая нуклеиновая кислота для miR-142-3p и/или miR-142-5p повторяется по меньшей мере 2-10 раз, по меньшей мере 2-8 раз, по меньшей мере 2-6 раз, по меньшей мере 4 раза или в любых пределах или количество раз.

В качестве примера выполнения изобретения miR-142-3p может содержать указанную последовательность оснований, которая повторяется 3 раза. Кроме того, последовательность оснований мишени для miR-142-3p, которая комплементарно связывается с miR-142-3p, может повторяться 4 раза. Последовательность оснований мишени для miR-142-3p по изобретению, содержащая комплементарную последовательность, повторяется 5 раз, но не ограничивается этим.

Рекомбинантный вектор может дополнительно содержать гетерологичный промотор и гетерологичный ген, функционально связанный с промотором.

“Гетерологичный ген” в изобретении может включать белок или полипептид с биологически подходящей активностью, последовательность, кодирующую целевой продукт типа иммуногена либо антигенного белка или полипептида, или же белок или полипептид для активации лечения.

Полипептиды могут восполнять недостаточность или отсутствие экспрессии эндогенного белка в клетках хозяина. Последовательность гена может быть получена из различных источников, включая ДНК, кДНК, синтезированную ДНК, РНК или их

комбинации. Последовательность гена может включать геномную ДНК, содержащую или не содержащую природный интрон. Кроме того, геномная ДНК может быть получена вместе с последовательностью промотора или последовательностью полиаденилирования. Геномную ДНК или кДНК можно получить различными способами. Геномную ДНК можно выделить и очистить из соответствующих клеток методом, общеизвестным в соответствующей области. А после выделения из клеток можно использовать мРНК для получения кДНК методом обратной транскрипции или другим методом. Или же последовательность полинуклеотида может содержать последовательность, комплементарную последовательности РНК, например, антисмысловую последовательность РНК, а антисмысловую РНК можно вводить индивидам для подавления экспрессии комплементарного полинуклеотида в клетках индивида.

Согласно целям изобретения, гетерологичный ген представлен сплайс-вариантом AIMP-2 с делецией экзона 2, а целевая последовательность для miR-142-3p по изобретению может быть связана с 3'-UTR гетерологичного гена. Последовательность белка AIMP2 (версия с 312 а.к.: AAC50391.1 или GI 1215669; версия с 320 а.к.: AAN 13630.1, GI 15489023, BC0 13630.1) описана в литературе (версия с 312 а.к.: Nicolaides N.C., Kinzler K.W. and Vogelstein B. Analysis of the 5' region of PMS2 reveals heterogeneous transcripts and a novel overlapping gene. *Genomics* 29(2), 329-334 (1995); версия с 320 а.к.: Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 (26), 16899-16903 (2002)).

Термин “сплайс-вариант AIMP-2” по изобретению относится к варианту, полученному вследствие частичной или полной потери экзона 2 среди экзонов 1-4. Такой вариант означает ухудшение нормальной функции AIMP2 при образовании белка и гетеродимера AIMP2. Кроме того, при гиперэкспрессии сплайс-варианта AIMP2 в клетках или тканях может индуцироваться рак. Следовательно, необходимо индуцировать тканеспецифичную экспрессию, чтобы подавить возникновение рака.

Рекомбинантный вектор по изобретению может включать в себя SEQ ID NO: 1 и 5.

Термин “% гомологии последовательности”, “% идентичности” или “на % идентична” для нуклеотидной или аминокислотной последовательности может относиться, напр., к сравнению 2 оптимально совмещенных в области сравнения последовательностей, причем некоторые последовательности оснований в домене сравнения могут включать вставки или делеции (то есть пробелы) по сравнению с эталонной последовательностью при оптимальном совмещении 2 последовательностей (исключая вставки или делеции).

Белки по изобретению включают не только белки с аминокислотной

последовательностью природного типа, но в рамках изобретения также находятся белки с вариантами аминокислотной последовательности.

Вариант белка по изобретению означает белок, последовательность которого отличается из-за делеции, вставки, неконсервативной или консервативной замены либо их комбинаций от природной аминокислотной последовательности более чем по 1 аминокислотному остатку. Замены аминокислот в белках и пептидах, которые не изменяют активность молекулы в целом, известны в данной области (H. Neurath, R.L. Hill. *The Proteins*. Academic Press, New York, 1979).

Белок или его вариант можно получить путем естественного выделения или синтеза (Merrifield, J. *Amer. Chem. Soc.* 85: 2149-2156, 1963) или методом рекомбинации генов на основе последовательности ДНК (Sambrook et al., *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA, 2nd Ed., 1989).

Замены аминокислот проводятся на основе относительного сходства заместителей боковой цепи аминокислоты, например, по гидрофильности, гидрофобности, электрическому заряду, размеру и т.п. В соответствии с анализом по размеру, форме и типу заместителей боковых цепей аминокислот можно отметить, что аргинин, лизин и гистидин дают остатки с положительным зарядом; аланин, глицин и серин имеют близкие размеры; фенилаланин, триптофан и тирозин имеют близкие формы. Следовательно, исходя из таких соображений, аргинин, лизин и гистидин; аланин, глицин и серин; фенилаланин, триптофан и тирозин можно считать функциональными эквивалентами с биологической точки зрения.

При введении одной или нескольких замен можно учитывать гидрофобный индекс аминокислоты. Каждой аминокислоте присваивается гидрофобный индекс в соответствии с гидрофобностью и зарядом: изолейцин (+4,5); валин (+4,2); лейцин (+3,8); фенилаланин (+2,8); цистеин (+2,5); метионин (+1,9); аланин (+1,8); глицин (-0,4); треонин (-0,7); серин (-0,8); триптофан (-0,9); тирозин (-1,3); пролин (-1,6); гистидин (-3,2); глутамат (-3,5); глутамин (-3,5); аспартат (-3,5); аспарагин (-3,5); лизин (-3,9); и аргинин (-4,5).

При определении интерактивной биологической функции белка очень важен гидрофобный индекс аминокислот. Хорошо известно, что близкая биологическая активность возможна только при замене на аминокислоты с аналогичным гидрофобным индексом. При введении замен согласно индексу гидрофобности проводятся замены между аминокислотами с отличиями по гидрофобному индексу предпочтительно в пределах ± 2 , более предпочтительно в пределах ± 1 и еще более предпочтительно в пределах $\pm 0,5$.

Между тем, также хорошо известно, что белки с эквивалентной биологической

активностью образуются при замене аминокислот с близкими значениями гидрофильности. Как указано в USA Patent No. 4,554,101, каждому из аминокислотных остатков присвоены следующие значения гидрофильности: аргинин (+3,0); лизин (+3,0); аспаргат (+3,0 $\pm$ 1); глутамат (+3,0 $\pm$ 1); серин (+0,3); аспарагин (+0,2); глутамин (+0,2); глицин (0); треонин (-0,4); пролин (-0,5 $\pm$ 1); аланин (-0,5); гистидин (-0,5); цистеин (-1,0); метионин (-1,3); валин (-1,5); лейцин (-1,8); изолейцин (-1,8); тирозин (-2,3); фенилаланин (-2,5); триптофан (-3,4).

При введении одной или нескольких замен согласно значениям гидрофильности проводятся замены между аминокислотами с отличиями по значениям гидрофильности предпочтительно в пределах ± 2 , более предпочтительно в пределах ± 1 и еще более предпочтительно в пределах $\pm 0,5$.

Замены аминокислот в белках, которые не изменяют активность молекулы в целом, известны в данной области (H. Neurath, R.L. Hill. *The Proteins*. Academic Press, New York, 1979). Самыми распространенными заменами являются замены между аминокислотными остатками Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thy/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu и Asp/Gly. Векторные системы изобретения можно конструировать различными методами, известными в данной области. Конкретные методы описаны в Sambrook et al. (2001) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, и данная статья указана в качестве эталона в настоящем описании.

Векторы по изобретению можно конструировать как типичные векторы для клонирования или для экспрессии. Кроме того, векторы по изобретению можно конструировать для прокариотических или эукариотических клеток в качестве хозяина. Если вектор по изобретению является вектором для экспрессии, а в качестве хозяина используются прокариотические клетки, то обычно включают и сильный промотор для выполнения транскрипции (например, промотор *tac*, промотор *lac*, промотор *lacUV5*, промотор *lpp*, промотор *pLX*, промотор *pRX*, промотор *gac5*, промотор *amp*, промотор *gcsA*, промотор *SP6*, промотор *trp*, промотор *T7* и т.п.), сайт связывания с рибосомой для запуска транскрипции и последовательность терминации транскрипции. При использовании *E. coli* (напр., HB101, BL21, DH5a и т.п.) в качестве клеток хозяина можно использовать промотор и сайт оператора пути биосинтеза триптофана в *E. coli* (Yanofsky C. (1984) *J. Bacteriol.*, 158: 1018-1024) или левонаправленный промотор фага X (промотор *pLX*, Herskowitz I. and Hagen D. (1980) *Ann. Rev. Genet.*, 14: 399-445) в качестве контролирующего сайта.

Между тем, векторы, которые можно использовать в изобретении, могут быть

выбраны из группы, состоящей из вирусных векторов, линейной ДНК и плазмидной ДНК.

“Вирусный вектор” в изобретении означает вирусный вектор, способный доставлять ген или генетический материал к желательным клеткам, тканям и/или органам.

Вирусные векторы могут быть выбраны из группы, состоящей из аденовирусов, аденоассоциированных вирусов, лентивирусов, ретровирусов, ВИЧ (вируса иммунодефицита человека), MLV (вируса лейкемии мышей), ASLV (вируса саркомы/лейкоза птиц), SNV (вируса некроза селезенки), RSV (вируса саркомы Рауса), MMTV (вируса опухолей молочной железы мышей) и вируса простого герпеса, без ограничения. В некоторых воплощениях вирусный вектор может быть вектором из аденоассоциированного вируса (AAV), аденовируса, лентивируса, ретровируса, вируса коровьей оспы или вируса простого герпеса.

Хотя ретровирусы обладают способностью встраиваться в геном клеток хозяина и безвредны для человеческого организма, они имеют такие характеристики, как подавление функций нормальных клеток во время встраивания и способность инфицировать широкий спектр клеток, легкость пролиферации, вмещаются примерно 1-7 т.п.н. внешнего гена и образуются дефектные по репликации вирусы. Однако ретровирусы имеют и недостатки, в том числе трудности с инфицированием клеток после митотического деления и с доставкой генов в условиях *in vivo*, а также потребность в пролиферации соматических клеток в условиях *in vitro*. Кроме того, ретровирусы подвержены риску внезапной мутации, так как они могут встраиваться в протоонкогены, тем самым представляя возможность для некроза клеток.

В то же время аденовирусы имеют различные преимущества в качестве клонирующего вектора, включая репликацию даже в ядре клеток среднего размера, они клинически нетоксичны, стабильны даже при вставке внешнего гена, нет перестройки или потери генов, трансформацию эукариотических организмов и стабильные процессы экспрессии на высоком уровне даже при встраивании в хромосомы клеток хозяина. Хорошие клетки-хозяева для аденовирусов – клетки, вызывающие гемопозитические, лимфатические заболевания и миеломы у человека. Однако пролиферация затруднена, так как это линейная ДНК, и трудно выделить инфицирующий вирус при низком уровне заражения вирусом. Кроме того, экспрессия введенного гена наиболее интенсивна в течение 1-2 недель, причем экспрессия сохраняется в течение 3-4 недель только в некоторых клетках. Другая проблема заключается в том, что они сильно иммуногенны.

В последние годы предпочтение отдается аденоассоциированным вирусам (AAV), так как они могут восполнять вышеупомянутые проблемы и имеют множество преимуществ в качестве средства генной терапии. Их также называют аденосателлитными

вирусами. Диаметр частиц аденоассоциированных вирусов составляет 20 нм, причем они практически не оказывают вреда организму человека. Поэтому была одобрена их продажа в качестве средства генной терапии в Европе.

AAV является одноцепочечным провирусом, которому нужен вспомогательный вирус для репликации, а геном AAV составляет 4680 п.н. и может быть вставлен в определенную область хромосомы 19 инфицируемых клеток. Трансген вставляется в плазмидную ДНК вместе с отрезком последовательности с 2 инвертированными концевыми повторами (ITR) по 145 п.н. и участком сигнальной последовательности. Трансфекция проводится вместе с другой плазмидной ДНК, экспрессирующей участки гер и сар AAV, и добавляется аденовирус в качестве вспомогательного вируса. Преимущества AAV заключаются в широком спектре клеток хозяина, куда вводятся гены, небольшом числе иммунологических побочных эффектах при повторном введении и длительном периоде экспрессии генов. Кроме того, они безопасны, даже если геном AAV встраивается в хромосомы клеток хозяина, но не изменяет и не перестраивает экспрессию генов хозяина.

Аденоассоциированные вирусы имеют всего 4 серотипа. Среди серотипов многих аденоассоциированных вирусов, которые могут применяться для доставки целевых генов, наиболее изученным вектором является аденоассоциированный вирус серотипа 2, который в настоящее время применяется для доставки клинических генов муковисцидоза, гемофилии и болезни Канавана. Кроме того, в последнее время возрастает потенциал рекомбинантных аденоассоциированных вирусов (гAAV) в области генной терапии рака [4]. Именно аденоассоциированный вирус серотипа 2 используется в изобретении. Хотя можно выбрать и применять другой подходящий вирусный вектор, не ограничиваясь этим.

Кроме того, если вектор по изобретению является экспрессирующим вектором, а в качестве хозяина используются эукариотические клетки, то можно использовать промотор, происходящий из генома клеток млекопитающих (пример: промотор металлотионеина), или промотор, происходящий из вируса млекопитающих (примеры: поздний аденовирусный промотор, промотор 7.5K вируса корьей оспы, промотор SV40, промотор цитомегаловируса и промотор ТК HSV). В частности, он может быть выбран из группы, состоящей из промоторов, выбранных из группы, состоящей из LTR ретровируса, промотора цитомегаловируса (CMV), промотора вируса саркомы Рауса (RSV), промотора МТ, промотора α -EF-1, промотора UB6, промотора β -актина курицы, промотора CAG, промотора RPE65 и промотора опсина, без ограничения. Кроме того, обычно он содержит и последовательность полиаденилирования в качестве последовательности терминации

транскрипции.

Векторы по изобретению могут быть слиты с другими последовательностями, если это нужно, чтобы облегчить очистку белка. Можно использовать, к примеру, такие слитые последовательности, как глутатион-S-трансфераза (Pharmacia, USA), белок, связывающий мальтозу (NEB, USA), FLAG (IBI, USA) и 6xHis (гексагистидин; Quiagen, USA), без ограничения. Кроме того, экспрессирующие векторы по изобретению могут включать гены устойчивости к антибиотикам, которые обычно используются в данной области в качестве отборочных маркеров, включая, к примеру, ампициллин, гентамицин, карбенициллин, хлорамфеникол, стрептомицин, канамицин, генетицин, неомицин и тетрациклин.

Кроме того, изобретением предусмотрены переносчики генов, в том числе рекомбинантные векторы, содержащие целевую последовательность для miR-142 типа miR-142-3p и/или miR-142-5p.

Термин “перенос генов” в изобретении включает доставку генетического материала в клетки для транскрипции и экспрессии в целом. Этот метод идеален для экспрессии белка и лечебных целей. Известен целый ряд методов доставки типа трансфекции ДНК и трансдукции вирусов. Это означает опосредованный вирусом перенос генов с возможностью наведения на конкретные рецепторы и/или типы клеток за счет высокой эффективности доставки и высокого уровня экспрессии введенных генов, а также, при необходимости, экологичности или псевдотипирования.

Переносчиками генов могут быть трансформированные объекты, которыми были трансформированы рекомбинантные векторы по изобретению, а трансформация включает все методы введения нуклеиновой кислоты в органические объекты, клетки, ткани или органы, и, как известно в данной области, их можно выбрать и в соответствии с клетками хозяина выполнить соответствующую стандартную технологию. Такие методы включают электропорацию, слияние протоплазмы, осаждение фосфатом кальция (CaPO_4), осаждение хлоридом кальция (CaCl_2), смешивание с помощью кремнийорганического волокна, опосредованную агрибактериями трансформацию, ПЭГ, сульфат декстрана, липофектамин и т.п., без ограничения.

Переносчики генов предназначены для экспрессии гетерологичных генов в нейронах. При этом они подавляют экспрессию гетерологичных генов в производящих CD45 клетках и могут повышать экспрессию гетерологичных генов в ткани мозга. Большая часть CD45 представляет собой трансмембранную тирозиновую протеинфосфатазу, локализованную в гемопоэтических клетках. Клетки можно определять в соответствии с молекулами, расположенными на клеточной поверхности, а

CD45 является клеточным маркером для всех групп лейкоцитов и В-лимфоцитов. Переносчики генов по изобретению не могут экспрессироваться в производящих CD45 клетках, в частности, в лимфоидных клетках и лейкоцитах.

Переносчики генов могут дополнительно включать носители, наполнители или разбавители, разрешенные для фармакологического применения.

Кроме того, изобретением предусмотрены способы доставки и экспрессии гетерологичных генов в нейронах, которые включают стадию введения рекомбинантного вектора в соответствующий объект.

Эти способы могут повышать экспрессию гетерологичных генов в тканях мозга и контролировать экспрессию гетерологичных генов в других тканях.

Кроме того, изобретением предусмотрены: 1) промоторы; 2) последовательность оснований, кодирующая целевой белок, связанный с промотором для обеспечения работы; и 3) экспрессионная кассета, содержащая целевую последовательность оснований для miR-142-3p, вставленная в 3'-UTR первой последовательности оснований. Изобретением также предусмотрены: 1) промоторы; 2) последовательность оснований, кодирующая целевой белок, связанная с промотором для обеспечения функциональности; и 3) экспрессионная кассета, содержащая целевую последовательность оснований для miR-142-5p, вставленную в 3'-UTR первой последовательности оснований.

Термин “экспрессионная кассета” в изобретении относится к несущей кассете, которая может осуществлять экспрессию для продукции и секреции целевого белка, функционально связанного с нижележащим сигнальным пептидом, так как она включает ген, кодирующий целевой белок, и последовательность оснований, которая кодирует промотор и сигнальный пептид. Экспрессирующая кассета для секреции по изобретению может использоваться вместе с системой секреции. В такую экспрессирующую кассету и без нее можно включать целый ряд факторов, которые могут способствовать эффективной продукции целевого белка.

Кроме того, изобретением предусмотрены препараты для профилактики или терапии нейродегенеративных заболеваний, которые включают последовательность оснований, кодирующую сплайс-вариант AIMP-2 с потерей экзона 2, и последовательность оснований мишени для miR-142-3p, связанную с 3'-UTR первой последовательности оснований.

Соответственно, также предусмотрены способы лечения нервных заболеваний у нуждающихся в этом субъектов, включающие введение любого из приведенных здесь векторов. Нейродегенеративные заболевания могут быть выбраны из группы, состоящей из болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, бокового амиотрофического склероза

(ALS), дегенерации сетчатки, легких когнитивных нарушений, мультиинфарктной деменции, лобно-височной деменции, деменции с тельцами Леви, болезни Хантингтона, дегенеративных нервных заболеваний, метаболических церебральных расстройств, депрессии, эпилепсии, рассеянного склероза, кортико-базальной дегенерации, множественной системной атрофии, прогрессирующего супрануклеарного пареза, дентаторубропаллидолюисной атрофии, спиноцеребеллярной атаксии, первичного бокового склероза, спинальной мышечной атрофии и инсульта, без ограничения. В некоторых воплощениях нервное заболевание представлено ALS. Лечение может улучшить память, дискинезию, двигательную активность или увеличить продолжительность жизни субъектов с нервным заболеванием, напр., ALS, болезнью Альцгеймера или болезнью Паркинсона. В некоторых воплощениях лечение может улучшить двигательную активность или увеличить продолжительность жизни субъектов с нервным заболеванием, напр., ALS.

Описанные в данном документе векторы могут вызывать, без ограничения, ингибирование апоптоза, уменьшение дискинезии и/или ингибирование окислительного стресса и тем самым предотвращать или лечить нервные заболевания.

Термин “лечение” в изобретении включает не только полное излечение нейродегенеративных заболеваний, но также частичное излечение, улучшение и уменьшение общих симптомов нейродегенеративных заболеваний в результате применения фармакологических средств по изобретению к субъектам с дегенеративными церебральными нарушениями.

Термин “профилактика” в изобретении означает предотвращение возникновения общих симптомов нейродегенеративных заболеваний заблаговременно путем подавления или блокирования таких симптомов или явлений, как когнитивные нарушения, поведенческие нарушения и разрушение нервов головного мозга путем применения фармакологических средств по изобретению к субъектам с дегенеративными церебральными нарушениями.

В дополнение к фармакологическому средству по изобретению можно включать адъюванты, отличные от активных ингредиентов. Хотя можно использовать любые адъюванты, без ограничения, если только они известны в данной области техники, однако можно повысить иммунитет еще больше, к примеру, путем включения полного и неполного адъюванта Фрейнда.

Фармакологические средства по изобретению могут производиться в виде смеси активных ингредиентов с фармакологически приемлемым носителем. При этом фармакологически приемлемый носитель включает носители, наполнители и разбавители,

которые обычно применяются в области фармакологии. Фармакологически приемлемые носители, которые можно использовать для фармакологических средств по изобретению, включают лактозу, декстрозу, сахарозу, сорбит, маннит, ксилит, эритрит, малит, крахмал, гуммиарабик, альгинат, желатин, фосфат кальция, силикат кальция, целлюлозу, метилцеллюлозу, поливинилпирролидон, воду, метилгидроксibenзоат, пропилгидроксibenзоат, тальк, стеарат магния и минеральное масло, но не ограничиваются этим.

Фармакологические средства по изобретению могут применяться в различных форматах, включая препараты для перорального введения, как-то порошки, гранулы, пилюли, капсулы, суспензии, эмульсии, сиропы, аэрозоли и т.п., и для наружного применения, препараты типа свечей или дезинфицирующих растворов и т.п. в соответствии с соответствующими общими методами изготовления.

При изготовлении препаратов можно использовать разбавители или такие эксципиенты, как заполнители, наполнители, связующие, увлажнители, разрыхлители и поверхностно-активные вещества, которые обычно используются. Твердые препараты для перорального введения включают пилюли, таблетки, порошки, гранулы и капсулы, причем такие твердые препараты могут быть изготовлены путем смешивания наполнителей типа крахмала, карбоната кальция, сахарозы, лактозы и желатина с активными ингредиентами. Кроме того, в дополнение к простым эксципиентам можно использовать такие смазывающие вещества, как стеарат магния и тальк. Жидкие препараты для перорального введения включают суспензии, растворы для внутреннего применения, масла и сиропы с включением различных эксципиентов типа увлажнителей, подсластителей, ароматизаторов и консервантов и т.д., кроме воды и жидкого парафина, которые являются общепринятыми разбавителями. Препараты для неперорального введения включают стерильные водные растворы, неводные растворители, суспендирующие средства, масла, лиофилизированные средства и свечи. В качестве неводных растворителей и суспендирующих веществ можно использовать растительное масло, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и оливковое масло, а также сложные эфиры для инъекций типа этилата. Вещества для получения свечей могут включать витепсол, tween-61, масло какао, лауриновое масло, глицерожелатин и др.

Фармакологические средства по изобретению можно вводить субъектам по различным каналам. Предусмотрены все форматы введения, такие как пероральное введение и внутривенное, внутримышечное, подкожное и внутрибрюшинное введение.

Желательные дозы для введения терапевтических средств по изобретению зависят от различных факторов, включая способ получения препарата, формат введения, возраст,

вес и пол пациента, степень симптомов заболевания, питание, период введения, способ введения, скорость выведения, чувствительность реакции и т.д. Тем не менее, соответствующий производитель может выбрать их надлежащим образом.

Однако, для эффективного лечения квалифицированный врач может определить и прописать эффективную дозу для намеченного лечения. Например, лечебные средства включают внутривенные, подкожные и внутримышечные инъекции, а также направленные инъекции в желудочки головного мозга или в спинной мозг с помощью микроиглы. Возможны множественные инъекции и повторные введения, напр., эффективная доза составляет от 0,05 до 15 мг/кг в случае вектора, от 5×10^{11} до $3,3 \times 10^{14}$ вирусных частиц (от $2,5 \times 10^{12}$ до $1,5 \times 10^{16}$ МЕ/кг) в случае рекомбинантного вируса и от 5×10^2 до 5×10^7 клеток/кг в случае клеток. Предпочтительно дозы составляют от 0,1 до 10 мг/кг в случае вектора, от 5×10^{12} до $3,3 \times 10^{13}$ частиц (от $2,5 \times 10^{13}$ до $1,5 \times 10^{15}$ МЕ/кг) в случае рекомбинантного вируса и от 5×10^3 до 5×10^6 клеток/кг в случае клеток из расчета 2-3 раза в неделю. Доза не имеет строгих ограничений. Но её можно модифицировать в соответствии с состоянием пациента и степенью проявления нервного расстройства. Эффективная доза для подкожного введения в жировую ткань или мышцы и прямого введения в пораженный участок составляет от 9×10^{10} до $3,3 \times 10^{14}$ рекомбинантных вирусных частиц с интервалом в 10 см и из расчета 2-3 раза в неделю. Доза не имеет строгих ограничений. Но её можно модифицировать в соответствии с состоянием пациента и степенью проявления нервного заболевания. В частности, фармакологические средства по изобретению включают от 1×10^{10} до 1×10^{12} в.г. (вирусных геномов)/мл рекомбинантного аденоассоциированного вируса и, как правило, рекомендуется вводить 1×10^{12} в.г. один раз каждые 2 дня на протяжении 2 недель. Их можно вводить раз в день или дробными дозами за несколько приемов в течение дня.

Фармакологические препараты могут производиться в различных формах для перорального и не перорального введения. В некоторых воплощениях описанные здесь векторы можно вводить в головной или спинной мозг. В некоторых воплощениях описанные здесь векторы можно вводить в мозг посредством стереотаксической инъекции.

Средства для перорального введения включают пилюли, таблетки, твердые и мягкие капсулы, жидкости, суспензии, масла, сиропы и гранулы и т.п. Эти средства могут включать разбавители (примеры: лактоза, декстроза, сахароза, маннит, сорбит, целлюлоза и/или глицин) и скользящие вещества (примеры: диоксид кремния, тальк, стеариновая кислота и её магниевые или кальциевые соли и/или полиэтиленгликоль) в дополнение к активным ингредиентам. Кроме того, пилюли могут содержать связующие вещества, как-

то силикат магния-алюминия, крахмал, желатин, трагакант, метилцеллюлозу, натриевую карбоксиметилцеллюлозу и/или поливинилпирролидин, а также, в зависимости от ситуации, могут содержать разрыхлители типа крахмала, агара, альгиновой кислоты и её натриевой соли либо аналогичные смеси и/или абсорбенты, красители, ароматизаторы и подсластители. Средства могут изготавливаться обычными методами смешивания, гранулирования или нанесения покрытия.

Кроме того, препараты для инъекций являются типичными формами препаратов не для перорального введения. Растворители для таких препаратов включают воду, раствор Рингера, изотонический физраствор и суспензии. В качестве растворителя или суспензионной среды препаратов для инъекций можно использовать стерильное нелетучее масло, причем для этой цели можно использовать любое не раздражающее нелетучее масло, включая моно- и диглицериды. Кроме того, в препаратах для инъекций можно использовать жирные кислоты типа олеиновой кислоты.

Далее следуют дополнительные воплощения А-Х.

А. Рекомбинантный вектор, содержащий целевую последовательность для miR-142-3p.

В. Рекомбинантный вектор из воплощения А, при этом последовательность оснований мишени для miR-142-3p повторяется 3 раза.

С. Рекомбинантный вектор из воплощения А, при этом целевую последовательность для miR-142-3p представляет собой последовательность, которая комплементарно связывается с последовательностью miR-142-3p.

Д. Рекомбинантный вектор из воплощения А, при этом целевая последовательность оснований для miR-142-3p повторяется 4 раза.

Е. Рекомбинантный вектор из воплощения А, при этом целевая последовательность мишени для miR-142-3p повторяется 5 раз.

Ф. Рекомбинантный вектор из воплощения А, при этом целевая последовательность оснований для miR-142-3p повторяется 4 раза, а гомология последовательности составляет более 90%.

Г. Рекомбинантный вектор из воплощения А, при этом целевая последовательность оснований для miR-142-3p повторяется 5 раз, а гомология последовательности составляет более 90%.

Н. Рекомбинантный вектор из воплощения А, причем рекомбинантный вектор дополнительно включает гетерологичный ген, функционально связанный с гетерологичным промотором, и промотор.

И. Рекомбинантный вектор из воплощения Н, при этом целевая последовательность

для miR-142-3p вставлена в 3'-UTR гетерологичного гена.

J. Рекомбинантный вектор из воплощения H, при этом гетерологичный ген представляет собой вариант AIMP2 с делецией экзона 2.

K. Рекомбинантный вектор из воплощения H, при этом гетерологичный промотор выбран из группы, состоящей из ретровирусного промотора (LTR), цитомегаловирусного (CMV) промотора, промотора вируса саркомы Рауса (RSV), промотора MT, промотора α -EF-1, промотора UB6, промотора β -актина курицы, промотора CAG, промотора RPE65 и промотора опсина.

L. Рекомбинантный вектор из воплощения A, при этом рекомбинантный вектор выбран из группы, состоящей из вирусных векторов, линейной ДНК и плазмидной ДНК.

M. Рекомбинантный вектор из воплощения L, при этом вирусный вектор выбран из группы, состоящей из аденовируса, аденоассоциированного вируса, лентивируса, ретровируса, вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), MLV (вируса лейкемии мышей), ASLV (вируса саркомы/лейкоза птиц), SNV (вируса некроза селезенки), RSV (вируса саркомы Рауса), MMTV (вируса опухолей молочной железы мыши) и вируса простого герпеса.

N. Рекомбинантный вектор из воплощения A, при этом рекомбинантный вектор включает последовательность оснований, которая повторяется 7 раз.

O. Переносчик генов, который включает рекомбинантный вектор, содержащий целевую последовательность для miR-142-3p.

P. Переносчик генов из воплощения O, при этом переносчик генов экспрессирует гетерологичный ген в нейронах.

Q. Переносчик генов из воплощения O, при этом переносчик генов подавляет экспрессию гетерологичного гена в производящих CD45 клетках.

R. Переносчик генов из воплощения O, при этом переносчик генов усиливает экспрессию гетерологичного гена в ткани мозга.

S. Способ доставки и экспрессии гетерологичного гена в нейронах, включающий стадию введения субъекту рекомбинантного вектора из воплощения A.

T. Способ из воплощения S, при этом способ включает усиление экспрессии гетерологичного гена и контролирование экспрессии гетерологичных генов в других тканях.

U. Воплощение, включающее:

1) промотор;

2) последовательность оснований, кодирующую целевой белок, функционально связанный с промотором; и

3) экспрессионную кассету, включающую последовательность оснований мишени для miR-142-3p, вставленную в 3'-UTR первой последовательности оснований.

V. Экспрессионная кассета из воплощения U, при этом целевым белком является вариант белка AIMP-2 с делецией экзона 2.

W. Препарат для профилактики или лечения нейродегенеративных заболеваний с помощью последовательности оснований, кодирующей вариант AIMP-2 с делецией экзона 2, который включает целевую последовательность оснований для miR-142-3p, вставленную в 3'-UTR первой последовательности оснований.

X. Нейродегенеративное заболевание из воплощения W, которое выбрано из группы, состоящей из болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, болезни Лу Герига (бокового амиотрофического склероза), дегенерации сетчатки, легких когнитивных нарушений, мультиинфарктной деменции, лобно-височной деменции, деменции с тельцами Леви, болезни Хантингтона, дегенеративных нервных заболеваний, метаболических церебральных расстройств, депрессии, эпилепсии, рассеянного склероза, кортико-базальной дегенерации, множественной системной атрофии, прогрессирующего супрануклеарного пареза, дентаторубропаллидолуисной атрофии, спиноцереbellарной атаксии, первичного бокового склероза, спинальной мышечной атрофии и инсульта, без ограничения.

Далее изобретение будет раскрыто более подробно на следующих ниже примерах выполнения. Однако следующие примеры выполнения предназначены только для определения содержания изобретения и не ограничивают применение изобретения такими примерами.

Примеры

Пример 1. Получение рекомбинантного вектора

Большая часть CD45 представляет собой трансмембранную тирозиновую протеинфосфатазу в гемопозитических клетках, которая может использоваться для определения клеток по молекулам на клеточной поверхности. CD45 является маркером для всех групп лейкоцитов и В-лимфоцитов. Авторы изобретения получили рекомбинантный вектор, который экспрессируется специфически только в нейронах, но не экспрессируется в производящих CD45 клетках, в частности, в лимфоидных клетках и лейкоцитах. Рекомбинантный вектор содержит сплайс-вариант взаимодействующего с комплексом аминоксил-тРНК-синтетазы многофункционального белка 2 (AIMP2) с делецией экзона 2 и способен, при введении миРНК, контролировать экспрессию сплайс-варианта AIMP2.

Было установлено, что сплайс-вариант AIMP2 гиперэкспрессируется в опухолях и

ингибирует подавление опухолей под действием AIMP2, так как сплайс-вариант AIMP2 не обладает функцией деградации TRAF2 (связанного с рецептором TNF фактора 2), связанного с передачей сигналов опухоли, поэтому сплайсинг AIMP2 нарушает функции AIMP2 путем конкуренции с AIMP2 за связывание с TRAF2.

Итак, рекомбинантный вектор по изобретению получали, как описано выше с тем, чтобы индуцировать специфическую экспрессию сплайс-варианта AIMP2 только в нейронах и подавлять экспрессию сплайс-варианта AIMP2 в опухоли.

1-1. Получение варианта AIMP2

AIMP2 является одним из белков, участвующих в образовании аминоксил-тРНК-синтетазы (ARS), и действует как супрессор опухолей. Для получения плазмиды, экспрессирующей вариант AIMP2 с делецией экзона 2, клонировали кДНК сплайс-варианта AIMP2 в pcDNA3.1-мус. Субклонирование в pcDNA3.1-мус проводили с помощью EcoRI и XhoI после амплификации сплайс-варианта AIMP2 с помощью праймеров и присоединения линкера для EcoRI и XhoI к кДНК по H322.

Вариант AIMP2 по изобретению имеет нуклеотидную последовательность по SEQ ID NO: 1 и аминокислотную последовательность по SEQ ID NO: 2.

1-2. Сортировка miRNA и выбор её целевой последовательности

Как указано выше, было установлено, что вариант AIMP2 по изобретению гиперэкспрессируется в опухолях. Поэтому проводили отбор miRNA и её мишени, способной контролировать экспрессию варианта AIMP2 так, чтобы подавлялась экспрессия варианта AIMP2 в лейкоцитах и лимфоидных клетках и в то же время он безопасно экспрессировался в целевых клетках – нейронах.

Для этого в качестве мишени была выбрана miR-142-3p, которая специфически экспрессируется только в гемопоэтических клетках, из которых образуются лейкоциты и лимфоидные клетки. Для получения последовательности мишени только для miR-142-3p использовали данные микроматриц В-клеток мыши и компьютерное программирование генов-мишеней miR-142-3p (по оценке mirSVR). Последовательность оснований miR-142-3p повторяется 3 раза. Последовательность оснований мишени для miR-142-3p, которая комплементарно связывается с miR-142-3p, повторяется 4 раза. Целевая последовательность для miR-142-3p может иметь нуклеотидную последовательность по SEQ ID NO: 5.

Целевая последовательность для miR-142-3p по изобретению включает последовательность сайтов рестрикционных ферментов для клонирования (NheI, HindIII, BmtI) (ccagaagcttgctagc) и последовательность сайта рестрикционного фермента HindIII (aagcttgtag). Она включает нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 5, которая

содержится в 4 повторах, с линкерами (tcac и gatatac), которые их соединяют (фиг. 4; SEQ ID NO: 6).

1-3. Получение рекомбинантного вектора

Для получения рекомбинантного вектора по изобретению целевую последовательность для miR-142-3p (SEQ ID NO: 5) вставляли в 3'-UTR варианта AIMP2 (порядковый номер 1) по изобретению. Соединение варианта AIMP-2 и последовательности мишени для miR-142-3p обозначено порядковым номером 6, в частности, его вырезали и вставляли по сайтам NheI и HindIII. Рекомбинантный вектор представлен на фиг. 1.

Пример 2. Подтверждение специфической экспрессии рекомбинантного вектора в нервных клетках

2-1. Подтверждение эффекта специфической экспрессии в нейронах в условиях *in vitro*

Поскольку miR142-3p специфически экспрессируется только в гемопоэтических клетках, то степень экспрессии варианта AIMP2 проверяли на данных клетках с подавлением варианта AIMP2 по изобретению при экспрессии последовательности мишени для miR142-3p из рекомбинантного вектора по изобретению.

В частности, были следующие группы: группа без обработки рекомбинантным вектором по изобретению (ложная обработка), группа обработки пустым/контрольным вектором (вектор NC), группа обработки одним лишь вектором для варианта AIMP2 (pscAAV_DX2) и группа обработки рекомбинантным вектором по изобретению (pscAAV-DX2-miR142-3pT). Концентрация всех векторов выражалась в мкг/мкл, и каждая группа получала по 2,5 мкл (2,5 мкг). В каждой из опытных групп проводилась обработка клеток линии THP-1 (клетки лейкемических моноцитов человека) и клеток линии SH-SY5Y (нейробластома) с проверкой подавления варианта AIMP2. Проводили кПЦР с помощью праймеров, приведенных ниже в табл. 1 (дегенерация в течение 15 сек и 40 циклов отжига и элонгации по 30 сек при температуре 60°C).

В результате было установлено, что вариант AIMP2 не экспрессируется в группах ложной обработки и обработки вектором NC. Кроме того, было установлено, что в группе обработки одним лишь вектором для варианта AIMP2 (pscAAV-DX2) наблюдается экспрессия и в клетках линии THP-1 и в клетках линии SH-SY5Y, тем самым подтверждая, что индуцируется экспрессия, не специфичная для нервных клеток. С другой стороны, было установлено, что вариант AIMP2 специфически экспрессируется только в клетках линии SH-SY5Y в группе, обработанной рекомбинантным вектором по изобретению (фиг. 2).

Таблица 1

Праймер	Последовательность	SEQ ID NO:
Прямой	CTGGCCACGTGCAGGATTACGGGG (только человек)	8
Обратный	AAGTGAATCCCAGCTGATAG (только человек)	9

2-2. Подтверждение специфической экспрессии в нервных клетках в условиях *in vivo*

В частности, были следующие группы: группа обработки пустым/контрольным вектором (вектор NC), группа обработки одним лишь вектором для варианта AIMP2 (pscAAV_DX2) и группа обработки рекомбинантным вектором по изобретению (pscAAV-DX2-miR142-3pT). Проводили интрапаренхимальную обработку 10 мкл (10^9 в.г.) каждого вируса при концентрации 10^8 в.г./мкл. Через 1 неделю после внутричерепной инъекции мышам каждой из обработанных групп экспрессия AIMP2 была подтверждена в тканях толстого кишечника, тканях легких, тканях головного мозга, тканях печени, тканях почек, тканях тимуса, тканях селезенки и мононуклеарных клетках периферической крови (PBMC). Проводили кПЦР с помощью праймеров, приведенных выше в табл. 1 (дегенерация в течение 15 сек и 40 циклов отжига и элонгации по 30 сек при температуре 60°C).

В результате было установлено, что экспрессия варианта AIMP2 возрастает только в тканях мозга с высокой концентрацией нейронов в группе, обработанной рекомбинантным вектором по изобретению (фиг. 3). С другой стороны, было установлено, что экспрессия варианта AIMP2 подавляется в тканях, отличных от тканей мозга.

Пример 3. Материалы и методы

3-1. КОТ-ПЦР

Выделяли суммарную РНК из спинного мозга с помощью TRIzol (Invitrogen, Waltham, MA, США) в соответствии с методикой производителя. Выделенную РНК определяли на спектрофотометре (ASP-2680, ACTgene, США) для количественной оценки. Для получения кДНК проводили обратную транскрипцию с помощью SuperScript III First-Strand (Invitrogen) по методике производителя. Полученную кДНК использовали для ПЦР в реальном времени с помощью смеси SYBR green PCR master mix (ThermoFisher Scientific, США). Для статистического анализа $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ использовали данные по экспрессии в двойных пробах, а для нормализации использовали экспрессию GADPH.

3-2. Животные

Трансгенных мышей hSOD1 G93A (B6.Cg-Tg(SOD1*G93A)1Gur/J), используемых в этом исследовании, приобретали у Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, США). Также использовали контрольных мышей WT соответствующего возраста. Животных содержали в индивидуальных клетках в специальных условиях, свободных от патогенов, и при

постоянных условиях окружающей среды (температура 21-23°C, влажность 50-60% и 12-часовой цикл свет/темнота) в виварии Сеульского национального университета, Республика Корея. Все экспериментальные процедуры проводили в соответствии с рекомендациями Институтского комитета по уходу и использованию животных Сеульского национального университета (SNU-IACUC, Aug. 7, 2017), а данное исследование было одобрено нашим местным комитетом по этике “SNU-IACUC” (номер разрешения SNU-170807-1). На пресимптоматической стадии самкам мышей одного и того же возраста вводили вектор AAV-GFP и DX2. Трансдукцию AAV-DX2 проводили путем интратекальной инъекции посредством прямого поясничного прокола. Всего 8 мкл (4 мкл на точку) вектора AAV-GFP или DX2 медленно (1 мкл/мин) вводили в две точки с помощью шприца Гамильтона (Hamilton, Швейцария), причем иглу вынимали медленно, чтобы предотвратить потерю вводимого вектора.

3-3. Эксперимент по ингибированию miR142-3p

Ингибирование miR-142-3p экспрессии DX2 можно наблюдать по последовательности мишени для miR-142-3p. Клетки HEK293 подвергали краткосрочной трансфекции векторами с последовательностью мишени для miR-142-3p, которая повторяется 1, 2 или 3 раза, а также 100 пмоль miR-142-3p с помощью липофектамина 2000 (Invitrogen, США), а затем инкубировали в течение 48 ч. Анализировали содержание мРНК DX2 методом ПЦР. Ингибирование miR142-3p экспрессии DX2 наблюдалось при повторе Tseq×1 последовательности мишени для miR142-3p (фиг. 5B).

Пример 4

4-1. Три типа векторов, созданных для ингибирующего действия основной связывающей последовательности

Tseq×1 содержит 1 основную связывающую последовательность, Tseq×2 содержит 2 основные связывающие последовательности, а Tseq×3 содержит 3 основные связывающие последовательности (фиг. 5A).

Ингибирование miR142-3p (100 пмоль) экспрессии DX2 наблюдалось, начиная с однократного (×1) повтора целевой последовательности для miR142-3p. Клетки HEK293 подвергали краткосрочной трансфекции векторами с целевой последовательностью для miR-142-3p, которая повторяется 1, 2 или 3 раза, а также 100 пмоль miR-142-3p с помощью липофектамина 2000 (Invitrogen, США), а затем инкубировали в течение 48 ч. Анализировали содержание мРНК DX2 методом ПЦР. При повышении числа основных связывающих последовательностей в целевой последовательности для miR142-3p также повышалось ингибирующее действие miR142-3p на экспрессию DX2. Вектор, содержащий основную последовательность Tseq×3, проявлял значительное ингибирование (фиг. 5B).

4-2. Мутации основной последовательности

Основную последовательность прогнозировали, используя данные микроматриц В-клеток мыши и оценки по miRSVR гена мишени для miR-142-3p. Четыре участка основной последовательности изменяли следующим образом: (5'-AACACTAC-3' → 5'-CCACTGCA-3') (см. исходную последовательность на фиг. 4 и схематическое изображение на фиг. 5А).

4-3. Основная связывающая последовательность важна для ингибирования DX2

Проводили замены 4 основных последовательностей (фиг. 5А). Клетки HEK293 подвергали краткосрочной трансфекции вектором DX2 с повторяющейся 3 раза последовательностью мишени для miR-142-3p (Tseq×3) или вектором с мутацией основной последовательности (mut) с помощью липофектамина 2000 (Invitrogen, США), а затем добавляли 100 пмоль miR-142-3p и инкубировали в течение 48 ч. Анализировали экспрессию мРНК DX2 методом ПЦР. В качестве контроля использовали вектор с 3-мя повторами Tseq, который проявлял значительное ингибирование DX2 (фиг. 5В), и конструкцию с DX2. Обработка 100 пмоль miR-142-3p существенно ингибировала вектор с 3-мя Tseq, но DX2 и мутантная последовательность не ингибировались (фиг. 6).

4-4. Данные о тканевом распределении на мышинной модели ALS

Выделяли суммарную РНК из спинного мозга после интратекальной инъекции scAAV2-DX2-miR142-3p. Проводили кОТ-ПЦР. Экспрессия DX2 должна ограничиваться только местом инъекции, т.е. спинным мозгом. У трансгенных мышей hSOD1 G93A при интратекальной инъекции экспрессировался scAAV-DX2-miR142-3p. При введении контрольного носителя экспрессия проявлялась только в спинном мозге, но не в головном мозге или седалищном нерве (фиг. 7).

Пример 5

В примере 2 клетки HEK293Т подвергали совместной трансфекции тремя плазмидами от Oxgene, UK, кодирующими все компоненты, необходимые для получения рекомбинантных частиц AAV2.

Клетки HEK293Т также подвергали трансфекции экспрессирующими векторами, в качестве которых использовали только pSF-AAV-ITR-CMV-EGFP-ITR-KanR (Oxgene, UK) со вставкой целевых нуклеотидов AIMP2-DX2 или DX2-miR142, но не для получения частиц AAV.

Кодирующий DX2 вектор (2 мкг) и вектор, кодирующий DX2 с целевой последовательностью для miR142 (2 мкг), трансфецировали в клетки THP-1 (моноциты человека, клетки CD45⁺) и SH-SY5Y (нервные клетки). Через 48 часов собирали клетки и выделяли мРНК. После синтеза кДНК анализировали экспрессию DX2 методом ПЦР в реальном времени.

В то время как уровень экспрессии DX2 был близким между клетками SH-SY5Y, трансфицированными вектором, кодирующим DX2, и вектором, кодирующим DX2 с целевой последовательностью для miR142, экспрессия DX2 сильно снижалась в клетках ТНР-1, трансфицированных вектором, кодирующим DX2 с целевой последовательностью для miR142. Таким образом, miR142-3р работает только в клетках ТНР-1 (фиг. 8).

Вышеприведенное описание конкретных воплощений должно настолько полно раскрывать общий характер изобретения, что другие могут, применяя знания в пределах квалификации в данной области, легко модифицировать и/или адаптировать для различных приложений, не отходя от общей концепции изобретения. Следовательно, такие адаптации и модификации должны быть в рамках замысла и диапазона эквивалентов раскрытых воплощений, исходя из представленных здесь положений и указаний. Следует понимать, что приведенная здесь фразеология или терминология предназначена для описания, а не для ограничения, так что терминология или фразеология настоящего описания должна интерпретироваться квалифицированным специалистом в свете этих положений и указаний.

Широта и объем настоящего изобретения не должны ограничиваться какими-либо из описанных выше типичных воплощений, а должны определяться только в соответствии со следующей формулой изобретения и её эквивалентами.

Все описанные здесь различные аспекты, воплощения и варианты могут сочетаться в самых разных комбинациях.

Все публикации, патенты и патентные заявки, упомянутые в данном описании, включены сюда путем ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент или патентная заявка была специально и индивидуально указана как включенная путем ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантный вектор, содержащий ген варианта AIMP2 с делецией экзона 2 (AIMP2-DX2) и целевую нуклеиновую кислоту для miR-142.

2. Вектор по п. 1, дополнительно содержащий промотор, функционально связанный с AIMP2-DX2.

3. Вектор по п. 2, при этом промотор представляет собой ретровирусный промотор (LTR), цитомегаловирусный (CMV) промотор, промотор вируса саркомы Рауса (RSV), промотор MT, промотор α -EF-1, промотор UB6, промотор β -актина курицы, промотор CAG, промотор RPE65 или промотор опсина.

4. Вектор по любому из пп. 1-3, при этом целевая нуклеиновая кислота для miR-142 находится с 3'-стороны от гена AIMP2-DX2.

5. Вектор по любому из пп. 1-4, при этом ген AIMP2-DX2 имеет нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 2.

6. Вектор по п. 5, при этом ген AIMP2-DX2 имеет нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность по SEQ ID NO: 2.

7. Вектор по любому из пп. 1-4, при этом ген AIMP2-DX2 имеет нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична нуклеотидной последовательности по SEQ ID NO: 1.

8. Вектор по п. 7, при этом ген AIMP2-DX2 имеет нуклеотидную последовательность по SEQ ID NO: 1.

9. Вектор по любому из пп. 1-8, при этом целевая нуклеиновая кислота для miR-142 включает нуклеотидную последовательность, содержащую ACACTA.

10. Вектор по п. 9, при этом целевая нуклеиновая кислота для miR-142 включает нуклеотидную последовательность, содержащую ACACTA и 1-17 дополнительных смежных нуклеотидов по SEQ ID NO: 5.

11. Вектор по любому из пп. 1-8, при этом целевая нуклеиновая кислота для miR-142 включает нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 50% идентична нуклеотидной последовательности по SEQ ID NO: 5 (TCCATAAAGTAGGAAACACTACA).

12. Вектор по п. 11, при этом целевая нуклеиновая кислота для miR-142 включает нуклеотидную последовательность по SEQ ID NO: 5.

13. Вектор по любому из пп. 1-8, при этом целевая нуклеиновая кислота для miR-142 включает нуклеотидную последовательность, содержащую ACTTTA.

14. Вектор по п. 13, при этом целевая нуклеиновая кислота для miR-142 включает нуклеотидную последовательность, содержащую ACACTA и 1-15 дополнительных смежных нуклеотидов по SEQ ID NO: 7.

15. Вектор по любому из пп. 1-8, при этом целевая нуклеиновая кислота для miR-142 включает нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 50% идентична нуклеотидной последовательности по SEQ ID NO: 7 (AGTAGTGCTTTCTACTTTATG).

16. Вектор по п. 15, при этом целевая нуклеиновая кислота для miR-142 включает нуклеотидную последовательность по SEQ ID NO: 7.

17. Вектор по любому из пп. 1-16, при этом целевая нуклеиновая кислота для miR-142 повторяется 2-10 раз.

18. Вектор по любому из пп. 1-17, при этом вектор представляет собой вирусный вектор.

19. Вектор по п. 18, при этом вирусный вектор является вектором из аденовируса, аденоассоциированного вируса, лентивируса, ретровируса, вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), MLV (вируса лейкемии мышей), ASLV (вируса саркомы/лейкоза птиц), SNV (вируса некроза селезенки), RSV (вируса саркомы Рауса), MMTV (вируса опухолей молочной железы мыши) или вируса простого герпеса.

20. Вектор по п. 18, при этом вирусный вектор является вектором из аденоассоциированного вируса (AAV), аденовируса, лентивируса, ретровируса, вируса коровьей оспы или вируса простого герпеса.

21. Способ лечения нервного заболевания у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение вектора по любому из пп. 1-20.

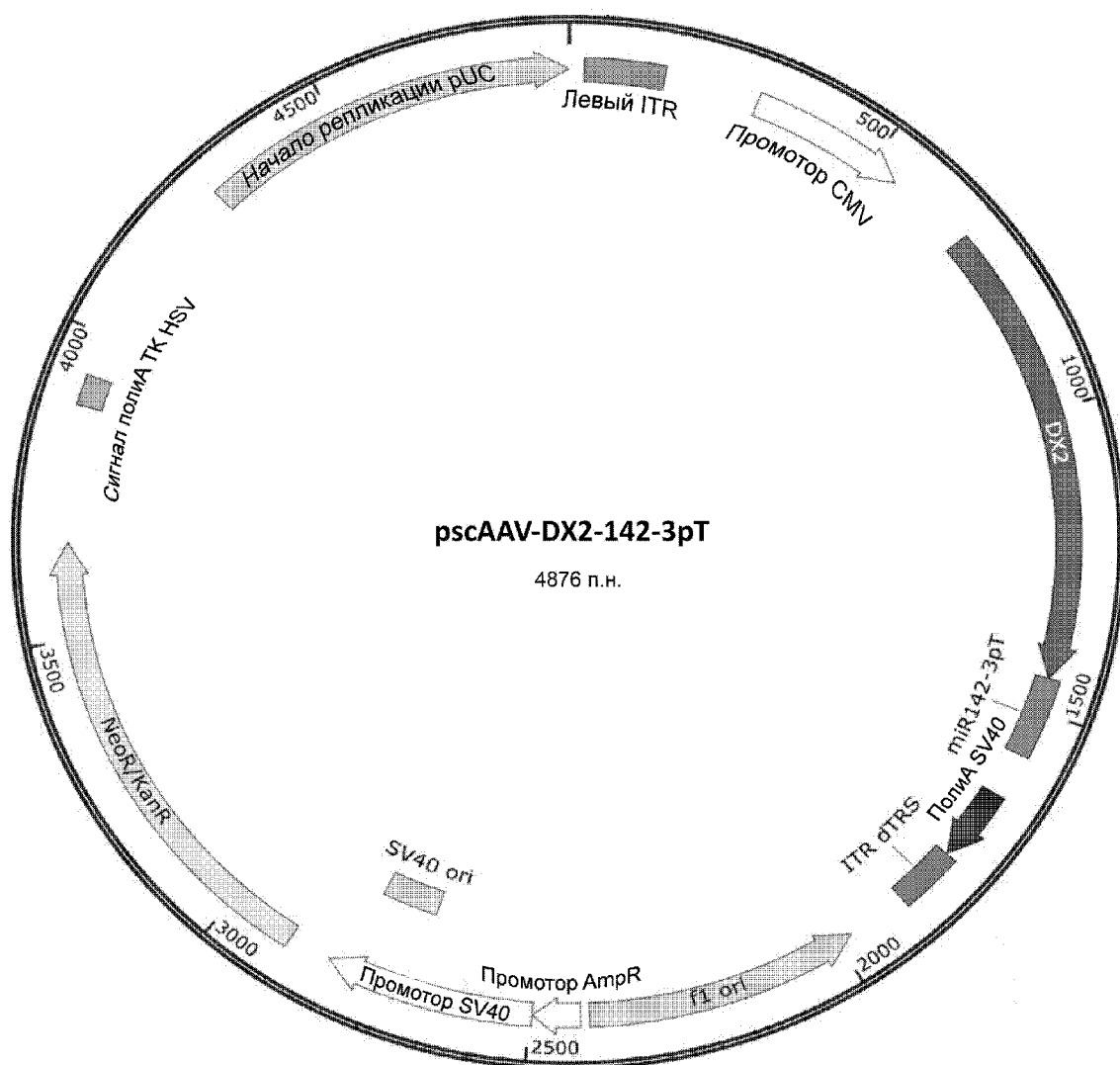
22. Способ по п. 21, при этом нервное заболевание представляет собой боковой амиотрофический склероз (ALS), болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, дегенерацию сетчатки, легкое когнитивное нарушение, мультиинфарктную деменцию, лобно-височную деменцию, деменцию с тельцами Леви, болезнь Хантингтона, дегенеративное нервное заболевание, метаболическое церебральное расстройство, депрессию, эпилепсию, рассеянный склероз, кортико-базальную дегенерацию, множественную системную атрофию, прогрессирующий супрануклеарный парез, дентаторубропаллидолуисную атрофию, спиноцеребеллярную атаксию, первичный боковой склероз, спинальную мышечную атрофию или инсульт.

23. Способ по п. 22, при этом нервное заболевание представляет собой ALS.

24. Способ по п. 23, при этом лечение улучшает двигательную активность или увеличивает продолжительность жизни субъекта.

25. Способ по любому из пп. 21-24, при этом вектор вводится в головной или спинной мозг.

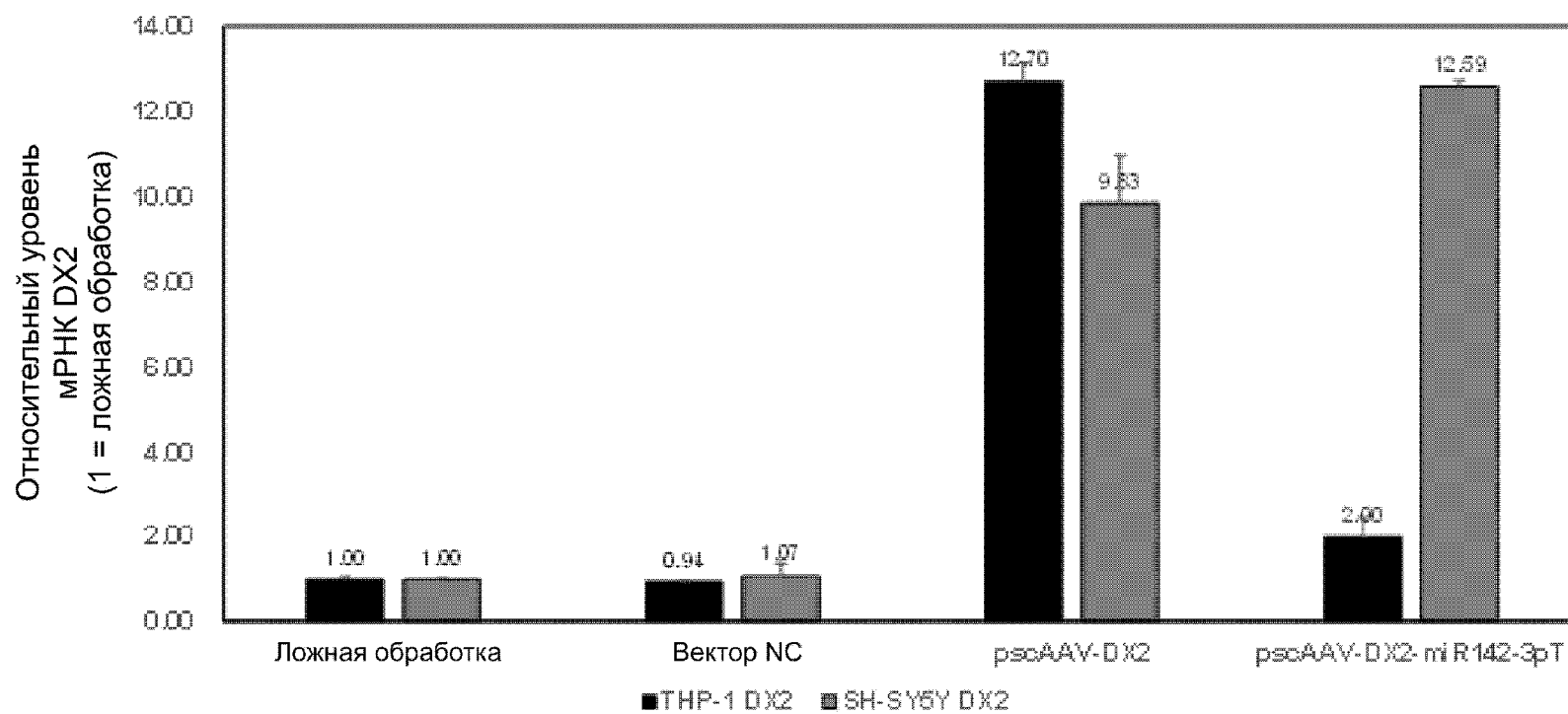
26. Способ по п. 25, при этом вектор вводится в мозг посредством стереотаксической инъекции.



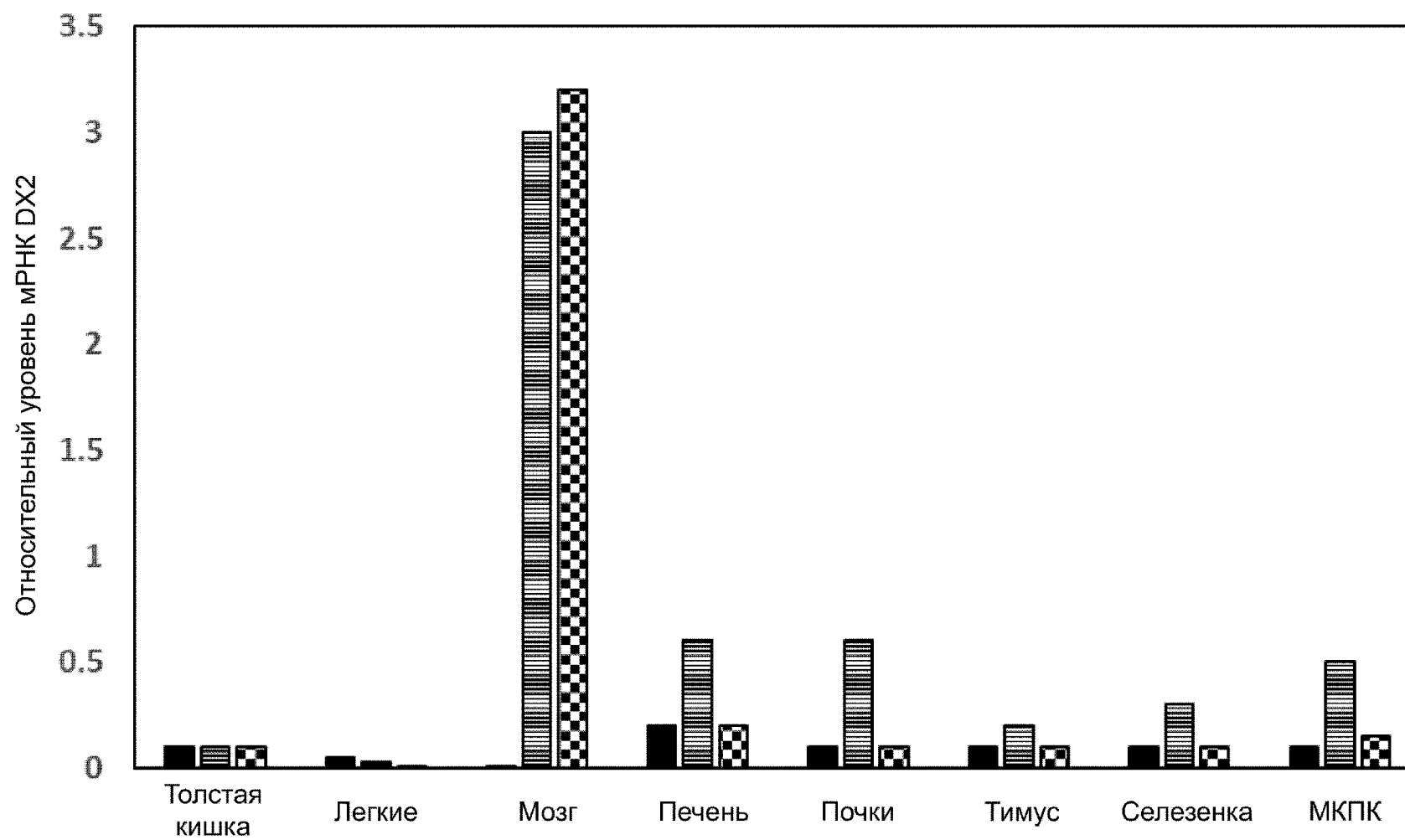
Фиг. 1

Фиг. 2

Подавление экспрессии DX2 с помощью miR142-3pT



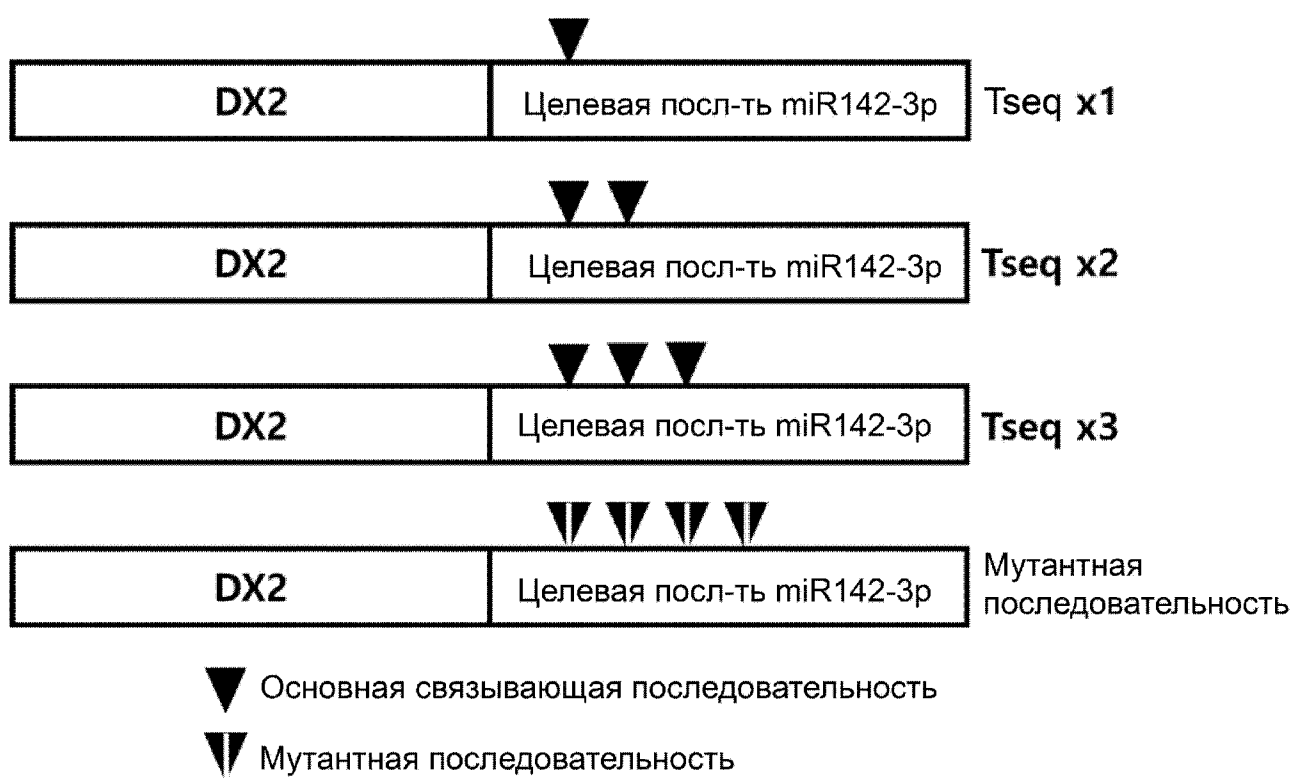
Фиг. 3



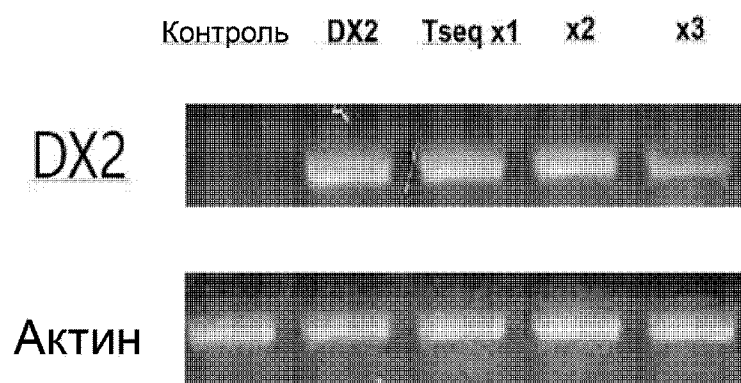
Фиг. 4

ccagaagcttgctagctccataaagtaggaaacactacatcactccataaagtaggaaacactac
 agatatctccataaagtaggaaacactacatcactccataaagtaggaaacactacaaagcttgt
 ag

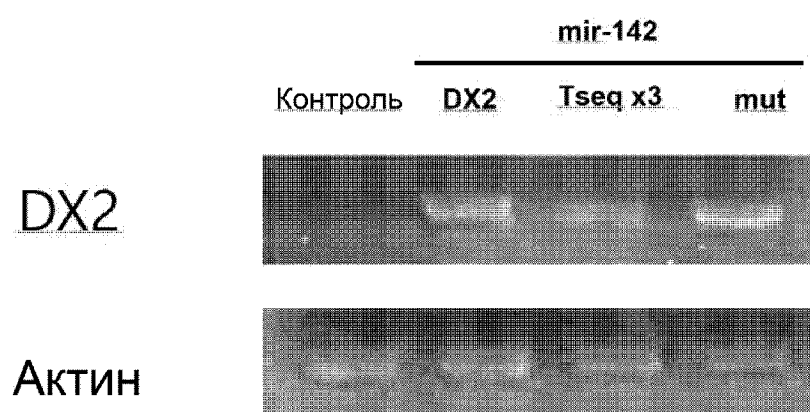
Фиг. 5А



Фиг. 5В

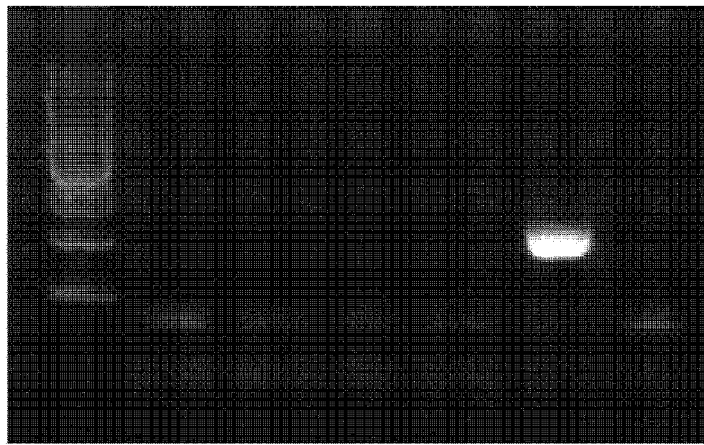


Фиг. 6

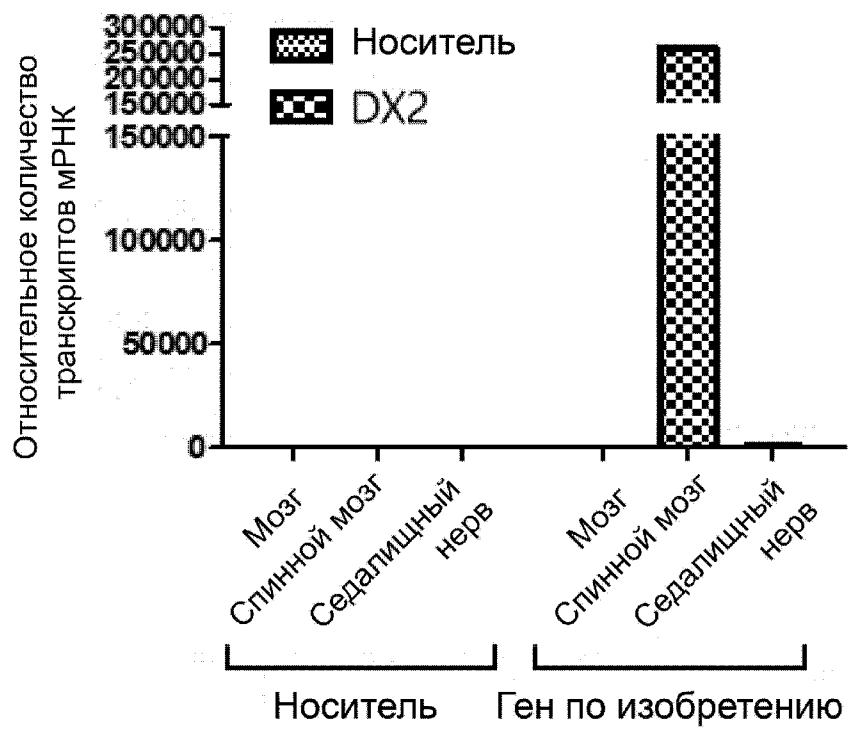


Фиг. 7

Распределение на модели ALS



Инtrateкальная инъекция, а затем КОТ-ПЦР



Фиг. 8

