

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 041384

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.10.18

(21) Номер заявки
201990864

(22) Дата подачи заявки
2017.11.08

(51) Int. Cl. C12N 15/86 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)

(54) КОНСТРУКЦИИ ДЛЯ ЭКСПРЕССИИ ФРАТАКСИНА

(31) 62/419,621

(32) 2016.11.09

(33) US

(43) 2019.11.29

(86) PCT/US2017/060680

(87) WO 2018/089527 2018.05.17

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ИНТРЕКСОН КОРПОРЕЙШН (US)

(72) Изобретатель:
Шауэр Стивен, Томас Дарби,
Робинсон Грегори, Пикетт Марк, Торн
Ричард, Груис Кирстен (US)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) WO-A1-2016115503

ZHOU PENGCHENG ET AL.: "Comparative Analysis In Vitro of Regulatory Elements That Drive Targeted Gene Expression in Adenovirus-Associated Viral (AAV) Vectors", MOLECULAR THERAPY, ACADEMIC PRESS, US, vol. 23, № Suppl. 1, 30 April 2015 (2015-04-30), p. S77-S78, XP009502758, ISSN: 1525-0016, DOI: 10.1016/S1525-0016(16)33800-X, abstract

LIM FILIP ET AL.: "Functional recovery in a Friedreich's ataxia mouse model by frataxin gene transfer using an HSV-1 amplicon vector", MOLECULAR THE, ACADEMIC PRESS, US, vol. 15, № 6, 1 June 2007 (2007-06-01), p. 1072-1078, XP008168725, ISSN: 1525-0016, DOI: 10.1038/SJ.MT.6300143 [retrieved on 2007-03-20], the whole document

GOMEZ-SEBASTIAN SILVIA ET AL.: "Infectious delivery and expression of a 135 kb human FRDA genomic DNA locus complements Friedreich's ataxia deficiency in human cells", MOLECULAR THE, ACADEMIC PRESS, US, vol. 15, № 2, 1 February 2007 (2007-02-01), p. 248-254, XP008168698, ISSN: 1525-0016, DOI: 10.1038/SJ.MT.6300021, the whole document

(57) В настоящем изобретении предусмотрены полинуклеотиды, векторы и вирусы, экспрессирующие фратаксин, а также способы лечения атаксии Фридрейха.

041384 B1

041384 B1

041384 B1

Ссылка на перечень последовательностей

Настоящая заявка включает посредством ссылки "Перечень последовательностей" (указанный ниже), который подан одновременно с данным документом в формате текстового файла с помощью системы электронной подачи документов патентного ведомства США (EFS). Копия перечня последовательностей в виде текстового файла, поданная одновременно с данным документом, обозначена как "INX00317PCTST25", представляет собой файл размером 40298 байтов и была создана 4 октября 2017 г. Данный перечень последовательностей включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Предпосылки изобретения

Атаксия Фридрейха (FA) является наиболее распространенной формой наследственной атаксии и поражает примерно 1 из 50000 людей в США. Атаксия Фридрейха вызывается мутацией в гене, кодирующем фратаксин (FXN), который присутствует в хромосоме 9. Молекулярные патологические процессы, лежащие в основе FA, обусловлены наличием экспансии тринуклеотидного повтора GAA (70-1700) в первом интроне FXN (Campuzano et al. (1996), Hum. Mol. Genet., 6:1771-1780). Эффектом данной генной мутации является выработка ненадлежащих количеств митохондриального белка фратаксина, который, по-видимому, играет важную роль в гомеостазе железа (Pandolfo (2008), Archives of Neurology, 65:1296-1303; Campuzano et al. (1996), Hum. Mol. Genet., 6:1771-1780). Пониженные уровни белка фратаксина ассоциированы с митохондриальной дисфункцией и приводят к клеточной токсичности и гибели клеток (Pandolfo (2009), J. Neurol., 256, Suppl., 1:3-8). У гетерозиготных носителей дефектного гена белок фратаксин экспрессируется на уровнях, составляющих примерно 50% от нормальных, и не проявляются симптомы; у гомозиготных пациентов фратаксин экспрессируется на уровнях, составляющих 5-25% от нормальных, и проявляются симптомы. Таким образом, возможно, что небольшие увеличения уровней белка фратаксина в клетках ЦНС пациентов с FA могут в результате приводить к значительным неврологическим улучшениям. Кроме того, молекулы, которые увеличивают уровни эндогенного FXN, или способы замещения белка FXN продемонстрировали перспективность в клинических и доклинических исследованиях. Таким образом, замещение белка посредством генной терапии является привлекательным альтернативным возможным вариантом терапевтической разработки. В данной области техники существует острая необходимость в лечении и предупреждении атаксии Фридрейха.

Краткое описание настоящего изобретения

В настоящем изобретении предусмотрен полинуклеотид, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую фратаксин человека, функционально связанную с контролируемыми элементами, которые управляют ее транскрипцией и трансляцией. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нуклеиновая кислота кодирует белок фратаксин с аминокислотной последовательностью, на по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 98 или 99% идентичной SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нуклеиновая кислота кодирует белок фратаксин с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления контролирующие элементы выбраны из группы, состоящей из промотора, 5'-регуляторного элемента, 3'-регуляторного элемента и их комбинаций.

В некоторых вариантах осуществления промотор выбран из группы, состоящей из промотора CMV, промотора UBC, промотора EF1 α , промотора PGK1 и минимального промотора гена фратаксина. В некоторых вариантах осуществления 5'-регуляторный элемент выбран из группы, состоящей из последовательности GAPDH, 5'-UTR FTH1, последовательности 5'-сайта сплайсинга RPL6 и последовательности 5U2. В некоторых вариантах осуществления 3'-регуляторный элемент выбран из группы, состоящей из последовательности раннего гена SV40, последовательности позднего гена SV40, синтетического 3'-регуляторного элемента и последовательности сигнала полиаденилирования гена гормона роста человека.

В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения нуклеиновая кислота кодирует белок с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 1, а контролирующие элементы включают промотор UBC (например, SEQ ID NO: 3), последовательность 5U2 (например, SEQ ID NO: 4) и последовательность сигнала полиаденилирования гена гормона роста человека (например, SEQ ID NO: 5).

В другом конкретном варианте осуществления настоящего изобретения нуклеиновая кислота кодирует белок с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 1, а контролирующие элементы включают промотор UBC (например, SEQ ID NO: 3), последовательность 5U2 (например, SEQ ID NO: 4) и последовательность синтетического 3'-регуляторного элемента (SEQ ID NO: 7).

В настоящем изобретении также предусмотрен вирусный вектор, содержащий полинуклеотид согласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой вектор на основе аденоассоциированного вируса. В конкретном варианте осуществления вирусный вектор представляет собой AAV5.

В настоящем изобретении также предусмотрен рекомбинантный вирион, который содержит вирусный вектор, где вирусный вектор содержит молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую фратаксин человека, функционально связанную с контролируемыми элементами, которые управляют ее транскрипцией и трансляцией. В некоторых вариантах осуществления вирион содержит вектор на основе аде-

ноассоциированного вируса. В некоторых определенных вариантах осуществления вектор на основе аденоассоциированного вируса представляет собой AAV5. В некоторых вариантах осуществления вирион содержит молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую белок с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления контролирующие элементы выбраны из группы, состоящей из промотора, 5'-регуляторного элемента, 3'-регуляторного элемента и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления промотор выбран из группы, состоящей из промотора CMV (например, SEQ ID NO: 13), промотора UBC (например, SEQ ID NO: 3), промотора EF1 α (например, SEQ ID NO: 18), промотора PGK1 (например, SEQ ID NO: 17) и минимального промотора гена фратаксина. В некоторых вариантах осуществления 5'-регуляторный элемент выбран из группы, состоящей из последовательности GAPDH (например, SEQ ID NO: 15), 5'-UTR FTH1 (например, SEQ ID NO: 14), последовательности 5'-сайта сплайсинга RPL6 (например, SEQ ID NO: 16) и последовательности 5U2 (SEQ ID NO: 4). В некоторых вариантах осуществления 3'-регуляторный элемент выбран из группы, состоящей из последовательности раннего гена SV40 (например, SEQ ID NO: 8), последовательности позднего гена SV40 (например, SEQ ID NO: 9), последовательности синтетического 3'-регуляторного элемента (SEQ ID NO: 7) и последовательности сигнала полиаденилирования гена гормона роста человека (например, SEQ ID NO: 5). В некоторых конкретных вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует белок с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 1, промотор представляет собой промотор UBC (SEQ ID NO: 3), а регуляторные элементы представляют собой последовательность 5U2 (SEQ ID NO: 4) и последовательность сигнала полиаденилирования гена гормона роста человека (SEQ ID NO: 5). В других конкретных вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует белок с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 1, промотор представляет собой промотор UBC (SEQ ID NO: 3), а регуляторные элементы представляют собой последовательность 5U2 (SEQ ID NO: 4) и последовательность синтетического 3'-регуляторного элемента (SEQ ID NO: 7).

В настоящем изобретении также предусмотрена композиция, содержащая

(а) вирусный вектор, где вирусный вектор содержит молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую фратаксин человека, функционально связанную с контролируемыми элементами, которые управляют ее транскрипцией и трансляцией; и

(b) фармацевтически приемлемый наполнитель.

В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой вектор на основе аденоассоциированного вируса. В некоторых определенных вариантах осуществления вектор на основе аденоассоциированного вируса представляет собой AAV5.

В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует белок фратаксин с аминокислотной последовательностью, на по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 98 или 99% идентичной SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления контролирующие элементы выбраны из группы, состоящей из промотора, 5'-регуляторного элемента, 3'-регуляторного элемента и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления промотор выбран из группы, состоящей из промотора CMV (например, SEQ ID NO: 13), промотора UBC (например, SEQ ID NO: 3), промотора EF1 α (например, SEQ ID NO: 18), промотора PGK1 (например, SEQ ID NO: 17) и минимального промотора гена фратаксина. В некоторых вариантах осуществления 5'-регуляторный элемент выбран из группы, состоящей из последовательности GAPDH (например, SEQ ID NO: 15), 5'-UTR FTH1 (например, SEQ ID NO: 14), последовательности 5'-сайта сплайсинга RPL6 (например, SEQ ID NO: 16) и последовательности 5U2 (SEQ ID NO: 4). В некоторых вариантах осуществления 3'-регуляторный элемент выбран из группы, состоящей из последовательности раннего гена SV40 (например, SEQ ID NO: 8), последовательности позднего гена SV40 (например, SEQ ID NO: 9), последовательности синтетического 3'-регуляторного элемента (SEQ ID NO: 7) и последовательности сигнала полиаденилирования гена гормона роста человека (например, SEQ ID NO: 5). В некоторых конкретных вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует белок с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 1, промотор представляет собой промотор UBC (SEQ ID NO: 3), а регуляторные элементы представляют собой последовательность 5U2 (SEQ ID NO: 4) и последовательность сигнала полиаденилирования гена гормона роста человека (SEQ ID NO: 5). В некоторых других конкретных вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует белок с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 1, промотор представляет собой промотор UBC (SEQ ID NO: 3), а регуляторные элементы представляют собой последовательность 5U2 (SEQ ID NO: 4) и последовательность синтетического 3'-регуляторного элемента (SEQ ID NO: 7).

В настоящем изобретении также предусмотрена композиция, содержащая

(а) рекомбинантный вирион; и

(b) фармацевтически приемлемый наполнитель, где рекомбинантный вирион содержит вирусный вектор и где вирусный вектор содержит молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую белок фратаксин человека с аминокислотной последовательностью, на по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 98 или 99% идентичной SEQ ID NO: 1, функционально связанную с контролируемыми элементами, которые управляют ее транскрипцией и трансляцией.

В некоторых вариантах осуществления вирион содержит вектор на основе аденоассоциированного вируса. В некоторых определенных вариантах осуществления вектор на основе аденоассоциированного вируса представляет собой AAV5. В некоторых вариантах осуществления вирион содержит молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую белок с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления контролирующие элементы выбраны из группы, состоящей из промотора, 5'-регуляторного элемента, 3'-регуляторного элемента и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления промотор выбран из группы, состоящей из промотора CMV, промотора UBC, промотора EF1 α , промотора PGK1 и минимального промотора гена фратаксина. В некоторых вариантах осуществления 5'-регуляторный элемент выбран из группы, состоящей из последовательности GAPDH (например, SEQ ID NO: 15), 5'-UTR FTH1 (например, SEQ ID NO: 14), последовательности 5'-сайта сплайсинга RPL6 (например, SEQ ID NO: 16) и последовательности 5U2 (SEQ ID NO: 4). В некоторых вариантах осуществления 3'-регуляторный элемент выбран из группы, состоящей из последовательности раннего гена SV40 (SEQ ID NO: 8), последовательности позднего гена SV40 (SEQ ID NO: 9), последовательности синтетического 3'-регуляторного элемента (SEQ ID NO: 7) и последовательности сигнала полиаденилирования гена гормона роста человека (SEQ ID NO: 5). В некоторых конкретных вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует белок с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 1, промотор представляет собой промотор UBC (SEQ ID NO: 3), а регуляторные элементы представляют собой последовательность 5U2 (SEQ ID NO: 4) и последовательность сигнала полиаденилирования гена гормона роста человека (SEQ ID NO: 5). В других конкретных вариантах осуществления нуклеиновая кислота кодирует белок с аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 1, промотор представляет собой промотор UBC (SEQ ID NO: 3), а регуляторные элементы представляют собой последовательность 5U2 (SEQ ID NO: 4) и последовательность синтетического 3'-регуляторного элемента (SEQ ID NO: 7).

В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемый наполнитель представляет собой 1 X PBS (например, 0,154 M NaCl, 0,056 M Na₂HPO₄ и 0,0106 M KH₂PO₄) или DPBS (например, 0,337 M NaCl, 0,027 M KCl, 0,015 M Na₂HPO₄ и 0,0015 M KH₂PO₄).

В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор присутствует в концентрации $2,5 \times 10^{11}$, $7,5 \times 10^{11}$ или $2,5 \times 10^{12}$ vg/мл.

В некоторых вариантах осуществления pH композиции составляет 6,5-7,5; 7,0-7,5; 6,8-7,2. В некоторых вариантах осуществления pH композиции составляет 7,0 или 7,4.

Композиция может дополнительно содержать пустые капсиды, процентная доля которых составляет не более 95% ср/ср, предпочтительно 50% ср/ср или меньше.

В настоящем изобретении также предусмотрен способ лечения атаксии Фридрейха, включающий предоставление фармацевтического состава, содержащего вирусный вектор (например, предпочтительно вектор на основе AAV, такой как без ограничения вектор на основе AAV5), где вектор содержит полинуклеотид, кодирующий белок фратаксин человека, и фармацевтически приемлемый наполнитель по меньшей мере в один участок-мишень в ЦНС субъекта в дозе, составляющей по меньшей мере приблизительно 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} или 1×10^{12} vg или больше. В некоторых вариантах осуществления доза составляет по меньшей мере приблизительно 1×10^{13} , 5×10^{13} , $1,5 \times 10^{14}$ или 5×10^{14} vg.

В некоторых вариантах осуществления участок-мишень представляет собой пространство, заполненное CSF; субарахноидальное пространство (например, большую цистерну); головной мозг (например, пространство желудочков головного мозга, мозжечок, большой мозг, гиппокамп, переднюю кору больших полушарий, ганглий заднего корешка или хвостатое ядро) или спинной мозг (например, поясничный отдел спинного мозга, грудной отдел спинного мозга, шейный отдел спинного мозга). В некоторых вариантах осуществления активный ингредиент (например, векторы, экспрессирующие фратаксин, вирионы, вирусы, гAAV и т.д.) доставляется посредством двух инъекций: одной в правое полушарие мозжечка и одной в левое полушарие мозжечка. В некоторых вариантах осуществления они являются двумя одинаковыми инъекциями. В некоторых вариантах осуществления активный ингредиент (например, векторы, экспрессирующие фратаксин, вирионы, вирусы, гAAV и т.д.) вводят посредством его инъекции в мозжечок, а также системного предоставления.

В вариантах осуществления способов фармацевтический состав можно вводить посредством интрапаренхимального, интратекального, интрацеребровентрикулярного, системного путей или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления фармацевтический состав вводят интратекально равными порциями в большую цистерну и поясничный отдел спинного мозга.

В некоторых вариантах осуществления способа доза представляет собой количество, составляющее по меньшей мере $3,7 \times 10^{10}$, $1,11 \times 10^{11}$ или $3,7 \times 10^{11}$ vg/г по весу головного мозга. В некоторых вариантах осуществления фармацевтический состав имеет концентрацию вектора, составляющую по меньшей мере 2×10^{12} , 7×10^{12} или 2×10^{13} vg/мл.

В некоторых вариантах осуществления способа фармацевтический состав вводят в виде однократной болюсной инъекции объемом от 0,1 до 5 мл (например, 3 или 2 мл). В других вариантах осуществления фармацевтический состав вводят в виде инфузии со скоростью от 0,001 до 1 мл/мин (например,

0,01 мл/мин).

В настоящем изобретении также предусмотрен способ лечения атаксии Фридрейха у субъекта, нуждающегося в этом. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции на основе вируса согласно настоящему изобретению, содержащей вирион, экспрессирующий фратаксин, в фармацевтическом носителе. Рекомбинантные вирионы трансдуцируют клетки в организме субъекта, и молекула нуклеиновой кислоты экспрессируется в трансдуцированных клетках на уровне, достаточном для уменьшения интенсивности по меньшей мере одного симптома атаксии Фридрейха у субъекта.

Симптомы атаксии Фридрейха могут представлять собой один или более симптомов, выбранных из группы, состоящей из нарушения координации рук и/или ног; усталости, ухудшения зрения, потери слуха, неразборчивой речи, агрессивного сколиоза, сахарного диабета, гипертрофической кардиомиопатии и аритмии сердца.

В некоторых вариантах осуществления фратаксин экспрессируется в митохондриях. В некоторых вариантах осуществления фратаксин экспрессируется в мозжечке. В некоторых вариантах осуществления фратаксин экспрессируется в гиппокампе. В некоторых вариантах осуществления фратаксин экспрессируется в передней коре больших полушарий. В некоторых вариантах осуществления фратаксин экспрессируется в ганглии заднего корешка.

В некоторых вариантах осуществления способа согласно настоящему изобретению фратаксин экспрессируется у указанного субъекта на уровне, превышающем 25% от нормальных уровней фратаксина. В других вариантах осуществления фратаксин экспрессируется у указанного субъекта на уровне, превышающем 30% от нормальных уровней фратаксина. В еще некоторых других вариантах осуществления фратаксин экспрессируется у указанного субъекта на уровне, превышающем 40% от нормальных уровней фратаксина. В еще некоторых других вариантах осуществления фратаксин экспрессируется у указанного субъекта на уровне, превышающем 50% от нормальных уровней фратаксина.

В некоторых вариантах осуществления в состав полинуклеотида, экспрессирующего фратаксин, включен переключатель генов, который осуществляет индуцируемую регуляцию (дозозависимым образом) экспрессии фратаксина. Переключатель генов может представлять собой, например, переключатель генов RHEOSWITCH THERAPEUTIC SYSTEM® (RTS®).

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 показаны результаты анализа 1 уровня в отношении выбранных конструкций с использованием промотора UBC в недифференцированных SY5Y наряду с зеленым флуоресцентным белком (GFP), CMV и ложнотрансфицированными контролями. На панели А показан выход FXN в пг на мкг общего белка. На панели В показана кратность уровней экспрессии по сравнению с ложнотрансфицированными клетками. См. табл. 1 в отношении состава конструкций.

На фиг. 2 показаны результаты анализа 1 уровня в отношении выбранных конструкций с использованием промотора UBC в фибробластах пациента с FA наряду с зеленым флуоресцентным белком (GFP), CMV и ложнотрансфицированными контролями. На панели А показан выход FXN в пг на мкг общего белка. На панели В показана кратность уровней экспрессии по сравнению с ложнотрансфицированными клетками. См. табл. 1 в отношении состава конструкций.

На фиг. 3 показаны результаты анализа 2 уровня в отношении выбранных конструкций с использованием промотора UBC в недифференцированных SY5Y наряду с зеленым флуоресцентным белком (GFP), CMV и ложнотрансфицированными контролями. На панели А показан выход FXN в пг на мкг общего белка. На панели В показана кратность уровней экспрессии по сравнению с ложнотрансфицированными клетками. См. табл. 1 в отношении состава конструкций.

На фиг. 4 показаны результаты анализа 2 уровня в отношении выбранных конструкций с использованием промотора UBC в фибробластах пациента с FA наряду с зеленым флуоресцентным белком (GFP), CMV и ложнотрансфицированными контролями. На панели А показан выход FXN в пг на мкг общего белка. На панели В показана кратность уровней экспрессии по сравнению с ложнотрансфицированными клетками. См. табл. 1 в отношении состава конструкций.

На фиг. 5 показаны результаты анализа 3 уровня в отношении выбранных конструкций с использованием промотора UBC в недифференцированных SY5Y наряду с зеленым флуоресцентным белком (GFP), CMV и ложнотрансфицированными контролями. На панели А показан выход FXN в пг на мкг общего белка. На панели В показана кратность уровней экспрессии по сравнению с ложнотрансфицированными клетками. См. табл. 1 в отношении состава конструкций.

На фиг. 6 показаны результаты анализа 3 уровня в отношении выбранных конструкций с использованием промотора UBC в фибробластах пациента с FA наряду с зеленым флуоресцентным белком (GFP), CMV и ложнотрансфицированными контролями. На панели А показан выход FXN в пг на мкг общего белка. На панели В показана кратность уровней экспрессии по сравнению с ложнотрансфицированными клетками. См. табл. 1 в отношении состава конструкций.

На фиг. 7 показан фратаксин человека, экспрессируемый и соответствующим образом мигрирующий в митохондрии, на флуоресцентных изображениях фибробластов африканской зеленой мартышки (COS-7), трансфицированных фратаксином человека: (А) ядра, окрашенные DAPI, (В) митохондрии, ок-

рашенные MitoTracker, (C) экспрессируемый фратаксин человека, окрашенный антителом к фратаксину человека (Abcam, № ab11038) и (D) колокализация фратаксина человека в ядрах и митохондриях.

На фиг. 8 показан фратаксин человека, экспрессируемый и соответствующим образом мигрирующий в митохондриях, на флуоресцентных изображениях фибробластов мыши (NC6), трансфицированных фратаксином человека: (A) ядра, окрашенные DAPI, (B) митохондрии, окрашенные MitoTracker, (C) экспрессируемый фратаксин человека, окрашенный антителом к фратаксину человека (Abcam, № ab11038) и (D) колокализация фратаксина человека в ядрах и митохондриях.

На фиг. 9 показана картина вестерн-блоттинга нейронов при FA (3816), трансдуцированных в день 21 AAV5 с геном фратаксина человека (026) в количестве 500000 копий геномов/клетка, в дни 5 и 7 после трансдукции (панель A) и в дни 10 и 14 после трансдукции (панель B). Фратаксин человека выявляли с помощью антитела к фратаксину человека (Abcam, № ab11038) с использованием стандартных методик вестерн-блоттинга. Маркеры молекулярной массы загружали для подтверждения размера зрелого белка фратаксина (14,2 кДа). FA+: транедуцированные клетки; FA: нетрансдуцированные клетки; Ctrl: контрольные клетки.

На фиг. 10 показан рисунок, изображающий стратегию перепрограммирования фибробластов с превращением их в плюрипотентные клетки, которые могут дифференцироваться в различные типы клеток для применения в моделировании, тестировании видов терапии и для трансплантации.

На фиг. 11 показаны результаты анализа экспрессии фратаксина в клетках-нейронах, происходящих из iPSC, трансформированных посредством электропорации с введением плазмиды, экспрессирующей фратаксин, для конструкций 024 и 026 (см. табл. 1), выраженные кратностью по сравнению с ложнотрансфицированными (обработанными GFP) клетками.

На фиг. 12 показаны результаты анализа экспрессии фратаксина в клетках-нейронах, происходящих из iPSC, трансдуцированных AAV, экспрессирующим фратаксин, для конструкций AAV 024 и 026 (см. табл. 1), выраженные кратностью по сравнению с ложнотрансфицированными (обработанными GFP) клетками.

На фиг. 13 показана экспрессия фратаксина (пг FXN/мг белка) в мозжечке мышей, которым интрапаренхимально вводили AAV5-FXN-026.

На фиг. 14 показана экспрессия фратаксина (пг FXN/мг белка) в мозжечке (CB), гиппокампе (HPC) и передней коре больших полушарий (ACX) мышей, которым интравентрикулярно вводили AAV5-FXN 026.

На фиг. 15 показана карта рекомбинантного вектора AAV5.hFXN. Показаны промотор гена убиквитина C (промотор UBC), 5'-регуляторный элемент (5U2), немодифицированная кДНК, кодирующая hFXN (GOI hFXN), 3'-регуляторный элемент полиаденилирования гена гормона роста человека (поли-А hGH) и линкер для ITR. Полная последовательность фланкирована инвертированными концевыми повторами (ITR) AAV.

На фиг. 16 показана выведенная аминокислотная последовательность предшественника нормально-го фратаксина человека (SEQ ID NO: 1). Подчеркнутая последовательность обозначает пептид, необходимый для переноса предшественника белка фратаксина в митохондрии. Пептид, выделенный курсивом, должен быть удален для активации белка. Полностью процессированный канонический белок фратаксин (выделенный жирным шрифтом) имеет 130 аминокислот. Последовательность получена из базы данных UniProt: идентификатор № Q16595-1. В консорциум UniProt входят Европейский институт биоинформатики (EBI), Швейцарский институт биоинформатики (SIB) и Информационный белковый ресурс (PIR).

На фиг. 17 показано схематическое представление процесса получения вектора AAV5.hFXN.

На фиг. 18 показана схематическая карта ДНК-плазмиды pAAV5-hFXN.

На фиг. 19 показана аннотированная нуклеотидная последовательность вектора AAV5-hFXN с геном-вставкой от ITR до ITR (SEQ ID NO: 19).

На фиг. 20 показана нуклеотидная последовательность плазмиды pAAV5-hFXN (SEQ ID NO: 20).

На фиг. 21 показана диаграмма, представляющая индуцируемую вектором gAAV5-hFXN экспрессию фратаксина человека в мозжечке мышей Sarsero с дефицитом фратаксина. gAAV5.hFXN (2 мкл) вводили путем прямой инъекции в мозжечок (IPc, N=7 мышей) или в пространство желудочков головного мозга (ICV, N=7) мышей с FA в дозе 7×10^9 vg/мкл. Трех мышам с FA вводили путем инъекции AAV5.GFP (контроль, 2 мкл) либо в мозжечок, либо в ICV в дозе 4×10^9 vg/мкл. Через 4 недели после инъекции мозжечки собирали. Также собирали ткань мозжечка от двух необработанных контрольных мышей. Лизаты тканей анализировали в отношении фратаксина человека, как описано выше. Показан средний уровень экспрессии для каждой обработки.

Фиг. 22 представляет собой диаграмму, на которой показано количество копий ДНК на мкг ткани из мозжечка свиней после биораспределения вектора при использовании нескольких местоположений и устройств для доставки.

Фиг. 23 представляет собой диаграмму, на которой показано количество копий ДНК на мкг ткани из других частей головного мозга свиней после биораспределения вектора при использовании нескольких местоположений и устройств для доставки.

Фиг. 24 представляет собой диаграмму, на которой показано количество копий ДНК на мкг ткани из

тканей спинного мозга свиней после биораспределения вектора при использовании нескольких местоположений и устройств для доставки.

Фиг. 25 представляет собой диаграмму, на которой показано количество копий ДНК на мкг ткани из системных тканей свиней после биораспределения вектора при использовании нескольких местоположений и устройств для доставки.

Фиг. 26 представляет собой диаграмму, на которой показано распределение гAAV5-FXN-026 после однократной инфузии в мозжечок. Показано количество копий геномов векторов в мозжечке самцов юкатанских свиней в день 28 в сравнении с днем 60 (vg ДНК/мкг ДНК в ткани).

Фиг. 27 представляет собой диаграмму, на которой показано распределение гAAV5-FXN-026 после однократной инфузии в мозжечок самцов юкатанских свиней. Показано количество копий геномов векторов в головном мозге в день 28 в сравнении с днем 60 (vg ДНК/мкг ДНК в ткани).

Фиг. 28 представляет собой диаграмму, на которой показано распределение гAAV5-FXN-026 после однократной инфузии в мозжечок самцов юкатанских свиней. Показано количество копий геномов векторов в спинном мозге и DRG в день 28 в сравнении с днем 60 (vg ДНК/мкг ДНК в ткани).

Фиг. 29 представляет собой диаграмму, на которой показана экспрессия белка фратаксина в образцах ткани из коры мозжечка, зубчатого ядра, гиппокампа и двигательной коры больших полушарий самцов юкатанских свиней. Уровни фратаксина определяли посредством ELISA.

Фиг. 30 представляет собой диаграмму, на которой показано биораспределение вектора AAV5-hFXN (026) на основе AAV5 с геном фратаксина человека после внутримозжечкового введения макакам-крабоедам. В образцах тканей из коры мозжечка, зубчатого ядра, гиппокампа и двигательной коры больших полушарий анализировали уровни фратаксина посредством ELISA.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к экспрессии фратаксина человека в клетках и лечению атаксии Фридрейха у пациентов, нуждающихся в этом.

Различные протоколы, которые можно применять в способах, описанных в данном документе, раскрыты в справочных руководствах, таких как *Current Protocols in Molecular Biology* (eds. Ausubel et al., Wiley, 2004 edition) и *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Sambrook and Russell (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001, third edition)). Способы, предусматривающие применение иммунореагентов, такие как разновидности вестерн-блоттинга, ELISA и иммунопреципитации, выполняют согласно описанному в *USING ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL* (Harlow and Lane Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999). Каждый из этих литературных источников включен в данный документ во всей своей полноте.

В тех случаях, когда в настоящем раскрытии используется форма единственного числа, она означает "по меньшей мере один" или "один или более", если не указано иное.

Термин "вирус AAV" будет означать целую вирусную частицу, например, частицу вируса AAV дикого типа (wt). Вирус AAV имеет оболочку из капсидного белка AAV, в которую заключен геном AAV в виде линейной однонитевой нуклеиновой кислоты. Вирус AAV является репликационно некомпетентным (т.е. вирусом, дефектным по репликации или зависимым от помощника). Вирус AAV необязательно получен из любого серотипа аденоассоциированного вируса, в том числе без ограничения AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5 или AAVX7. Вирусы AAV могут характеризоваться полной или частичной делецией одного или более генов AAV дикого типа, предпочтительно генов *g* и/или *с*, но сохраняют функциональные фланкирующие последовательности ITR. Примеры вирусов AAV включают без ограничения вирусы AAV, доступные в Американской коллекции типовых культур ("ATCC") под номерами доступа 53222, 53223, 53224, 53225 и 53226. В отношении описания вирусов AAV и путей их применения см., например, Haj-Ahmad and Graham (1986), *J. Virol.*, 57:267-274; Bett et al. (1993), *J. Virol.*, 67:5911-5921; Mittereder et al. (1994), *Human Gene Therapy*, 5:717-729; Seth et al. (1994), *J. Virol.*, 68:933-940; Barr et al. (1994), *Gene Therapy*, 1:51-58; Berkner, K.L. (1988), *BioTechniques*, 6:616-629; и Rich et al. (1993), *Human Gene Therapy*, 4:461-476.

Как используется в данном документе, "вирион" представляет собой полинуклеотид, содержащий каркас из вирусной нуклеиновой кислоты с геном, представляющим интерес, который должен экспрессироваться (например, геном фратаксина), и по меньшей мере одним регуляторным элементом для контроля экспрессии гена, представляющего интерес.

Термины "рекомбинантный AAV", "гAAV", "рекомбинантный вектор на основе AAV" или "вектор на основе гAAV" будут означать инфекционный, но дефектный по репликации вирус, состоящий из белкового наружного покрова AAV (т.е. капсида), инкапсулирующего вирусный вектор с геном-вставкой, отличным от ДНК AAV дикого типа.

Термин "инвертированный концевой повтор" или "ITR" будет означать последовательность нуклеиновой кислоты, симметрично расположенную на обоих концах генетического материала вируса. Без ограничения какой-либо теорией литературные сообщения демонстрируют, что ITR содействуют эффективному манипулированию с геномом AAV. В литературе также сообщается о способности ITR образовывать шпильки, что способствует самопраймрованию, обеспечивающему возможность независимого от праймазы синтеза второй нити нуклеиновой кислоты. Также было показано, что ITR содействуют интеграции

ДНК AAV в геном клетки-хозяина. ITR не обязательно должны представлять собой нуклеотидные последовательности дикого типа и могут быть изменены, например, путем вставки, делеции или замены нуклеотидов, при условии, что последовательности обеспечивают функциональное спасение, репликацию и упаковку. Известны необязательные нуклеотидные последовательности ITR-областей AAV. См., например, Kotin, R.M. (1994), "Human Gene Therapy", 5:793-801; Berns, K.I., "Parvoviridae and their Replication" в *Fundamental Virology*, 2nd edition (B.N. Fields and D.M. Knipe, eds.).

Термин "ген-вставка" будет означать молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую часть, которая кодирует полипептид.

Термин "генная терапия" будет означать лечение субъекта, включающее введение субъекту нормальной копии одного или более дефектных или отсутствующих генов.

Термин "генная терапия FXN" или "генная терапия фратаксином" будет означать лечение субъекта, включающее введение нормальной копии гена FXN субъекту, у которого имеется дефектный ген FXN, отсутствует ген FXN, наблюдается недостаточная экспрессия гена FXN или вырабатываются недостаточные количества фратаксина.

Термины "субъект", "индивидуум" или "пациент" будут использоваться взаимозаменяемо и будут означать млекопитающее, предпочтительно человека, нуждающееся в терапии. Субъект может иметь любой возраст. Субъект может быть взрослым. Субъект может быть взрослым в возрасте от приблизительно 18 лет до приблизительно 60 лет. Субъект может быть ребенком. Субъект может быть несовершеннолетним ребенком в возрасте приблизительно 17 лет или меньше. Субъект может быть несовершеннолетним ребенком в возрасте приблизительно 10 лет или меньше. Субъект может быть несовершеннолетним ребенком в возрасте приблизительно 3 лет или меньше.

Термин "капсид" будет означать белковую оболочку или наружный покров вируса. Капсид необязательно содержит одну или более олигомерных структурных субъединиц, содержащих белки, необязательно называемых протомерами. Капсид может необязательно быть окружен липидным бислоем и гликопротеиновой оболочкой. В одном варианте осуществления капсид представляет собой капсид аденоассоциированного вируса (AAV). В другом варианте осуществления капсид представляет собой капсид рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV) серотипа 5.

Термин "пустой капсид" будет означать белковую оболочку вируса, в которую не заключен геном вектора. Пустой капсид может представлять собой вирусоподобную частицу, поскольку он реагирует с одним или более антителами, реагирующими с интактным (например, несущим геном вектора) вирусом (например, аденоассоциированным вирусом AAV). В неограничивающем примере пустой капсид AAV5 сохраняет способность реагировать с одним или более антителами, которые связываются с AAV, таким как AAV5 или AAV другого серотипа. Например, пустой капсид AAV2 сохраняет способность реагировать с одним или более антителами, которые связываются с AAV8.

Пустые капсиды могут иногда обнаруживаться в естественных условиях в препаратах векторов на основе AAV. Такие препараты можно применять в соответствии с настоящим изобретением. С такими препаратами можно необязательно производить манипуляции для увеличения или уменьшения количества пустых капсидов. Например, количество пустых капсидов можно доводить до количества, при котором согласно ожиданиям будет ослабляться ингибирующий эффект антител. Пустые капсиды также можно получать независимо от препаратов векторов и необязательно (i) добавлять к препаратам векторов или (ii) вводить субъекту в отдельности. См. F. Mingozzi et al., публикация заявки на патент США № 2014/0336245 "Virus vectors for highly efficient transgene delivery".

Термин "модифицированный капсид" будет означать капсид с модифицированным содержимым или капсид, модифицированный таким образом, что капсид не способен проникать в клетку.

Термин "капсид с модифицированным содержимым" будет означать капсид, несущий модифицированный ген-вставку. Примеры модифицированных генов-вставок включают без ограничения некодирующие нуклеиновые кислоты.

Термин "мутантный пустой капсид" будет означать пустой капсид, содержащий мутацию, нарушающую связывание вируса с рецепторами. В одном варианте осуществления мутантный пустой капсид представляет собой неинфекционный мутантный капсид. В другом варианте осуществления пустой капсид может адсорбировать антитело, но не может проникать в клетку-мишень. В другом варианте осуществления пустой капсид может адсорбировать нейтрализующее антитело. См. C.J. Aalbers et al., "Empty Capsids and Macrophage Inhibition/Depletion Increase rAAV Transgene Expression in Joints of Both Healthy and Arthritic Mice", *Human Gene Therapy*, 2017 Feb, 28(2):168-1781; и Ayuso E et al., "High AAV vector purity results in serotype- and tissue independent enhancement of transduction efficiency", *Gene Ther.*, 2010, 17:503-510.

Термин "ген-вставка FXN" будет означать ген-вставку, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую FXN. В одном варианте осуществления ген-вставка содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую FXN человека (hFXN). В другом варианте осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая hFXN, представляет собой немодифицированную кДНК, кодирующую FXN. В одном конкретном варианте осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая hFXN, представляет собой кДНК, соответствующую последовательности

мРНК, кодирующей нормальный фратаксин человека, описанной под идентификационным номером последовательности NM_000144.4 (см. J.J. Carvajal et al., "The Friedreich's ataxia gene encodes a novel phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase", Nat. Genet., 14(2), 157-162 (1996)).

Термин "геном вектора" или "vg" будет пониматься в широком смысле как охватывающий векторы или вирионы, содержащие гены-вставки. Для удобства "геномы векторов" будут включать без ограничения векторы или вирионы, содержащие гены-вставки, инкапсулированные в капсиды, такие как вирусы AAV и векторы на основе гAAV, а также гены-вставки, не инкапсулированные в капсиды. Для удобства векторы или вирионы, содержащие гены-вставки, которые не инкапсулированы в капсиды, включают выделенные векторы или вирионы, содержащие гены-вставки. См. патент США № 9598703 "Capsid-free AAV vectors, compositions, and methods for vector production and gene delivery".

Для целей количественной оценки "vg" рассчитывается как число векторов или вирионов, содержащих гены-вставки. В одном примере один "геном вектора" или один "vg" представляет собой один ген-вставку или один капсид, несущий вектор или вирион, содержащий ген-вставку. В другом примере одна векторная частица AAV5.hFXN будет означать "1 vg", а приблизительно 5×10^{14} vg будет означать приблизительно 5×10^{14} векторов AAV5.hFXN.

Термин "капсидная частица" или "cp" будет пониматься в широком смысле как охватывающий любой капсид. Для удобства капсиды могут быть полными (например, инкапсулирующими ген-вставку) или пустыми. Капсидные частицы включают без ограничения капсиды, несущие геномы векторов (например, вирусы AAV и векторы на основе гAAV), пустые капсиды, модифицированные капсиды, капсиды с модифицированным содержимым и мутантные пустые капсиды.

Для целей количественной оценки "cp" рассчитывается как общее число капсидов, несущих геномы векторов (например, вирусов AAV и векторов на основе гAAV, вирионов), пустых капсидов, модифицированных капсидов, капсидов с модифицированным содержимым и мутантных пустых капсидов, вместе взятых. В одном примере "1 cp" будет означать один пустой капсид, а приблизительно $1,76 \times 10^{12}$ cp будет означать приблизительно $1,76 \times 10^{12}$ пустых капсидов. В другом примере фармацевтический состав, содержащий 50% cp/cp пустых капсидов, содержит 50 пустых капсидных частиц на общее количество 100 капсидных частиц (полных и пустых). В другом примере фармацевтический состав, содержащий 10% пустых капсидов, может содержать в общей сложности приблизительно $5,5 \times 10^{14}$ cp капсидных частиц, при этом фармацевтический состав содержит приблизительно 5×10^{14} vg векторов AAV5.hFXN и приблизительно 5×10^{13} cp пустых капсидов.

Термин "трансдукция" будет означать перенос гена в клетку с помощью вирусной частицы.

Термин "эффективное количество" или "терапевтически эффективное количество" означает количество, достаточное для достижения терапевтически благоприятного или терапевтически желаемого результата. Терапевтически эффективное количество можно вводить посредством одного или более введений, нанесений или дозирования.

Термин "место-мишень" или "участок-мишень" будет означать местоположение в центральной нервной системе (ЦНС) субъекта, в которое вводят фармацевтический состав. В одном аспекте участок-мишень представляет собой пространство, заполненное спинномозговой жидкостью (CSF). В одном варианте осуществления участок-мишень представляет собой субарахноидальное пространство. В другом варианте осуществления участок-мишень представляет собой пространство желудочков головного мозга. В одном варианте осуществления участок-мишень представляет собой головной мозг. В другом варианте осуществления участок-мишень представляет собой спинной мозг. В другом варианте осуществления участок-мишень представляет собой конский хвост. Участок-мишень может необязательно представлять собой большой мозг, мозжечок, гиппокамп, переднюю кору больших полушарий, ганглий заднего рога, зубчатое ядро, хвостатое ядро или большую цистерну. Участок-мишень может необязательно представлять собой крестцовый, поясничный, грудной или шейный отдел спинного мозга. Фармацевтический состав можно вводить в один или более участков-мишеней.

Термин "плазмидная конструкция" будет означать кольцевую молекулу нуклеиновой кислоты, применяемую в комбинации по меньшей мере с одной другой плазмидой для трансфекции линии клеток *in vitro* с целью получения капсидных частиц. В одном варианте осуществления плазмидная конструкция содержит: последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую hFXN (например, кДНК, кодирующую FXN человека); промотор гена убиквитина С человека (UBC); 5U2, который представляет собой синтетический 5'-регуляторный элемент, полученный из второго интрона гена кальциевой АТФазы саркоплазматического/эндоплазматического ретикулума собак и 5'-нетранслируемой области гена казеина крупного рогатого скота (патент США № 8835621); элемент поли-А гена гормона роста человека (поли-А hGH); два инвертированных концевых повтора (ITR) AAV2, фланкирующих генетические элементы AAV2; и ген устойчивости к антибиотику.

Как используется в данном документе, "нуклеиновая кислота", "молекула нуклеиновой кислоты", "последовательность нуклеиновой кислоты", "олигонуклеотид", "олигонуклеотидная последовательность", "нуклеотидная последовательность", "полинуклеотид" и "полинуклеотидная последовательность" используются взаимозаменяемо и относятся к полимерной форме сложных фосфатных эфиров рибонук-

леозидов (аденозина, гуанозина, уридина или цитидина; "молекулам РНК"), или дезоксирибонуклеозидов (дезоксиаденозина, дезоксигуанозина, дезокситимидина или дезоксицитидина; "молекулам ДНК"), или любых аналогов этих сложных фосфозэфиров, таких как фосфотиоаты и сложные тиоэфиры, в однонитевой форме либо в форме двухнитевой спирали. Возможны двухнитевые спирали ДНК-ДНК, ДНК-РНК и РНК-РНК. Термин "молекула нуклеиновой кислоты" и, в частности, молекула ДНК или РНК относится только к первичной и вторичной структуре молекулы и не ограничивает ее какими-либо конкретными формами третичной структуры. Таким образом, данный термин предусматривает двухнитевую ДНК, обнаруживаемую, помимо прочего, в линейных или кольцевых молекулах ДНК (например, рестрикционных фрагментах), плаزمидах, сверхспиральной ДНК и хромосомах. При обсуждении структуры конкретных двухнитевых молекул ДНК последовательности могут быть описаны в данном документе в соответствии с общепринятым правилом указания последовательности только в направлении 5'-3' вдоль не-транскрибируемой нити ДНК (т.е. нити, имеющей последовательность, гомологичную мРНК).

Как используется в данном документе, "рекомбинантная молекула ДНК" представляет собой молекулу ДНК, которая была подвергнута молекулярно-биологическим манипуляциям. ДНК включает без ограничения кДНК геномную ДНК, плазмидную ДНК, синтетическую ДНК и полусинтетическую ДНК.

Как используется в данном документе, термин "фрагмент", используемый по отношению к полинуклеотидной последовательности (например, "фрагмент полинуклеотида"), относится к нуклеотидной последовательности, имеющей уменьшенную длину по сравнению с эталонной нуклеиновой кислотой и содержащей в общей с ней части нуклеотидную последовательность, идентичную данной эталонной нуклеиновой кислоте. Такой фрагмент нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением может при необходимости содержаться в более крупном полинуклеотиде, компонентом которого он является. Такие фрагменты содержат полинуклеотиды, длина которых находится в диапазоне от по меньшей мере 6, 8, 9, 10, 12, 15, 18, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 39, 40, 42, 45, 48, 50, 51, 54, 57, 60, 63, 66, 70, 75, 78, 80, 90, 100, 105, 120, 135, 150, 200, 300, 500, 720, 900, 1000 или 1500 последовательных нуклеотидов нуклеиновой кислоты в соответствии с настоящим изобретением, или в качестве альтернативы состоят из них.

Как используется в данном документе, термин "химерный" означает состоящий из фрагментов, которые не являются смежными в их естественном состоянии. Например, химерный полинуклеотид означает полинуклеотид, содержащий фрагменты, которые не являются смежными в их естественном состоянии.

Как используется в данном документе, термин "синтетический", используемый по отношению к полинуклеотидной последовательности, означает неприродный полинуклеотид (или часть полинуклеотида), который отличается от полинуклеотидной последовательности дикого типа. Например, синтетический ген (или часть гена) может содержать одну или более последовательностей нуклеиновой кислоты, не являющихся смежными в природе (химерных последовательностей), и/или может охватывать замены, вставки и делеции и их комбинации.

Как используется в данном документе, "ген" относится к полинуклеотиду, содержащему нуклеотиды, кодирующие функциональную молекулу (например, полипептид или РНК), и предусматривает нуклеиновые кислоты, представляющие собой кДНК или геномную ДНК. Обычно понятно, что геномная ДНК, кодирующая полипептид или РНК, содержит некодирующие области (т.е. интроны), которые вырезаются из зрелой мРНК путем сплайсинга и, таким образом, отсутствуют в кДНК, кодирующей те же самые полипептид или РНК. "Ген" может содержать фрагмент нуклеиновой кислоты, который экспрессирует специфические РНК, белок или полипептид. "Ген" может дополнительно содержать регуляторные последовательности, расположенные перед кодирующей последовательностью (5'-некодирующие последовательности) и после нее (3'-некодирующие последовательности). "Ген" также может содержать триплекс-образующие олигонуклеотиды (ТФО). "Нативный ген" относится к гену, обнаруживаемому в природе с его собственными регуляторными последовательностями. "Химерный ген" или "рекомбинантный ген" относится к любому гену, не являющемуся нативным геном, содержащему регуляторные и/или кодирующие последовательности, не обнаруживаемые вместе в природе. Соответственно химерный ген может содержать регуляторные последовательности и кодирующие последовательности, полученные из разных источников, или регуляторные последовательности и кодирующие последовательности, полученные из одного и того же источника, но расположенные отличным от обнаруживаемого в природе образом. Химерный ген может содержать кодирующие последовательности, полученные из разных источников, и/или регуляторные последовательности, полученные из разных источников. "Эндогенный ген" относится к нативному гену в его естественном местоположении в геноме организма.

"Чужеродный" ген, или "экзогенный" ген, или "гетерологичный" ген, или "трансген" относится к гену, в обычных условиях не обнаруживаемому в клетке-хозяине или организме-хозяине, но вводимому в клетку-хозяина или организм-хозяина путем переноса генов. Трансгены могут включать нативные гены, вставляемые в ненативный организм, или химерные или синтетические гены. Трансген может также представлять собой кДНК-версию эндогенного гена. Трансгенный ген также может представлять собой немутантную версию эндогенного мутантного гена или мутантную версию эндогенного немутантного гена. Трансгенный ген также может представлять собой терапевтический ген или экспериментальный

ген, такой как репортер. Трансген можно вводить напрямую в клетки-мишени организма-хозяина или вводить опосредованно путем переноса трансформированных клеток, например аутологических клеток, в организм-хозяин.

Как используется в данном документе, под "5'-нетранслируемой областью" или "5'-UTR" гена следует понимать ту часть гена, которая транскрибируется в первичный РНК-транскрипт (пре-мРНК), причем эта часть расположена выше кодирующей последовательности. Первичный транскрипт представляет собой первоначальный РНК-продукт, содержащий интроны и экзоны, получаемый путем транскрипции ДНК. Многие первичные транскрипты должны подвергнуться процессингу РНК для образования физиологически активных соединений РНК. Процессинг до зрелой мРНК может включать обрезку концов, удаление интронов, экзипирование и/или вырезание отдельных молекул рРНК из их РНК-предшественников. 5'-UTR мРНК представляет собой, таким образом, ту часть мРНК, которая не транслируется в белок и которая расположена выше кодирующей последовательности. В геномной последовательности 5'-UTR обычно определяется как область между сайтом инициации транскрипции и стартовым кодоном. 5'-нетранслируемые области (5'-UTR) мРНК позвоночных могут иметь длину, составляющую от нескольких десятков оснований до нескольких сотен оснований (Crowe et al., 2006, BMC Genomics, 7:16). "Синтетическая 5'-UTR" представляет собой неприродную 5'-UTR, которая отличается от полинуклеотидной последовательности 5'-UTR дикого типа. Синтетическая 5'-UTR может содержать одну или более последовательностей нуклеиновой кислоты, не являющихся смежными в природе (химерных последовательностей), и/или может охватывать замены, вставки и делеции и их комбинации.

Как используется в данном документе, "граница сплайсинга", "экзон-интронное сочленение" или "сайт сплайсинга" представляют собой области на границах интронов пре-мРНК эукариот, распознаваемые клеточным аппаратом сплайсинга, в которых соединяются два соседних экзона и удаляется интрон. Сайты сплайсинга представлены консервативными последовательностями на 5'- и 3'-границах интрон-экзон. Для подавляющего большинства интронов наиболее консервативными последовательностями являются GU, фланкирующая интрон с 5'-конца, и AG, фланкирующая с 3'-конца. Тем не менее также известны исключения для этих консенсусных последовательностей, как, например, в интронах с сайтами сплайсинга AU-AC. 5'-сайт сплайсинга на границе интрон-экзон известен как "донорный сайт сплайсинга". 3'-сайт сплайсинга на границе интрон-экзон известен как "акцепторный сайт сплайсинга". "Сплайсосома" представляет собой крупный рибонуклеопротеиновый комплекс, который служит в качестве клеточного аппарата сплайсинга. Сплайсосома состоит из субъединиц - малых ядерных рибонуклеопротеинов (snRNP), которые собираются на подложке из пре-мРНК. snRNP сами по себе состоят из малых ядерных РНК (snRNA) и нескольких белковых субъединиц. В ходе реакции сплайсинга распознавание сайтов сплайсинга в пре-мРНК выполняется посредством образования пар оснований с snRNA.

Как используется в данном документе, "гетерологичная" ДНК относится к ДНК, в естественных условиях не находящейся в клетке или в участке хромосомы в клетке. Таким образом, гетерологичная ДНК содержит ген, чужеродный для клетки. "Гетерологичная" ДНК также может содержать ген, в естественных условиях находящийся в клетке, но расположенный в ненативном местоположении. Кроме того, "гетерологичная" молекула ДНК может представлять собой молекулу ДНК, содержащую сегмент ДНК, отличной от ДНК хозяина, функционально связанный с сегментом ДНК хозяина, например транскрипционным промотором. И наоборот, гетерологичная молекула ДНК может содержать эндогенный ген, функционально связанный с экзогенным промотором. Кроме того, "гетерологичный" может относиться к молекуле или фрагменту ДНК, полученным из гена, не имеющего общего эволюционного происхождения с эталонными молекулой или фрагментом ДНК.

Как используется в данном документе, термин "геном" предусматривает хромосомную, а также митохондриальную, хлоропластную и вирусную ДНК или РНК.

Как используется в данном документе, термин "зонд" относится к одонитевой молекуле нуклеиновой кислоты, которая может образовывать пары оснований с комплементарной одонитевой нуклеиновой кислотой-мишенью с образованием двухнитевой молекулы.

Как используется в данном документе, "кодирующая последовательность" ДНК относится к двухнитевой последовательности ДНК, которая кодирует полипептид и может быть транскрибирована и транслирована в полипептид в клетке *in vitro* или *in vivo* или вне клетки, например в пробирке, будучи помещенной под контроль соответствующих регуляторных последовательностей. "Подходящие регуляторные последовательности" относится к нуклеотидным последовательностям, расположенным выше (5'-некодирующие последовательности) кодирующей последовательности, в пределах нее или ниже нее (3'-некодирующие последовательности), которые влияют на транскрипцию, процессинг или стабильность РНК или трансляцию связанной кодирующей последовательности. Регуляторные последовательности могут включать промоторы, лидерные последовательности для трансляции, интроны, последовательности для распознавания полиаденилирования, сайт процессинга РНК, сайт связывания эффектора и структуру типа "стебель-петля". Границы кодирующей последовательности определяются стартовым кодоном на 5'-(амино-) конце и стоп-кодоном для трансляции на 3'-(карбоксильном) конце. Кодированная последовательность может включать без ограничения прокариотические, эукариотические или химерные последовательности, кДНК образующуюся на мРНК, геномные последовательности ДНК и даже синте-

тические последовательности ДНК.

Как используется в данном документе, "открытая рамка считывания" сокращенно указана как ORF и относится к длине последовательности нуклеиновой кислоты ДНК, кДНК либо РНК, которая охватывает сигнал начала трансляции или инициаторный кодон, такой как ATG или AUG, и терминирующий кодон и может потенциально транслироваться в полипептидную последовательность.

Как используется в данном документе, термин "нижерасположенный" относится к нуклеотидной последовательности, расположенной в 3'-направлении от эталонной нуклеотидной последовательности. В частности, нижерасположенные нуклеотидные последовательности обычно относятся к последовательностям, расположенным после точки начала транскрипции. Например, кодон гена, иницирующий трансляцию, расположен ниже сайта начала транскрипции. Термин "вышерасположенный" относится к нуклеотидной последовательности, расположенной в 5'-направлении от эталонной нуклеотидной последовательности. В частности, вышерасположенные нуклеотидные последовательности обычно относятся к последовательностям, расположенным с 5'-концевой стороны от кодирующей последовательности или точки начала транскрипции. Например, большинство промоторов расположено выше сайта начала транскрипции.

Как используется в данном документе, термин "химически синтезированный", относящийся к последовательности ДНК, означает, что составляющие ее нуклеотиды были собраны *in vitro*. Можно осуществлять химический синтез ДНК вручную с помощью хорошо известных процедур, или можно выполнять автоматический химический синтез с помощью одного из ряда коммерчески доступных аппаратов. Соответственно гены можно приспособить для оптимальной экспрессии генов с использованием оптимизации нуклеотидной последовательности, отражающей смещение частоты использования кодонов в клетке-хозяине. Специалист в данной области осознает вероятность успешной экспрессии гена при смещении частоты использования кодонов в сторону кодонов, предпочитаемых хозяином. Определение предпочтительных кодонов может проводиться на основе исследования генов, полученных из клетки-хозяина, в тех случаях, когда доступна информация об их последовательности.

Как используется в данном документе, термины "эндонуклеаза рестрикции" и "рестрикционный фермент" используются взаимозаменяемо и относятся к ферменту, который связывает и разрезает специфическую нуклеотидную последовательность в пределах двухнитевой ДНК.

Как используется в данном документе, термины "полипептид", "пептид" и "белок" используются взаимозаменяемо и относятся к полимерному соединению, состоящему из ковалентно связанных аминокислотных остатков.

Как используется в данном документе, "полимеразная цепная реакция" сокращенно указана как ПНР и относится к способу ферментативной амплификации специфических последовательностей нуклеиновых кислот *in vitro*. ПЦР предполагает серию повторяющихся температурных циклов, при этом каждый цикл включает три стадии: денатурацию нуклеиновой кислоты-матрицы с разделением нитей молекулы-мишени, отжиг одностороннего олигонуклеотидного праймера для ПЦР с нуклеиновой кислотой-матрицей и удлинение отожженного(ых) праймера(ов) с помощью ДНК-полимеразы.

Как используется в данном документе, термин "гомология" относится к процентной идентичности двух полинуклеотидных или двух полипептидных компонентов. Соответствие между последовательностями одного и другого компонентов можно определить с помощью методик, известных из уровня техники. Например, гомологию можно определить посредством прямого сравнения информации о последовательностях для двух молекул полипептидов путем выравнивания информации о последовательностях и использования легкодоступных компьютерных программ. В качестве альтернативы гомологию можно определить посредством гибридизации полинуклеотидов в условиях, в которых между гомологичными областями образуются стабильные дуплексы, с последующим расщеплением с помощью нуклеазы(нуклеаз), специфичной(ых) в отношении односторонних нуклеиновых кислот, и определением размера фрагментов, полученных в результате расщепления. Как используется в данном документе, термин "гомологичный" во всех его грамматических формах и вариантах произношения относится к взаимоотношениям между белками, имеющими "общее эволюционное происхождение", в том числе белками из суперсемейств (например, в супер семействе иммуноглобулинов) и гомологичными белками из различных видов (например, легкими цепями миозина и т.д.) (Reeck et al. (1987), Cell, 50:667). Такие белки (и кодирующие их гены) характеризуются гомологией последовательности, как видно из высокой степени сходства их последовательностей. Однако в разговорной речи и в настоящей заявке термин "гомологичный", будучи модифицированным с помощью такого наречия, как "высоко", может относиться к сходству последовательностей, но не к общему эволюционному происхождению.

Соответственно термин "сходство последовательностей" во всех его грамматических формах относится к степени идентичности или соответствия между последовательностями нуклеиновых кислот или аминокислотными последовательностями белков, которые могут иметь или не иметь общее эволюционное происхождение (см. Reeck et al. (1987), Cell, 50:667). В одном варианте осуществления две последовательности ДНК являются "по сути гомологичными" или "по сути сходными", если на определенной длине последовательностей ДНК совпадает по меньшей мере приблизительно 21% (предпочтительно по меньшей мере приблизительно 50% и наиболее предпочтительно по меньшей мере приблизительно

75, 90, 95, 96, 97, 98 или 99%) нуклеотидов. Последовательности, которые являются по сути гомологичными, можно идентифицировать путем сравнения последовательностей с помощью стандартного программного обеспечения, доступного в банках данных о последовательностях, или в рамках эксперимента по Саузерн-блот-гибридизации, например, в жестких условиях, как определено для этой конкретной системы. Определение соответствующих условий гибридизации находится в пределах квалификации специалиста в данной области (см., например, Sambrook et al., 1989, ниже).

Как используется в данном документе, "по сути сходный" относится к фрагментам нуклеиновых кислот, в которых изменения одного или более нуклеотидных оснований приводят к замене одной или более аминокислот, но не влияют на функциональные свойства белка, кодируемого последовательностью ДНК. "По сути сходный" также относится к фрагментам нуклеиновых кислот, в которых изменения одного или более нуклеотидных оснований не влияют на способность фрагмента нуклеиновой кислоты опосредовать изменение экспрессии генов с помощью технологии антисмыслового ингибирования или косупрессии. "По сути сходный" также относится к модификациям фрагментов нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению, таким как делеция или вставка одного или более нуклеотидных оснований, которые по сути не влияют на функциональные свойства образующегося в результате транскрипта. Таким образом, понятно, что настоящее изобретение охватывает больше, чем конкретные иллюстративные последовательности. Каждая из предложенных модификаций, как и определение сохранения биологической активности кодируемых продуктов, находится вполне в пределах квалификации обычного специалиста в данной области.

Кроме того, специалисту в данной области понятно, что по сути сходные последовательности, охватываемые настоящим изобретением, также определяются по их способности к гибридизации в жестких условиях. Молекула нуклеиновой кислоты "способна к гибридизации" с другой молекулой нуклеиновой кислоты, такой как кДНК, геномная ДНК или РНК, в случае, если одонитевая форма молекулы нуклеиновой кислоты может отжигаться с другой молекулой нуклеиновой кислоты при соответствующих условиях температуры и ионной силы раствора (см. Sambrook et al., 1989, ниже). Условия гибридизации и отмывки хорошо известны и проиллюстрированы на примере в Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (1989), в частности, в главе 11 и табл. 11.1 в этом источнике. Условия температуры и ионной силы определяют "жесткость" гибридизации.

Условия жесткости можно регулировать для скрининга в отношении от фрагментов с умеренной степенью сходства, таких как гомологичные последовательности из организмов, состоящих в дальнем родстве, до фрагментов с высокой степенью сходства, таких как дублированные гены функциональных ферментов из близкородственных организмов. Для предварительного скрининга в отношении гомологичных нуклеиновых кислот можно использовать условия гибридизации низкой жесткости, соответствующие T_m 55°C, например 5X SSC, 0,1% SDS, 0,25% молока, без формамида; или 30% формамид, 5X SSC, 0,5% SDS. Условия гибридизации умеренной жесткости соответствуют более высокой T_m , например 40% формамид с 5X или 6X SSC. Условия гибридизации высокой жесткости соответствуют наиболее высокой T_m , например 50% формамид, 5X или 6X SSC.

Для гибридизации требуется, чтобы две нуклеиновые кислоты содержали комплементарные последовательности, хотя в зависимости от жесткости гибридизации возможны ошибки спаривания оснований. Термин "комплементарный" используется для описания взаимоотношений между нуклеотидными основаниями, способными к гибридизации друг с другом. Например, применительно к ДНК, аденозин является комплементарным тимину, а цитозин является комплементарным гуанину. Соответственно настоящее изобретение также предусматривает выделенные фрагменты нуклеиновых кислот, комплементарные полным последовательностям, раскрытым или применяемым в данном документе, а также по сути сходным с ними последовательностям нуклеиновых кислот.

В одном варианте осуществления полинуклеотиды выявляют путем использования условий гибридизации, включающих стадию гибридизации при T_m 55°C, и с использованием условий, изложенных выше. В другом варианте осуществления T_m составляет 60°C; в определенных вариантах осуществления T_m составляет 63 или 65°C.

Отмывки после гибридизации также определяют условия жесткости. В одном наборе предпочтительных условий используется серия отмывок, которые начинаются с 6X SSC, 0,5% SDS при комнатной температуре в течение 15 минут (мин), затем повторяются с 2X SSC, 0,5% SDS при 45°C в течение 30 мин, а затем дважды повторяются с 0,2X SSC, 0,5% SDS при 50°C в течение 30 мин. В другом примере жестких условий используются более высокие температуры, при которых отмывки идентичны описанным выше за исключением того, что температуру двух последних 30-минутных отмывок с 0,2X SSC, 0,5% SDS увеличивают до 60°C. В еще одном другом примере условий высокой жесткости две последние отмывки используются с 0,1X SSC, 0,1% SDS при 65°C. Для гибридизации требуется, чтобы две нуклеиновые кислоты содержали комплементарные последовательности, хотя в зависимости от жесткости гибридизации возможны ошибки спаривания оснований.

Соответствующая жесткость гибридизации нуклеиновых кислот зависит от длины нуклеиновых ки-

слот и степени комплементарности - переменных, хорошо известны из уровня техники. Чем большей является степень сходства или гомологии между двумя нуклеотидными последовательностями, тем большим является значение T_m для гибридов нуклеиновых кислот, имеющих эти последовательности. Относительная стабильность (соответствующая более высокой T_m) гибридов нуклеиновых кислот уменьшается в следующем порядке: РНК:РНК, ДНК:РНК, ДНК:ДНК. Для гибридов длиной более 100 нуклеотидов были выведены уравнения для расчета T_m (см. Sambrook et al., выше, 9.50-10.51). Для гибридизации с более короткими нуклеиновыми кислотами, т.е. олигонуклеотидами, положение ошибок спаривания становится более важным, и длина олигонуклеотида определяет его специфичность (см. Sambrook et al., выше, 11.7-11.8).

В одном варианте осуществления полинуклеотиды выявляют путем использования условий гибридизации, включающих стадию гибридизации при концентрации солей менее 500 мМ и температуре по меньшей мере 37°C и стадию отмывки в 2X SSPE при температуре по меньшей мере 63°C. В другом варианте осуществления условия гибридизации включают концентрацию солей менее 200 мМ и температуру по меньшей мере 37°C на стадии гибридизации. В определенных вариантах осуществления условия гибридизации включают 2X SSPE и 63°C на стадиях как гибридизации, так и отмывки.

Длина нуклеиновой кислоты, способной к гибридизации, составляет, например, по меньшей мере приблизительно 10 нуклеотидов. Минимальная длина нуклеиновой кислоты, способной к гибридизации, может составлять по меньшей мере приблизительно 15 нуклеотидов; по меньшей мере приблизительно 20 нуклеотидов или по меньшей мере 30 нуклеотидов. Кроме того, специалисту в данной области будет понятно, что температуру и концентрацию солей в растворе для отмывки можно при необходимости отрегулировать в соответствии с такими факторами, как длина зонда.

По сути сходные фрагменты нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению представляют собой те фрагменты нуклеиновых кислот, последовательности ДНК которых являются на по меньшей мере 70% идентичными последовательностям ДНК фрагментов нуклеиновых кислот, о которых сообщается в данном документе. Фрагменты нуклеиновых кислот согласно настоящему изобретению включают те фрагменты нуклеиновых кислот, последовательности ДНК которых являются на по меньшей мере 80, 90, 95, 96, 97, 98 и 99% идентичными последовательностям ДНК фрагментов нуклеиновых кислот, о которых сообщается в данном документе.

Как используется в данном документе, термин "соответствующий" используется в данном документе в отношении сходных или гомологичных последовательностей независимо от того, является ли точное положение идентичным находящемуся в молекуле, сходство или гомология с которой измерится, или отличным от него. Выравнивание последовательностей нуклеиновых кислот или аминокислотных последовательностей может содержать пробелы. Таким образом, термин "соответствующий" относится к сходству последовательностей, а не к нумерации аминокислотных остатков или нуклеотидных оснований.

Как используется в данном документе, "значительная часть" аминокислотной или нуклеотидной последовательности охватывает достаточную часть аминокислотной последовательности полипептида или нуклеотидной последовательности гена для предположительной идентификации этого полипептида или гена посредством оценивания последовательности вручную специалистом в данной области либо компьютерно-автоматизированного сравнения и идентификации последовательностей с помощью алгоритмов, таких как BLAST (средство поиска основного локального выравнивания; Altschul et al., J. Mol. Biol., 215:403, 410 (1993)); BLAST является общедоступным во Всемирной паутине. Как правило, для предположительной идентификации полипептидной последовательности или последовательности нуклеиновой кислоты как гомологичной известному белку или гену необходима последовательность из десяти или более смежных аминокислот или тридцати или более нуклеотидов. Кроме того, применительно к нуклеотидным последовательностям в зависимых от последовательности способах идентификации (например, Саузерн-блот-гибридизации) и выделения (например, гибридизации *in situ* в бактериальных колониях или бляшках бактериофагов) генов можно применять геноспецифические олигонуклеотидные зонды, содержащие 20-30 смежных нуклеотидов. В дополнение для получения конкретного фрагмента нуклеиновой кислоты, содержащего праймеры, можно применять короткие олигонуклеотиды размером 12-15 оснований в качестве праймеров для амплификации в ПЦР. Соответственно "значительная часть" нуклеотидной последовательности охватывает достаточную часть последовательности для специфической идентификации и/или выделения фрагмента нуклеиновой кислоты, содержащего данную последовательность.

Как используется в данном документе, термин "процентное сходство", известный в данной области техники, означает взаимоотношение между двумя или более полипептидными последовательностями или двумя или более полинуклеотидными последовательностями, определяемое путем сравнения последовательностей. В данной области техники "идентичность" также означает в зависимости от конкретного случая степень родства последовательностей между полипептидными или полинуклеотидными последовательностями, определяемую по совпадению между нитями с такими последовательностями. "Идентичность" и "сходство" можно без труда рассчитать с помощью известных способов, в том числе без ограни-

чения 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., Griffin, H.G., eds.), Humana Press, New Jersey (1994); Sequence Analysis in Molecular Biology (von Heinje, G., ed.), Academic Press (1987); и Sequence Analysis Primer (Gribskov, M., Devereux, J., eds.), Stockton Press, New York (1991). Способы определения идентичности разработаны для определения наилучшего совпадения между тестируемыми последовательностями. Способы определения идентичности и сходства закодированы в общедоступных компьютерных программах. Выравнивания последовательностей и расчеты процентной идентичности можно выполнять с помощью программы Megalign из пакета программ для биоинформатических вычислений LASERGENE (DNASTAR Inc., Мэдисон, Висконсин). Множественное выравнивание последовательностей можно выполнять с помощью способа выравнивания Clustal (Higgins et al., CABIOS, 5:151-153 (1989)) с параметрами по умолчанию (штраф за открытие гэпа=10, штраф за продление гэпа=10). Можно выбрать параметры по умолчанию для попарных выравниваний с помощью способа Clustal: k-кортеж=1, штраф за открытие гэпа=3, окно=5 и сохраненные диагонали=5.

Как используется в данном документе, термин "программное обеспечение для анализа последовательностей" относится к любому компьютерному алгоритму или программе из системы программного обеспечения, применимым для анализа нуклеотидных или аминокислотных последовательностей. "Программное обеспечение для анализа последовательностей" может быть коммерчески доступным или независимо разработанным. Типичное программное обеспечение для анализа последовательностей включает без ограничения пакет программ GCG (Wisconsin Package, версия 9.0, Genetics Computer Group (GCG), Мэдисон, Висконсин), BLASTP, BLASTN, BLASTX (Altschul et al., J. Mol. Biol., 215:403-410 (1990)) и DNASTAR (DNASTAR, Inc., 1228, S. Park St., Мэдисон, Висконсин, 53715, США). В контексте настоящей заявки будет понятно, что в тех случаях, когда для анализа применяется программное обеспечение для анализа последовательностей, результаты анализа будут определены с использованием "значений по умолчанию" упоминаемой программы, если не указано иное. Как используется в данном документе, "значения по умолчанию" будут означать любой набор значений или параметров, изначально загружаемых в программном обеспечении при первой инициализации.

Как используется в данном документе, термины "экспрессия" или "экспрессия генов" относятся к процессу преобразования генетической информации, закодированной в гене, в РНК (например, мРНК, рРНК, тРНК или snRNA) посредством "транскрипции" гена (т.е. под действием фермента РНК-полимеразы), а для генов, кодирующих белки - в белок посредством "трансляции" мРНК. Экспрессию генов можно регулировать на многих стадиях процесса. "Положительная регуляция" или "активация" относится к регуляции, при которой увеличивается выработка продуктов экспрессии генов (т.е. РНК или белка), тогда как "отрицательная регуляция" или "репрессия" относится к регуляции, при которой уменьшается выработка. Факторы (например, факторы транскрипции), участвующие в положительной регуляции или отрицательной регуляции, зачастую называют соответственно "активаторами" и "репрессорами". Для целей настоящего изобретения ген-мишень может подвергаться "посттранскрипционной" (т.е. на уровне РНК-транскрипта) отрицательной регуляции посредством специфического взаимодействия с молекулой РНК, осуществляющей отрицательную регуляцию.

Как используется в данном документе, термин "последовательности, контролируемые транскрипцию и трансляцию" относится к регуляторным последовательностям ДНК, таким как промоторы, энхансеры, терминаторы и т.п., которые обеспечивают экспрессию кодирующей последовательности в клетке-хозяине.

Термин "на основе рецептора экдизона" применительно к переключателю генов относится к переключателю генов, содержащему по меньшей мере функциональную часть встречающегося в природе или синтетического лигандсвязывающего домена рецептора экдизона, который регулирует экспрессию генов в ответ на воздействие лиганда, связывающегося с лигандсвязывающим доменом рецептора экдизона. Примеры систем, отвечающих на экдизон, описаны в патентах США № 7091038 и 6258603. В одном варианте осуществления система представляет собой RHEOSWITCH THERAPEUTIC SYSTEM® (RTS®), которая содержит два слитых белка - DEF-домены рецептора экдизона (EcR), подвергнутого мутагенезу, слитые с ДНК-связывающим доменом Gal4, и EF-домены химерного RXR, слитые с доменом активации транскрипции VP16, которые экспрессируются под контролем конститутивного промотора.

Как используется в данном документе, термин "функционально связанный" относится к такой связи последовательностей нуклеиновой кислоты в одном фрагменте нуклеиновой кислоты, что на функцию одной из них влияет другая. Например, промотор функционально связан с кодирующей последовательностью в случае, если он способен влиять на экспрессию этой кодирующей последовательности (т.е. когда кодирующая последовательность находится под транскрипционным контролем промотора). Кодирующие последовательности могут быть функционально связанными с регуляторными последовательностями в смысловой или антисмысловой ориентации.

Как используется в данном документе, "вектор" относится к любому средству для клонирования и/или переноса нуклеиновой кислоты в клетку-хозяина. Вектор может представлять собой репликон, к которому может быть присоединен другой сегмент ДНК в целях обеспечения репликации присоединен-

ного сегмента. "Репликон" относится к любому генетическому элементу (например, плазмиде, фагу, космиде, хромосоме, вирусу), функционирующему в качестве автономной единицы репликации ДНК *in vivo*, т.е. способному к репликации под своим собственным контролем. Термин "вектор" предусматривает как вирусные, так и невирусные средства для введения нуклеиновой кислоты в клетку-хозяина *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*. Термин "вектор" также может предусматривать миникольцевые ДНК. Например, вектор может представлять собой плазмиду без последовательностей бактериальной ДНК. Было показано, что в результате удаления последовательностей бактериальной ДНК, богатых CpG-областями, уменьшается сайленсинг экспрессии трансгена и достигается более устойчивая экспрессия с плазмидных ДНК-векторов (см., например, Ehrhardt, A. et al. (2003), *Hum. Gene Ther.*, 10:215-25; Yet, N.S. (2002), *Mol. Ther.*, 5:731-38; Chen, Z.Y. et al. (2004), *Gene Ther.*, 11:856-64). Термин "вектор" также может предусматривать транспозоны, такие как Sleeping Beauty (Izsvak et al. (2000), *J. Mol. Biol.*, 302:93-102) или искусственные хромосомы.

Большое количество векторов, известных из уровня техники, можно применять для манипуляций с нуклеиновыми кислотами, включения в состав генов элементов ответа и промоторов и т.д. или переноса нуклеиновой кислоты в клетку-хозяина. Возможные векторы включают, например, плазмиды или модифицированные вирусы, в том числе, например, бактериофаги, такие как производные фага лямбда, или плазмиды, такие как производные плазмид pBR322 или pUC, или вектор Bluescript. Для размещения более крупных вставок можно применять более крупные векторы, такие как искусственные хромосомы (бактерий (BAC), дрожжей (YAC) или человека (HAC)). Например, вставку фрагментов ДНК, соответствующих элементам ответа или промоторам, в подходящий вектор можно осуществлять путем лигирования соответствующих фрагментов ДНК в выбранный вектор, имеющий комплементарные "липкие" концы. В качестве альтернативы концы молекул ДНК могут быть подвергнуты ферментативной модификации или может быть получен любой сайт путем лигирования нуклеотидных последовательностей (линкеров) в концы ДНК. Такие векторы могут быть сконструированы таким образом, чтобы они содержали селективируемые маркерные гены, обеспечивающие отбор клеток, трансфицированных или трансформированных с помощью вектора. Рекомбинантный вектор, содержащий полинуклеотид в соответствии с настоящим изобретением, может содержать одну или более точек начала репликации в клеточных хозяевах, в которых желательна его амплификация или его экспрессия, маркеров или селективируемых маркеров.

Как используется в данном документе, термин "селективируемый маркер" относится к идентифицирующему фактору, обычно гену устойчивости к антибиотику или химическому веществу, по которому можно провести отбор исходя из эффекта маркерного гена, т.е. устойчивости к антибиотикам, устойчивости к гербицидам, колориметрических маркеров, ферментов, флуоресцентных маркеров и т.п., где эффект используется для отслеживания наследования нуклеиновой кислоты, представляющей интерес, и/или для идентификации или отбора клетки или организма, унаследовавших нуклеиновую кислоту, представляющую интерес. Примеры селективируемых маркерных генов, известных и применяемых в данной области техники, включают: гены, обеспечивающие устойчивость к ампициллину, стрептомицину, гентамицину, канамицину, гигромицину, гербициду биалафосу, сульфонамиду и т.п.; а также гены, применяемые в качестве фенотипических маркеров, т.е. гены, регулирующие биосинтез антоцианов, ген изопентанилтрансферазы и т.п.

Как используется в данном документе, термин "репортерный ген" относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей идентифицирующий фактор, который можно идентифицировать исходя из эффекта репортерного гена, где эффект используется для отслеживания наследования нуклеиновой кислоты, представляющей интерес, для идентификации клетки или организма, унаследовавших нуклеиновую кислоту, представляющую интерес, и/или для измерения индукции экспрессии или транскрипции гена. Примеры репортерных генов, известных и применяемых в данной области техники, включают гены люциферазы (Luc), флуоресцентных белков, таких как зеленый флуоресцентный белок (GFP), хлорамфениколацетилтрансферазы (CAT), бета-галактозидазы (LacZ), бета-глюкуронидазы (Gus) и т.п. Селективируемые маркерные гены также могут считаться репортерными генами.

Как используется в данном документе, термин "плаزمид" относится к внехромосомному элементу, зачастую несущему ген, который не участвует в центральном метаболизме клетки, и обычно имеющему форму кольцевых двухнитевых молекул ДНК. Такие элементы могут представлять собой автономно реплицирующиеся последовательности, последовательности, интегрирующиеся в геном, фаговые или нуклеотидные последовательности, линейную, кольцевую или сверхспиральную одно-или двухнитевую ДНК или РНК, полученные из любого источника, в которых ряд нуклеотидных последовательностей был соединен или рекомбинирован с получением уникальной конструкции, способной обеспечивать введение промоторного фрагмента и последовательности ДНК, кодирующей выбранный продукт гена, вместе с соответствующей 3'-нетранслируемой последовательностью в клетку.

Как используется в данном документе, "клонированный вектор" относится к "репликону", который представляет собой единицу длины нуклеиновой кислоты, например ДНК, которая реплицируется последовательно и которая содержит точку начала репликации, такую как плаزمид, фаг или космид, к которой может быть присоединен другой сегмент нуклеиновой кислоты в целях обеспечения репликации

присоединенного сегмента. Клонированные векторы могут быть способны к репликации в одном типе клеток и к экспрессии в другом ("челночные векторы"). Термин "вектор экспрессии" относится к вектору, плазмиде или средству, предназначенным для обеспечения экспрессии вставленной последовательности нуклеиновой кислоты после введения ее в клетку-хозяина путем трансформации. Клонированный ген, т.е. вставленную последовательность нуклеиновой кислоты, обычно помещают под контроль контролирующих элементов, таких как промотор, минимальный промотор, энхансер и т.п. Области, контролирующей инициацию, или промоторы, применимые для управления экспрессией нуклеиновой кислоты в клетке-хозяине, являются многочисленными и знакомыми специалистам в данной области.

Примеры эукариотических векторов включают без ограничения pW-LNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1 и pSG, доступные от Stratagene; pSVK3, pBPV, pMSG и pSVL, доступные от Amersham Pharmacia Biotech; а также pCMVDsRed2-express, pIRES2-DsRed2, pDsRed2-Mito, pCMV-EGFP, доступные от Clontech. Многие другие векторы являются хорошо известными и коммерчески доступными.

Например, применимые векторы, которые содержат молекулярные "опорные точки" вставки для быстрой вставки и удаления элементов генетических программ, описаны в публикации заявки на патент США № 2004/0185556, заявке на патент США № 11/233246 и публикациях международных заявок № WO 2005/040336 и WO 2005/116231.

Как используется в данном документе, термины "промотор" и "промоторные последовательности" используются взаимозаменяемо и относятся к последовательности ДНК, способной контролировать экспрессию кодирующей последовательности или функциональной РНК. Как правило, кодирующая последовательность расположена в направлении 3'-конца от промоторной последовательности. Промоторы могут быть полностью получены из нативного гена или состоять из различных элементов, полученных из различных промоторов, обнаруживаемых в природе, или даже содержать синтетические сегменты ДНК. Специалистам в данной области понятно, что экспрессией гена в различных тканях или типах клеток, или на различных стадиях развития, или в ответ на различные условия окружающей среды или физиологические условия могут управлять различные промоторы.

Промоторы, которые обуславливают экспрессию гена в большинстве типов клеток в большинстве моментов времени, обычно называют "конститутивными промоторами". Промоторы, которые обуславливают экспрессию гена в конкретном типе клеток, обычно называют "промоторами, активными в определенных условиях". Неограничивающими примерами промоторов, активных в определенных условиях, являются "клеточноспецифические промоторы" или "тканеспецифические промоторы". Промоторы, которые обуславливают экспрессию гена на конкретной стадии развития или дифференцировки клеток, обычно называют "промоторами, специфичными для стадии развития" или "промоторами, специфичными для стадии дифференцировки". Промоторы, которые индуцируются и обуславливают экспрессию гена после воздействия на клетку или обработки клетки с помощью средства, биологической молекулы, химического средства, лиганда, света и т.п., которые индуцируют промотор, обычно называют "индуцируемыми промоторами" или "регулируемыми промоторами". Неограничивающими примерами индуцируемых промоторов являются TetO-содержащий индуцируемый промотор, промотор гена белка теплового шока, промотор гена металлотионеина, промотор гена гормона роста и промотор MMTV-LTR. Кроме того, понятно, что поскольку в большинстве случаев точные границы регуляторных последовательностей не были определены в полной мере, фрагменты ДНК разной длины могут обладать идентичной промоторной активностью.

Промоторная последовательность обычно ограничена на своем 3'-конце сайтом инициации транскрипции и простирается выше него (в 5'-направлении), охватывая минимальное количество оснований или элементов, необходимых для инициации транскрипции на выявляемых уровнях, превышающих фоновые. В пределах промоторной последовательности будет находиться сайт инициации транскрипции (в целях удобства определяемый, например, посредством картирования с помощью нуклеазы S1), а также домены связывания белков (консенсусные последовательности), отвечающие за связывание с РНК-полимеразой.

Кодирующая последовательность "находится под контролем" последовательностей, контролирующих транскрипцию и трансляцию в клетке, в случае если РНК-полимераза транскрибирует кодирующую последовательность в мРНК, которая затем подвергается транс-сплайсингу РНК (если кодирующая последовательность содержит интроны) и транслируется в белок, кодируемый кодирующей последовательностью.

Области, контролирующей терминацию, т.е. терминаторные последовательности или последовательности полиаденилирования, также могут быть получены из различных генов, нативных для предпочтительных хозяев. Сайт терминации необязательно может не быть необходимым, тем не менее он может быть включен. В одном варианте осуществления настоящего изобретения область, контролирующая терминацию, может состоять или быть получена из синтетической последовательности, синтетического сигнала полиаденилирования, позднего сигнала полиаденилирования SV40, сигнала полиаденилирования SV40, сигнала полиаденилирования гена гормона роста крупного рогатого скота (BGH), вирусных терминаторных последовательностей и т.п.

Как используется в данном документе, термин "трансфекция" относится к поглощению экзогенной

или гетерологичной РНК или ДНК клеткой. Клетка была "трансфицирована" экзогенной или гетерологичной РНК или ДНК, в случае если такая РНК или ДНК была введена внутрь клетки. Введенная путем трансфекции РНК или ДНК может интегрироваться в хромосомную ДНК (ковалентно связываться с ней), дополняя геном клетки-хозяина. "Трансформация" относится к переносу фрагмента нуклеиновой кислоты в геном организма-хозяина, в результате которого происходит генетически стабильное наследование.

Как используется в данном документе, термины "модулировать" и "модулирует" означают индукцию, снижение или ингибирование экспрессии нуклеиновой кислоты или гена, в результате чего происходят соответствующие индукция, снижение или ингибирование выработки белка или полипептида.

Как используется в данном документе, "РНК-транскрипт" относится к продукту, образующемуся в результате транскрипции последовательности ДНК, катализируемой РНК-полимеразой. В случае если РНК-транскрипт является абсолютно комплементарной копией последовательности ДНК, его называют первичным транскриптом или он может представлять собой последовательность РНК, полученную в результате посттранскрипционного процессинга первичного транскрипта, и его называют зрелой РНК. "Матричная РНК (мРНК)" относится к РНК, которая не содержит интроны и может транслироваться в белок в клетке. "кДНК" относится к двухнитевой ДНК, комплементарной мРНК и полученной из нее. "Смысловая" РНК относится к РНК-транскрипту, который содержит мРНК и поэтому может транслироваться в белок в клетке.

В состав вирусных векторов согласно настоящему изобретению могут быть включены "спейсерные последовательности", состоящие из некодирующих полинуклеотидов с длиной в диапазоне от 1001 до 3000 п.о., для обеспечения оптимального размера генома для упаковки в AAV.

В настоящем изобретении предусмотрены полинуклеотиды, содержащие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую белок фратаксин. Как используется в данном документе, "белок фратаксин" относится к полипептиду, обладающему биологической активностью фратаксина и имеющему аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 80% идентичную последовательности фратаксина человека, показанной под SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления полипептид имеет аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 85% идентичную SEQ ID NO: 1. В других вариантах осуществления полипептид имеет аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную SEQ ID NO: 1. В других вариантах осуществления полипептид имеет аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную SEQ ID NO: 1. В других вариантах осуществления полипептид имеет аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 96, 97, 98 или 99% идентичную SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления полипептид имеет аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1. Нуклеиновые кислоты, кодирующие белок фратаксин, могут иметь последовательность, показанную под SEQ ID NO: 2, или любую последовательность, кодирующую SEQ ID NO: 1, которая отличается от SEQ ID NO: 2 вследствие вырожденности генетического кода. Нуклеиновые кислоты, кодирующие варианты белка фратаксина, могут представлять собой нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, который имеет аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичную SEQ ID NO: 1.

Молекулы нуклеиновых кисло.

Фратаксины.

Атаксия Фридрейха (FRDA) связана с дефицитом фратаксина (FXN), митохондриального белка, участвующего в синтезе железосерных кластеров. Белки фратаксины, применимые в настоящем изобретении, представляют собой полноразмерные белки фратаксины, функциональные усеченные белки, функциональные варианты и функциональные аналоги. Под "функциональным" подразумевается, что фратаксин, применяемый в настоящем изобретении, сохраняет активность фратаксина, достаточную для облегчения по меньшей мере одного симптома атаксии Фридрейха. Последовательность белка фратаксина предпочтительно содержит часть на N-конце, которая направляет белок на транслокацию в митохондрии. Последовательности для локализации в митохондриях (также называемые "транзитными пептидами") известны из уровня техники. Последовательность для локализации фратаксина представляет собой аминокислоты 1-41 из SEQ ID NO: 1. Эта последовательность может быть заменена другими митохондриальными транслокаторами, последовательности которых известны из уровня техники. Под SEQ ID NO: 1 показан фратаксин в форме препропротеина, в котором аминокислоты 1-41 составляют транзитный пептид, аминокислоты 42-210 составляют пропротеин, а аминокислоты 56-2010 составляют зрелый белок.

В подробном исследовании белка фратаксина Faraj et al. изучали структурно-функциональную взаимосвязь С-концевой области (CTR) фратаксина и эффекта изменений в отношении стабильности белка фратаксина (Faraj, S.E. et al. (2014), FEBS J., 281(15):3397-3419) (включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). Faraj et al. обнаружили, что наличие определенной мутантной формы с мутацией L198R или полным усечением остатков 81-193 было достаточным для того, чтобы вызвать атаксию Фридрейха. Другие мутантные формы, как, например, имеющие мутацию L203C, увеличивали стабильность белка. В другом исследовании в рамках подготовки своей магистерской диссертации в Техасском университете A&M (2013) Melissa Thorstad обнаружила, что остатки Q153, W155 и R165 в β4- и β5-складчатых слоях FXN подразумеваются как наиболее важные для связывания с SDU, а остатки N146,

Q148, Q153 и W155, по-видимому, являются существенными для активации SDU. Таким образом, функциональные белки фратаксыны, применяемые в настоящем изобретении, включают те белки, в которых сохраняется структура и стабильность CTR фратаксина, и одним из их примеров является вариант L203C. Как правило, белок фратаксин, применимый в настоящем изобретении, имеет аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичную последовательности под SEQ ID NO: 1, при условии, что включены определенные остатки, в том числе транзитный пептид и пропоследовательность (аминокислоты 42-55 из SEQ ID NO: 1), а также Q153, W155, R165, N146, Q148, Q153 и W155. Такие белки фратаксыны могут быть определены специалистом в данной области с помощью способов согласно Faraj et al. и оценки стабильности и структуры CTR, а также сохранения критически важных остатков согласно описанному у Faraj и Thorstad.

Промоторы.

Промоторы, применимые для управления экспрессией нуклеиновой кислоты в желаемой клетке-хозяине, являются многочисленными и знакомыми специалистам в данной области. В векторе экспрессии можно применять практически любой промотор, способный управлять экспрессией полинуклеотида, кодирующего фратаксин, в том числе без ограничения вирусные промоторы, бактериальные промоторы, промоторы для экспрессии в животных клетках, промоторы для экспрессии в клетках млекопитающих, синтетические промоторы, конститутивные промоторы, тканеспецифические промоторы, промоторы генов, связанных с патогенезом или заболеваниями, промоторы, специфичные для стадии развития, индуцируемые промоторы и промоторы, регулируемые светом. Промоторы для экспрессии у животных и млекопитающих, известные из уровня техники, включают без ограничения раннюю промоторную область SV40 (SV40e), промотор, содержащийся в длинном концевом повторе (LTR), расположенном на 3'-конце, вируса саркомы Рауса (RSV), промотор E1A или главный поздний промотор (MLP) генов аденовирусов (Ad), ранний промотор цитомегаловируса (CMV), промотор гена тимидинкиназы (TK) вируса простого герпеса (HSV), промотор IE1 бакуловируса, промотор гена фактора элонгации 1-альфа (EF1), промотор гена фосфоглицераткиназы (PGK1), промотор гена убиквитина (UBC), промотор гена альбумина, регуляторные последовательности промотора гена металлотионеина-L мышцы и области, контролирующей транскрипцию, повсеместно активные промоторы (генов HPRT, виментина, х-актина, тубулина и т.п.), промоторы генов белков промежуточных филаментов (десмина, нейрофиламентов, кератина, GFAP и т.п.), промоторы терапевтических генов (MDR, CFTR или фактора свертывания крови VIII типа и т.п.), промоторы генов, связанных с патогенезом или заболеваниями, а также промоторы, которые демонстрируют тканеспецифичность и использовались у трансгенных животных, такие как контролирующая область гена основного белка миелина, активная в клетках-олигодендроцитах в головном мозге, контролирующая область гена легкой цепи 2 миозина, активная в скелетных мышцах. В дополнение эти экспрессионные последовательности могут быть модифицированы путем добавления энхансерных или регуляторных последовательностей и т.п. В полинуклеотидах согласно настоящему изобретению ген фратаксина функционально связан с промотором, управляющим транскрипцией гена фратаксина. Промотор может представлять собой любой известный промотор, обладающий эффектом управления транскрипцией гена фратаксина. Конкретные определенные примеры таких промоторов включают без ограничения промотор CMV, промотор UBC, промотор EF1 α , промотор PGK1 и минимальный промотор гена фратаксина. В конкретных вариантах осуществления полинуклеотид, кодирующий фратаксин, функционально связан с промотором UBC, таким как, например, показанный под SEQ ID NO: 3.

5'-регуляторные элементы.

В полинуклеотиде, содержащем ген фратаксина, полинуклеотид предпочтительно содержит по меньшей мере часть 5'-нетранслируемой области (5'-UTR), функционально связанную с геном фратаксина, где 5'-UTR может быть получена из любого вида млекопитающих. Неограничивающие примеры 5'-UTR, которые можно применять, включают 5'-UTR из гена фратаксина человека, гена фратаксина крупного рогатого скота, гена фратаксина мыши, гена фратаксина крысы, гена фратаксина овцы, гена фратаксина обезьяны, гена фратаксина козы, гена фратаксина лошади, гена фратаксина свиньи, гена фратаксина верблюда, гена фратаксина кошки или гена фратаксина собаки.

В определенных вариантах осуществления применяют по меньшей мере часть 5'-UTR гена, отличного от гена фратаксина. Примеры 5'-UTR гена, отличного от гена фратаксина, включают без ограничения 5'-регуляторный элемент гена глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH) (например, SEQ ID NO: 15), синтетический 5'-регуляторный элемент (такой как описанные в патенте США № 8835621, включенном в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте, в том числе 5U2 (SEQ ID NO: 4)), 5'-регуляторный элемент гена рибосомного белка L560S (5'-сайт сплайсинга RPL6) (например, SEQ ID NO: 16) и 5'-регуляторный элемент гена тяжелой цепи ферритина (5'-UTRFTN1) (например, SEQ ID NO: 14).

В некоторых вариантах осуществления 5'-UTR может иметь длину, составляющую по меньшей мере приблизительно 25 нуклеотидов. В других вариантах осуществления 5'-UTR может иметь длину, составляющую по меньшей мере приблизительно 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 185, 190, 195, 200 или больше нуклеотидов. В другом варианте осуществления фрагмент полинуклеотида, содержащий 5'-UTR гена фратаксина-

на, может представлять собой по меньшей мере приблизительно 50% природной последовательности 5'-UTR. В других вариантах осуществления фрагмент полинуклеотида, содержащий 5'-UTR гена фратаксина, может представлять собой по меньшей мере приблизительно 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98% или больше природной последовательности 5'-UTR. В другом варианте осуществления фрагмент полинуклеотида, содержащий 5'-UTR гена фратаксина, может представлять собой полную природную последовательность 5'-UTR.

3'-регуляторные элементы.

В полинуклеотиде, содержащем ген фратаксина, полинуклеотид предпочтительно содержит 3'-регуляторную область, функционально связанную с геном фратаксина, где 3'-регуляторная область может быть получена из любого вида млекопитающих. В определенных вариантах осуществления полинуклеотид, содержащий ген фратаксина, дополнительно содержит 3'-регуляторный элемент, такой как сигнал полиаденилирования гена гормона роста человека (hGHrA) (например, SEQ ID NO: 5), ранняя область полиаденилирования вируса обезьян 40 (ранний элемент SV40) (например, SEQ ID NO: 8), поздняя область полиаденилирования вируса обезьян 40 (поздний элемент SV40) (например, SEQ ID NO: 9) и синтетический 3'-регуляторный элемент (такой как SEQ ID NO: 7).

Векторы.

Некоторые способы, известные из уровня техники, можно применять для размножения полинуклеотида в соответствии с настоящим изобретением. После определения подходящей системы клеток-хозяев и условий роста рекомбинантные векторы экспрессии можно размножать и получать в большом количестве. Как описано в данном документе, векторы экспрессии, которые можно применять, включают без ограничения следующие векторы или их производные: вирусы человека или животных, такие как вирус осповакцины или аденовирус; вирусы насекомых, такие как бакуловирус; дрожжевые векторы; векторы на основе бактериофагов (например, лямбда), а также плазмидные и космидные ДНК-векторы и т.п.

Большое количество векторов, известных из уровня техники, можно применять для манипуляций с нуклеиновыми кислотами, включения в состав генов элементов ответа и промоторов и т.д. Возможные векторы включают, например, плазмиды или модифицированные вирусы, в том числе, например, бактериофаги, такие как производные фага лямбда, или плазмиды, такие как производные плазмид pBR322 или pUC, или вектор Bluescript. Другим примером векторов, применимых в настоящем изобретении, является производственная система ULTRAVECTOR® (Intrexon Corp., Блэксберг, Виргиния), описанная в WO 2007/038276. Например, вставку фрагментов ДНК, соответствующих элементам ответа и промоторам, в подходящий вектор можно осуществлять путем лигирования соответствующих фрагментов ДНК в выбранный вектор, имеющий комплементарные "липкие" концы. В качестве альтернативы концы молекул ДНК могут быть подвергнуты ферментативной модификации, или может быть получен любой сайт путем лигирования нуклеотидных последовательностей (линкеров) в концы ДНК. Такие векторы могут быть сконструированы таким образом, чтобы они содержали селективируемые маркерные гены, обеспечивающие отбор клеток, в состав клеточного генома которых был включен маркер. Такие маркеры обеспечивают возможность идентификации и/или отбора клеток-хозяев, в состав которых включены и которые экспрессируют белки, кодируемые маркером.

Вирусные векторы и, в частности, ретровирусные векторы, применялись как в клетках, так и у животных. Вирусные векторы, которые можно применять, включают без ограничения векторы на основе ретровирусов, аденоассоциированного вируса, поксвирусов, бакуловирусов, вируса осповакцины, вируса простого герпеса, вируса Эпштейна-Барра, аденовирусов, геминивирусов и каулимовирусов. Невирусные векторы включают плазмиды, липосомы, электрически заряженные липиды (цитофектины), комплексы ДНК-белок и биополимеры. В дополнение к нуклеиновой кислоте, вектор также может содержать одну или более регуляторных областей и/или один или более селективируемых маркеров, применимых при отборе, измерении и отслеживании результатов переноса нуклеиновых кислот (того, в какие ткани происходит перенос, продолжительности экспрессии и т.д.).

Векторы можно вводить в желаемые клетки-хозяева с помощью способов, известных из уровня техники, например, трансфекции, электропорации, микроинъекции, трансдукции, слияния клеток, DEAE-декстранового способа, осаждения фосфатом кальция, липофекции (слияния лизосом), применения генной пушки или переносчика ДНК-векторов (см., например, Wu et al. (1992), J. Biol. Chem., 267:963; Wu et al. (1988), J. Biol. Chem., 263:14621; и Hartmut et al., заявка на канадский патент № 2012311).

Полинуклеотид в соответствии с настоящим изобретением также можно вводить *in vivo* посредством липофекции (Feigner et al. (1987), Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84:7413; Mackey et al. (1988), Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 85:8027; и Ulmer et al. (1993), Science, 259:1745; Feigner et al. (1989), Science 337:387). Из уровня техники известны различные липидные соединения и другие композиции для переноса нуклеиновых кислот, в том числе без ограничения описанные в публикациях согласно РСТ № WO 95/18863, WO 96/17823, патенте США № 5459127, WO 95/21931, WO 96/25508 и WO 95/21931.

Также возможно вводить вектор *in vivo* в виде "голой" ДНК-плазмиды, как описано в патентах США № 5693622, 5589466 и 5580859.

В определенных вариантах осуществления полинуклеотиды согласно настоящему изобретению могут быть включены в состав вирусного вектора для доставки субъекту. Неограничивающие примеры ви-

русных векторов включают аденовирусные векторы, ретровирусные векторы, лентивирусные векторы, герпесвирусные векторы и векторы на основе аденоассоциированного вируса (AAV).

В конкретных вариантах осуществления полинуклеотиды согласно настоящему изобретению представлены в векторах на основе аденоассоциированного вируса (AAV). Вектор на основе аденоассоциированного вируса может относиться к AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAVrh10 или любым другим серотипам AAV, которые могут инфицировать людей. В некоторых определенных вариантах осуществления вектор на основе аденоассоциированного вируса представляет собой AAV5.

Векторы на основе AAV представляют собой векторы, полученные из аденоассоциированного вируса определенного серотипа. Векторы на основе AAV могут характеризоваться полной или частичной делецией одного или более генов AAV дикого типа, предпочтительно генов гер и/или сар, но сохраняют функциональные фланкирующие последовательности ITR. Векторы на основе AAV содержат по меньшей мере те последовательности, которые требуются в цис-положении для репликации и упаковки вируса (например, функциональные ITR). Известны нуклеотидные последовательности ITR-областей AAV (Kotin, R.M. (1994), *Hum. Gene Ther.*, 5(7):793-801; Berns, K.I., "Parvoviridae and their Replication" в *Virology*, 2nd edition (Fields, BN and Knipe, DM, eds.) New York : Raven Press, 1990b:1743-1763). ITR могут быть получены из различных серотипов при условии, что они являются функциональными. Векторы экспрессии на основе AAV согласно настоящему изобретению могут быть сконструированы с помощью любых способов, известных из уровня техники, для функционального связывания компонентов по направлению транскрипции (т.е. контролируемые элементы, в том числе промотор, 5'-UTR, ген фратаксина и 3'-регуляторный элемент (такой как область терминации транскрипции)).

В одном конкретном аспекте настоящее изобретение направлено на вектор, содержащий AAV серотипа 5 (AAV5) и ген-вставку FXN. В одном варианте осуществления вектор представляет собой вектор AAV5-hFXN, содержащий капсид гAAV5 и последовательность комплементарной ДНК (кДНК), кодирующую hFXN.

Пример вектора AAV5.hFXN с геном-вставкой показан на фиг. 15.

// - ITR - UBC - 5U2 - GOI hFXN - поли-A hGH - линкер для ITR - ITR - //

ITR=инвертированный концевой повтор AAV2,

UBC=промотор гена убиквитина С человека (UBC),

5U2=синтетический 5'-регуляторный элемент,

GOI hFXN=кДНК, кодирующая FXN человека,

Поли-A hGH=элемент поли-A гена гормона роста человека.

Рекомбинантные вирусы, содержащие конструкции для экспрессии фратаксина, можно получить с помощью любой методики, известной из уровня техники, в том числе без ограничения путем трансфекции пакующих клеток (например, клеток PA317, клеток PsiCRIP, клеток GPenv+, клеток 293) или транзientной трансфекции плазмидами- или вирусами-помощниками. Описание и протоколы получения рекомбинантных вирусов, дефектных по репликации, можно найти, например, в WO 94/19478, WO 95/14785, WO 96/22378, патентах США № 5882877, 6013516, 4861719 и 5278056.

В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения полинуклеотид содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую белок фратаксин, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1, функционально связанную с промотором UBC (SEQ ID NO: 3) и 5'-UTR 5U2 (SEQ ID NO: 4), а также синтетическим 3'-регуляторным элементом (SEQ ID NO: 7). В других конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения полинуклеотид содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую белок фратаксин, имеющий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 1, функционально связанную с промотором UBC (SEQ ID NO: 3) и 5'-UTR 5U2 (SEQ ID NO: 4), а также 3'-регуляторным элементом hGHpA (SEQ ID NO: 5). В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения каждый из этих двух полинуклеотидов включен в состав вектора на основе AAV5 с получением таким образом двух типов векторов AAV5 для экспрессии фратаксина. В других конкретных вариантах осуществления каждый из этих типов векторов на основе AAV5 для экспрессии фратаксина упакован в вирионы с получением двух типов гAAV5 для экспрессии фратаксина, каждый из которых может необязательно быть составлен в виде композиций согласно настоящему изобретению.

Фармацевтический состав.

Вектор AAV5.hFXN необязательно составлен в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS), 1XPBS, 2XPBS, 10XPBS, PBS Дульбекко (DPBS) или DPBS, не содержащем магний или кальций.

В одном варианте осуществления фармацевтический состав содержит вектор AAV5.hFXN и 1X PBS. В другом варианте осуществления фармацевтический состав содержит вектор AAV5.hFXN, 1X DPBS и приблизительно 200 mM NaCl.

В одном аспекте фармацевтический состав имеет pH, по сути сходный с pH спинномозговой жидкости человека. В одном варианте осуществления фармацевтический состав имеет pH, составляющий от приблизительно 6,5 до приблизительно 7,5. В другом варианте осуществления фармацевтический состав имеет pH, составляющий от приблизительно 6,8 до приблизительно 7,2. В другом варианте осуществления фармацевтический состав имеет pH, составляющий от приблизительно 7,0 до приблизительно 7,5. В

другом варианте осуществления фармацевтический состав имеет рН, составляющий приблизительно 7. В другом варианте осуществления фармацевтический состав имеет рН, составляющий приблизительно 7,1. В другом варианте осуществления фармацевтический состав имеет рН, составляющий приблизительно 7,2. В другом варианте осуществления фармацевтический состав имеет рН, составляющий приблизительно 7,2. В другом варианте осуществления фармацевтический состав имеет рН, составляющий приблизительно 7,4.

В одном конкретном варианте осуществления фармацевтический состав содержит вектор AAV5.hFXN, 0,154 М NaCl, 0,056 М Na₂HPO₄ и 0,0106 М КН₂РO₄. В другом конкретном варианте осуществления фармацевтический состав содержит вектор AAV5.hFXN, 0,337 М NaCl, 0,027 М KCl, 0,015 М Na₂HPO₄ и 0,0015 М КН₂РO₄.

Примеры фармацевтических составов включают без ограничения фармацевтические составы, показанные в табл. 2.

Таблица 2
Примеры составов на основе AAV5.hFXN

Компонент	Состав 1	Состав 2
AAV5-hFXN	2,5 x 10 ¹¹ vg/мл	2,5 x 10 ¹² vg/мл
Наполнители	PBS	PBS Дульбекко (без Mg, без Ca) + 200 mM NaCl
pH	7,4	7,0

В одном аспекте фармацевтический состав содержит пустые капсиды, процентная доля которых составляет не более чем от приблизительно 25% до приблизительно 95% ср/ср. В некоторых вариантах осуществления фармацевтический состав содержит пустые капсиды, процентная доля которых составляет не более чем от приблизительно 50% ср/ср до приблизительно 75% ср/ср. В других вариантах осуществления фармацевтический состав содержит пустые капсиды, процентная доля которых составляет не более чем от приблизительно 25% ср/ср до приблизительно 50% ср/ср. В некоторых вариантах осуществления фармацевтический состав содержит пустые капсиды, процентная доля которых составляет не более чем приблизительно 95% ср/ср. В некоторых вариантах осуществления фармацевтический состав содержит пустые капсиды, процентная доля которых составляет от 0% до не более чем приблизительно 25% ср/ср. Диапазоны в данном документе включают все целые числа между указанными числами (например, от 25 до 50% включает 25, 26, 27, 28 и т.д. до 50% включительно). В некоторых вариантах осуществления фармацевтический состав по сути не содержит пустые капсиды. Подразумевается, что "по сути не содержит", как используется в данном документе, относится к составу, имеющему незначительное количество компонента или вовсе его не имеющему. "По сути не содержит пустые капсиды" относится к составу, имеющему от 1 до 0% пустых капсидов.

Путь введения; доставка фармацевтического состава.

В одном аспекте фармацевтический состав вводят путем интратекальной (IT) доставки. В другом аспекте фармацевтический состав вводят путем интрацеребровентрикулярной (ICV) доставки. В другом аспекте фармацевтический состав вводят путем интрапаренхимальной доставки.

В одном варианте осуществления фармацевтический состав вводят путем интрапаренхимальной доставки в головной мозг. В одном варианте осуществления фармацевтический состав вводят путем интрапаренхимальной доставки в мозжечок. В другом варианте осуществления фармацевтический состав вводят путем интрапаренхимальной доставки в большой мозг. В другом варианте осуществления фармацевтический состав вводят путем интрапаренхимальной доставки в зубчатое ядро. В другом варианте осуществления фармацевтический состав вводят путем интрапаренхимальной доставки в ганглии заднего корешка.

Фармацевтический состав можно вводить с помощью любого подходящего устройства для доставки, в том числе без ограничения иглы, катетера или схожего устройства. Фармацевтический состав можно вводить с помощью любых подходящих методик, известных из уровня техники, в том числе без ограничения путем стереотаксической инъекции (см. Davidson et al., "Recombinant adeno-associated virus type 2, 4, and 5 vectors: Transduction of variant cell types and regions in the mammalian central nervous system" PNAS 97:3428-3432, 2000; и Alisky et al., "Gene therapy for amyotrophic lateral sclerosis and other motor neuron diseases", Hum. Gene Ther., 11:2315-2329, 2000).

В одном варианте осуществления фармацевтический состав вводят посредством однократной болюсной инъекции. В другом варианте осуществления фармацевтический состав вводят посредством непрерывной инфузии. В другом варианте осуществления фармацевтический состав вводят посредством многократных инъекций. В другом варианте осуществления фармацевтический состав вводят посредством одной инъекции, двух инъекций, трех инъекций или четырех инъекций.

В одном варианте осуществления фармацевтический состав вводят билатерально. В другом вариан-

те осуществления фармацевтический состав вводят билатерально. В одном конкретном варианте осуществления фармацевтический состав вводят в виде билатеральной инъекции в мозжечок.

Фармацевтический состав может быть доставлен посредством ручной инъекции с помощью инфузионных насосов или с помощью осмотического насоса. Неручная инъекция включает без ограничения конвекционную доставку (CED). Ссылка делается на L. Samaranch et al., "MR-guided parenchymal Delivery of Adeno-Associated Viral Vector Serotype 5 in Non-Human Primate Brain", *Gene Therapy* (2017), 24, 253-261; и патент США № 9701984, "CNS targeting AAV Vectors and Methods of use Thereof". Как осмотические, так и инфузионные насосы являются коммерчески доступными от разнообразных поставщиков, например Alzet Corporation, Hamilton Corporation, Alza, Inc., Пало-Альто, Калифорния. Одним неограничивающим примером шприцевого насоса является Pump 11 серии Elite, Harvard Pump, Harvard Apparatus, Холлистон, Массачусетс. Одним неограничивающим примером шприцевого насоса является шприцевой насос Legato™, KD Scientific Inc., Холлистон, Массачусетс.

Можно использовать любые подходящие канюли или иглы. Можно использовать любую подходящую модель наконечника. Канюля или игла может необязательно содержать одну или более конических областей. В различных вариантах осуществления канюля или игла может быть скошенной.

Примеры игл для спинномозговой пункции включают без ограничения скошенные иглы карандашного типа (Pencan® - Braun; Reganesth® - Sarstedt AG; Whitacre; Sprotte) и типа Квинке (Spinocan® - Braun).

Можно использовать канюлю или иглу любых подходящих размеров. Размеры могут зависеть от участка для имплантации. Например, ширина эпидурального пространства составляет лишь приблизительно 3-5 мм в грудном отделе и приблизительно 5-7 мм в поясничном отделе. Примеры длин канюли или иглы могут включать без ограничения длину, составляющую приблизительно 15-150 мм, например приблизительно 65 мм для эпидурального применения в лечении детей, приблизительно 85 мм для обычного взрослого и приблизительно 110 мм для взрослого пациента с ожирением. Пример толщины канюли или иглы включает без ограничения от приблизительно 0,05 мм до приблизительно 2 мм.

Можно использовать канюлю или иглу любого подходящего калибра. Примеры включают без ограничения от приблизительно 14G до приблизительно 22G. В некоторых вариантах осуществления калибр иглы или канюли составляет от приблизительно 18 до приблизительно 22G.

Примеры устройств для доступа в ICV включают без ограничения резервуары Оммаи и Рикхема. Ссылка делается на J.L. Cohen-Pfeffer et al., "Intracerebroventricular Delivery as a Safe, Long-Term Route of Drug Administration" *Pediatric Neurology*, vol. 67, February 2017, p. 23-35; "Safety of Ommaya reservoirs in children with brain tumors: a 20-year experience with 5472 intraventricular drug administrations in 98 patients", *J. Neurooncol.*, 120 (2014), p. 139-145; A. Desi et al., "Gibaldi's Drug Delivery Systems In Pharmaceutical Care", *American Society of Health-System Pharmacists*, 2007; и Cook A.M. et al., *Intracerebroventricular administration of drugs. Pharmacotherapy*, 2009 Jul, 29(7):832-45.

В одном другом варианте осуществления фармацевтический состав вводят посредством интратекальной доставки в CSF путем люмбальной пункции с помощью катетерной системы интратекальной доставки Medtronic ASCENDA™. В одном конкретном варианте осуществления фармацевтический состав вводят путем установки катетера в субарахноидальное пространство и введения 1/2 дозы фармацевтического состава в поясничный отдел спинного мозга и 1/2 дозы фармацевтического состава в большую цистерну.

В одном варианте осуществления набор катетерной системы интратекальной доставки ASCENDA™ 8781 включает без ограничения: спинальный сегмент со вставленным проводочным проводником, насосный сегмент с присоединенным бесшовным коннектором для насоса, коннектор катетера с 2 присоединенными зажимными втулками, проводниковая игла калибра 16 T (11,4 см), фиксатор с диспенсером фиксатора. Длина: катетер в целом - 139,7 см, спинальный сегмент - 66,0 см, насосный сегмент - 73,7 см. Спинальный сегмент: наружный диаметр - 1,2 мм (4 френча), внутренний диаметр - 0,5 мм, расстояние между маркерами - 1 см, закрытый наконечник катетера с 6 боковыми отверстиями. Насосный сегмент: наружный диаметр (только катетер) - 1,2 мм (4 френча), внутренний диаметр - 0,5 мм (только катетер), расстояние между маркерами - расстояние 1 см. Объем катетера: 0,0022 мл/см. Коннектор катетера: внутренний диаметр - 0,3 мм, наружный диаметр зажимных втулок - 4,3 мм, проводочный проводник: наружный диаметр - 0,5 мм, проводниковая игла калибра 16 T, 11,4 см. Регулируемые сегменты: коннектор катетера соединяет концы спинального и насосного сегментов. Усилие разделения насосного сегмента и спинального сегмента >10,0 Н. Усилие разделения бесшовного коннектора для насоса и насоса: >10,0 Н.

Фармацевтический состав необязательно доставляется с помощью катетера и инфузионного насоса. Необязательно используется любая комбинация катетера и насоса, подходящая для инфузии в ЦНС. Одним неограничивающим примером комбинации катетера и насоса является катетерная система интратекальной доставки Medtronic ASCENDA™. Примеры применимых насосов включают без ограничения насосы Medtronic SynchroMed®EL на 18 мл, SynchroMed® II на 20 мл и SynchroMed® II на 40 мл.

В другом варианте осуществления фармацевтический состав необязательно доставляется с помо-

щью каноли Alcyone MEMS (АМС™, Alcyone Lifesciences, Inc., Лоуэлл, Массачусетс) - двухпросветной MR-совместимой инъекционной и аспирационной нейровентрикулярной каноли. В другом варианте осуществления фармацевтический состав необязательно доставляется с помощью интратекального катетера Alcyone Pulsar.

Контейнер.

В одном варианте осуществления фармацевтический состав содержится в контейнере из боросиликатного стекла фармацевтической степени чистоты, имеющем пластмассовую крышку со фторполимерной прокладкой. Примеры фторполимеров включают без ограничения политетрафторэтилен (PTFE) (Teflon®), полиэтилентетрафторэтилен (ETFE) (Fluorotec®) и сополимер этилена и тетрафторэтилена (Tefzel®). В одном варианте осуществления крышка имеет прокладку из политетрафторэтилена (PTFE) (Teflon®).

Доза.

Дозировки вектора зависят от факторов, включающих без ограничения способ введения, состояние отдельного субъекта и конкретный доставляемый вектор.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения величина дозы в расчете на одного субъекта находится в диапазоне от приблизительно 1×10^{10} vg до приблизительно 1×10^{15} vg. В другом варианте осуществления величина дозы составляет по меньшей мере приблизительно 1×10^{11} vg, по меньшей мере приблизительно 1×10^{12} vg, по меньшей мере приблизительно 1×10^{13} vg, по меньшей мере приблизительно 1×10^{14} vg или по меньшей мере приблизительно 1×10^{15} vg.

В другом варианте осуществления величина дозы составляет по меньшей мере приблизительно 5×10^{13} vg, по меньшей мере приблизительно $1,5 \times 10^{14}$ vg или по меньшей мере приблизительно 5×10^{14} vg.

В другом варианте осуществления величина дозы составляет приблизительно 5×10^{13} vg, приблизительно $1,5 \times 10^{14}$ vg или приблизительно 5×10^{14} vg.

В другом варианте осуществления величина дозы представляет собой количество, составляющее приблизительно $3,7 \times 10^{10}$ vg/г по весу головного мозга, приблизительно $1,11 \times 10^{11}$ vg/г по весу головного мозга или приблизительно $3,7 \times 10^{11}$ vg/г по весу головного мозга.

Доза представляет собой суммарную дозу в расчете на одно введение одному субъекту по всем участкам-мишеням.

В качестве одного неограничивающего примера суммарная доза в расчете на одного субъекта, составляющая приблизительно 5×10^{13} vg, предусматривает две инъекции в количестве приблизительно $2,5 \times 10^{13}$ vg (т.е. одну инъекцию в количестве $2,5 \times 10^{13}$ vg в правую половину мозжечка и одну инъекцию в количестве $2,5 \times 10^{13}$ vg в левую половину мозжечка). В качестве другого неограничивающего примера суммарная доза в расчете на одного субъекта, составляющая приблизительно $1,5 \times 10^{14}$ vg, предусматривает две инъекции в количестве приблизительно $7,5 \times 10^{13}$ vg (т.е. одну инъекцию в количестве $7,5 \times 10^{13}$ vg в правую половину мозжечка и одну инъекцию в количестве $7,5 \times 10^{13}$ vg в левую половину мозжечка). В качестве другого неограничивающего примера, суммарная доза в расчете на одного субъекта, составляющая приблизительно 5×10^{14} vg, предусматривает две инъекции в количестве приблизительно $2,5 \times 10^{14}$ vg (т.е. одну инъекцию в количестве $2,5 \times 10^{14}$ vg в правую половину мозжечка и одну инъекцию в количестве $2,5 \times 10^{14}$ vg в левую половину мозжечка).

В качестве другого неограничивающего примера суммарная доза в расчете на одного субъекта, составляющая приблизительно 5×10^{13} vg, предусматривает две инъекции в количестве приблизительно $2,5 \times 10^{13}$ vg (т.е. одну инъекцию в количестве $2,5 \times 10^{13}$ vg в поясничный отдел спинного мозга и одну инъекцию в количестве $2,5 \times 10^{13}$ vg в большую цистерну). В качестве другого неограничивающего примера, суммарная доза в расчете на одного субъекта, составляющая приблизительно $1,5 \times 10^{14}$ vg, предусматривает две инъекции в количестве приблизительно $7,5 \times 10^{13}$ vg (т.е. одну инъекцию в количестве $7,5 \times 10^{13}$ vg в поясничный отдел спинного мозга и одну инъекцию в количестве $7,5 \times 10^{13}$ vg в большую цистерну). В качестве другого неограничивающего примера суммарная доза в расчете на одного субъекта, составляющая приблизительно 5×10^{14} vg, предусматривает две инъекции в количестве приблизительно $2,5 \times 10^{14}$ vg (т.е. одну инъекцию в количестве $2,5 \times 10^{14}$ vg в поясничный отдел спинного мозга и одну инъекцию в количестве $2,5 \times 10^{14}$ vg в большую цистерну).

Ссылка делается на D.J. Schuster, "Supraspinal gene transfer by intrathecal adeno-associated virus serotype 5", Front. Neuroanat. (2014b), 8:66; S.J. Gray, "Global CNS gene delivery and evasion of anti-AAV-neutralizing antibodies by intrathecal AAV administration in non-human primates", Gene Ther., 2013, 20(4):450-459; T. Federici et al., "Robust spinal motor neuron transduction following intrathecal delivery of AAV9 in pigs", Gene Ther., 19(8):852, 2012; и B. Snyder et al., "Comparison of adeno-associated viral vector serotypes for spinal cord and motor neuron gene delivery", Hum. Gene Ther., 22(9):1129, 2011.

Объем дозы.

В одном варианте осуществления фармацевтический состав доставляется в объеме дозы в диапазоне от приблизительно 0,1 мл до приблизительно 10 мл в расчете на один участок-мишень. В другом варианте осуществления фармацевтический состав доставляется в объеме дозы в диапазоне от приблизительно 1 мл до приблизительно 5 мл в расчете на один участок-мишень. В другом варианте осуществле-

Врач средней квалификации в данной области техники будет способен скорректировать дозу в сторону повышения или снижения и определить соответствующую дозу/режим дозирования в зависимости от таких факторов, как путь введения (например, системная доза может характеризоваться логарифмом увеличения вплоть до 2-3), интервалы приема доз, облегчение симптомов (т.е. эффективность) или индивидуальные потребности конкретного пациента.

Критерии эффективности.

Ссылка делается на M. Patel et al., "Progression of Friedreich ataxia: quantitative characterization over 5 years", *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 2016, 3(9):684-69; D. Lynch et al., "Friedreich ataxia: effects of genetic understanding on clinical evaluation and therapy", *Arch. Neurol.*, 2002, 59:743-747; C. Wilson et al., "Quality of life in Friedreich ataxia: what clinical, social and demographic factors are important?", *Eur. J. Neurol.*, 200714(9):1040-1047; G. Rance et al., "Speech perception ability in individuals with Friedreich ataxia", *Brain.*, 2008131:2002-2012; A. Koeppe, "Friedreich's ataxia: Pathology, pathogenesis, and molecular genetics", *J. Neurol. Sci.*, 2011, 303(1-2):1-12; and S.R. Regner et al., "Friedreich ataxia clinical outcome measures: natural history evaluation in 410 participants", *J. Child Neurol.*, 2012, 27(9):1152-8.

Данные об эффективности собирают через 1, 3, 6 и 12 месяцев после введения исследуемого лекарственного средства. Эффективность оценивают у субъектов с помощью диффузионно-тензорной томографии и различных функциональных результатов (в том числе без ограничения оценивания по общей шкале FARS и неврологической шкале FARS; оценивания результатов теста ходьбы на 25 футов; оценивания с помощью системы-дорожки для ходьбы GAITRite; оценивания с помощью Biodex Balance System SD; оценивания с помощью теста с колышками и 9 отверстиями). Измерения в ходе диффузионно-тензорной томографии можно производить, например, путем T2-релаксометрии зубчатого ядра и DRG и/или определения уровней NAA и уровней железа с помощью магнитно-резонансной томографии (MRS).

Фармацевтические наполнители для применения *in vivo*, активные ингредиенты (например, векторы, экспрессирующие фратаксин, вирионы, вирусы, gAAV и т.д.), описанные в данном документе, могут быть поглощены в фармацевтически приемлемых носителях, таких как, например, растворы, суспензии, таблетки, капсулы, мази, настойки и инъекционные композиции. Фармацевтические композиции могут содержать от 0,01 до 99% по весу активного ингредиента. Композиции могут находиться в форме одной или нескольких доз. Количество лиганда в любой конкретной фармацевтической композиции будет зависеть от эффективной дозы, т.е. дозы, требуемой для того, чтобы вызвать экспрессию или супрессию желаемого гена.

Подходящие пути для введения фармацевтических препаратов включают пероральный, ректальный, местный (в том числе дермальный, трансбуккальный и сублингвальный), вагинальный, парентеральный (в том числе подкожный, интрапаренхимальный, внутримышечный, внутривенный, внутриопухольный, интрадермальный, интратекальный, интравентрикулярный и эпидуральный), интравитреальный и с помощью назогастрального зонда. В определенных вариантах осуществления путь введения представляет собой введение в пространство, заполненное CSF; субарахноидальное пространство (например, большую цистерну); головной мозг (например, пространство желудочков головного мозга, мозжечок, большой мозг, гиппокамп, переднюю кору больших полушарий, ганглий заднего корешка или хвостатое ядро) или спинной мозг (например, поясничный отдел спинного мозга, грудной отдел спинного мозга, шейный отдел спинного мозга). В некоторых вариантах осуществления активный ингредиент (например, векторы, экспрессирующие фратаксин, вирионы, вирусы, gAAV и т.д.) доставляется посредством двух инъекций: одной в правое полушарие мозжечка и одной в левое полушарие мозжечка. В некоторых вариантах осуществления они являются двумя одинаковыми инъекциями. В некоторых вариантах осуществления активный ингредиент (например, векторы, экспрессирующие фратаксин, вирионы, вирусы, gAAV и т.д.) вводят посредством его инъекции в мозжечок, а также системного предоставления. Специалистам в данной области будет понятно, что путь введения будет зависеть от состояния, лечение которого осуществляют, и может варьироваться в зависимости от таких факторов, как состояние пациента, получающего лечение.

Полинуклеотиды согласно настоящему изобретению для экспрессии фратаксина (например, вирионы, AAV, векторы, вирусы и т.д.) можно применять для лечения атаксии Фридрейха. Введение полинуклеотидов, вирионов и/или композиций согласно настоящему изобретению субъекту, нуждающемуся в этом, приводит к уменьшению интенсивности по меньшей мере одного симптома атаксии Фридрейха. Симптомы атаксии Фридрейха, интенсивность которых можно уменьшить, включают без ограничения нарушение координации рук и/или ног, усталость, ухудшение зрения, потерю слуха, неразборчивую речь, агрессивный сколиоз, сахарный диабет, гипертрофическую кардиомиопатию и аритмию сердца.

Лечение атаксии Фридрейха с помощью конструкций и композиций согласно настоящему изобретению обеспечивает возможность достижения экспрессии фратаксина у субъекта на уровне, составляющем по меньшей мере 25% от нормального уровня экспрессии фратаксина или больше вплоть до нормальных уровней (включая уровни, превышающие нормальные уровни, при условии, что это не вызывает нежелательных эффектов). В некоторых вариантах осуществления уровень будет составлять по меньшей мере 30% от нормального. В других вариантах осуществления уровень будет составлять по меньшей

мере или более чем 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 98% от нормальных уровней фрактасина. В других вариантах осуществления достигаются нормальные уровни фрактасина.

При применении композиций и способов согласно настоящему изобретению фрактасин экспрессируется в митохондриях. Фрактасин предпочтительно экспрессируется в митохондриях по меньшей мере одной ткани, выбранной из группы, состоящей из мозжечка, гиппокампа, передней коры головного мозга и ганглии заднего корешка.

Системы переключения генов.

Переключатель генов может представлять собой любой переключатель генов, регулирующий экспрессию генов при добавлении или удалении специфического лиганда. В одном варианте осуществления переключатель генов является переключателем, для которого уровень экспрессии генов зависит от уровня присутствующего лиганда. Примеры лиганд-зависимых комплексов факторов транскрипции, которые можно применять в переключателях генов согласно настоящему изобретению, включают без ограничения членов суперсемейства ядерных рецепторов, активируемых их соответствующими лигандами (например, глюкокортикоидами, эстрогеном, прогестинном, ретиноидами, экдизоном, а также их аналогами и миметиками), и гТТА, активируемый тетрациклином. В одном аспекте настоящего изобретения переключатель генов представляет собой переключатель генов на основе EcR. Примеры таких систем включают без ограничения системы, описанные в патентах США № 6258603, 7045315, публикациях заявок на патент США № 2006/0014711, 2007/0161086, а также публикации международной заявки № WO 01/70816. Примеры систем на основе химерного рецептора экдизона описаны в следующих документах: патенте США № 7091038, публикациях заявок на патент США № 2002/0110861, 2004/0033600, 2004/0096942, 2005/0266457 и 2006/0100416, а также публикациях международных заявок № WO 01/70816, WO 02/066612, WO 02/066613, WO 02/066614, WO 02/066615, WO 02/29075 и WO 2005/108617, каждый из которых включен посредством ссылки во всей своей полноте. Примером системы, регулируемой нестероидными агонистами экдизона, является система индуцируемой экспрессии у млекопитающих RheoSwitch® (New England Biolabs, Ипсвич, Массачусетс). В другом аспекте настоящего изобретения в основе переключателя генов лежит гетеродимер FK506-связывающего белка (FKBP) и белка, ассоциированного с комплексом FKBP/рапамицин (FRAP), и он регулируется рапамицином или его неиммундепрессивными аналогами. Примеры таких систем включают без ограничения транскрипционную технологию ARGENT™ (ARIAD Pharmaceuticals, Кембридж, Массачусетс) и системы, описанные в патентах США № 6015709, 6117680, 6479653, 6187757 и 6649595.

В одном варианте осуществления переключатель генов содержит одну последовательность, кодирующую фактор транскрипции, которая кодирует лиганд-зависимый комплекс факторов транскрипции, под контролем промотора терапевтического переключателя. Последовательность, кодирующая фактор транскрипции, может кодировать лиганд-зависимый комплекс факторов транскрипции, который представляет собой встречающийся в природе или искусственный лиганд-зависимый комплекс факторов транскрипции. Искусственный фактор транскрипции представляет собой фактор транскрипции, в котором природная последовательность фактора транскрипции была изменена, например, путем мутации в последовательности или путем объединения доменов из различных факторов транскрипции. В одном варианте осуществления фактор транскрипции содержит лигандсвязывающий домен ядерного рецептора группы H. В одном варианте осуществления лигандсвязывающий домен ядерного рецептора группы H получен из рецептора экдизона, убиквитарного рецептора (UR), орфанного рецептора 1 (OR-1), ядерного рецептора 1 стероидных гормонов (NER-1), белка-15, взаимодействующего с ретиноидным X-рецептором (RIP-15), печеночного X-рецептора β (LXR β), белка, подобного рецептору стероидных гормонов (RLD-1), печеночного X-рецептора (LXR), печеночного X-рецептора α (LXR α), фарнезоидного X-рецептора (FXR), белка 14, взаимодействующего с рецепторами (RIP-14), или рецептора фарнезола (HRR-1). В другом варианте осуществления LBD ядерного рецептора группы H получен из рецептора экдизона.

А. Переключатель генов на основе рецептора экдизона.

EcR и другие ядерные рецепторы группы H являются членами супер семейства ядерных рецепторов, все члены которого обычно характеризуются наличием аминоконцевого трансаактивирующего домена (AD, также взаимозаменяемо называемого "TA" или "TD"), необязательно слитого с партнером по гетеродимеризации (HP) с образованием коактиваторного белка (CAP), ДНК-связывающего домена (DBD) и LBD, слитого с DBD с помощью шарнирной области с образованием лиганд-зависимого фактора транскрипции (LTF). Как используется в данном документе, термин "ДНК-связывающий домен" охватывает минимальную полипептидную последовательность ДНК-связывающего белка размером вплоть до полной длины ДНК-связывающего белка при условии, что ДНК-связывающий домен функционирует, связываясь с конкретным элементом ответа. Члены супер семейства ядерных рецепторов также характеризуются наличием четырех или пяти доменов: A/B, C, D, E и у некоторых членов F (см. US 4981784 и Evans, Science 240 №9 (1988)). Домен "A/B" соответствует трансаактивирующему домену, "C" соответствует ДНК-связывающему домену, "D" соответствует шарнирной области и "E" соответствует лигандсвязывающему домену. Некоторые члены семейства также могут иметь другой трансаактивирующий домен с карбоксиконцевой стороны от LBD, соответствующий "F".

О следующей полипептидной последовательности сообщалось как о полипептидной последовательности рецептора экдизона (рецептора экдистероидов) (рецептора 20-гидроксиэкдизона) (рецептора 20E) (EcRH) (члена 1 группы H подсемейства 1 ядерных рецепторов), и она имеет номер доступа P34021 в Genbank.

Белковая последовательность рецептора экдизона *Drosophila melanogaster* (SEQ ID NO: 10).

```

1 MKRRWSNNGG FMRLPEESSS EVTSSSNGLV LPSGVNMSPS SLDSHDYCDQ DLWLCGNESG

61 SFGGSNGHGL SQQQQSVITL AMHGCSSTLP AQTTIIPING NANGNGGSTN GQYVPGATNL

121 GALANGMLNG GFNGMQQQIQ NGHGLINSTT PSTPTTPLHL QQNLGGAGGG GIGGMGILHH

181 ANGTPNGLIG VVGGGGGVGL GVGGGGVGGL GMQHTPRS DS VNSISSGRDD LSPSSSLNGY

241 SANESCDAKK SKKGPAPRVQ EELCLVCGDR ASGYHYNALT CEGCKGFFRR SVTKSAVYCC

301 KFRACEMDM YMRRKCQECR LKKCLAVGMR PECVVPENQC AMKRREKKAQ
KEKDKMTTSP

361 SSQHGGNGSL ASGGGQDFVK KEILDLMTC EPPQHATIPLL PDEILAKCQA RNIPSLTYNQ

421 LAVIYKLIWY QDGYEQPSEE DLRRIMSQPD ENESQTDVSF RHTEITILT VQLIVEFAKG

481 LPAFTKIPQE DQITLLKACS SEVMMLRMAR RYDHSSDSIF FANNRSYTRD SYKMAGMADN

541 IEDLLHFCRQ MFSMKVDNVE YALLTAIVIF SDRPGLEKAQ LVEAIQSYI DTLRIYILNR

601 HCGDSMSLVF YAKLLSILTE LRTLGNQNAE MCFSLKLNK KLPKFLEEIW DVHAIPPSVQ

661 SHLQITQEEN ERLERAERM ASVGGAITAG IDCDSASTSA AAAAAQHQPQ PQPQPQSSSL

721 TQNSQHQQTQ PQLQPQLPPQ LQGQLQPQLQ PQLQTQLQPQ IQPQPQLPV SAPVPASVTA

781 PGSLSAVSTS SEYMGGSAAI GPITPATTSS ITAAVTASST TSAVPMGNV GVGVGVGNGV

841 SMYANAQTAM ALMGVALHSH QEQLIGGVAV KSEHSTTA

```

В одном варианте осуществления лигандсвязывающий домен рецептора экдизона выбран из группы, состоящей из лигандсвязывающего домена рецептора экдизона беспозвоночных, лигандсвязывающего домена рецептора экдизона членистоногих, лигандсвязывающего домена рецептора экдизона чешуекрылых, лигандсвязывающего домена рецептора экдизона двукрылых, лигандсвязывающего домена рецептора экдизона прямокрылых, лигандсвязывающего домена рецептора экдизона равнокрылых хоботных, лигандсвязывающего домена рецептора экдизона полужесткокрылых, лигандсвязывающего домена рецептора экдизона Ecr еловой листовёртки *Choristoneura fumiferana*, лигандсвязывающего домена рецептора экдизона жука *Tenebrio molitor*, лигандсвязывающего домена рецептора экдизона *Manduca sexta*, лигандсвязывающего домена рецептора экдизона *Heliothis virescens*, лигандсвязывающего домена рецептора экдизона комара-звонца *Chironomus tentans*, лигандсвязывающего домена рецептора экдизона тутового шелкопряда *Bombyx mori*, лигандсвязывающего домена рецептора экдизона африканской коричневой нимфалиды *Bicyclus anupana*, лигандсвязывающего домена рецептора экдизона бермудской юнии *Junonia coenia*, лигандсвязывающего домена рецептора экдизона плодовой мушки *Drosophila melanogaster*, лигандсвязывающего домена рецептора экдизона настоящего комара *Aedes aegypti*, лигандсвязывающего домена рецептора экдизона мясной мухи *Lucilia capitata*, лигандсвязывающего домена рецептора экдизона мясной мухи *Lucilia cuprina*, лигандсвязывающего домена рецептора экдизона мясной мухи *Calliphora vicina*, лигандсвязывающего домена рецептора экдизона средиземноморской плодовой мухи *Ceratitis capitata*, лигандсвязывающего домена рецептора экдизона саранчи *Locusta migratoria*, лигандсвязывающего домена рецептора экдизона тли *Myzus persicae*, лигандсвязывающего домена рецептора экдизона манящего краба *Celaca pugilator*, лигандсвязывающего домена рецептора экдизона иксодового клеща *Amblyomma americanum*, лигандсвязывающего домена рецептора экдизона белокрылки *Bemisia argentifolii* и лигандсвязывающего домена рецептора экдизона цикадки *Nephotettix cincticeps*.

В другом варианте осуществления лигандсвязывающий домен рецептора экдизона представляет собой лигандсвязывающий домен рецептора экдизона *Choristoneura fumiferana*, аминокислотная последовательность которого приведена под SEQ ID NO: 11.

В другом варианте осуществления лигандсвязывающий домен рецептора экдизона представляет собой аналог лигандсвязывающего домена рецептора экдизона *Choristoneura fumiferana*, который сохраняет по меньшей мере 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% активности связывания лигандов рецепторов эк-

дизона *Choristoneura fumiferana* лигандсвязывающим доменом рецептора экдизона *Choristoneura fumiferana* in vitro. In vitro анализы связывания лигандов рецепторов экдизона хорошо известны средним специалистам в данной области. См., например, WO 02/066612.

В другом варианте осуществления аналог лигандсвязывающего домена рецептора экдизона представляет собой лигандсвязывающий домен рецептора экдизона, раскрытый в WO 02/066612, US 2006/0100416, WO 05/108617 и 2005/0266457. В другом варианте осуществления аналог лигандсвязывающего домена рецептора экдизона представляет собой мутантную форму рецептора экдизона *Choristoneura fumiferana* с заменой V107I/Y127E, приведенную под SEQ ID NO: 12.

DBD характеризуется наличием двух богатых цистеином "цинковых пальцев", между которыми находятся два аминокислотных мотива, Р-бокс и D-бокс, которые придают специфичность к элементам ответа. Эти домены могут быть нативными, модифицированными либо химерными, состоящими из различных доменов гетерологичных рецепторных белков. Подобно подгруппе в семействе ядерных рецепторов, EcR также имеет менее четко определенные области, отвечающие за свойства гетеродимеризации. Поскольку домены ядерных рецепторов являются модульными по своей природе, LBD, DBD и AD могут меняться местами.

В другом варианте осуществления фактор транскрипции содержит AD, DBD, который распознает элемент ответа, связанный с терапевтическим белком или терапевтическим полинуклеотидом, экспрессия которого должна модулироваться; и LBD ядерного рецептора группы Н. В определенных вариантах осуществления LBD ядерного рецептора группы Н содержит мутацию по типу замены.

ДНК-связывающий домен может представлять собой любой ДНК-связывающий домен (DBD), для которого известен элемент ответа, в том числе синтетические и химерные ДНК-связывающие домены или их аналоги, комбинации или модификации. В одном варианте осуществления ДНК-связывающий домен выбран из группы, состоящей из DBD GAL4, DBD LexA, DBD фактора транскрипции, DBD члена группы Н ядерных рецепторов, DBD члена суперсемейства ядерных рецепторов стероидных/тиреоидных гормонов, DBD бактериального LacZ, DBD EcR, DBD GAL4 и DBD LexA.

Трансактивирующий домен (сокращенно "AD" или "TA") может представлять собой AD любого члена группы Н ядерных рецепторов, AD ядерного рецептора стероидных/тиреоидных гормонов, синтетический или химерный AD, полиглутаминовый AD, AD, богатый основными или кислыми аминокислотами, AD VP16, AD GAL4, AD NF-κB, AD BP64, кислый активирующий домен B42 (B42AD), трансактивирующий домен p65 (p65AD) или их аналог, комбинацию или модификацию.

В другом варианте осуществления переключатель генов содержит последовательность, кодирующую первый фактор транскрипции, например CAP, под контролем первого промотора терапевтического переключателя (TSP-1) и последовательность, кодирующую второй фактор транскрипции, например LTF, под контролем второго промотора терапевтического переключателя (TSP-2), где белки, кодируемые указанной последовательностью, кодирующей первый фактор транскрипции, и указанной последовательностью, кодирующей второй фактор транскрипции, взаимодействуют с образованием белкового комплекса (LDTFC), т.е. "двойного переключателя" или "двухгибридного" переключателя генов. Первый и второй TSP могут быть одинаковыми или разными. В данном варианте осуществления в случае присутствия в переключателе генов двух разных TSP, требуемых для экспрессии терапевтической молекулы, повышается специфичность терапевтического способа (см. фиг. 2 в WO 2011/119773). На фиг. 2 в WO 2011/119773 также демонстрируется возможность модификации терапевтического переключателя генов для лечения любого заболевания, нарушения или состояния просто путем вставки соответствующих TSP.

В дополнительном варианте осуществления последовательности, кодирующие как первый, так и второй факторы транскрипции, например, CAP или LTF, находятся под контролем одного и того же промотора терапевтического переключателя (например, TSP-1 на фиг. 1 в WO 2011/119773). При активации данного промотора в одной и той же открытой рамке считывания образуются как CAP, так и LTF. Этого можно достичь посредством применения транскрипционного линкера, такого как IRES (участок внутренней посадки рибосомы). В данном варианте осуществления обе части лигандзависимого комплекса факторов транскрипции синтезируются при активации TSP-1. TSP-1 может представлять собой конститутивный промотор или активироваться только в условиях, ассоциированных с заболеванием, нарушением или состоянием.

В дополнительном варианте осуществления одна последовательность, кодирующая фактор транскрипции, например LTF, находится под контролем промотора терапевтического переключателя, который активируется только в условиях, ассоциированных с заболеванием, нарушением или состоянием (например, TSP-2 или TSP-3 на фиг. 4 в WO 2011/119773), а другая последовательность, кодирующая фактор транскрипции, например CAP, находится под контролем конститутивного промотора терапевтического переключателя (например, TSP-1 на фиг. 4 в WO 2011/119773). В данном варианте осуществления одна часть лигандзависимого комплекса факторов транскрипции присутствует конститутивно, тогда как вторая часть будет синтезироваться только в условиях, ассоциированных с заболеванием, нарушением или состоянием.

В другом варианте осуществления одна последовательность, кодирующая фактор транскрипции,

например CAP, находится под контролем первого TSP (например, TSP-1 на фиг. 3 в WO 2011/119773), а две или более различные последовательности, кодирующие второй фактор транскрипции, например LTF-1 и LTF-2, находятся под контролем других TSP (например, TSP-2 и TSP-3 на фиг. 3 в WO 2011/119773). В данном варианте осуществления каждый из LTF может иметь отличный от других DBD, который распознает отличную от других промоторную последовательность, регулируемую факторами транскрипции (например, DBD-A связывается с элементом ответа, связанным с промотором 1, регулируемым факторами транскрипции (FRP-1), а DBD-B связывается с элементом ответа, связанным с промотором 2, регулируемым факторами транскрипции (FRP-2)). Каждый из промоторов, регулируемых факторами транскрипции, может быть функционально связан с отличным от других терапевтическим геном. Таким образом, одновременно можно предоставлять несколько видов лечения.

В одном варианте осуществления последовательность, кодирующая первый фактор транскрипции, кодирует полипептид, содержащий AD, DBD, который распознает элемент ответа, связанный с последовательностью, кодирующей терапевтический продукт, экспрессия которой должна модулироваться; и LBD ядерного рецептора группы H, а последовательность, кодирующая второй фактор транскрипции, кодирует фактор транскрипции, содержащий LBD ядерного рецептора, выбранного из ретиноидного X-рецептора позвоночных (RXR), RXR беспозвоночных, белка Ultraspiracle (USP) или химерного ядерного рецептора, содержащего по меньшей мере два различных полипептидных фрагмента, представляющих собой лигандсвязывающие домены ядерных рецепторов, выбранных из RXR позвоночных, RXR беспозвоночных и USP (см. WO 01/70816 A2 и US 2004/0096942 A1). Лигандсвязывающий домен ядерного рецептора-"партнера" может дополнительно содержать мутацию по типу усечения, мутацию по типу делеции, мутацию по типу замены или другую модификацию.

В другом варианте осуществления переключатель генов содержит последовательность, кодирующую первый фактор транскрипции, которая кодирует первый полипептид, содержащий LBD ядерного рецептора и DBD, который распознает элемент ответа, связанный с последовательностью, кодирующей терапевтический продукт, экспрессия которой должна модулироваться, и последовательность, кодирующую второй фактор транскрипции, которая кодирует второй полипептид, содержащий AD и LBD ядерного рецептора, где один из LBD ядерных рецепторов представляет собой LBD ядерного рецептора группы H. В одном варианте осуществления первый полипептид по сути не содержит AD, а второй полипептид по сути не содержит DBD. Для целей настоящего изобретения "по сути не содержит" означает, что рассматриваемый белок не содержит последовательность рассматриваемого домена, достаточную для обеспечения активации или активности связывания.

В другом аспекте настоящего изобретения последовательность, кодирующая первый фактор транскрипции, кодирует белок, содержащий партнера по гетеродимеризации и AD ("CAP"), а последовательность, кодирующая второй фактор транскрипции, кодирует белок, содержащий DBD и LBD ("LTF").

В случае если только один LBD ядерного рецептора представляет собой LBD рецептора группы H, другой LBD ядерного рецептора может быть получен из любого другого ядерного рецептора, который образует димер с LBD рецептора группы H. Например, если LBD ядерного рецептора группы H представляет собой LBD EcR, то другой LBD ядерного рецептора-"партнера" может быть получен из EcR, RXR позвоночных, RXR беспозвоночных, белка Ultraspiracle (USP) или химерного ядерного рецептора, содержащего по меньшей мере два различных полипептидных фрагмента, представляющих собой LBD ядерных рецепторов, выбранных из RXR позвоночных, RXR беспозвоночных или USP (см. WO 01/70816 A2, международную заявку на патент № PCT/US02/05235, US 2004/0096942 A1 и патент США № 7531326, включенные в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). Лигандсвязывающий домен ядерного рецептора-"партнера" может дополнительно содержать мутацию по типу усечения, мутацию по типу делеции, мутацию по типу замены или другую модификацию.

В одном варианте осуществления LBD RXR позвоночных получен из RXR человека *Homo sapiens*, мышцы *Mus musculus*, крысы *Rattus norvegicus*, курицы *Gallus gallus*, свиньи *Sus scrofa domestica*, лягушки *Xenopus laevis*, данио-рерио *Danio rerio*, оболочника *Polyandrocarpa misakiensis* или медузы *Tripedalia cystophora*.

В одном варианте осуществления лигандсвязывающий домен RXR беспозвоночных получен из полипептида Ultraspiracle саранчи *Locusta migratoria* ("LmUSP"), гомолога 1 RXR иксодового клеща *Amblyomma americanum* ("AmaRXR1"), гомолога 2 RXR иксодового клеща *Amblyomma americanum* ("AmaRXR2"), гомолога RXR манящего краба *Celaca pugilator* ("CrRXR"), гомолога RXR жука *Tenebrio molitor* ("TmRXR"), гомолога RXR медоносной пчелы *Apis mellifera* ("AmRXR"), гомолога RXR или *Myzus persicae* ("MpRXR") или гомолога RXR из вида, отличного от двукрылых и чешуекрылых.

В одном варианте осуществления химерный LBD RXR содержит по меньшей мере два полипептидных фрагмента, выбранных из полипептидного фрагмента RXR из вида позвоночных, полипептидного фрагмента RXR из вида беспозвоночных или полипептидного фрагмента гомолога RXR из вида беспозвоночных, отличного от двукрылых и чешуекрылых. Химерный лигандсвязывающий домен RXR для применения в настоящем изобретении может содержать по меньшей мере два полипептидных фрагмента RXR из разных видов, или, если виды являются одинаковыми, два или более полипептидных фрагмента могут быть получены из двух или более различных изоформ полипептидного фрагмента RXR из данного

вида. Такие химерные LBD RXR раскрыты, например, в WO 2002/066614.

В одном варианте осуществления химерный лигандсвязывающий домен RXR содержит по меньшей мере один полипептидный фрагмент RXR из вида позвоночных и один полипептидный фрагмент RXR из вида беспозвоночных.

В другом варианте осуществления химерный лигандсвязывающий домен RXR содержит по меньшей мере один полипептидный фрагмент RXR из вида позвоночных и один полипептидный фрагмент гомолога RXR из вида беспозвоночных, отличного от двукрылых и чешуекрылых.

Лиганд в комбинации с LBD ядерного(ых) рецептора(ов), которые, в свою очередь, связываются с элементом ответа FRP, связанного с последовательностью, кодирующей терапевтический продукт, обеспечивают внешнюю временную регуляцию экспрессии последовательности, кодирующей терапевтический продукт. Механизм связывания или порядок, в котором различные компоненты согласно настоящему изобретению связываются друг с другом, т.е., например, лиганд с LBD, DBD с элементом ответа, AD с промотором и т.д., не является критически важным.

В конкретном примере связывание лиганда с LBD ядерного рецептора группы H и LBD его ядерного рецептора-партнера обеспечивает экспрессию последовательности, кодирующей терапевтический продукт. Данный механизм не исключает возможность связывания лиганда с ядерным рецептором группы H (GHNR) или его партнером и образования в результате этого активных гомодимерных комплексов (например, GHNR+GHNR или партнер+партнер). Один или более доменов рецепторов предпочтительно изменяют с получением гибридного переключателя генов. Один или более из трех доменов DBD, LBD и AD обычно могут быть выбраны из источника, отличного от источника других доменов, так, чтобы у гибридных генов и получаемых в результате гибридных белков в выбранных клетке-хозяине или организме-хозяине были оптимизированы транскрипционная активность, комплементарное связывание лиганда и распознавание специфического элемента ответа. В дополнение элемент ответа сам по себе может быть модифицирован или заменен элементами ответа для ДНК-связывающих доменов других белков, таких как белок GAL-4 дрожжей (см. Sadowski et al., *Nature*, 335:563 (1988)) или белок LexA *Escherichia coli* (см. Brent et al., *Cell*, 43:729 (1985)), или синтетическими элементами ответа для специфических целенаправленных взаимодействий с белками, разработанными, модифицированными и отобранными для таких специфических взаимодействий (см., например, Kim et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 94:3616 (1997)) для обеспечения соответствия гибридным рецепторам. Другим преимуществом двугибридных систем является то, что они обеспечивают возможность выбора промотора, применяемого для управления экспрессией гена, в соответствии с желаемым конечным результатом. Такой двойной контроль может быть особенно важным в области генной терапии, в частности, когда вырабатываются цитотоксические белки, поскольку можно контролировать как временные рамки экспрессии, так и клетки, в которых происходит экспрессия. В случае когда гены, функционально связанные с подходящим промотором, вводятся в клетки субъекта, экспрессия экзогенных генов контролируется благодаря присутствию системы согласно настоящему изобретению. Промоторы могут подвергаться конститутивной или индуцируемой регуляции или могут быть тканеспецифическими (т.е. экспрессироваться только в конкретном типе клеток) или специфическими для определенных стадий развития организма.

ДНК-связывающий домен первого гибридного белка связывается в присутствии или в отсутствие лиганда с последовательностью ДНК элемента ответа, обеспечивая инициацию или супрессию транскрипции нижерасположенного(ых) гена(ов), регулируемых данным элементом ответа.

Функциональный LDTFC, например комплекс EcR, также может содержать дополнительный(ые) белок(и), такие как иммунофилины. Дополнительные члены семейства белков-ядерных рецепторов, известные как факторы транскрипции (такие как DHR38 или бета-FTZ-1), также могут являться лиганд-зависимыми или лиганднезависимыми партнерами для EcR, USP и/или RXR. Дополнительно могут требоваться другие кофакторы, такие как белки, общеизвестные как коактиваторы (также называемые адаптерами или медиаторами). Эти белки не связываются с ДНК специфично к последовательности и не участвуют в базальной транскрипции. Они могут оказывать свой эффект на активацию транскрипции посредством различных механизмов, в том числе путем стимуляции связывания активаторов с ДНК, путем влияния на структуру хроматина или путем опосредования взаимодействий активаторов и иницирующего комплекса. Примеры таких коактиваторов включают RIP140, TIF1, RAP46/Bag-1, ARA70, SRC-1/NCoA-1, TIF2/GRIP/NCoA-2, ACTR/AIB1/RAC3/pCIP, а также избирательный коактиваторный (C) белок, связывающийся (B) с элементами ответа, CBP/p300 (для обзора см. Glass et al, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 9:222 (1997)). Для эффективного ингибирования активации транскрипции в отсутствие лиганда также могут требоваться белковые кофакторы, общеизвестные как корепрессоры (также известные как репрессоры, сайленсеры или медиаторы сайленсинга). Эти корепрессоры могут взаимодействовать с EcR без лиганда, обеспечивая сайленсинг активности на уровне элемента ответа. Существующие данные позволяют предположить, что при связывании лиганда изменяется конформация рецептора, что в результате приводит к высвобождению корепрессора и привлечению вышеописанных коактиваторов, за счет чего устраняется их активность сайленсинга. Примеры корепрессоров включают N-CoR и SMRT (для обзора см. Horwitz et al., *Mol. Endocrinol.*, 70:1167 (1996)). Эти кофакторы могут быть эндогенными в клетке или организме или могут быть добавлены экзогенно в виде трансгенов, которые должны экспрессироваться

регулируемым или нерегулируемым образом.

В. Переключатель генов на основе рецептора рапамицина.

В настоящем изобретении дополнительно предусмотрена система переключения генов, в которой используется FKBP-связывающий белок в качестве лигандзависимого комплекса факторов транскрипции и рапамицин в качестве лиганда. В одном варианте осуществления конструкция, кодирующая переключатель генов, содержит

(а) первый полинуклеотид, кодирующий первый химерный белок, который связывается с рапамицином или его аналогом и который содержит по меньшей мере один домен FKBP-связывающего белка (FKBP) и по меньшей мере один белковый домен, гетерологичный по отношению к нему, где домен FKBP содержит пептидную последовательность, выбранную из

(1) встречающегося в природе FKBP,

(2) варианта встречающегося в природе FKBP, в котором до 10 аминокислотных остатков были удалены, вставлены или замещены заменяющими аминокислотами, и

(3) FKBP, кодируемого последовательностью ДНК, которая избирательно гибридизируется с последовательностью ДНК, кодирующей FKBP согласно (1) или (2);

(b) второй полинуклеотид, кодирующий второй химерный белок, который образует комплекс как с (а) рапамицином или аналогом рапамицина, так и с (b) первым химерным белком и который содержит по меньшей мере один домен, связывающийся с комплексом FKBP:рапамицин (FRB), и по меньшей мере один белковый домен, гетерологичный по отношению к нему, где FRB-домен содержит пептидную последовательность, выбранную из

(4) встречающегося в природе FRB-домена,

(5) варианта встречающегося в природе FRB-домена, в котором до 10 аминокислотных остатков были удалены, вставлены или замещены заменяющими аминокислотами, и

(6) FRB-домена, кодируемого последовательностью ДНК, которая избирательно гибридизируется с последовательностью ДНК, кодирующей FRB согласно (4) или (5).

В этой системе переключения генов каждый из первого полинуклеотида и второго полинуклеотида находится под контролем одного или более промоторов терапевтических переключателей, описанных в другом месте в данном документе. Кроме того, в определенных вариантах осуществления по меньшей мере один белковый домен, гетерологичный по отношению к домену FKBP и/или FRB-домену в первом и втором химерных белках, может представлять собой один или более "действующих" или "эффektorных" доменов. Эффекторные домены могут быть выбраны из большого разнообразия белковых доменов, в том числе ДНК-связывающих доменов, доменов активации транскрипции, доменов клеточной локализации и сигнальных доменов (т.е. доменов, способных при кластеризации или мультимеризации запускать рост, пролиферацию, дифференцировку, апоптоз клеток, транскрипцию генов и т.д.).

В определенных вариантах осуществления один слитый белок содержит по меньшей мере один ДНК-связывающий домен (например, ДНК-связывающий домен GAL4 или ZFHD1), а другой слитый белок содержит по меньшей мере один домен активации транскрипции (например, домен активации транскрипции VP16 или р65). Опосредованное лигандом связывание слитых белков представляет собой образование комплекса факторов транскрипции и приводит к инициации транскрипции гена-мишени, связанного с последовательностью ДНК, распознаваемой ДНК-связывающим доменом (т.е. способной к связыванию с ним) одного из слитых белков. Информация о системе экспрессии генов, а также о лиганде раскрыта в патентах США № 6187757; 6649595; 6509152; 6479653 и 6117680.

В других вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрена система переключения генов, которая содержит полинуклеотиды, кодирующие два слитых белка, подвергающиеся спонтанной агрегации в отсутствие лиганда, где

(а) первый слитый белок содержит домен условной агрегации, который связывается с определенным лигандом, и домен активации транскрипции, и

(b) второй слитый белок содержит домен условной агрегации, который связывается с определенным лигандом, и ДНК-связывающий домен, и

(с) в отсутствие лиганда клетки экспрессируют ген, функционально связанный с регуляторной ДНК, с которой связывается указанный ДНК-связывающий домен.

Модифицированные клетки, содержащие систему переключения генов, размножают в присутствии лиганда в количестве, достаточном для репрессии гена. Удаление лиганда индуцирует экспрессию кодируемого белка, который вызывает гибель клеток. Нуклеиновые кислоты, кодирующие два слитых белка, находятся под контролем по меньшей мере одного промотора, активного в определенных условиях. Система экспрессии генов, в которой используются домены условной агрегации, раскрыта в публикации заявки на патент США 2002/0048792.

С. Система переключения генов на основе прокариотического репрессора/оператора.

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрена система переключения генов, содержащая

(а) первый полинуклеотид, кодирующий трансактивирующий слитый белок, содержащий прокариотический тетрациклиновый ("tet") репрессор и эукариотический белковый домен активации транс-

крипции; и

(b) второй полинуклеотид, кодирующий полипептид фратаксин, где указанный второй полинуклеотид функционально связан с минимальным промотором и по меньшей мере одной последовательностью tet-оператора.

Первый полинуклеотид, кодирующий трансактивирующий слитый белок, может содержать промотор терапевтического переключателя, описанный в другом месте в данном документе.

В другом варианте осуществления система переключения генов содержит лактозные ("Lac") системы репрессор-оператор бактерии *Escherichia coli*. Система переключения генов согласно настоящему изобретению также может содержать

(a) первый полинуклеотид, кодирующий трансактивирующий слитый белок, содержащий прокариотический lacI-репрессор и эукариотический белковый домен активации транскрипции; и

(b) второй полинуклеотид, кодирующий полипептид фратаксин, где указанный второй полинуклеотид функционально связан с промотором переключателя генов.

В Lac-системе lac-оперон инактивирован в отсутствие лактозы или ее синтетических аналогов, таких как изопропил-b-D-тиогаляктозид.

Дополнительные системы переключения генов включают системы, описанные в следующих документах: US 7091038; WO 2004078924; EP 1266015; US 20010044151; US 20020110861; US 20020119521; US 20040033600; US 20040197861; US 20040235097; US 20060020146; US 20040049437; US 20040096942; US 20050228016; US 20050266457; US 20060100416; WO 2001/70816; WO 2002/29075; WO 2002/066612; WO 2002/066613; WO 2002/066614; WO 2002/066615; WO 2005/108617; US 6258603; US 20050209283; US 20050228016; US 20060020146; EP 0965644; US 7304162; US 7304161; MX 234742; KR 10-0563143; AU 765306; AU 2002-248500 и AU 2002-306550.

D. Комбинация систем переключения генов.

В настоящем изобретении предусмотрены композиции на основе нуклеиновых кислот, модифицированные клетки и биореакторы, содержащие две или более системы переключения генов, которые содержат различные лигандзависимые комплексы факторов транскрипции, активируемые эффективным количеством одного или более лигандов, где две или более системы переключения генов содержат первый переключатель генов и второй переключатель генов, оба из которых избирательно индуцируют экспрессию одного или более полипептидов интерлейкинов при связывании с одним или более лигандами. В пределах объема настоящего изобретения находится любое количество систем переключения генов и/или их комбинации.

В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрена композиция на основе нуклеиновой кислоты, содержащая систему переключения генов, которая содержит

(i) первую кассету экспрессии генов, содержащую полинуклеотид, кодирующий первый гибридный полипептид, который содержит

(1) трансактивирующий домен, который активирует промотор, функционально связанный с полинуклеотидом, кодирующим полипептид фратаксин; и

(2) домен-партнер по гетеродимеризации,

(ii) вторую кассету экспрессии генов, содержащую полинуклеотид, кодирующий второй гибридный полипептид, который содержит

(1) ДНК-связывающий домен, который распознает промотор, регулируемый факторами транскрипции, функционально связанный с полинуклеотидом, кодирующим полипептид фратаксин; и

(2) лигандсвязывающий домен; и

(iii) третью кассету экспрессии генов, содержащую полинуклеотид, кодирующий полипептид фратаксин, при этом указанная кассета экспрессии генов содержит

(1) индуцируемый промотор, активируемый трансактивирующим доменом второго гибридного полипептида; и

(2) полинуклеотид, кодирующий указанный полипептид фратаксин.

В определенных вариантах осуществления комбинация двух или более систем переключения генов может представлять собой

(1) систему экспрессии генов на основе рецептора экдизона по типу двойного переключателя; и

(2) переключатель генов на основе рецептора экдизона по типу одинарного переключателя.

В других вариантах осуществления комбинация может представлять собой

(1) переключатель генов на основе рецептора экдизона по типу одинарного или двойного переключателя; и

(2) переключатель генов на основе рецептора рапамицина.

В качестве альтернативы комбинация систем переключения генов может представлять собой две идентичные системы переключения генов на основе рецептора рапамицина, раскрытые выше. Любые возможные комбинации систем переключения генов находятся в пределах объема настоящего изобретения. Примеры систем на основе рецептора экдизона по типу двойных переключателей можно найти, например, в WO 2002/29075 и US 2002/0110861.

E. Другие переключатели генов.

В другом аспекте настоящего изобретения в состав кассет экспрессии генов согласно настоящему изобретению включена куматная система переключения, которая функционирует благодаря репрессору CymR, связывающемуся с последовательностями куматного оператора с высоким сродством (куматный переключатель SparQ™, System Biosciences, Inc.). Репрессия ослабляется посредством добавления кумата, нетоксичной малой молекулы, которая связывается с CymR. Данная система характеризуется динамической индуцируемостью может быть точно настроена и является обратимой и индуцируемой.

В другом аспекте настоящего изобретения в состав кассет экспрессии генов согласно настоящему изобретению включен рибопереклюатель, который представляет собой регуляторный сегмент молекулы матричной РНК, связывающийся с эффектором, в результате чего изменяется выработка белков, кодируемых мРНК. мРНК, содержащая рибопереклюатель, непосредственно участвует в регуляции своей собственной активности в ответ на воздействие концентраций ее эффекторной молекулы. Эффекторы могут представлять собой метаболиты, образующиеся из пуринов/пиримидинов, аминокислот, витаминов или других низкомолекулярных кофакторов. Эти эффекторы выступают в качестве лигандов для чувствительного элемента рибопереклюателя или аптамера. См. Breaker, R.R., Mol Cell. (2011), 43(6):867-79.

В другом аспекте настоящего изобретения в состав кассет экспрессии генов согласно настоящему изобретению включена система переключения генов, функционирующая на основе чувствительности к биотину, в которой бактериальный репрессорный белок TetR слит со стрептавидином, который взаимодействует с синтетическим сигналом биотинилирования AVITAG, слитым с VP16, активируя экспрессию генов. Биотинилирование пептида AVITAG регулируется бактериальной биотинлигазой BirA, за счет чего обеспечивается способность отвечать на лиганд. См. Weber et al. (2007), Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 104, 2643-2648; Weber et al. (2009), Metabolic Engineering, 11(2):117-124.

Из уровня техники хорошо известны дополнительные системы переключения генов, которые можно применять в качестве части настоящего изобретения, в том числе без ограничения системы, описанные в Auslander and Fussenegger, Trends in Biotechnology (2012), 31(3):155-168, включенной в данный документ посредством ссылки.

Лиганды для переключателей генов.

Как используется в данном документе, термин "лиганд" применительно к переключателям генов (например, переключателям генов на основе EcR) описывает малые и растворимые молекулы, обладающие способностью к активации переключателя генов со стимуляцией экспрессии полипептида, кодируемого в нем. Лиганд для лиганд-зависимого комплекса факторов транскрипции согласно настоящему изобретению связывается с белковым комплексом, содержащим один или более из лигандсвязывающего домена, домена-партнера по гетеродимеризации, ДНК-связывающего домена и трансаактивирующего домена. Выбор лиганда, активирующего лигандзависимый комплекс факторов транскрипции, зависит от типа используемого переключателя генов.

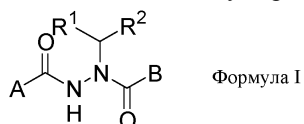
Примеры лигандов включают без ограничения экистероиды, такие как экизон, 20-гидроксиэкизон, понастерон А, муристерон А и т.п., 9-цис-ретиноевую кислоту, синтетические аналоги ретиноевой кислоты, N,N'-диацилгидразины, как, например, раскрытые в патентах США № 6013836; 5117057; 5530028 и 5378726 и публикациях заявок на патент США № 2005/0209283 и 2006/0020146; оксадиазолины, описанные в публикации заявки на патент США № 2004/0171651; дибензоилалкилцианогидазины, как, например, раскрытые в заявке на европейский патент № 461809; N-алкил-N,N'-диароилгидразины, как, например, раскрытые в патенте США № 5225443; N-ацил-N-алкилкарбонилгидразины, как, например, раскрытые в заявке на европейский патент № 234994; N-ароил-N-алкил-N'-ароилгидразины, как, например, описанные в патенте США № 4985461; амидокетоны, как, например, описанные в публикации заявки на патент США № 2004/0049037; каждый из каковых документов включен в данный документ посредством ссылки, а также другие сходные вещества, в том числе 3,5-ди-трет-бутил-4-гидрокси-N-изобутилбензамид, 8-О-ацетилгарпагид, оксистеролы, 22(R)-гидроксихолестерин, 24(S)-гидроксихолестерин, 25-эпоксихолестерин, T0901317, 5-альфа-6-альфаэпоксихолестерин-3-сульфат (ECHS), 7-кетохолестерин-3-сульфат, фамезол, желчные кислоты, 1,1-бисфосфонатные сложные эфиры, ювенильный гормон III и т.п. Примеры диацилгидразиновых лигандов, применимых в настоящем изобретении, включают RG-115819 (N-(1-этил-2,2-диметилпропил)-N'-(2-метил-3-метоксибензоил)-гидразид 3,5-диметилбензойной кислоты), RG-115932 (N-(1-трет-бутилбутил)-N'-(2-этил-3-метоксибензоил)-гидразид (R)-3,5-диметилбензойной кислоты) и RG-115830 (N-(1-трет-бутилбутил)-N'-(2-этил-3-метоксибензоил)-гидразид 3,5-диметилбензойной кислоты). См., например, заявку на патент США с регистрационным № 12/155111, опубликованную как US 2009/0163592, а также заявку согласно PCT № PCT/US2008/006757, обе из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Например, лиганд для переключателя генов на основе рецептора экизона может быть выбран из любых подходящих лигандов. В качестве лигандов для переключателя генов согласно настоящему изобретению можно применять как встречающиеся в природе экизоны или аналоги экизонов (например, 20-гидроксиэкизон, муристерон А, понастерон А, понастерон В, понастерон С, 26-йодпонастерон А, инокостерон или 26-мезилинокостерон), так и нестероидные индукторы. В патенте США № 6379945 В1

описан рецептор стероидов насекомых, выделенный из *Heliothis virescens* ("HEcR"), который способен выступать в качестве переключателя генов, отвечающего как на стероидные, так и на определенные нестероидные индукторы. В этой и многих других системах, отвечающих как на стероиды, так и на нестероидные индукторы, нестероидные индукторы обладают явным преимуществом по сравнению со стероидами по целому ряду причин, включающих, например, более низкие затраты на производство, метаболическую стабильность, отсутствие насекомых, растений или млекопитающих и приемлемость для окружающей среды. В патенте США № 6379945 В1 описана практическая ценность двух дибензоилгидразинов - 1,2-дибензоил-1-трет-бутилгидразина и тебуфенозида (N-(4-этилбензоил)-N'-(3,5-диметилбензоил)-N'-трет-бутилгидразина) - в качестве лигандов для переключателя генов на основе рецептора экдизона. В настоящее изобретение также включены в качестве лигандов другие дибензоилгидразины, как, например, раскрытые в патенте США № 5117057 В1. Применение тебуфенозида в качестве химического лиганда рецептора экдизона из *Drosophila melanogaster* также раскрыто в патенте США № 6147282. Дополнительными неограничивающими примерами лигандов рецепторов экдизона являются 3,5-ди-трет-бутил-4-гидрокси-N-изобутилбензамид, 8-O-ацетилгарпагид, 1,2-диацилгидразин, N'-замещенный и N,N'-дизамещенный гидразин, дибензоилалкилцианогидразин, N-замещенный N-алкил-N,N'-диароилгидразин, N'-замещенный

N-ацил-N-алкилкарбонилгидразин или N-ароил-N'-алкил-N'-ароилгидразин (см. патент США № 6723531).

В одном варианте осуществления лиганд для системы переключения генов на основе рецептора экдизона представляет собой диацилгидразиновый лиганд или хиральный диацилгидразиновый лиганд. Лиганды, применяемые в системе переключения генов, могут представлять собой соединения формулы I



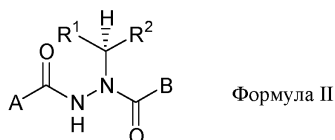
где А представляет собой алкокси, арилалкилокси или арилокси;

В представляет собой необязательно замещенный арил или необязательно замещенный гетероарил; и

R¹ и R² независимо представляют собой необязательно замещенный алкил, арилалкил, гидроксиалкил, галогеналкил, необязательно замещенный циклоалкил, необязательно замещенный алкенил, необязательно замещенный алкинил, необязательно замещенный гетероциклический радикал, необязательно замещенный арил или необязательно замещенный гетероарил;

или их фармацевтически приемлемые соли, гидраты, кристаллические формы или аморфные формы.

В другом варианте осуществления лиганды могут представлять собой энантимерно обогащенные соединения формулы II



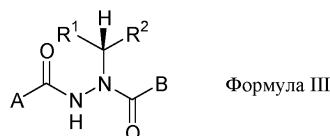
где А представляет собой алкокси, арилалкилокси, арилокси, арилалкил, необязательно замещенный арил или необязательно замещенный гетероарил;

В представляет собой необязательно замещенный арил или необязательно замещенный гетероарил; и

R¹ и R² независимо представляют собой необязательно замещенный алкил, арилалкил, гидроксиалкил, галогеналкил, необязательно замещенный циклоалкил, необязательно замещенный алкенил, необязательно замещенный алкинил, необязательно замещенный гетероциклический радикал, необязательно замещенный арил или необязательно замещенный гетероарил; при условии что R¹ и R² не являются одинаковыми; где абсолютная конфигурация при асимметрическом атоме углерода, несущем R¹ и R², представляет собой преимущественно S;

или их фармацевтически приемлемые соли, гидраты, кристаллические формы или аморфные формы.

В определенных вариантах осуществления лиганды могут представлять собой энантимерно обогащенные соединения формулы III



где А представляет собой алкокси, арилалкилокси, арилокси, арилалкил, необязательно замещенный арил или необязательно замещенный гетероарил;

В представляет собой необязательно замещенный арил или необязательно замещенный гетероарил; и

R¹ и R² независимо представляют собой необязательно замещенный алкил, арилалкил, гидроксиалкил, галогеналкил, необязательно замещенный циклоалкил, необязательно замещенный алкенил, необязательно замещенный алкинил, необязательно замещенный гетероциклический радикал, необязательно замещенный арил или необязательно замещенный гетероарил; при условии, что R¹ и R² не являются одинаковыми;

наковыми; где абсолютная конфигурация при асимметрическом атоме углерода, несущем R¹ и R², представляет собой преимущественно R;

или их фармацевтически приемлемые соли, гидраты, кристаллические формы или аморфные формы.

В одном варианте осуществления лиганд может представлять собой N-(1-трет-бутилбутил)-N'-(2-этил-3-метоксибензоил)-гидразид (R)-3,5-диметилбензойной кислоты, характеризующийся энантиомерным избытком, составляющим по меньшей мере 95%, или его фармацевтически приемлемую соль, гидрат, кристаллическую форму или аморфную форму.

Диацилгидразиновые лиганды формулы I и хиральные диацилгидразиновые лиганды формулы II или III, применяемые в системе переключения генов на основе рецептора экдизона, обеспечивают средство для внешней временной регуляции экспрессии полипептида фратаксина согласно настоящему изобретению. См. заявку на патент США № 12/155111, опубликованную как US 2009/0163592, поданную 29 мая 2008 г., которая включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

Лиганды, применяемые в настоящем изобретении, могут образовывать соли. Термин "соль(соли)", как используется в данном документе, обозначает кислые и/или основные соли, образуемые неорганическими и/или органическими кислотами и основаниями. В дополнение, в случае если соединение формулы I, II или III содержит как основной компонент, так и кислый компонент, могут образовываться цвиттер-ионы ("внутренние соли"), и они включены в объем термина "соль(соли)", как используется в данном документе. Применяются фармацевтически приемлемые (т.е. нетоксичные, физиологически приемлемые) соли, хотя другие соли также являются применимыми, например, на стадиях выделения или очистки, которые можно использовать в ходе получения. Соли соединений формулы I, II или III могут образовываться, например, при осуществлении реакции соединения с количеством кислоты или основания, таким как эквивалентное количество, в среде, такой как среда, в которой соль осаждается, или в водной среде с последующей лиофилизацией.

Лиганды, которые содержат основной компонент, могут образовывать соли с разнообразными органическими и неорганическими кислотами. Иллюстративные соли присоединения кислоты включают ацетаты (как, например, образуемые уксусной кислотой или тригалогенуксусной кислотой, например трифторуксусной кислотой), адипаты, альгинаты, аскорбаты, аспартаты, бензоаты, бензолсульфонаты, бисульфаты, бораты, бутираты, цитраты, камфораты, камфорсульфонаты, циклопентанпропионаты, диглюконаты, додецилсульфаты, этансульфонаты, фумараты, глюконогептаноаты, глицерофосфаты, гемисульфаты, гептаноаты, гексаноаты, гидрохлориды (образуемые хлористоводородной кислотой), гидробромиды (образуемые бромистоводородной кислотой), гидройодиды, 2-гидроксиэтансульфонаты, лактаты, малеаты (образуемые малеиновой кислотой), метансульфонаты (образуемые метансульфоновой кислотой), 2-нафталинсульфонаты, никотинаты, нитраты, оксалаты, пектинаты, персульфаты, 3-фенилпропионаты, фосфаты, пикраты, пивалаты, пропионаты, салицилаты, сукцинаты, сульфаты (как, например, образуемые серной кислотой), сульфонаты (как, например, упоминаемые в данном документе), тартраты, тиоцианаты, толуолсульфонаты, такие как тозилаты, ундеканаты и т.п.

Лиганды, которые содержат кислый компонент, могут образовывать соли с разнообразными органическими и неорганическими основаниями. Иллюстративные основные соли включают соли аммония, соли щелочных металлов, такие как соли натрия, лития и калия, соли щелочноземельных металлов, такие как соли кальция и магния, соли органических оснований (например, органических аминов), такие как бензатины, дициклогексиламины, гидрабины (образуемые N,N-бис(дегидроабиетил)этилендиамином), N-метил-D-глюкамины, N-метил-D-глюкамиды, трет-бутиламины, а также соли аминокислот, таких как аргинин, лизин и т.п.

Неограничивающими примерами лигандов для системы индуцируемой экспрессии генов, в которой используется FK506-связывающий домен, являются FK506, циклоспорин А или рапамицин. FK506, рапамицин и их аналоги раскрыты в патентах США № 6649595 B2 и 6187757. См. также патенты США № 7276498 и 7273874.

Лиганды, описанные в данном документе, можно вводить в отдельности или в качестве части фармацевтической композиции, содержащей фармацевтически приемлемый носитель. В одном варианте осуществления фармацевтические композиции находятся в форме растворов, суспензий, таблеток, капсул, мазей, настоек или инъекционных композиций.

Определенные варианты осуществления настоящего изобретения теперь будут описаны со ссылкой на конкретные примеры, которые представлены исключительно для иллюстрации настоящего изобретения и не должны никоим образом истолковываться как ограничивающие.

Примеры

Определенные аспекты настоящего изобретения теперь будут описаны, но не должны истолковываться как ограничивающие настоящее изобретение.

Материалы и способы, применяемые в примерах А.

Разработка матрицы и планирование экспериментов.

Цикл первоначальной разработки системы экспрессии фратаксина выполняли в течение трех фаз. В первую очередь, выбирали части на основании хронологических данных и мнений экспертов, а также литературных прецедентов использования типа клеток-мишеней (DRG) *in vivo*. Во вторую очередь, со-

ставляли матрицу планирования полнофакторного эксперимента. В третью очередь, проводили D-оптимальное планирование эксперимента полнофакторным методом. В результате этого получали подмножество матрицы, которое позволяет выявить максимальную дисперсию и которое быстрее всего приводит к разработке прогностической модели.

Матрицу для конститутивной экспрессии из ~80 конструкций с варьирующимися промоторами и 5'/3'-регуляторными элементами разрабатывали и анализировали с помощью алгоритмов планирования эксперимента для уменьшения количества конструкций, необходимых для проведения надлежащего тестирования в отношении "высоких" и "средних" уровней экспрессии FXN (потенциально представляющих соответственно сверхфизиологические и физиологические уровни). Существенно важный минимальный промотор FXN размером 1255 п. о., описанный в Greene et al. (2005), был включен в матрицу для обеспечения потенциально физиологических уровней экспрессии FXN. Другие конститутивные промоторы включали промоторы EF1 α , UBC и PGK1. На основе исходной матрицы из 80 конструкций было создано пятьдесят конструкций.

Матрица была уменьшена до 50 векторов с помощью дополнительных положительных контролей, обеспечивающих сверхфизиологические уровни экспрессии, включенных в скрининг экспрессии: CAG-FXN-hGHpA и CMV-5U2-FXN-hGHpA. Промотор CMV, известный как очень сильный промотор, не был включен в матрицу, поскольку он, как известно, подвергается сайленсингу с течением времени *in vivo* (McCown et al. (1996), *Brain Res.*, 713:99-107; Klein et al. (1998), *Exp. Neurol.*, 150:183-194; Paterna et al. (2000), *Gene Ther.*, 7, 1304-1311; Tenenbaum et al. (2004), *J. Gene Med.*, 6 (Suppl. 1), S212-S222). Конструкция CAG-FXN-hGHpA с промотором CAG (гибридным промотором гена бета-актина курицы), также являющаяся сильным промотором, была включена в качестве средства сравнения. Промотор CAG также содержит ранний энхансер CMV и первый экзон и первый интрон гена бета-актина курицы, а также 5'-акцепторный сайт сплайсинга гена бета-глобина кролика. Применение этого гибридного промотора и других его разновидностей является повседневной практикой в путях применения генной терапии с использованием AAV (например, Flotte et al. (2011), *Hum. Gene Ther.*, 22:1239-1247; Maclachlan et al. (2011), *Mol. Ther.*, 19:326-334; Perdomini et al. (2014), *Nature Med.*, 20:542-547).

50 векторов матрицы и контроли конструировали с помощью стандартных методик клонирования. Векторы матрицы и контроли встраивали в каркас AAV, в котором кассета экспрессии была вставлена между двумя последовательностями инвертированных концевых повторов (ITR) AAV, существенно важными для упаковки генома в капсид AAV определенного серотипа. Конструкции также содержали некодирующие "спейсерные" последовательности с длиной в диапазоне от 1001 до 2500 п. о., доводящие размер генома до ~4,2 т. п. о., который является оптимальным для упаковки в капсид. Конструкции подвергали полной проверке последовательностей с помощью технологий секвенирования нового поколения, в том числе с использованием набора для получения ДНК Nextera XT от Illumina с некоторыми модификациями. Их подмножество представлено в данном документе и перечислено в табл. 1.

В. Процедуры трансфекции, пробы и анализ.

В день 0 замороженные клетки SY5Y (Европейская коллекция клеточных культур, ECACC, находящаяся в ведении Службы общественного здравоохранения Англии, Sigma, № по кат. 94030304; № партии 13C014) высевали в оригинальную колбу и инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в условиях насыщающей влажности. Отдельно высевали замороженные фибробласты при FA (Coriell; № по кат. GM03816) в оригинальный флакон и инкубировали при 37°C, при 5% CO₂ в условиях насыщающей влажности.

В день 3, когда SY5Y и фибробласты достигали 75% конfluence, среду в каждом флаконе аспирировали, и клетки однократно прополаскивали с помощью 10 мл DPBS (Gibco, без кальция и магния, № по кат. 14190) перед ресуспендированием их в 3 мл раствора трипсин-EDTA (0,25%, Gibco, № по кат. 25200) и инкубированием их в течение 3 мин при к. т. В каждый флакон добавляли по 5 мл среды для нейтрализации трипсина. Клетки собирали из каждого из флаконов T75 в пробирки Falcon на 15 мл и центрифугировали при 1000 об/мин в настольной центрифуге Sorvall в течение 5 мин при к. т. Образцы надосадочной жидкости сливали и клетки ресуспендировали в 2 мл свежей среды. Клетки осторожно встряхивали для разрушения каких-либо скоплений. Клетки затем разделяли 1:2 и в каждый из 4 флаконов T75 добавляли по 1 мл суспензий клеток.

С. Трансфекция.

В день 0 $4,0 \times 10^4$ живых клеток SY5Y и фибробластов при FA высевали в 0,4 мл среды/лунка в четырех 48-луночных планшетах, обработанных для культивирования тканей. Клетки собирали путем аспирации и сливания среды, однократного прополаскивания каждого флакона с помощью 10 мл DPBS, аспирации и сливания DPBS, ресуспендирования клеток в 3 мл раствора трипсин-EDTA и инкубирования их в течение 3 мин при к. т. Затем в каждый флакон добавляли по 5 мл среды для нейтрализации трипсина, и клетки собирали в пробирки Falcon на 15 мл и центрифугировали при 1000 об/мин в настольной центрифуге Sorvall в течение 5 мин при к. т. Образцы надосадочной жидкости сливали, клетки ресуспендировали в 2 мл свежей среды для культивирования фибробластов и клетки каждого из 2 типов клеток объединяли (фибробласты отдельно от SY5Y). Клетки осторожно встряхивали для разрушения каких-либо скоплений.

Клетки подсчитывали, добавляя 10 мкл суспензии клеток к 90 мкл разбавленного трипанового синего и осторожно перемешивая перед загрузкой клеток в гемоцитометр для подсчета клеток. При определении живых и мертвых клеток были получены следующие результаты: $6,5 \times 10^6$ клеток/мл SY5Y и $1,8 \times 10^6$ клеток/мл фибробластов при FA, где жизнеспособность составляла $83/85=97,6\%$ для SY5Y и $82/85=96,5\%$ для фибробластов при FA.

Затем в каждую из лунок 48-луночных планшетов, содержащих 0,4 мл свежей среды DMEM/F12 (Gibco, № по кат. 11320-033, дополненной 10% термоинактивированной фетальной бычьей сывороткой (FBS) (Atlanta Bio, № по кат. S11550H) высевали по $4,0 \times 10^4$ клеток SY5Y и фибробластов при FA. Планшеты покачивали в поперечном направлении и взад и вперед для равномерного распределения клеток. Планшеты инкубировали в течение ночи при 37°C при 5% CO₂ в условиях насыщающей влажности.

В случае с фибробластами при FA в день 1 клетки наблюдали, оценивая конфлюэнтность и общий внешний вид. Получали комплексы ДНК:TransfeX (1:1) для фибробластов при FA. Одну пробирку для каждой плазмиды помечали, и для каждой из плазмид было по 3 пробирки. TransfeX, плазмидную ДНК и среду Opti-MEM I с пониженным содержанием сыворотки (Gibco, № по кат. 31985-062, с L-глутамином, с HEPES, с 2,4 г/л бикарбоната натрия) нагревали до комнатной температуры и осторожно перемешивали вихревым способом. 50 мкл среды Opti-MEM I с пониженным содержанием сыворотки отмеряли пипеткой в стерильные микроцентрифужные пробирки. В каждую пробирку добавляли соответствующие объемы плазмидной ДНК (0,75 мкг ДНК) и тщательно перемешивали путем осторожного пипетирования. Затем к разбавленной смеси ДНК в каждой из пробирок добавляли по 0,75 мкл реагента TransfeX (ATCC, № по кат. ACS-4005). Комплексы TransfeX: ДНК тщательно перемешивали путем пипетирования с последующим легким постукиванием по пробиркам. Комплексы TransfeX:ДНК инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин. Пробирки центрифугировали (кратковременное центрифугирование) для смещения всей жидкости в нижнюю часть пробирок Eppendorf. Для добавления трансфекционных комплексов к фибробластам при FA данные комплексы распределяли по клеткам путем добавления комплексов по каплям в различные области лунок (по 50 мкл смеси в каждую из трех лунок в трех повторностях). Культуральные сосуды осторожно покачивали взад и вперед и в поперечном направлении для равномерного распределения комплексов TransfeX:ДНК и инкубировали в течение ~72 ч.

В случае с клетками SY5Y в день 1 получали комплексы ДНК:FuGene 6 (1:3). Одну пробирку для каждой плазмиды помечали, и для каждой из плазмид было по 3 пробирки. FuGene 6, плазмидную ДНК и среду Opti-MEM I с пониженным содержанием сыворотки нагревали до комнатной температуры и осторожно перемешивали вихревым способом. 50 мкл среды Opti-MEM I с пониженным содержанием сыворотки отмеряли пипеткой в стерильные микроцентрифужные пробирки. Затем к среде в каждой из пробирок добавляли по 2,25 мкл реагента Fugene 6 (Promega, № по кат. 2692) и их инкубировали в течение 5 мин. В каждую пробирку добавляли соответствующие объемы плазмидной ДНК (0,75 мкг ДНК) и тщательно перемешивали путем осторожного пипетирования. Комплексы реагент для трансфекции/среда/ДНК тщательно перемешивали путем пипетирования с последующим легким постукиванием по пробиркам. Комплексы инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин. Пробирки центрифугировали (кратковременное центрифугирование) для смещения всей жидкости в нижнюю часть пробирок Eppendorf. Для добавления трансфекционных комплексов к клеткам SY5Y данные комплексы распределяли по клеткам путем добавления комплексов по каплям в различные области лунок (по 50 мкл смеси в каждую из трех лунок в трех повторностях). Культуральные сосуды осторожно покачивали взад и вперед и в поперечном направлении для равномерного распределения трансфекционных комплексов и инкубировали в течение ~72 ч.

В день 4 подтверждали сигнал флуоресценции GFP (визуально) и клетки лизировали в буфере для лизиса клеток (на каждые 10 мл буфера для лизиса клеток: 200 мкл (50X средства для усиления экстракции клеток)+2 мл (5X буфера для экстракции клеток)+7,8 мл (DI-воды, Gibco, № по кат. A12873)+1 таблетка ингибитора протеаз без EDTA (Roche, № по кат. 04693159001)). Вкратце образцы надосадочной жидкости из каждой из лунок в четырех 48-луночных планшетах аспирировали и клетки дважды промывали охлажденным 1X PBS (все стадии процедуры выполняли на льду). Охлажденный буфер для лизиса добавляли при 150 мкл/лунка. Клетки в каждой лунке соскабливали с помощью нижней части наконечника P1000 для обеспечения лизиса клеток. Планшеты с клетками в буфере для лизиса инкубировали при 4°C во встряхивателе в течение 30 мин. Лизаты клеток собирали путем пипетирования вверх-вниз без образования пены и добавляли в микроцентрифужную пробирку. Лизаты центрифугировали при 4°C, 18000 об/мин в течение 20 мин. Лизаты клеток затем переносили в новую микроцентрифужную пробирку и хранили при -80°C до готовности к применению в ELISA фратаксина (см. ниже).

В день 5 определяли концентрации общего белка в лизатах клеток SY5Y и фибробластов при FA, трансфицированных с помощью матрицы для экспрессии FXN, с использованием протокола анализа Мi-сто BCA (Pierce, № по кат. 23235; № партии PK 207908) согласно инструкциям производителя.

В день 6 определяли содержание FXN в образцах SY5Y и фибробластах при FA, трансфицированных с помощью матрицы для экспрессии FXN, с использованием ELISA FXN (ELISA SimpleStep для фратаксина человека, Abcam, ab176112) в соответствии с рекомендациями производителя за исключени-

ем того, что все образцы и стандарты разбавляли в 1X PBS. Вкратце реагенты, рабочие стандарты и образцы получали в соответствии с инструкциями производителя набора Abscam. Все материалы и реагенты уравнивали до комнатной температуры перед применением. Все стандарты, контроли и образцы анализировали в двух повторностях.

Аликвоты каждого из образцов или стандартов объемом 50 мкл добавляли в соответствующие лунки. Лизаты клеток SY5Y разбавляли 1:150, а фибробласты при FA разбавляли 1:50 исходя из данных о концентрации общего белка, полученных в анализе Micro BCA (Pierce, № по кат. 23235; № партии РК 207908) согласно инструкциям производителя. В каждую лунку добавляли аликвоту коктейля антител (1X захватывающее антитело и 1X детекторное антитело, предусмотренные в наборе для ELISA фратаксина и полученные согласно инструкциям производителя) объемом 50 мкл. Планшет запечатывали и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре во встряхивателе для планшетов, установленном на 400 об/мин. Каждую лунку промывали с помощью 3×350 мкл 1X промывочного буфера РТ (буфера, предусмотренного в наборе для ELISA фратаксина и полученного согласно инструкциям производителя) путем аспирации или декантации из лунок, а затем дозированного внесения по 350 мкл 1X промывочного буфера РТ в каждую лунку. После последнего промывания планшет переворачивали и промокали чистыми бумажными полотенцами для удаления избыточной жидкости. В каждую лунку добавляли по 100 мкл субстрата TMB и инкубировали в течение 10 мин в темноте во встряхивателе для планшетов, установленном на 400 об/мин. Затем в каждую лунку добавляли по 100 мкл останавливающего раствора. Планшет встряхивали во встряхивателе для планшетов в течение 1 мин для перемешивания. В каждой лунке регистрировали OD при 450 нм в качестве показания в конечной точке.

Плазмиды: описание конструкций приведено в табл. 1. Все конструкции содержат спейсер с длиной в диапазоне от 1001 до 3000 п. о. для обеспечения оптимального размера генома для упаковки в AAV.

Таблица 1

Выбранные конструкции

№/Название	Состав*		
	Промотор	5'-регуляторный элемент	3'-регуляторный элемент
CMV	CMV (SEQ ID NO: 13)	5U2 (SEQ ID NO: 4)	hGHpA (SEQ ID NO: 5)
012	UBC (SEQ ID NO: 3)	5'-UTR FTH1 (SEQ ID NO: 14)	Ранний элемент SV40 (SEQ ID NO: 8)
017	UBC (SEQ ID NO: 3)	5'-UTR FTH1 (SEQ ID NO: 14)	Поздний элемент SV40 (SEQ ID NO: 9)
020	UBC (SEQ ID NO: 3)	GAPDH (SEQ ID NO: 15)	Другая
021	UBC (SEQ ID NO: 3)	5'-сайт сплайсинга RPL6 (SEQ ID NO: 16)	Другая
023	UBC (SEQ ID NO: 3)	GAPDH (SEQ ID NO: 15)	Синтетический 3'-регуляторный элемент (SEQ ID NO: 7)
024	UBC	5U2	Синтетический 3'-регуляторный элемент

	(SEQ ID NO: 3)	(SEQ ID NO: 4)	(SEQ ID NO: 7)
025	UBC (SEQ ID NO: 3)	5'-сайт сплайсинга RPL6 (SEQ ID NO: 16)	Синтетический 3'-регуляторный элемент (SEQ ID NO: 7)
026	UBC (SEQ ID NO: 3)	5U2 (SEQ ID NO: 4)	hGHpA (SEQ ID NO: 5)
034	PGK1 (SEQ ID NO: 17)	GAPDH (SEQ ID NO: 15)	Поздний элемент SV40 (SEQ ID NO: 9)
GFP	CMV (SEQ ID NO: 13)	Нет данных	Неизвестный
Средство ложной трансфекции			

D. Получение векторов на основе AAV5.

Вирусные частицы, в том числе без ограничения вирусы, векторы, вирионы, средства доставки генов, rAAV, капсиды и пустые капсиды, применимые при практическом осуществлении настоящего изобретения, можно конструировать с помощью способов, хорошо известных в области молекулярной биологии. Вирусные векторы, несущие трансгены, можно собирать из полинуклеотидов, кодирующих трансген, подходящих регуляторных элементов и элементов, необходимых для выработки вирусных белков, которые опосредуют трансдукцию клеток.

Биологическое вещество AAV5.hFXN представляет собой рекомбинантный аденоассоциированный вирус (rAAV), содержащий кДНК, кодирующую hFXN WT. Ген-вставка (например, "трансген") кодирует предшественника белка фратаксина человека, экспрессия которого предполагается для увеличения количества митохондриального фратаксина у субъектов, получающих лечение. кДНК, кодирующая hFXN, в векторе была синтезирована химически de novo так, чтобы она соответствовала последовательности мРНК, кодирующей нормальный фратаксин человека, описанной под идентификационным номером последовательности NM_000144.4 (доступной во Всемирной паутине по URL-адресу ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_000144).

Описание конструкции 026. Основные элементы рекомбинантного вектора на основе AAV5 в виде одонитевой ДНК показаны на фиг. 21. Элементы вектора описаны более подробно в табл. 3.

Таблица 3

Описание элементов вектора в виде односторонней ДНК

Нуклеотидные основания	Идентификатор элемента	Описание
1 - 141	ITR	Инвертированный концевой повтор AAV2
142 - 191	Не показан	Сайты для рестрикционных ферментов
192 - 762	Промотор UBC	Промотор гена убиквитина С человека (UBC)
763 - 784	Не показан	Сайты для рестрикционных ферментов
785 - 964	5U2	Синтетический 5'-регуляторный элемент
965 - 970	Не показан	Сайт для рестрикционного фермента
971 - 1609	GOI hFXN	кДНК, кодирующая FXN человека
1610 - 1635	Не показан	Сайты для рестрикционных ферментов
1636 - 2262	Поли-А hGH	Элемент поли-А гена гормона роста человека
2263 - 2283	Не показан	Сайты для рестрикционных ферментов
2284 - 4533	Линкер для ITR	Синтетический линкер
4534 - 4451	Не показан	Сайт для рестрикционного фермента
4452 - 4691	ITR	Инвертированный концевой повтор AAV2

Типичный пример нуклеотидной последовательности плазмиды gAAV5.hFXN (SEQ ID NO: 20) показан на фиг. 20. Варианты осуществления настоящего изобретения включают без ограничения функциональные гомологи нуклеотидной последовательности плазмиды gAAV5.hFXN (SEQ ID NO: 20).

Типичным примером вектора, содержащего ген-вставку, является нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 19), показанная на фиг. 19. Последовательность представляет плазмиду pAAV5.hFXN от начала левого ITR до конца правого ITR. Варианты осуществления настоящего изобретения включают без ограничения функциональные гомологи нуклеотидной последовательности (SEQ ID NO: 19).

Фармацевтический состав.

Биологический препарат, вектор gAAV5.hFXN, составляют в стерильном забуференном растворе, подходящем для интратекальной инъекции. Иллюстративные составы показаны в табл. 4 и 5.

Таблица 4

Иллюстративный состав препарата вектора на основе AAV5.hFXN

Компонент	Концентрация	Функция
AAV5.hFXN	5×10^{13} vg/мл	Активный ингредиент
NaCl	7,01 г/л	Разбавитель активного вектора, который имитирует по основным видам химических ионов, концентрациям и pH (7,3)
KCl	0,208 г/л	
CaCl ₂	0,233 г/л	
MgCl ₂	0,029 г/л	

Na ₂ HPO ₄	1,10 г/л	спинномозговую человека жидкость
NaH ₂ PO ₄	0,329 г/л	
H ₂ O	Достаточное количество 1,0 л	

Таблица 5
Иллюстративный состав препарата вектора на основе AA5.hFXN

Компонент	Концентрация	Функция
AAV5.hFXN	2,5 x 10 ¹¹ vg/мл	Активный ингредиент
NaCl	0,154 M	pH (7,4)
Na ₂ HPO ₄	0,056 M	
KH ₂ PO ₄	0,0106 M	

Таблица 7
Иллюстративный состав препарата вектора на основе AA5.hFXN

Компонент	Концентрация	Функция
AAV5.hFXN	5 x 10 ¹³ vg/мл	Активный ингредиент
NaCl	0,337 M	pH (7,0)
KCl	0,027 M	
Na ₂ HPO ₄	0,015 M	
KH ₂ PO ₄	0,0015 M	

Пример 1.

(А) Скрининг 1 уровня.

Трансфекции производили в 48-луночных планшетах в двух повторностях. Для каждой конструкции клетки из двух лунок объединяли, анализировали в отношении уровней общего белка (BCA), а затем анализировали в отношении уровней FXN с помощью ELISA. Уровни FXN нормализовали относительно общего содержания белка, а планки погрешностей представляют две повторности анализа ELISA. На фиг. 1 и 2 показаны соответственно уровни экспрессии FXN в недифференцированных клетках SY5Y и фибробластах пациентов с FA с конструкциями, в которых используется промотор UBC. На панели А на фиг. 1 и 2 показано отношение пг FXN/нг общего белка. На панели В на фиг. 1 и 2 показана кратность уровней экспрессии FXN по сравнению с ложнотрансфицированными клетками. За лишь минимальным исключением, промоторы UBC (SEQ ID NO: 3) и EF1α (SEQ ID NO: 18) обеспечивали более высокие уровни экспрессии FXN в SY5Y и в фибробластах пациентов с FA (фиг. 2).

(В) Скрининг 2 уровня.

Трансфекции выполняли в 48-луночных планшетах в трех повторностях при использовании отдельных препаратов комплексов ДНК/липид для каждой лунки. На фиг. 3 и 4 показаны результаты скрининга 2 уровня. Оценивали экспрессию FXN с конструкций с промоторами UBC и EF1α (а также конструкций с минимальным промотором FXN, не включенных в первый скрининг) и результаты группировали по 5'-регуляторным элементам.

(С) Скрининг 3 уровня.

На основании объединенных результатов первичного (1 уровня) и вторичного (2 уровня) скрининга были отобраны 14 конструкций FXN для дальнейшей разработки. Результаты выполнения второго прогона третичного (3 уровня) скрининга показаны ниже на фиг. 5 и 6 для обоих типов клеток.

Пример 2.

Для демонстрации участка, в котором происходит экспрессия фратаксина в клетках, фибробласты африканской зеленой мартышки (COS-7) или фибробласты мыши (NC6) выращивали на покровных стеклах при стандартных условиях культивирования. Культуральную среду удаляли и клетки фиксировали с помощью 1 мл 3,7% формалина в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS) при комнатной температуре в течение 10 мин. Клетки промывали три раза в течение 10 мин с помощью 2 мл PBS, а затем обра-

батывали блокирующим раствором (1 мл 2% фетальной бычьей сыворотки/0,2% Triton X-100/PBS) в течение 1 ч при комнатной температуре. После инкубирования в течение ночи при 40°C с антителом к фратаксину человека (в разведении 1:500 в блокирующем растворе, Abcam, № ab11038) клетки промывали три раза в течение 10 мин с помощью PBS-T (0,2% Tween 20/PBS). Клетки затем инкубировали в темноте с 250 мкл вторичного детекторного антитела (конъюгированного с Alexa Fluor 488 антитела козы к IgG мыши, Thermo Fisher, № A-11017) в разведении 1:500 в блокирующем буфере в течение 1 ч при комнатной температуре. После трех 10-минутных промываний с помощью PBS-T покровные стекла, содержащие клетки, помещали лицевой стороной вниз на предметные стекла микроскопа, добавляли одну каплю VectaShield HardSet с ядерным контрастным красителем DAPI (Vector, № H1500) и анализировали с помощью конфокальной микроскопии. На фиг. 7, панели А, ядра были окрашены с помощью DAPI. На панели В митохондрии были окрашены с помощью MitoTracker. На панели С показано окрашивание с помощью антитела к фратаксину человека. Объединенные данные о колокализации показаны на панели D и демонстрируют, что фратаксин экспрессируется в митохондриях клеток COS (фиг. 7) и клеток NC6 (фиг. 8).

Пример 3.

Для демонстрации того, что фратаксин человека экспрессируется и правильно процессируется в клетках, проводили следующий эксперимент. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC), полученные от пациентов с FA, могут дифференцироваться в кардиомиоциты и нейроны - типы клеток, являющиеся специфическими типами клеток, пораженными у пациентов с FA - и сохранять сниженные уровни фратаксина и нестабильность триплетных повторов (Liu et al. (2011), Stem Cell Rev., 7(3):703-713; Polak et al. (2012), J. Vis. Exp., 60:3416; Du et al. (2012), J. Biol. Chem., 287(35):29861-29872). Клетки-нейроны называются FA-iPSC. 21-дневные нейроны при FA (3816) транедуцировали с помощью AAV5 с геном фратаксина человека (026) в количестве 500000 копий геномов/клетка. Нейроны собирали в буфер для пассивного лизиса (Promega, № E1941) с ингибиторами протеиназ в дни 5, 7, 10 и 14 после транедукции. Общий белок выделяли из клеток с помощью обработки ультразвуком. Концентрацию белка рассчитывали с помощью способа Бредфорда. 30 мг общего белка на каждой дорожке разделяли с помощью SDS-PAGE (Thermo Fisher, № NW04120BOX, 4-12% NuPage). Фратаксин человека выявляли с помощью антитела к фратаксину человека (Abcam, № ab11038) с использованием стандартных методик вестерн-блоттинга. Маркеры молекулярной массы загружали для подтверждения размера зрелого белка фратаксина (14,2 кДа). На фиг. 9, панели А, показаны 21-дневные нейроны, собранные в дни 5 и 7 после транедукции (FA+), наряду с нетрансдуцированными клетками (FA) и iPSC, полученными от здоровых пациентов, которые служили в качестве контрольных клеток (Ctrl). На фиг. 9, панели В, показаны 21-дневные нейроны, собранные в дни 10 и 14 после транедукции (FA+), наряду с нетрансдуцированными клетками (FA) и iPSC, полученными от здоровых пациентов, которые служили в качестве контрольных клеток (Ctrl). Результаты показывают, что фратаксин человека экспрессируется и правильно процессируется в клетках, транедуцированных с помощью FA-AAV5.

На фиг. 10 показано схематическое изображение путей применения терапии стволовыми клетками (по материалам "Stem Cell Therapy: A Panacea or Perturbed Claim!" (December 30, 2014) (источник: stem-cells.uct.ac.za).

Пример 4.

8-дневные iPSC трансфицировали с помощью 2 мкг ДНК ДНК-конструкции 024 или 026, кодирующей фратаксин человека, с использованием электропорационной системы Gene Pulser Xcell от BioRad. Экспрессию белка фратаксина определяли спустя 4 дня обработки (в 12-дневных iPSC) с помощью количественного анализа белка фратаксина с использованием индикаторной полоски (AbCam, № ab109881) и выражали в виде сигнала антитела к фратаксину/мг общего белка. Кратность увеличения экспрессии фратаксина рассчитывали путем деления средней концентрации/сигнала фратаксина в обработанных клетках на концентрацию/сигнал фратаксина в ложнотрансфицированных контрольных (обработанных GFP) клетках. На фиг. 11 показано, что для 024, а также для 026 демонстрировалась кратность увеличения средней концентрации/сигнала фратаксина, превышающая соответственно 3 и 3,5.

Пример 5.

8-дневные iPSC транедуцировали с помощью AAV5 с геном фратаксина человека (AAV5-hFXN) 024 и 026 при множественности инфицирования (MOI), составляющей $3,75 \times 10^5$ геномов векторов (vg)/клетка. Экспрессию белка фратаксина определяли спустя 4 дня обработки (в 12-дневных iPSC) с помощью количественного анализа белка фратаксина с использованием индикаторной полоски (AbCam, № ab109881) и выражали в виде сигнала антитела к фратаксину/мг общего белка. Кратность увеличения экспрессии фратаксина рассчитывали путем деления средней концентрации/сигнала фратаксина в обработанных клетках на концентрацию/сигнал фратаксина в ложнотрансфицированных контрольных (обработанных GFP) клетках. На фиг. 12 показано, что для 024, а также для 026 демонстрировалась кратность увеличения средней концентрации/сигнала фратаксина, превышающая соответственно 2,5 и 3,5.

Пример 6.

Вектор на основе AAV5 с геном фратаксина человека вводили путем прямой инъекции в мозжечок (CB) четырех здоровых мышей дикого типа (WT) в дозе 7×10^9 vg в 3 мкл. Через 4 недели после инъекции

собирали мозжечки у обработанных мышей, а также двух необработанных мышей. Лизаты тканей анализировали с помощью ELISA SimpleStep для фратаксина человека (Abcam, № 176112) в отношении экспрессии фратаксина человека, которую нормализовали к пг фратаксина/мг общего белка. На фиг. 13 показано, что в лизатах мозжечка с 024 и 026 было выявлено соответственно более 30 и 70 нг фратаксина. У необработанных животных экспрессия фратаксина человека не была выявлена (данные не показаны).

Пример 7.

Вектор на основе AAV5 с геном фратаксина человека вводили путем интрацеребровентрикулярной инъекции в мозжечок (CB) четырех здоровых мышей дикого типа (WT) в дозе 7×10^9 vg в 3 мкл. Через 4 недели после инъекции мозжечок (CB), гиппокамп (HPC) и переднюю кору головного мозга (ACX) собирали у обработанных мышей, а также у двух необработанных мышей. Лизаты тканей анализировали с помощью ELISA SimpleStep для фратаксина человека (Abcam, № 176112) в отношении экспрессии фратаксина человека, которую нормализовали к пг фратаксина/мг общего белка. У необработанных животных экспрессия фратаксина человека не была выявлена (данные не показаны). На фиг. 14 показано, что накопление фратаксина было наибольшим в гиппокампе как в случае с 024, так и в случае с 026, однако для 026 было показано более чем 8-кратное увеличение уровня фратаксина в гиппокампе, чем для 024.

Пример 8. Клиническое исследование генной терапии вектором AAV5.hFXN.

Вектор AAV5.hFXN составляют в стерильном растворе, содержащем стандартные фармакопейные наполнители. Вектор вводят путем интратекальной (IT) инъекции. Суммарная доза составляет от 5×10^{13} до 5×10^{14} vg в максимальном объеме 10 мл, который составляет примерно 5% от среднего объема спинномозговой жидкости (CSF) у людей, равного примерно 200 мл (см. D. Agamanolis, 2013, Neuropathology: An illustrated interactive course for medical students and residents. Chapter 14: Cerebrospinal Fluid.; Brown et al., "Molecular Mechanisms of Cerebrospinal Fluid Production. Neuroscience", 2004, 129(4):957-970).

В исследовании фазы 1 с однократной нарастающей дозой по схеме 3+3 оценивается безопасность AAV5.hFXN у взрослых пациентов с ФА. Однократную дозу фармацевтического состава на основе AAV5.hFXN вводят интратекально последовательным когортам по 3 субъекта в каждой. Вводят три нарастающие дозы AAV5.hFXN с проверкой безопасности независимым DSMB перед включением в исследование на следующем более высоком уровне дозы. Оценивание безопасности и неврологических показателей выполняют периодически в течение 24 месяцев после приема дозы. Выполняют функциональные оценки.

Используют интратекальную катетерную систему Medtronic ASCENDA™ модели 8781, с помощью которой лекарственные средства для парентерального введения могут доставляться в интратекальное пространство. Компоненты катетерной системы включают насос и катетерную систему Medtronic - катетер имплантируют в ходе хирургической процедуры в стерильных условиях, выполняемой под общей или местной анестезией. Катетерную систему устанавливают на уровне поясницы, где осуществляют инъекцию половины дозы, подлежащей введению, а затем катетер осторожно продвигают до уровня большой цистерны с помощью управляемой визуализации, где осуществляют инъекцию оставшейся половины дозы.

Изучают три необязательные дозы. Низкая доза, тестируемая в клиническом испытании, составляет 5×10^{13} vg. Средняя доза составляет $1,5 \times 10^{14}$ vg. Высокая доза составляет 5×10^{14} vg. Неограничивающие иллюстративные дозы показаны в табл. 6.

Таблица 6

Суммарная доза вектора (vg)	Суммарная доза - по объему CSF (vg/мл)	Суммарная доза - по весу головного мозга (vg/g)
$5,0 \times 10^{13}$	$2,5 \times 10^{11}$	$3,7 \times 10^{10}$
$1,5 \times 10^{14}$	$7,5 \times 10^{11}$	$1,11 \times 10^{11}$
$5,0 \times 10^{14}$	$2,5 \times 10^{12}$	$3,7 \times 10^{11}$

Данные об эффективности собирают через 1, 3, 6 и 12 месяцев после введения исследуемого лекарственного средства. Эффективность оценивают у субъектов с помощью диффузионно-тензорной томографии и различных функциональных результатов (в том числе без ограничения оценивания по общей шкале FARS и неврологической шкале FARS; оценивания результатов теста ходьбы на 25 футов; оценивания с помощью системы-дорожки для ходьбы GAITRite; оценивания с помощью Biodex Balance System SD; оценивания с помощью теста с колышками и 9 отверстиями). Измерения в ходе диффузионно-тензорной томографии можно производить, например, путем T2-релаксометрии зубчатого ядра и DRG и/или определения уровней NAA и уровней железа с помощью магнитно-резонансной томографии (MRS).

Пример 9.

Лечение атаксии Фридрейха с помощью генной терапии с внутримозжечковым введением вектора

AAV5.hFXN 30-летнему пациенту с атаксией Фридрейха вводят суммарную дозу вектора $5,0 \times 10^{13}$ (vg) в фармацевтическом составе на основе вектора AAV5.hFXN ($2,5 \times 10^{13}$ vg/мл с 1X PBS при pH 7,4). Вектор доставляет ген hFXN в центральную нервную систему пациента с атаксией Фридрейха. Фармацевтический состав вводят в виде однократной болюсной внутримозжечковой инъекции. Скорость инъекции контролируется насосом Medtronic SynchroMed®EL на 18 мл. Суммарную дозу вектора $5,0 \times 10^{13}$ (vg) вводят со скоростью 0,001 мл/мин и при концентрации $2,5 \times 10^{13}$ vg/мл. Суммарный объем=2 мл.

Наблюдается улучшение функций по сравнению с естественным прогрессированием заболевания. Увеличения количества баллов по общей шкале FARS и неврологической шкале FARS по сравнению с исходным уровнем улучшаются с течением времени и достигают статистической значимости к моменту времени 6 месяцев после выполнения процедуры. Комплексные анализы количества баллов пациента по общей шкале FARS и неврологической шкале FARS, в тесте ходьбы на 25 футов, при оценивании с помощью системы-дорожки для ходьбы GAITRite, при оценивании с помощью Biodex Balance System SD, в тесте с колышками и 9 отверстиями демонстрируют статистически значимое улучшение навыков крупной и мелкой моторики уже через 6 месяцев после проведения генной терапии. Значительный благоприятный эффект лечения, наблюдаемый в отношении моторных навыков, обычно продолжает улучшаться с течением времени. После хирургической операции у пациентов обычно демонстрируется непрерывное увеличение количества их баллов по общей шкале FARS и неврологической шкале FARS, в тесте ходьбы на 25 футов, при оценивании с помощью системы-дорожки для ходьбы GAITRite, при оценивании с помощью Biodex Balance System SD, в тесте с колышками и 9 отверстиями. Оценивание безопасности и неврологических показателей выполняют периодически в течение 24 месяцев после приема дозы. Выполняют функциональные оценки. В заключение настоящее изобретение, в котором применяются вирусные векторы на основе AAV для переноса генов hFXN для лечения атаксии Фридрейха, является практичным и эффективным.

Пример 10.

Лечение атаксии Фридрейха с помощью генной терапии с внутримозжечковым введением вектора AAV5.hFXN 30-летнему пациенту с атаксией Фридрейха вводят суммарную дозу вектора $5,0 \times 10^{14}$ (vg) в фармацевтическом составе на основе вектора AAV5.hFXN ($2,5 \times 10^{14}$ vg/мл с 1X PBS при pH 7,4). Вектор доставляет ген hFXN в центральную нервную систему пациента с атаксией Фридрейха. Фармацевтический состав вводят в виде однократной болюсной внутримозжечковой инъекции. Скорость инъекции контролируется насосом Medtronic SynchroMed®EL на 18 мл. Суммарную дозу вектора $5,0 \times 10^{14}$ (vg) вводят со скоростью 0,01 мл/мин и при концентрации $2,5 \times 10^{14}$ vg/мл. Суммарный объем=2 мл.

Наблюдается улучшение функций по сравнению с естественным прогрессированием заболевания. Увеличения количества баллов по общей шкале FARS и неврологической шкале FARS по сравнению с исходным уровнем улучшаются с течением времени и достигают статистической значимости к моменту времени 6 месяцев после выполнения процедуры. Комплексные анализы количества баллов пациента по общей шкале FARS и неврологической шкале FARS, в тесте ходьбы на 25 футов, при оценивании с помощью системы-дорожки для ходьбы GAITRite, при оценивании с помощью Biodex Balance System SD, в тесте с колышками и 9 отверстиями демонстрируют статистически значимое улучшение навыков крупной и мелкой моторики уже через 6 месяцев после проведения генной терапии. Значительный благоприятный эффект лечения, наблюдаемый в отношении моторных навыков, обычно продолжает улучшаться с течением времени. После хирургической операции у пациентов обычно демонстрируется непрерывное увеличение количества их баллов по общей шкале FARS и неврологической шкале FARS, в тесте ходьбы на 25 футов, при оценивании с помощью системы-дорожки для ходьбы GAITRite, при оценивании с помощью Biodex Balance System SD, в тесте с колышками и 9 отверстиями. Оценивание безопасности и неврологических показателей выполняют периодически в течение 24 месяцев после приема дозы. Выполняют функциональные оценки. В заключение настоящее изобретение, в котором применяются вирусные векторы на основе AAV для переноса генов hFXN для лечения атаксии Фридрейха, является практичным и эффективным.

Пример 11.

Лечение атаксии Фридрейха с помощью генной терапии с интрацеребровентрикулярным введением вектора AAV5.hFXN 25-летнему пациенту с атаксией Фридрейха вводят суммарную дозу вектора $3,5 \times 10^{12}$ vg в фармацевтическом составе на основе вектора AAV5.hFXN (7×10^{12} vg/мл с DPBS при pH 7,0). Вектор доставляет ген hFXN в центральную нервную систему пациента с атаксией Фридрейха. Фармацевтический состав вводят пациенту в виде однократной болюсной интрацеребровентрикулярной инъекции в пространство, заполненное CSF. Скорость инъекции контролируется насосом Medtronic SynchroMed®EL на 18 мл. Суммарную дозу вектора $3,5 \times 10^{12}$ vg вводят со скоростью 0,001 мл/мин и при концентрации 7×10^{12} vg/мл. Суммарный объем=0,5 мл.

Наблюдается улучшение функций по сравнению с естественным прогрессированием заболевания. Увеличения количества баллов по общей шкале FARS и неврологической шкале FARS по сравнению с исходным уровнем улучшаются с течением времени и достигают статистической значимости к моменту времени 6 месяцев после выполнения процедуры. Комплексные анализы количества баллов пациента по

общей шкале FARS и неврологической шкале FARS, в тесте ходьбы на 25 футов, при оценивании с помощью системы-дорожки для ходьбы GAITRite, при оценивании с помощью Biodex Balance System SD, в тесте с колышками и 9 отверстиями демонстрируют статистически значимое улучшение навыков крупной и мелкой моторики уже через 6 месяцев после проведения генной терапии. Значительный благоприятный эффект лечения, наблюдаемый в отношении моторных навыков, обычно продолжает улучшаться с течением времени. После хирургической операции у пациентов обычно демонстрируется непрерывное увеличение количества их баллов по общей шкале FARS и неврологической шкале FARS, в тесте ходьбы на 25 футов, при оценивании с помощью системы-дорожки для ходьбы GAITRite, при оценивании с помощью Biodex Balance System SD, в тесте с колышками и 9 отверстиями. Оценивание безопасности и неврологических показателей выполняют периодически в течение 24 месяцев после приема дозы. Выполняют функциональные оценки. В заключение настоящее изобретение, в котором применяются вирусные векторы на основе AAV для переноса генов hFXN для лечения атаксии Фридрейха, является практичным и эффективным.

Пример 12.

Лечение атаксии Фридрейха с помощью генной терапии с интратекальным введением вектора AAV5.hFXN 30-летнему пациенту с атаксией Фридрейха вводят суммарную дозу вектора $5,0 \times 10^{14}$ (vg) в фармацевтическом составе на основе вектора AAV5.hFXN ($2,5 \times 10^{14}$ vg/ml с 1X PBS при pH 7,4). Вектор доставляет ген hFXN в центральную нервную систему пациента с атаксией Фридрейха. Фармацевтический состав вводят пациенту в виде однократной болюсной интратекальной инъекции в пространство, заполненное CSF. Половину дозы вводят в поясничный отдел спинного мозга пациента, и половину дозы вводят в большую цистерну пациента. Интратекальную катетерную систему Medtronic ASCENDA™ модели 8781 со спинальным сегментом длиной 66 см имплантируют в ходе хирургической процедуры в стерильных условиях, выполняемой под общей или местной анестезией. Катетерную систему устанавливают на уровне поясницы, где осуществляют инъекцию половины дозы, подлежащей введению, а затем катетер осторожно продвигают до уровня большой цистерны с помощью управляемой визуализации, где осуществляют инъекцию оставшейся половины дозы. Скорость инъекции контролируется насосом Medtronic SynchroMed®EL на 18 мл. Суммарную дозу вектора $5,0 \times 10^{14}$ (vg) вводят со скоростью 0,01 мл/мин и при концентрации $2,5 \times 10^{14}$ vg/мл. Общий объем=2 мл (1 мл в поясничный отдел спинного мозга + 1 мл в большую цистерну).

Наблюдается улучшение функций по сравнению с естественным прогрессированием заболевания. Увеличения количества баллов по общей шкале FARS и неврологической шкале FARS по сравнению с исходным уровнем улучшаются с течением времени и достигают статистической значимости к моменту времени 6 месяцев после выполнения процедуры. Комплексные анализы количества баллов пациента по общей шкале FARS и неврологической шкале FARS, в тесте ходьбы на 25 футов, при оценивании с помощью системы-дорожки для ходьбы GAITRite, при оценивании с помощью Biodex Balance System SD, в тесте с колышками и 9 отверстиями демонстрируют статистически значимое улучшение навыков крупной и мелкой моторики уже через 6 месяцев после проведения генной терапии. Значительный благоприятный эффект лечения, наблюдаемый в отношении моторных навыков, обычно продолжает улучшаться с течением времени. После хирургической операции у пациентов обычно демонстрируется непрерывное увеличение количества их баллов по общей шкале FARS и неврологической шкале FARS, в тесте ходьбы на 25 футов, при оценивании с помощью системы-дорожки для ходьбы GAITRite, при оценивании с помощью Biodex Balance System SD, в тесте с колышками и 9 отверстиями. Оценивание безопасности и неврологических показателей выполняют периодически в течение 24 месяцев после приема дозы. Выполняют функциональные оценки. В заключение настоящее изобретение, в котором применяются вирусные векторы на основе AAV для переноса генов hFXN для лечения атаксии Фридрейха, является практичным и эффективным.

Пример 13.

Модель на мышах с дефицитом фратаксина по Sarsero.

Ссылка делается на JP Sarsero et al., "Human BAC-mediated rescue of the Friedreich ataxia knockout mutation in transgenic mice", Mamm. Genome, 2004 May, 15(5):370-82. Модельные мыши FVB;B6.Tg(FXN); FXN- (№ 018299, The Jackson Laboratories) являются гемизиготными по трансгену FXN*500GAA человека и гомозиготными по нокаутному аллелю гена фратаксина. Таким образом, мышь является нулевой по фратаксину мыши и содержит ген фратаксина человека (с 500 повторами GAA в первом интроне), вставленный в хромосому 5. В модели экспрессируется фратаксин человека на низком уровне (~10%), что спасает мышью от смертности и является сходным со снижением уровня фратаксина у людей, но не обуславливает формирование каких-либо болезненных фенотипов, характерных для FA.

А. Способы.

Мышей подвергали анестезии изофлураном и помещали в стереотаксический аппарат (цифровой стереотаксический инструмент 51725D Just for Mice, Stoelting, Вуд Дейл, Иллинойс). Разрез производили в сагиттальной плоскости по средней линии черепа и окружающую кожу оттягивали назад для расширения отверстия. В черепе просверливали трепанационные отверстия с помощью дрели Dremel и стомато-

логического бора под стереотаксическим контролем. Мыши получали билатеральные внутримозжечковые инъекции в количестве 2 мкл AAV5-FXN-026 в концентрации 7×10^{12} геномов векторов/мл ($N=7$) либо AAV5-GFP (контроля) в концентрации 4×10^{12} геномов векторов/мл ($N=3$) с помощью шприца Hamilton на 10 мкл с тупоконечной иглой 27 калибра и стеклянным капилляром. Вирус вводили путем инъекции со скоростью 2,5 мкл/мин с помощью способа конвекционной доставки. Хирургический разрез сшивали нейлоновыми швами (Ethilon®). В качестве альтернативы мыши получали билатеральные интрацеребровентрикулярные инъекции в количестве 2 мкл AAV5-FXN-026 в концентрации 7×10^{12} vg/мл ($N=7$) либо AAV5-GFP (контроля) в концентрации 4×10^{12} vg/мл ($N=3$) с помощью шприца Hamilton на 10 мкл. Через 4 недели после инъекции мозжечки собирали. Также собирали ткань мозжечка от двух необработанных контрольных мышей. Лизаты тканей анализировали в отношении экспрессии фратаксина человека с помощью ELISA SimpleStep для фратаксина человека (Abcam, № 176112) - анализа, который обеспечивает специфическое выявление фратаксина человека.

В. Результаты.

После введения вектора AAV5-FXN-026 различными путями оценивали экспрессию белка фратаксина в конкретных тканях, как показано на фиг. 21. Выявляемый уровень эндогенного белка фратаксина в мозжечке являлся результатом экспрессии с внедренного трансгена фратаксина человека, спасающего нулевой фенотип по фратаксину мыши. После интрапаренхимального (IPc) введения в мозжечок наблюдалось примерно 7-кратное увеличение экспрессии белка фратаксина по сравнению с контрольными уровнями в мозжечке. После интрацеребровентрикулярного (ICV) введения происходило более чем 4-кратное увеличение экспрессии белка фратаксина по сравнению с контрольными уровнями в мозжечке.

С. Выводы.

AAV5-FXN-026 увеличивал экспрессию фратаксина в мозжечке мышей с дефицитом фратаксина примерно в 4 раза при ICV-введении и примерно в 7 раз после IPc-инъекции. Увеличение экспрессии белка фратаксина человека с AAV5-FXN-026 в мышинной модели FA по сравнению с контрольными уровнями предоставляет доказательство того, что промотор/регуляторные элементы в ДНК-конструкции AAV5-FXN-026 являются функциональными в сложной среде *in vivo*. При том что уровень экспрессии фратаксина в этой мышинной модели составляет 10% от нормального, уровень экзогенного фратаксина, достигаемый после транефекции, будет составлять 40-70% от нормального и находиться в диапазоне, при котором у людей не проявляются симптомы.

Пример 14. Сравнительное исследование путей введения у свиней.

Биораспределение тестируемого препарата AAV5-FXN-026 изучали у свиней с использованием нескольких местоположений и устройств для доставки. Пять групп лечения, включающих по три самца юкатанских свиней, были подвергнуты хирургической процедуре, в ходе которой был получен доступ к участку(участкам) для введения доз (поясничному отделу спинного мозга, поясничному отделу спинного мозга и большой цистерне или зубчатому ядру). Тестируемый препарат вводили в день 0 с помощью иглы для спинномозговой пункции в поясничный отдел спинного мозга (группа 2), катетера Medtronic ASCENDA™ в поясничный отдел спинного мозга и большую цистерну (группа 3), катетера Alcyone Pulsar в поясничный отдел спинного мозга и большую цистерну (группа 4), иглы для спинномозговой пункции в зубчатое ядро (группа 5) или канюли Alcyone MEMS (AMC™) в зубчатое ядро (группа 6). Тестируемый препарат вводили при уровне дозы 3×10^{13} (группы 2-4) или 3×10^{12} (группы 5 и 6) вирусных геномов (vg) и в объеме дозы 2,2-2,3 или 0,12-0,146 мл соответственно. Одно животное служило в качестве контроля и не подвергалось хирургической процедуре или лечению (группа 1). Животных выдерживали в течение восстановительного периода 28 ± 1 дней.

Наблюдения в отношении заболеваемости, смертности, повреждений, а также доступности пищи и воды проводили дважды в день у всех животных. Клинические наблюдения проводили у всех животных ежедневно в дни от -1 до 7 и в дальнейшем еженедельно. Значения массы тела измеряли и регистрировали у всех животных еженедельно, начиная в течение недели -1. У всех животных до тестирования проводили физикальные обследования. При завершении исследования выполняли изучение секционного материала и выбранные ткани анализировали в отношении концентраций тестируемого препарата с помощью анализа по методу количественной ПЦР.

Результаты исследования биораспределения варьировались внутри каждой группы и между каждой двумя группами. Уровни AAV5-FXN-026 в области зубчатого ядра мозжечка были наиболее высокими у тех животных, которые получали прямую инфузию в мозжечок (группы 5 и 6).

А. Хирургическая процедура.

Тестируемый препарат вводили в день 0 с помощью иглы для спинномозговой пункции в поясничный отдел спинного мозга (группа 2, 2,2 мл при 3×10^{13} vg), катетера.

Medtronic ASCENDA в поясничный отдел спинного мозга и большую цистерну (группа 3, 2,2 мл при 3×10^{13} vg), катетера Alcyone Pulsar в поясничный отдел спинного мозга и большую цистерну (группа 4, 2,2-2,3 мл при 3×10^{13} - $3,14 \times 10^{13}$ vg), иглы для спинномозговой пункции в зубчатое ядро (группа 5, 0,12 мл при 3×10^{13} vg) или канюли Alcyone MEMS (AMC™) в зубчатое ядро (группа 6, 0,13-0,146 мл при $2,71 \times 10^{12}$ - $3,04 \times 10^{12}$ vg). Одно животное служило в качестве контроля и не подвергалось хирургической процедуре

или лечению (группа 1). Животных выдерживали в течение восстановительного периода 28 ± 1 дней.

(а) Группа 2 - инъекция в поясничный отдел спинного мозга (игла для спинномозговой пункции).

Каждое животное помещали в положение лежа на животе. Разрез кожи производили непосредственно каудально от L2-L3. Иглу для спинномозговой пункции калибра 14G продвигали в интратекальное пространство на уровне L2-L3. Размещение подтверждали посредством флуороскопической визуализации и/или методики "висячей капли", а также обратного тока спинномозговой жидкости (CSF). Получали флуороскопическое изображение размещения иглы и размещение катетера подтверждали посредством инъекции контрастного средства Omnipaque-300. Иглу промывали струей 1,5 мл физиологического раствора. Тестируемый препарат (2,2 мл) набирали в шприц объемом 3 куб. см и вводили дозой в течение 48-72 с. После завершения инъекции допускалось время удерживания иглы, составляющее по меньшей мере 1 минуту. Иглу удаляли и разрез сшивали стандартным образом с помощью любой комбинации рассасывающихся швов, кожных скоб или кожного клея.

(b) Группа 3 - инъекция в поясничный отдел спинного мозга и большую цистерну (катетер Medtronic ASCENDA™, модель 8780).

Каждое животное помещали в положение лежа на животе. Разрез кожи производили непосредственно каудально от L3-L4. Проводниковую иглу калибра 16G продвигали в интратекальное пространство на уровне L3-L4.

Размещение подтверждали посредством флуороскопической визуализации и/или методики "висячей капли", а также обратного тока CSF. Получали флуороскопическое изображение размещения иглы и размещение катетера подтверждали посредством инъекции контрастного средства Omnipaque-300. Катетер Medtronic ASCENDA™ продвигали под флуороскопическим контролем в целевую область большой цистерны. Проводниковую иглу извлекали из интратекального пространства и катетер промывали струей 1,5 мл физиологического раствора. Тестируемый препарат (2,2 мл) набирали в шприц объемом 3 куб. см. Одну половину суммарного объема тестируемого препарата (1,1 мл) вводили дозой в большую цистерну в течение 30 с и катетер промывали струей 1 мл физиологического раствора. Катетер перемещали в верхнюю часть поясничного отдела спинного мозга (L1) под флуороскопическим контролем, вторую половину суммарного объема тестируемого препарата (1,1 мл) вводили дозой в течение 30-45 с и катетер промывали струей 1 мл физиологического раствора. Затем катетер удаляли и разрез сшивали стандартным образом с помощью любой комбинации рассасывающихся швов, кожных скоб или кожного клея.

(с) Группа 4 - инъекция в поясничный отдел спинного мозга и большую цистерну (катетер Alcyone Pulsar).

Каждое животное помещали в положение лежа на животе. Разрез кожи производили непосредственно каудально от L3-L4. Проводниковую иглу калибра 16G продвигали в интратекальное пространство на уровне L2-L3 или L3-L4. Размещение подтверждали посредством флуороскопической визуализации и/или методики "висячей капли", а также обратного тока CSF. Получали флуороскопическое изображение размещения иглы и размещение катетера подтверждали посредством инъекции контрастного средства Omnipaque-300. Катетер Alcyone Pulsar продвигали под флуороскопическим контролем в область большой цистерны. Проводниковую иглу извлекали из интратекального пространства и катетер промывали струей 1,5 мл физиологического раствора. Тестируемый препарат (2,2 мл) набирали в шприц объемом 3 куб. см. Одну часть суммарного объема тестируемого препарата (1,1-1,4 мл) вводили дозой в большую цистерну в течение 20-29 с и катетер промывали струей 1 мл физиологического раствора. Катетер перемещали в L1 под флуороскопическим контролем, вторую половину суммарного объема тестируемого препарата (0,9-1,1 мл) вводили дозой в течение 19-71 с и катетер промывали струей 1 мл физиологического раствора. Затем катетер удаляли и разрез сшивали стандартным образом с помощью любой комбинации рассасывающихся швов, кожных скоб или кожного клея.

(d) Группа 5 - инъекция в зубчатое ядро (игла для спинномозговой пункции калибра 22Ga).

Каждое животное помещали в положение лежа на животе. На дорсальной поверхности черепа производили дорсальный разрез вдоль средней линии черепа, проходящий до области шеи. Обнажали основание черепа, координатную метку для магнитно-резонансной томографии (MRI) помещали в левую часть затылочной кости и закрепляли на месте с помощью костного воска. Кожный разрез временно сшивали швом и животное переносили на MRI-сканер для визуализации мозжечка во фронтальной и сагиттальной плоскости. После сбора данных MRI их загружали в Osirix MD для целей определения мишеней. Животное помещали в раму для иммобилизации головы и разрез повторно открывали. С помощью трепана выполняли краниотомию на правой стороне черепа. Исходя из стереотаксических координат, полученных в Osirix, в правое полушарие мозжечка в область зубчатого ядра устанавливали иглу для спинномозговой пункции калибра 22G длиной 3,50 дюйма (иглу для спинномозговой пункции BD с заточкой типа Квинке). Получали флуороскопическое изображение расположения иглы и расположение иглы подтверждали посредством инъекции контрастного средства Omnipaque-300. Тестируемый препарат (0,15 мл) загружали в микрокапиллярную удлинительную линию и устанавливали отделитель пузырьков воздуха на 30 мкл. Остальную часть микрокапиллярного удлинителя заполняли стерильным физиологическим раствором. Тестируемый препарат (0,12 мл) вводили путем инфузии со скоростью 10 мкл/мин в течение

ние примерно 12 мин. После завершения введения дозы допускалось время удерживания иглы, составляющее по меньшей мере 1 мин. В трепанационное отверстие помещали костный воск. Разрез сшивали стандартным образом с помощью любой комбинации рассасывающихся швов, кожных скоб или кожного клея.

(е) Группа 6 - инъекция в зубчатое ядро (канюля Alcyone MEMS (АМС™)).

Каждое животное помещали в положение лежа на животе. На дорсальной поверхности черепа производили дорсальный разрез вдоль средней линии черепа, проходящий до области шеи. Обнажали основание черепа и координатную метку для MRI помещали на левой стороне черепа. Кожный разрез временно сшивали швом и животное переносили на MRI-сканер для визуализации мозжечка во фронтальной и сагиттальной плоскости. После сбора данных MRI их загружали в Osirix MD для целей определения мишеней. Животное помещали в раму для иммобилизации головы и разрез повторно открывали. С помощью трепана выполняли краниотомию на правой стороне черепа. Исходя из стереотаксических координат, полученных в Osirix, в правое полушарие мозжечка в область зубчатого ядра устанавливали канюлю Alcyone MEMS. Получали флуороскопическое изображение расположения наконечника катетера. Тестируемый препарат (0,13-0,146 мл) вводили путем инфузии со скоростью 10 мкл/мин в течение 13-14 мин и 40 с. В трепанационное отверстие помещали костный воск. Разрез сшивали стандартным образом с помощью любой комбинации рассасывающихся швов, кожных скоб или кожного клея.

В. Оценивание биораспределения (количественная ПЦР).

Образцы тканей (100-200 мг в расчете на один орган) собирали из головного мозга, ганглиев задних корешков (DRG) (шейного, поясничного и грудного), почки (левой), спинного мозга (шейного, поясничного и грудного отделов), селезенки и печени (левой латеральной доли) всех выживших животных для анализа концентраций тестируемого препарата. В случае с тканями головного мозга образцы брали как из правого, так и из левого полушарий с сохранением латеральности с помощью круглого пуансона диаметром 8 мм; образцы брали из области коры мозжечка (с включением слоя клеток Пуркинье), зубчатого ядра, гиппокампа и двигательной коры больших полушарий. Ткани спинного мозга собирали с помощью круглого пуансона диаметром 8 мм в виде осевых сегментов длиной 4-6 мм в области переднего рога с включением как белого, так и серого вещества. DRG собирали в виде пар, состоящих из левого и правого ганглиев, соотносящихся с собранными сегментами спинного мозга. Из каждого указанного отдела спинного мозга собирали достаточное количество пар DRG для получения 100-200 мг ткани.

На фиг. 22 показано количество копий ДНК на мкг ткани из мозжечка. На фиг. 23 показано количество копий ДНК на мкг ткани из других областей головного мозга. На фиг. 24 показано количество копий ДНК на мкг ткани из тканей спинного мозга. На фиг. 25 показано количество копий ДНК на мкг ткани из системных тканей. Интратекальное и интракраниальное введение AAV5-FXN-026 хорошо переносилось самцами юкатанских свиней массой от 51,0 до 55,2 кг. Результаты исследования биораспределения варьировались внутри каждой группы и между каждыми двумя группами. Уровни AAV5-FXN-026 в области зубчатого ядра мозжечка были наиболее высокими у тех животных, которые получали дробную инфузию в мозжечок (группы 5 и 6). Как правило, в результате инъекций с помощью иглы для спинномозговой пункции калибра 22Ga достигались высокие уровни AAV5-FXN-026 в мозжечке. В результате интратекальной доставки, будь то посредством однократной болюсной инъекции в поясничный отдел спинного мозга (группа 2), введения доз как в нижнесреднюю часть, так и в поясничный отдел спинного мозга с помощью катетера Medtronic ASCENDA (группа 3) или введения доз как в верхнюю часть шейного отдела спинного мозга/большую цистерну, так и в поясничный отдел спинного мозга с помощью катетера Alcyone Pulsar, достигались выявляемые уровни AAV5-FXN-026. Alcyone Pulsar можно было продвинуть до уровня C1 или большой цистерны.

Пример 15. Исследование переносимости внутримозжечкового введения и биораспределения у свиней.

Оценивали биораспределение AAV5-FXN-026 при прямой инъекции в зубчатое ядро свиней. Две группы обработки, включающие по три или шесть самцов юкатанских свиней на группу, были подвергнуты хирургической процедуре, в ходе которой тестируемый препарат вводили путем однократной инфузии в зубчатое ядро мозжечка после краниотомии черепа. Обработываемым животным вводили тестируемый препарат в день 0 при уровне дозы 1×10^{12} вирусных геномов (vg) (56 мкл) (низкая доза) или 3×10^{12} vg (167 мкл) (высокая доза). Одна дополнительная группа, включающая одного самца животного, служила в качестве контроля и не получала тестируемый препарат, а также не подвергалась хирургической процедуре; это животное подвергали эвтаназии в день 0 для получения контрольных тканей. Животных выдерживали в течение восстановительного периода 28 ± 1 дней или 60 ± 4 дней.

Наблюдения в отношении заболеваемости, смертности, повреждений, а также доступности пищи и воды проводили дважды в день у всех животных. Клинические наблюдения проводили ежедневно в дни от 1 до 7 и затем после этого еженедельно. Значения массы тела измеряли и регистрировали, начиная с недели -1 и еженедельно в ходе исследования. Физикальные обследования проводили до тестирования. У всех животных до тестирования собирали образцы крови для клинико-патологического оценивания. Образцы крови собирали для возможного будущего определения концентраций антитела к AAV5 в цельной

крови у всех животных до тестирования и перед каждым вскрытием. Образцы спинномозговой жидкости (CSF) собирали для возможного определения концентрации антитела к AAV5 в CSF в группах 2 и 3 до тестирования и у всех животных при каждом вскрытии. При завершении исследования каждое животное подвергали эвтаназии и проводили изучение секционного материала. У всех животных собирали кровь и выбранные ткани для количественной ПЦР и анализа белка фратаксина. Дополнительно проводили вестерн-блот-анализ для животного из группы 1 и одного из животных из группы 3.

По результатам данного исследования было обнаружено обширное и устойчивое распределение AAV5-FXN-026 по всему головному мозгу и спинному мозгу после однократной инфузии в мозжечок. На фиг. 26 показано количество копий геномов векторов в мозжечке в день 28 в сравнении с днем 60 (vg ДНК/мкг ДНК в ткани). На фиг. 27 показано количество копий геномов векторов в головном мозге в день 28 в сравнении с днем 60 (vg ДНК/мкг ДНК в ткани). На фиг. 28 показано количество копий геномов векторов в спинном мозге и DRG в день 28 в сравнении с днем 60 (vg ДНК/мкг ДНК в ткани). В момент времени 28 дней наиболее высокие уровни геномов векторов были обнаружены в мозжечке, двигательной коре больших полушарий и ганглиях задних корешков. К моменту времени 60 дней AAV5-FXN-026 по-прежнему присутствовал в этих тканях, хотя уровни были сниженными по сравнению с моментом времени 28 дней. Эти результаты демонстрируют сродство капсида AAV5 к двигательным нейронным трактам в ЦНС. Уровни AAV5-FXN-026 в крови переходили от невыявляемых у большинства животных в день 28 к выявляемым у всех животных в день 60, что согласовалось с очищением ЦНС от вектора.

Для анализа экспрессии белка фратаксина собирали образцы тканей из коры мозжечка, зубчатого ядра, гиппокампа и двигательной коры больших полушарий. Уровни фратаксина, проанализированные посредством ELISA, показаны на фиг. 29. Животные, получавшие низкую дозу, демонстрировали варьирующиеся увеличения по сравнению с фоновыми контрольными уровнями фратаксина. В день 28 после введения дозы уровни фратаксина были увеличенными в от 1,5 (кора мозжечка) до 6,4 (гиппокамп) раза в тканях с низкой дозой по сравнению с контрольными тканями. Животные, получавшие высокую дозу, через 28 и 60 дней после введения дозы демонстрировали уровни фратаксина, увеличенные в примерно 2 (двигательная кора больших полушарий) и 9 (зубчатое ядро) раз по сравнению с уровнями, отмечаемыми в необработанных контрольных тканях. Эти результаты демонстрируют устойчивое увеличение выработки белка фратаксина через 60 дней после обработки высокой дозой AAV5-FXN-026.

В целом данное исследование продемонстрировало, что после прямой инфузии тестируемого препарата в дозах 1×10^{12} и 3×10^{12} vg в мозжечок в результате происходило обширное и устойчивое биораспределение капсида AAV5 со сродством к двигательным нейронным трактам.

Пример 16. 28-дневное поисковое исследование переносимости внутримозжечкового введения и биораспределения у приматов.

В данном исследовании оценивали переносимость и биораспределение вектора на основе AAV5 с геном фратаксина человека, AAV5-hFXN (026), после внутримозжечкового введения макакам-крабоедам (*Macaca fascicularis*).

Данное исследование было проведено на основе действующего Согласованного трехстороннего руководства Международной конференции по гармонизации (ICH) и общепринятых процедур тестирования фармацевтических соединений, а также в соответствии с Законом о благополучии животных, реализуемым Министерством сельского хозяйства США (USDA) (раздел 9 CFR, части 1, 2 и 3), и Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, Institute of Laboratory Animal Resources, National Academy Press, Washington, D.C., 2011 (см. "Guidance on non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorization for Pharmaceuticals", ICH M3(R2), 2009 June 11; и "Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals", ICH S6 (R1), 1997 Jul 16 (приложение датировано 12 июня 2011 г.)).

Две группы обработки, включающие по три самца макаков-крабоедов на группу, были подвергнуты хирургической процедуре, в ходе которой тестируемый препарат вводили путем унилатеральной или билатеральной инфузии в зубчатое ядро мозжечка после краниотомии черепа. Обработываемым животным вводили препарат в день 1 при уровне дозы $1,2 \times 10^{12}$ (30 мкл) или $2,4 \times 10^{12}$ (30 мкл/полушарие) вирусных геномов (vg) в расчете на одно животное. Одна дополнительная группа, включающая двух самцов животных, служила в качестве контроля и получала билатеральную инфузию контрольного препарата - фосфатно-солевого буферного раствора (PBS) с pH 7,4. Животных выдерживали до вскрытия в день 29 ± 1 день.

Наблюдения в отношении заболеваемости, смертности, повреждений, а также доступности пищи и воды проводили дважды в день у всех животных. Клинические наблюдения проводили ежедневно, начиная с дня 1. Оценки в рамках батареи стандартных тестов (FOB) и изучение неврологических показателей проводили до введения дозы (день 1), через 24 и 48 часов после введения дозы и через 7, 14 и 28 дней после введения дозы. Значения массы тела измеряли и регистрировали еженедельно, начиная с дня -1. У всех животных до тестирования и перед вскрытием собирали образцы крови для кликопатологического оценивания. При завершении исследования выполняли изучение секционного материала, и ткани изучали под микроскопом. Кровь и выбранные ткани собирали для количественной ПЦР и анализа белка фратаксина методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA).

Результаты демонстрировали сродство капсида AAV5 к двигательным нейронным трактам в ЦНС. При анализе ткани головного мозга в отношении экспрессии белка фратаксина с помощью ELISA через 28 дней после введения дозы у животных, обработанных тестируемым препаратом, уровни фратаксина были увеличенными в от примерно 2 (кора мозжечка) до 14 (зубчатое ядро) раз по сравнению с уровнями, отмечаемыми в тканях контрольных животных. С введением тестируемого препарата была ассоциирована инфильтрация мозговых оболочек менингеальными мононуклеарными клетками с иногда наблюдающимся образованием скоплений вокруг мелких кровеносных сосудов мозговых оболочек (периваскулярных). В дополнение также отмечались минимальные периваскулярные мононуклеарные инфильтраты в паренхиме головного мозга. Инфильтрация мононуклеарными клетками является ожидаемой реакцией ткани на вирусный капсид, не являющейся нежелательной.

Подводя итог, следует отметить, что результаты данного исследования продемонстрировали, что после прямой инфузии тестируемого препарата AAV5-hFXN (026) в дозах $1,2 \times 10^{12}$ и $2,4 \times 10^{12}$ vg в мозжечок наблюдалось обширное и устойчивое биораспределение капсида AAV5 со сродством к двигательным нейронным трактам. Экспрессия фратаксина была выраженной в областях зубчатого ядра и коры мозжечка, где наблюдались стойкие увеличения уровней фратаксина в тканях по сравнению с контрольными тканями. Через 28 дней наиболее высокие уровни геномов векторов обнаруживались в зубчатом ядре и коре мозжечка. Эти результаты демонстрировали сродство капсида AAV5 к двигательным нейронным трактам в ЦНС. Эти результаты дополнительно демонстрировали, что тестируемый препарат, вводимый путем внутримозжечковой инъекции в дозах до $2,4 \times 10^{12}$ vg, хорошо переносится и хорошо распределяется по всей ЦНС.

Получение тестируемого и контрольного препаратов.

Тестируемый препарат AAV5-hFXN (026) составляли в концентрации 4×10^{13} GC/мл и нагревали до температуры в диапазоне между комнатной температурой и температурой тела перед введением дозы. Контрольный препарат представлял собой PBS с pH 7,4.

Приобретение животных.

Использовали в общей сложности девятых самцов макаков-крабоедов (*Macaca fascicularis*) (в возрасте от примерно 3 лет 10 месяцев до 4 лет 5 месяцев на момент передачи).

Рандомизация, распределение в группы исследования и содержание.

С помощью стандартной процедуры рандомизации по массе тела восемь самцов животных (массой от 3,4 до 4,9 кг на момент рандомизации) распределяли в группы исследования, как определено в табл. 8. Животных содержали до вскрытия в день 29 ± 1 день.

Таблица 8

Распределение в группы

Номер группы	Путь введения	Обработка	Доза (vg)	Количество самцов животных
1	Билатеральная внутримозжечковая инъекция	PBS, pH 7,4	0	2
2	Унилатеральная внутримозжечковая инъекция	AAV5-hFXN (026)	$1,2 \times 10^{12}$	3
3	Билатеральная внутримозжечковая инъекция	AAV5-hFXN (026)	$2,4 \times 10^{12}$	3

Хирургическая процедура.

Контрольный и тестируемый препараты вводили путем унилатеральной (группа 2) или билатеральной (группы 1 и 3) внутримозжечковой инфузии в область зубчатого ядра. Группам обработки (группам 2 и 3) вводили препарат в день 1 при уровне дозы $1,2 \times 10^{12}$ (30 мкл) или $2,4 \times 10^{12}$ (30 мкл/полушарие) вирусных геномов (vg) в расчете на одно животное. Контрольная группа (группа 1) получала билатеральную инфузию контрольного препарата - фосфатно-солевого буферного раствора (PBS) с pH 7,4. Животных выдерживали до вскрытия в день 29 ± 1 день.

После индукции анестезии волосистую часть кожи головы обривали и животное фиксировали в стереотаксической раме (Kopf), совместимой с магнитно-резонансной томографией (MRI). Проводили MRI на исходном уровне для установления мишеней и затем животное переносили в операционный блок. Производили разрез и кожу отгибали. Краниотомию выполняли с помощью спицы Кишнера и канюлированной бурильной дрели в соответствующем(их) месте(ах) инъекции. Исходя из стереотаксических координат в правое (и левое для билатерального введения) полушарие мозжечка в область зубчатого ядра устанавливали тупоконечную иглу (22 калибра; длиной 3,5 дюйма; B&D; регистрационный номер 405181).

Расположение иглы подтверждали посредством флуороскопии и инъекции контрастного средства. Разъем иглы промывали струей стерильного физиологического раствора перед прикреплением дозирующей линии. Контрольный или тестируемый препарат (30 мкл в расчете на одну инфузию) загружали в микрокапиллярную удлинительную линию с отделителем пузырьков воздуха на 30 мкл. Остальную часть микрокапиллярного удлинителя заполняли стерильным физиологическим раствором. Контрольный или тестируемый препарат вводили путем инфузии со скоростью 10 мкл/мин в течение 9 мин с учетом мертвого пространства в игле. Иглу оставляли на месте в течение по меньшей мере 2 мин после завершения инфузии. После удаления иглы в трепанационное отверстие помещали костный воск и разрез сшивали стандартным образом с помощью любой комбинации рассасывающихся швов, кожных скоб или кожного клея.

Подробные клинические наблюдения.

Подробное клиническое обследование каждого животного выполняли ежедневно в ходе исследования. В отдельных случаях клинические наблюдения регистрировали с незапланированными интервалами. Наблюдения включали в себя без ограничения оценивание состояния кожи, шерсти, глаз, ушей, носа, полости рта, грудной клетки, живота, наружных половых органов, конечностей и стоп, респираторных и гемодинамических эффектов, вегетативных эффектов, таких как слюноотделение, и эффектов нервной системы, в том числе эпизодов тремора, судорог, способности реагировать на обращение и необычного поведения.

Оценивание биораспределения (ткань, кровь и составы).

Образцы крови и тканей (примерно 100-200 мг на каждый образец) собирали из головного мозга (по восемь образцов от каждого животного), костного мозга, сердца, печени, шейного лимфатического узла и почки. В случае с тканями головного мозга образцы брали как из правого, так и из левого полушарий с сохранением латеральности. Образцы брали из области коры мозжечка (с включением слоя клеток Пуркинье), области зубчатого ядра мозжечка, гиппокампа и двигательной коры больших полушарий. Срез каждой ткани собирали с помощью биопсийного пуансона диаметром 8 мм и помещали в меченые микроцентрифужные пробирки на 2 мл, подвергали мгновенному замораживанию в жидком азоте, а затем помещали на сухой лед, чтобы хранить в замороженном состоянии при температуре от -60 до -90°C перед анализом методом количественной ПЦР.

В каждый день проведения хирургической процедуры один образец (примерно 100 мкл) тестируемого препарата вводили путем инъекции с помощью иглы, и образец собирали, помещали на сухой лед и хранили при температуре от -60 до -90°C перед анализом концентрации тестируемого препарата (vg/мл) методом количественной ПЦР.

Сбор тканей для анализа белка фратаксина.

Образцы из областей головного мозга, собранные для анализа методом количественной ПЦР (по меньшей мере 50 мг), собирали для анализа белка фратаксина методом ELISA. Образцы брали как из правого, так и из левого полушарий с сохранением латеральности с помощью круглого пуансона диаметром 5 мм.

Вестерн-блот-анализ локализации фратаксина в митохондриях.

У одного животного из группы 1 (животного № 701) и всех животных из группы 3 брали два дополнительных образца коры мозжечка (примерно 100-300 мг) для потенциального вестерн-блот-анализа.

Изучение неврологических показателей выполнялось штатным ветеринаром в дни 1, 2, 3, 7, 14 и 28. Оценивали реакцию черепных нервов, чувствительность периферических нервов и позыотонические/поведенческие реакции. После изучения все реакции/рефлексы черепных нервов и реакция на поверхностную боль считались находящимися в пределах нормы. У макаков-крабоедов, которым вводили AAV5-hFXN (026) путем внутримозжечковой инъекции в день 1 в дозах $1,2 \times 10^{12}$ или $2,4 \times 10^{12}$ vg, в день 27 среди конечных точек клинико-патологического анализа не наблюдались эффекты, связанные с тестируемым препаратом.

Ни на одном уровне дозы не наблюдались эффекты, связанные с тестируемым препаратом, в отношении конечных точек гематологического анализа. Все кажущиеся различия среди конечных точек гематологического анализа не считались связанными с тестируемым препаратом ввиду их пренебрежимо малой величины, отсутствия дозозависимого характера и/или связи с ожидаемыми величинами биологической изменчивости и изменчивости, связанной с процедурой.

Ни на одном уровне дозы не наблюдались эффекты, связанные с тестируемым препаратом, в отношении показателей времени свертывания крови (т.е. показателей АРТТ и протромбинового времени) или концентрации фибриногена. Все кажущиеся различия среди конечных точек анализа свертываемости крови не считались связанными с тестируемым препаратом ввиду их пренебрежимо малой величины, отсутствия дозозависимого характера и/или связи с ожидаемыми величинами биологической изменчивости и изменчивости, связанной с процедурой.

Ни на одном уровне дозы не наблюдались эффекты, связанные с тестируемым препаратом, в отношении конечных точек клинико-биохимического анализа. Все кажущиеся различия среди конечных точек клинико-биохимического анализа не считались связанными с тестируемым препаратом ввиду их

пренебрежимо малой величины, отсутствия дозозависимого характера и/или связи с ожидаемыми величинами биологической изменчивости и изменчивости, связанной с процедурой.

Не наблюдались макроскопические проявления, связанные с тестируемым препаратом; все ткани всех животных считались находящимися в пределах нормы.

Микроскопические проявления, связанные с AAV5-hFXN (026), были ограничены присутствием небольших количеств моноклеарных инфильтратов у животных, получавших $2,4 \times 10^{12}$ vg (билатеральные инъекции) и $1,2 \times 10^{12}$ vg (унилатеральная инъекция, в правое полушарие). У животных из группы параллельного контроля не наблюдались моноклеарные инфильтраты.

У большинства животных менингеальные моноклеарные клетки характеризовались накоплением небольших количеств моноклеарных клеток в мозговых оболочках с распространенностью от очаговой до местной и иногда наблюдающимся образованием скоплений вокруг мелких кровеносных сосудов (периваскулярных). В дополнение у небольшого числа животных также отмечались периваскулярные моноклеарные инфильтраты минимальных размеров в паренхиме головного мозга (в участках коры правого полушария мозжечка и двигательной коры правого полушария большого мозга одного животного, получавшего $1,2 \times 10^{12}$ vg, а также в коре правого полушария мозжечка или двигательной коре левого полушария большого мозга отдельных животных, получавших $2,4 \times 10^{12}$ vg). Моноклеарные инфильтраты были ассоциированы с увеличенной интенсивностью окрашивания на IBA-1/иммунореактивностью IBA-1 и/или демонстрировали ее. Инфильтрация моноклеарными клетками является ожидаемым проявлением и считается реакцией ткани на вирусный капсид, не являющейся нежелательной.

Результаты и обсуждение.

Анализ белка фратаксина.

Образцы тканей из коры мозжечка, зубчатого ядра, гиппокампа и двигательной коры больших полушарий собирали и передавали на анализ уровней фратаксина (фиг. 30) посредством ELISA. По результатам этого анализа у животных из группы контроля, получавшей инертное вещество, были обнаружены фоновые уровни фратаксина. Уровни фратаксина обсуждаются как относительные увеличения по сравнению с фоновыми уровнями, отмечаемыми у контрольных животных. Животные в группе 2 получали однократную инъекцию в кору правого полушария мозжечка, а животные в группе 3 получали билатеральные инъекции. В день 28 после введения дозы отмечалось, что уровни фратаксина были увеличенными в от 1,2 до 6,6 (кора мозжечка) и от 2,7 до 14,5 (зубчатое ядро) раза по сравнению с уровнями, отмечаемыми в контрольных тканях. Через 28 дней после введения дозы уровни фратаксина в гиппокампе и двигательной коре больших полушарий были примерно эквивалентными. Эти результаты, хоть и являются изменчивыми, демонстрируют стойкое увеличение выработки белка фратаксина в течение 28 дней после обработки тестируемым препаратом в виде однократной инъекции либо билатеральной инъекции в зубчатое ядро мозжечка и кору мозжечка.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантный вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV), содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид фратаксина человека, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, причем указанная молекула нуклеиновой кислоты функционально связана с промотором, 5'-регуляторным элементом (5'-UTR) и 3'-регуляторным элементом (3'-UTR), причем указанный промотор выбран из промотора CMV, промотора UBC, промотора EF1 α , промотора PGK1 или минимального промотора гена фратаксина, при этом

(i) указанный 5'-UTR представляет собой FTH1 и указанный 3'-UTR представляет собой последовательность раннего сигнала полиаденилирования SV40 или последовательность позднего сигнала полиаденилирования SV40; или

(ii) указанный 5'-UTR представляет собой GAPDH и указанный 3'-UTR представляет собой последовательность позднего сигнала полиаденилирования SV40 или синтетический 3'-регуляторный элемент, имеющий последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 7; или

(iii) указанный 5'-UTR представляет собой 5U2 и указанный 3'-UTR представляет собой последовательность полиаденилирования гена гормона роста человека (hGHpA) или синтетический 3'-регуляторный элемент, имеющий последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 7; или

(iv) указанный 5'-UTR представляет собой 5'-сайт сплайсинга RPL6 и указанный 3'-UTR представляет собой синтетический 3'-регуляторный элемент, имеющий последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 7.

2. Рекомбинантный вектор на основе AAV по п.1, где указанный промотор UBC содержит последовательность SEQ ID NO: 3 и последовательность 5U2 содержит последовательность SEQ ID NO: 4.

3. Рекомбинантный вектор на основе AAV по п.1, где указанный аденоассоциированный вирус представляет собой AAV5.

4. Рекомбинантный вектор на основе AAV по п.1, при этом указанный рекомбинантный AAV содержит последовательность SEQ ID NO: 19 или SEQ ID NO: 20.

5. Рекомбинантный вектор на основе AAV по п.1, отличающийся тем, что указанный промотор

представляет собой промотор UBC, 5'-UTR представляет собой 5U2 и 3'-UTR представляет собой hGHpA или синтетический 3'-регуляторный элемент, имеющий последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 7.

6. Рекombинантный вектор на основе AAV по п.1, отличающийся тем, что указанный промотор представляет собой промотор UBC, 5'-UTR представляет собой 5'-сайт сплайсинга RPL6 и 3'-UTR представляет собой синтетический 3'-регуляторный элемент, имеющий последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 7.

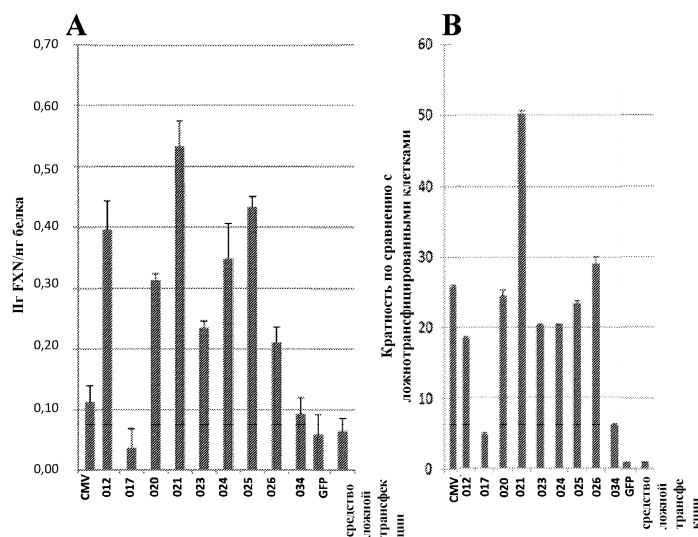
7. Рекombинантный вектор на основе AAV по п.1, отличающийся тем, что указанный промотор представляет собой промотор UBC, 5'-UTR представляет собой последовательность GAPDH и 3'-UTR представляет собой синтетический 3'-регуляторный элемент, имеющий последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 7.

8. Композиция, содержащая рекombинантный вектор на основе AAV по любому из пп.1-7 и фармацевтически приемлемый наполнитель.

9. Способ лечения атаксии Фридрейха у субъекта, нуждающегося в этом, при этом указанный способ включает введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества композиции по п.8, где указанная молекула нуклеиновой кислоты экспрессируется клетками указанного субъекта на уровне, достаточном для уменьшения интенсивности по меньшей мере одного симптома атаксии Фридрейха у указанного субъекта.

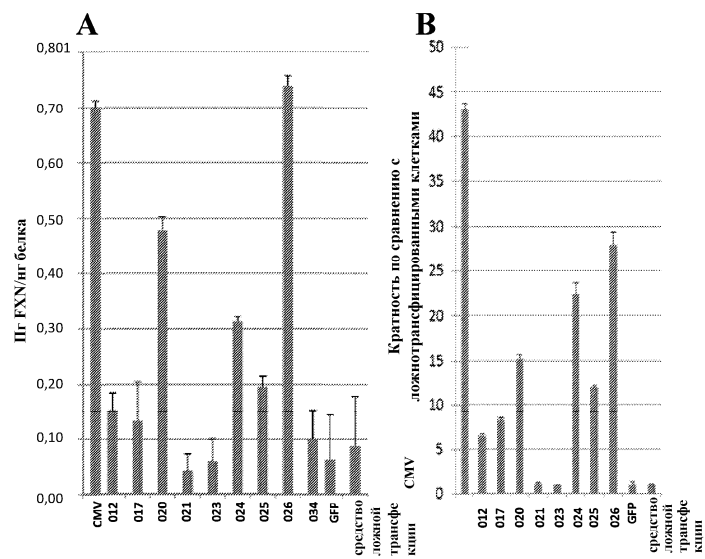
10. Способ по п.9, где указанный фратаксин экспрессируется у указанного субъекта на уровне, превышающем 25% от нормальных уровней фратаксина для указанного субъекта, причем предпочтительно указанный фратаксин экспрессируется в мозжечке, гиппокампе, передней коре головного мозга и/или ганглии заднего рожек.

Анализ экспрессии первого уровня



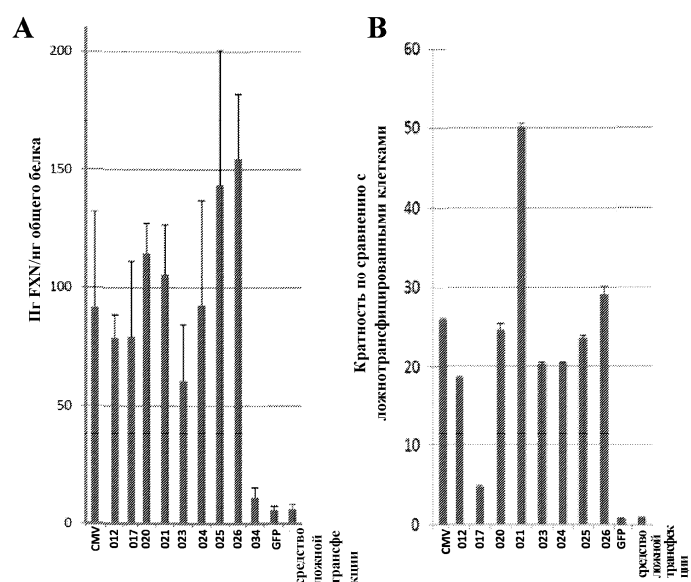
Фиг. 1

Анализ экспрессии первого уровня



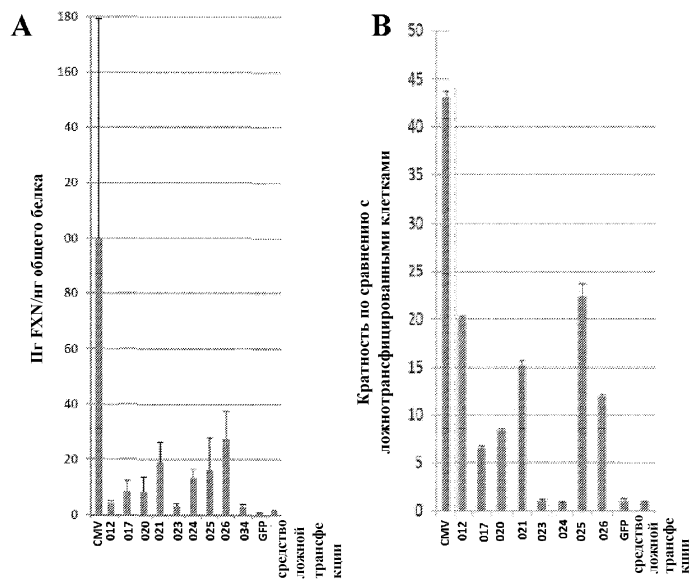
Фиг. 2

Анализ экспрессии второго уровня



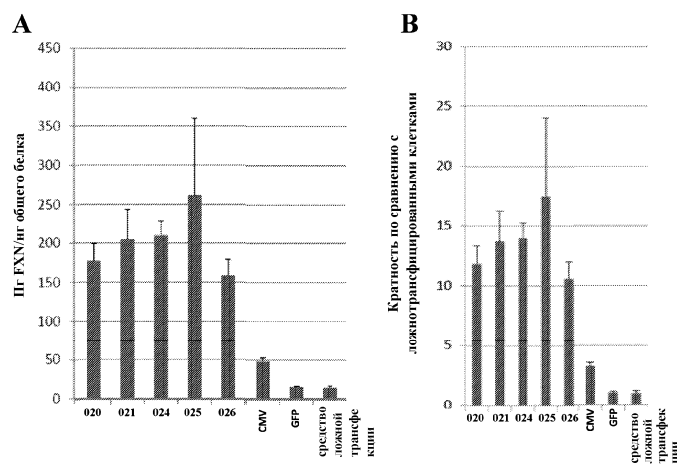
Фиг. 3

Анализ экспрессии второго уровня



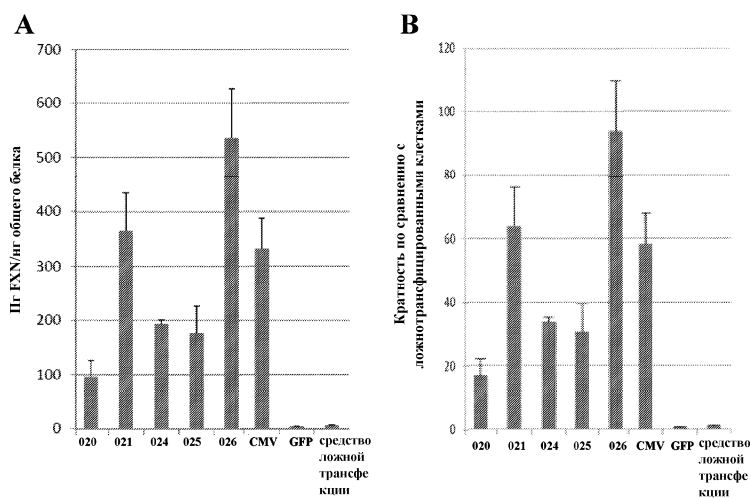
Фиг. 4

Анализ экспрессии третьего уровня



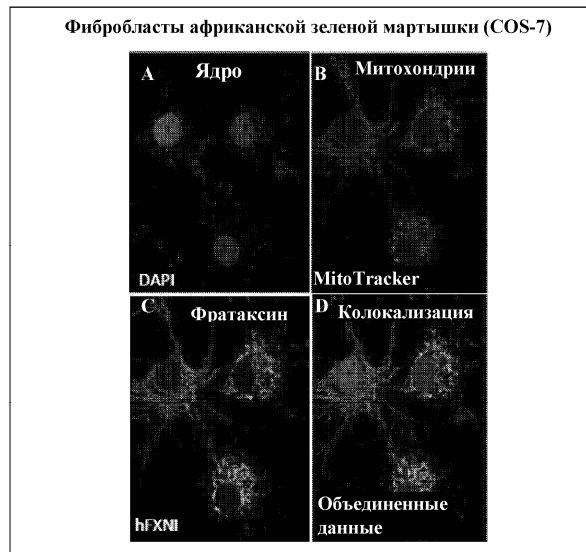
Фиг. 5

Анализ экспрессии третьего уровня



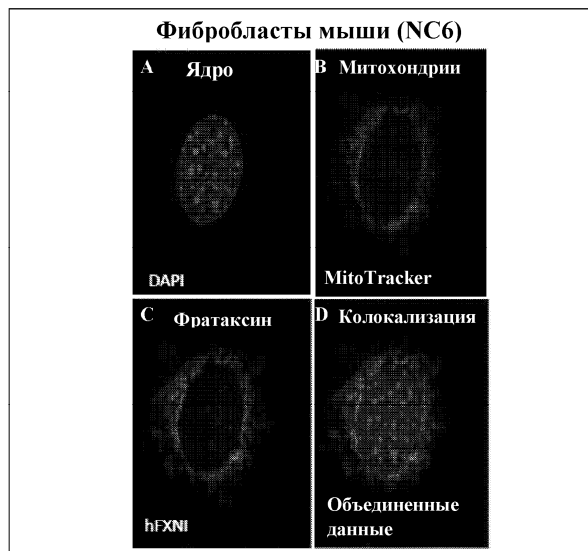
Фиг. 6

Фратаксин человека переносится в митохондрии посредством соответствующей внутриклеточной миграции



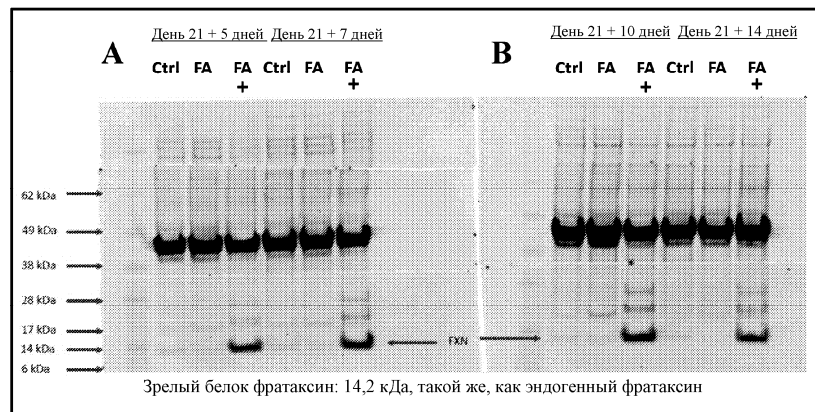
Фиг. 7

Фратаксин человека переносится в митохондрии посредством соответствующей внутриклеточной миграции

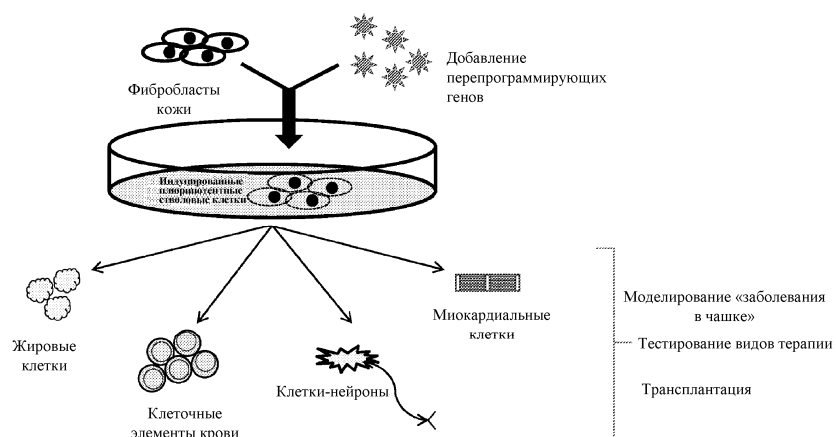


Фиг. 8

Фратаксин человека экспрессируется и правильно процессируется

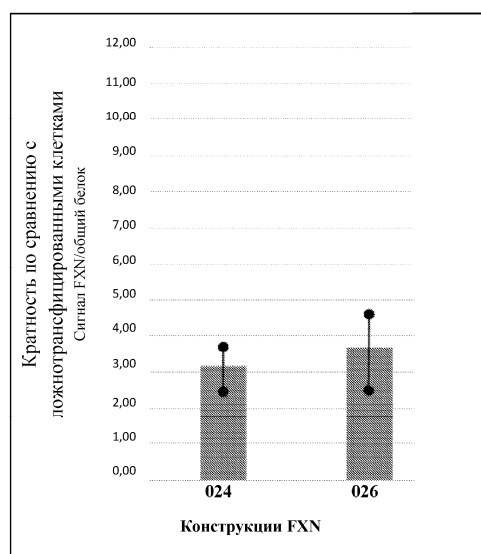


Фиг. 9



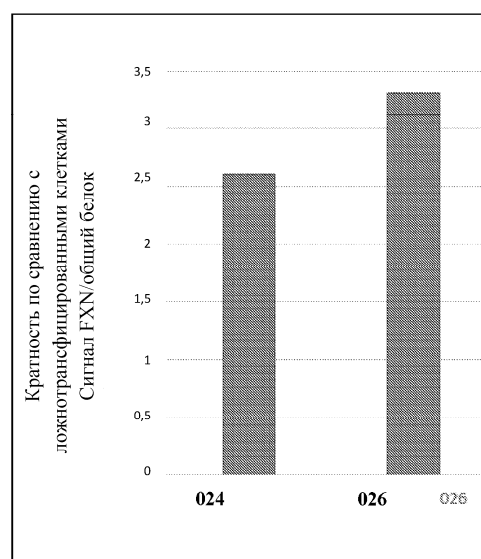
Фиг. 10

Транфекция плазмидами - электропорация



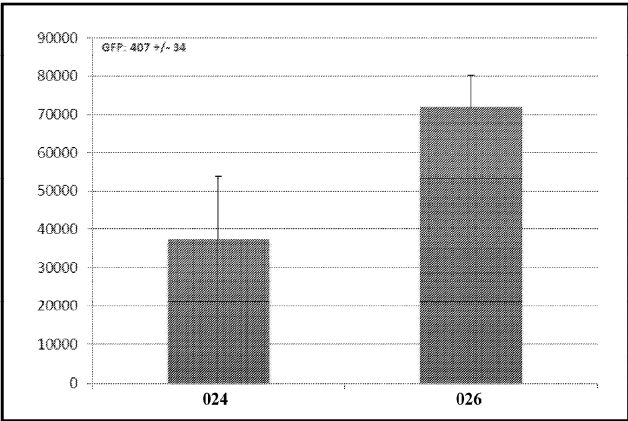
Фиг. 11

AAV-hFcXN - трансдукция



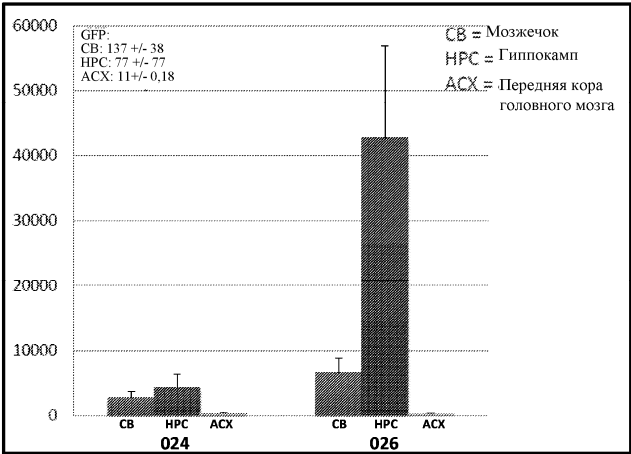
Фиг. 12

Внутри мозжечковая инъекция
(пг фратаксина/мг белка)



Фиг. 13

ICV
(пг фратаксина/мг белка)

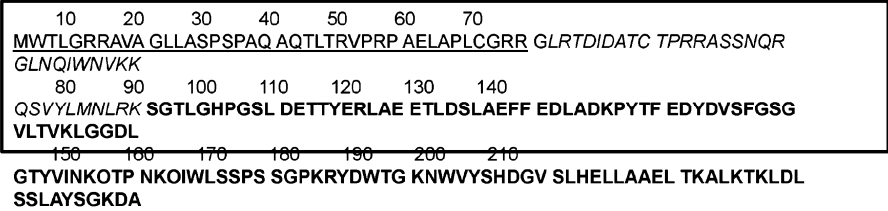


Фиг. 14

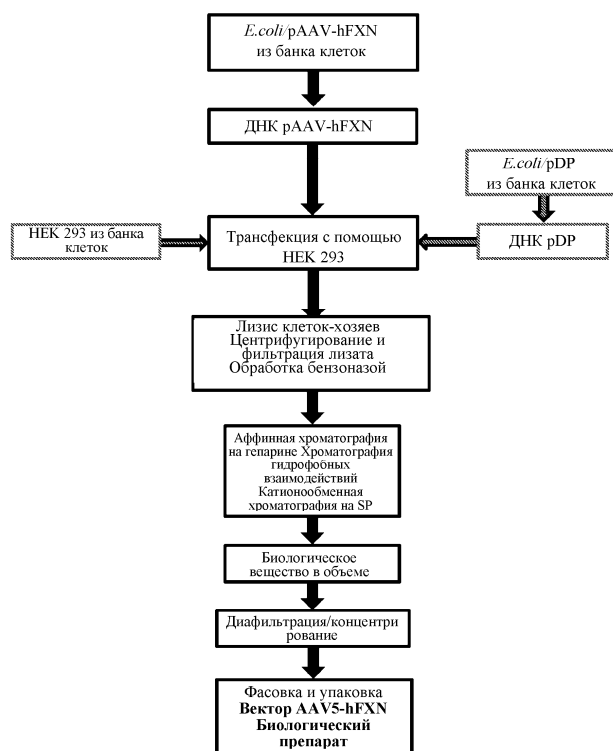
Карта рекомбинантного вектора
AAV5.hFXN



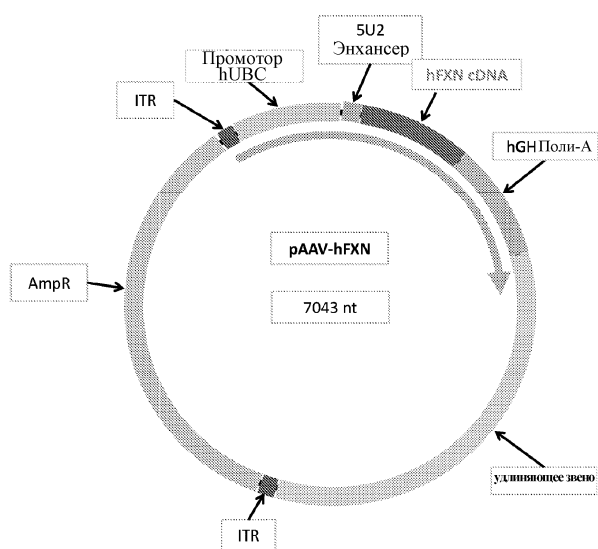
Фиг. 15



Фиг. 16



Фиг. 17



Фиг. 18

AAV2 ITR

cct gca ggc agc tgc gcg ctc gct cgc tca ctg agg ccg ccc ggg caa agc ccg ggc gtc

ggg cga cct ttg gtc gcc cgg cct cag tga gcg agc gag cgc gca gag agg gag tgg cca

act cca tca cta ggg gtt cct taa cta taa cgg tcc taa ggt agc ga

__AsiSI__ __PacI__ __FseI__ __промотор UBC человека__

gcg atc gct taa tta agg ccg gcc ggc ctc cgc gcc ggg ttt tgg cgc ctc ccg cgg gcg

ccc ccc tcc tca cgg cga gcg ctg cca cgt cag acg aag ggc gca gcg agc gtc ctg atc

ctt ccg ccc gga cgc tca gga cag cgg ccc gct gct cat aag act cgg cct tag aac ccc

agt atc agc aga agg aca ttt taq gac ggg act tgg gtg act cta ggg cac tgg ttt tct

ttc cag aga gcg gaa cag gcg agg aaa agt agt ccc ttc tgg gcg att ctg cgg agg gat

ctc cgt ggg gcg gtg aac gcc gat gat tat ata agg acg cgc cgg gtg tgg cac agc tag

ttc cgt cgc agc cgg gat ttg ggt cgc ggt tct tgt ttg tgg atc gct gtg atc gtc act

tgg tga gta gcg gcc tgc tgg gct ggg tac gtg cgc tgg ggg ttg gcg agt gtc ttt tgt

gaa gtt ttt tag gca cct ttt gaa atg taa tca ttt ggg tca ata tgt aat ttt cag tgt

tag act agt aaa ttg tcc gct aaa ttc tgg ccg ttt ttg gct ttt ttg tta gac gcc tgc

__AscI__ __MluI__ __5U2__

agg ggc gcg cca cgc gtc gaa gaa ggt gag taa tct taa cat gct ctt ttt ttt ttt

tgc taa tcc ctt ttg tgt gct gat gtt agg atg aca ttt aca aca aat gtt tgt tcc tga

cag gaa aaa cct tgc tgg gta cct tgg ttg ccg gac act tct tgt cct cta ctt tgg aaa

__NheI__ __FXN (+последовательность Козак)__

aaa gga att gag agc cgc tag cgc cac cat gtg gac tct cgg gcg ccg cgc agt agc cgg

cct cct ggc gtc acc cag ccc agc cca ggc cca gac cct cac ccg ggt ccc gcg gcc ggc

aga gtt ggc ccc act ctg cgg ccg ccg tgg cct gcg cac cga cat cga tgc gac ctg cac

gcc ccg ccg cgc aag ttc gaa cca acg tgg cct caa cca gat ttg gaa tgt caa aaa gca

gag tgt cta ttt gat gaa ttt gag gaa atc tgg aac ttt ggg cca ccc agg ctc tct aga

tga gac cac cta tga aag act agc aga gga aac gct gga ctc ttt agc aga gtt ttt tga

aga cct tgc aga caa gcc ata cac gtt tga gga cta tga tgt ctc ctt tgg gag tgg tgt

ctt aac tgt caa act ggg tgg aga tct agg aac cta tgt gat caa caa gca gac gcc aaa

caa gca aat ctg gct atc ttc tcc atc cag tgg acc taa gcg tta tga ctg gac tgg gaa

aaa ctg ggt gta ctc cca cga cgg cgt gtc cct cca tga gct gct ggc cgc aga gct cac

taa agc ctt aaa aac caa act gga ctt gtc ttc ctt ggc cta ttc ccg aaa aga tgc ttg

__ClaI__ __SnaBI__ __NotI__ __SalI__ __hGH поли А__

aat cga tta cgt agc ggc cgc gtc gac tga tgg gtg gca tcc ctg tga ccc ctc ccc agt

Фиг. 19А

hGH поли А (продолжение)

```

gcc tct cct ggc cct gga agt tgc cac tcc agt gcc cac cag cct tgt cct aat aaa att
aag ttg cat cat ttt gtc tga cta ggt gtc ctt cta taa tat tat ggg gtg gag ggg ggt
ggt atg gag caa ggg gca agt tgg gaa gac aac ctg tag ggc ctg cgg ggt cta ttg gga
acc aag ctg gag tgc agt ggc aca atc ttg gct cac tgc aat ctc cgc ctc ctg ggt tca
agc gat tct cct gcc tca gcc tcc cga gtt gtt ggg att cca ggc atg cat gac cag gct
cag cta att ttt gtt ttt ttg gta gag acg ggg ttt cac cat att ggc cag gct ggt ctc
caa ctc cta atc tca ggt gat cta ccc acc ttg gcc tcc caa att gct ggg att aca ggc
gtg aac cac tgc tcc ctt ccc tgt cct tct gat ttt aaa ata act ata cca gca gga gga
cgt cca gac aca gca tag gct acc tgg cca tgc cca acc ggt ggg aca ttt gag ttg ctt
gct tgg cac tgt cct ctc atg cgt tgg gtc cac tca gta gat gcc tgt tga att att taa
RsrII BsiWI 2250 bp синтетический нейтральный спейсер млекопитающих
atc ggt ccg cgt acg tta tgg cta tag aat gcc cca tct tag att gta ggt gac ttg aga
ggt cta agt cct tct ata gga tat cct tct agg tag gta taa tac tag tct agg tta aac
tag gct agg gag tca gag agc att cgc aaa gtt tac cta gtc tac aag tct ctc cca cta
tcc ttg agc cta ccc tag gct aga tcc tag gaa tca tcc cat gtc gtc att cta gct cat
agc act ctc act atc cta cta gct agg cca tct tcc tag gaa aag tat aag atc cta gtt
tga tat agc atc aat gta gct agt ggg aag gat acg gat gac ctc ata gct tgc agc ttt
ata aac ttc tcc ctc cca tac cac cta cct agg tgc tat gag gtg act tta gaa tca ccc
tct agg agg tag act atg ata gtc ctt cct tct agt atc aag ata tca tct agc tac aag
tta tcg aag gtt gac cta acc tta tag caa tat ttt gac cta cct gag agc ttt aga gcc
cta gtt tga gag tct atg tcc atc tag ggc cta cct acc tta cct act aca tga tgt agc
tct atc cta gag ccc tct cat ggt tat gag ttg cct gca agg cta gaa tct agg aag atc
ctt cca tca tat cct tgt agc tat ttt cta caa tcg aga aga ggt cct cct act tct aac
ttt tgc cat tgc ccc atc tag cta caa ggt tat gag aga gag tat aag tca tgc cat aat
acc tag gta gaa att ctc acc tat cct att tct ttc tag ctt gca gtg cta cta gca tgg
ggt gag atc ttg agt cta gcc ttt tgt cct agg gac ttt tag agc cta aga ctc tag agt
gcc ccg atc taa tat cct tct ata act tcc tac cag tct ctt ata gcc ttt gac cct att
tct acc acc tac ttc gca tgg tct ttc ttt acc tta cca taa gac tgc ctt aga cta cct
agg gag aga ctt aag gcc atg cta taa gct ata ggt cta ggc tat atc ctt tca cca tat
agc atg atc ata ggc gca aag tag aaa gga ctc tag gat aga gac tct ata gat gag ctt

```

Фиг. 19В

```

gat act gac ttt gtc gtt act ttg acc cta gta gct cat act atc atg atg gtg act ctt
gag cca gta tga tct ttg tcc taa gtc cca ccc cat ctt tgc cac gct ata gat ctg ctc
taa gct ata gac cat cct tga cct acc tta gag tat agg tca aac tct aga cta gac ttt
gta gga ggg cta tag cct ttg ccc cat ctc acc tca ctc tct aat att tct atg agc ttt
tag gta aag tat ctt cta aag cta tcc tag ggt cct ttt act tca gca agt gca agg agt
caa atc tct tac ttt agg cct agc aat ctt agg tgc caa gac cct cta tag ctc tct tct
agc tca tag cat ggg ata acc ttc agt caa aag tgc tag act tgc tag aga tgc tct aga
taq ttt gac cta aqg taq gtt aqa aaq tca ctt tcg tcc ttt tgt aqt aqg tca ctg aqa
ctt aga atg gtc tat cct tgc tcc cta gct tag ggt ggg atc ttt tag gcc ttt gag cct
agc aag gac tct agt cta ggg tcc atc cca tct cct gca aga atc tct caa gga aag gtt
gta gaa gga atg aga gta gca atc tat agc aag gat gat ggt tgt aga atg agc atg tag
gta agg cat gag ata ctt tta cct cgt acc ttg tag gcc tat aag act ttg act tat aaa
agt ctg tcc tcc cta gcc tat atg gcc tag aaa ata gga cct tga aag aat gct ata gtg
agc tta tgg cct aca tcc tag aga atc tag gta aaa gat att atg act tag gta cta gag
tac cag caa gct aga gcc tat agc ccc atc cta ctt caa atc tta gag tat agt act tca
aag atc ata tac tct gac ttt aga cca tgg cct tag aag agg tta gag tga ggg tcc tcc
ctt gcg agg tag gag agc atc ttg agc ttt tag gag cat cct agc agc tag gtc tag aga
ggg caa gtt aga gaa gtt tga gtc atg cta gag ggc aaa gtc tca gcc tcc ttg tcc tac
aag agt cat cta ggt ata gct aca tca aac tat cat aga agt ttg att acc ctg tta tcc
cta agg aac ccc tag tga tgg agt tgg cca ctc cct ctc tgc gcg ctc gct cgc tca ctg
agg ccg ggc gac caa agg tgc ccc gac gcc cgg gct ttg ccc ggg cgg cct cag tga gcg
agc gag cgc gca gct gcc tgc agg

```

Фиг. 19С

```

0001 taactataac ggtcctaagg tagcgagcga tcgcttaatt aaggccggcc gccctccgcg
0061 cggggttttg gcgcctcccg cgggcgcccc cctctcaccg gcgagcgctg ccacgtcaga
0121 cgaaggcgcg agcgagcgtc ctgatccttc cgcccggaag ctcaggacag cggcccgctg
0181 ctcataagac tcggccttag aaccccagta tcagcagaag gacattttag gacgggactt
0241 ggggtgactct agggcactgg ttttctttcc agagagcgga acagggcgag aaaagtagtc
0301 ccttctcggc gattctcgcg agggatctcc gtggggcggt gaacgcgcgt gattatataa
0361 ggacgcgcgc ggtgtggcac agctagtctc gtcgcagccg ggattttgggt cgcggttctt
0421 gtttgtggat cgctgtgac gtcacttggg gagttagcgg ctgctgggct gggtagctgc
0481 gctcgggggt ggcgagtgtg ttttgtgaag ttttttaggc accttttgaa atgtaatcat
0541 ttgggtcaat atgtaatttt cagtgttaga ctagtaaatt gtcgcgtaaa ttctggccgt
0601 ttttggtttt ttgttagac gctgcaggg gcgcgccacg cgtcgaagaa ggtgagtaat
0661 cttaacatgc tctttttttt tttttttgct aatccctttt gtgtgctgat gtttaggatga
0721 catttacaa aaatgtttgt tcctgacagg aaaaaccttg ctgggtacct tcggtgcggc
0781 acacttcttg tcctctactt tggaaaaaag gaattgagag ccgctagcgc caccatgttg
0841 actctcgggc gcgcgcagc agccggcctc ctggcgctac ccagcccgag ccaggcccg
0901 accctcaccg gggtcgcgc gcgcgcagag ttggccccc acctcgggcg ccgtggcctg
0961 cgcaccgaca tcgatgcgac ctgcacgccc cgccgcgcaa gttcgaacca acgtggcctc
1021 acccagattt ggaatgtcaa aaagcacagc gtcattttga tgaatttgag gaaatctgga
1081 actttgggccc acccaggtct tctagatgag accacctatg ctgagacaca gtttaggacg
1141 ctggaactct tagcagagtt ttttgaagac ctgagacaca actgtcaaac tgggtggaga
1201 tatgtatgta acaagcagac gccaaacca gcaaatctggc tatcttctcc atccagtggg
1261 cctaaagcgt atgactggac tgggaaaaac tgggtgtact cccacgacgg cgtgtccctc
1321 catgagctgc tggccgcaga gctcactaaa gccttaaaaa gattacgtag cggccgcgct
1441 ttggcctatt ccggaaaaga tgcttgaatc ctctggccc tgggaagtgc cactccagtg
1501 tggcatccct gtgacccctc ccagtgccct ctctggccc tgcatcattt tgtctgacta
1561 cccaccagcc ttgtccta ataaatgaag tgcatcattt tgtctgacta ggtgtccctc
1621 tataatatta tggggtggag gggggtggta tggagcaagg ggcaagtgg gaagacaacc
1681 ttaggggccc gcgggggtcta ttgggaacca agctggagtg cagtggcaca atcttggctc
1741 actgcaatct ccgcctctct ggttcaagcg atttctctgc ctcagcctcc cgaagtgttg
1801 ggattccagg catgcatgac caggctcagc taatttttgt ttttttggtg gagacggggg
1861 ttaccataat tggccaggct ggtctccaac tcctaattct aggtgatcta cccaccttgg
1921 cctcccaaat tgctgggatt acaggcgtga accactgtct ccttccctgt ccttctgatt
1981 ttaaaataac tataccagca ggaagcgtc caqacacagc ataggttacc tgggccaatg
2041 caaccggttg gacatttgag ttgcttgcct ggcactgtcc tctcatgctg tgggtccact
2101 cagtagatgc ctgttgaa atttaaatcg gtcgcgctac gttatggcta tagaatgccc
2161 catcttagat ttaggtgac ttgagaggtc taagtctctc tataggatat ccttctaggt
2221 aggtataata ctagtctagg ttaaactagg ctagggagtc agagagcatt cgcaagttt
2281 acctagtcta caagtctctc ccaactatct ctctcactat cctactagct agggccatct
2341 catcccatgt cgtcattcta gctcatagca ctctcactat cctactagct agggccatct
2401 cctagaaaaa gtataagatc ctagtttgat atagcatcaa ttagcttagt tgggaaggata
2461 cggatgacct catagcttgc agctttataa acttctccct cccataccac ctacctaggt
2521 gctatgaggt gactttagaa tcacctcta ggaggtagac tatgatagtc cctcctcta
2581 gtatcaagat atcatctagc tacaagtatt cgaaggttga cctaacccta tagcaatatt
2641 ttgacctacc tgagagcttt agagccctag tttgagagtc tatgtccatc tagggcctac
2701 ctaccttacc tactacatga ttagctcta tcctagagcc ctctcatggt tatgattgct
2761 ctgcaaggct agaacttagg aagatccttc catcatatcc ttgtagctat tttctacaat
2821 cgagaagagg tcctcctact tctaactttt gccattgccc catctagcta caaggttatg
2881 agagagagta taagtcatgc cataatacct aggtagaat tctcacctat cctatttctt
2941 tctagcttgc agtgctacta gcatggggtg agatcttgag tctagccttt tgtcctaggg
3001 acttttagag cctaagactc tagagtgccc cgatctaata tcttctata acttctacc
3061 agtctcttat agcctttgac cctatttcta ccacctactt cgcattgtct tctttacct
3121 taccataaga ctgccttaga ctacctaggg agagacttaa ggccatgcta taagctatag
3181 gtctaggcta tatcctttca ccatatagca tgatcatagg cgaaaagtag aaaggactct
3241 aggatagaga ctctatagat gagcttgata ctgactttgt cgttactttg accctagtag
3301 ctcatactat catgatggtg actcttgagc cagtatgac tttgtcctaa gtccccccc
3361 atctttgcca cgctatagat ctgctctaag ctatagacca tccctgacct accctagtag
3421 ataggtcaaa ctctagacta gactttgtag gagggtata gcccttgccc catctcactt

```

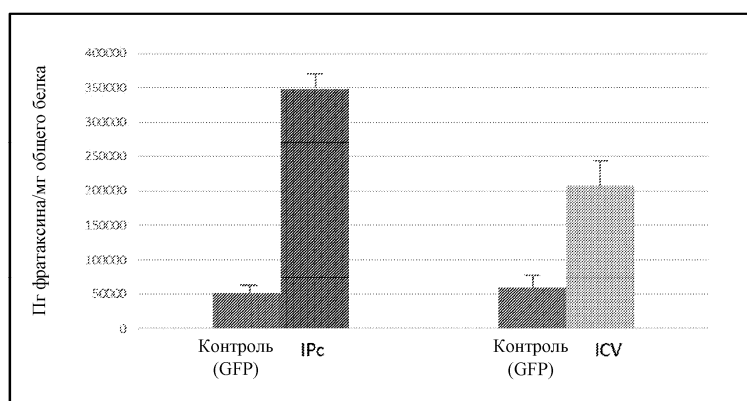
Фиг. 20А


```

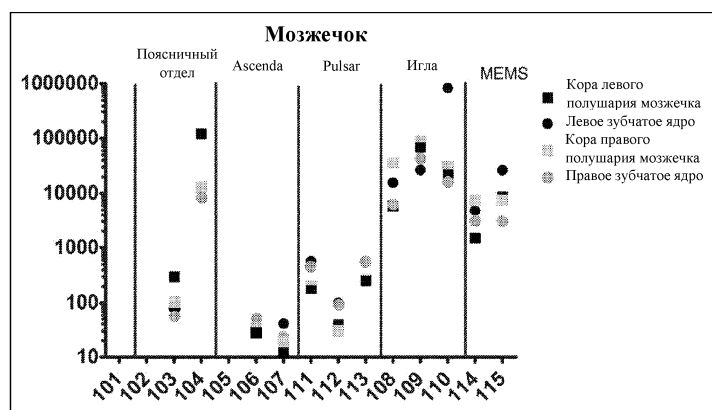
3481 cactctctaa tatttctatg agcttttagg taaagtatct tctaaagcta tcttagggtc
3541 cttttacttc agcaagtga aggagtcaaa tctcttactt tagggctagc aatcttaggt
3601 cgcgaagacc tctataagct tcttctagct catagcatgg gataaccttc agtcaaaagt
3661 gctagacttg cttagagatgc tctagatagt ttgacctaa gtaggttaga agtcaacttt
3721 cgtccttttg taqtaggtca ctgagactta gaatggtcta tcttctgctc ctactcttag
3781 gtgggatctt ttaggccttt gagcctagca aggaactctag tctagggtcc atccactctc
3841 ctgcaagaat cctctcaagga aaggtttagg aaggaatgag agtagcaatc tatagcaagg
3901 atgatgggtg tagaatgagc atgtaggtaa ggcattgagat acttttacct cgtaccttgt
3961 aggcctataa gactttgact tataaaagtc tgtctccctc agcctatatg gcctagaaaa
4021 taggaccttg aaagaatgct atagttagct tatggcctac atcctagaga atctaggtaa
4081 aagatattat gacttaggta cttagagtacc agcaagctag agcctatagc cccatccctac
4141 ttcaaatctt agagtatagt acttcaaaaga tcatatactc tgacttttaga ccatggcctt
4201 aqaagaggtt agagttaggg tctctccctg ctaggttagga gagcatcttg agcttttagg
4261 agcatcctag cagctagggtc tagagagggc aagtttagaga agtttgagtc atgctagagg
4321 gcaaaagtct agcctccttg tctacaaga gtcactctagg tatagctaca tcaaacctatc
4381 atagaagtgt gattaccctg ttatccctaa ggaaccccta gtgatggagt tggccactcc
4441 ctctctgcgc gctcgtcgc tcaactgaggc cgggcgacca aaggctgccc gacgcccggg
4501 ctttgcccgg gcggcctcag tgaagcagcg agcgcgcagc tgcctgcagg atctatgtcg
4561 ggtgcggaga aagaggtaat gaaatggcaa gtacttccgg aactataaat tgcgttgccc
4621 tcaactgccc ctttccagtc gggaaacctg tctgtcccagc tgcataaatg aatcggccaa
4681 cgcgcgggga gaggcgggtt gcgtattggg cgcgctcccg cttcctcgct caactgaactc
4741 ctgcgctcgg tcgttcggct gcggcagagc gtatcagctc actcaaaaggc ggtaatacgg
4801 ttatccacag aatcagggga taacgcagga aagaacatgt gagcaaaagg ccagcaaaag
4861 gccaggaaac gtaaaaaggc cgcgttgtct gcgttttctc ataggctccg ccccctgac
4921 gagcatcaca aaaatcgacg ctcaagtcag aggtggcgaa acccgacagg actataaaga
4981 taccagcggt ttcccctgg aagctccctc gtgcgctctc ctgttccgac cctgctctt
5041 accggatacc tgcctcgctt tctcctctcg ggaagcgtgg cgttttctca tagctcacgc
5101 tgtaggtatc tcagttcggt gtaggtcggt cgtctcaagc tgggctgtgt gcacgaaccc
5161 cccgttcagc ccgaccgctg cgccttatcc ggtaactatc tcttttagtc caaccggta
5221 agacacgact tatcgccact ggcagcagcc actggttaac ggattagcag agcgagggtat
5281 gtaggcggtg ctacagagtt cttgaagtgg tggcctaact acggctacac tagaagaaca
5341 gtatttggtg tctgcgctct gctgaagcca gttacctctg gaaaaagagt ttggtagctc
5401 tgatccggca aacaaaccac cgctggttagc ggtggttttt ttgtttgcaa gcacgaggtt
5461 acgcgcagaa aaaaaggatc tcaagaagat cctttgatct tttctacggg gtctgacgct
5521 cagtggaacg aaaactcacg ttaagggatt ttggtcatga gattatcaaa aaggatcttc
5581 atcatgatcc ttttaattga aaaaatgaag tttaaatcaa tctaaagtat atatgagtaa
5641 acttggtctg acatgcgcag ttaccaatgc ttaatcagtg aggcacctat ctacgcatc
5701 tgcttatctc gttcatccat agttgectga ctcccctcg ttagataac tacgatacgg
5761 gagggcttac catctggccc cagtgcgtga atgataccgc gagaccacg ctaccggct
5821 ccagatttat cagcaataaa ccagccagcc ggaagcggcg agcgcagaag tggctctgca
5881 actttatccg cctccatcca gtctattaac tgttgccggg aagctagagt aagtagttcg
5941 ccagtttaata gtttgcgag cggtgttgcc attgctacag gcatcggtg gtccgctcg
6001 tccgtttggt tggcttcatt cagctccggt tcccacgat caaggcgagt tacatgatcc
6061 cccatgttgt gcaaaaaagc ggtagctcc ttoggctctc cagtggttgt cagaagtaag
6121 ttggccgcag tgttatcact catggttatg gcagcactgc ataattctct tactgtcatg
6181 ccatccgtaa gatgcttttc tgtgactggt gaglatcca ccaagtcatt ctgagaaatg
6241 tgtagtcggc gaccgagttg ctcttgcctg gcgtcaatcc gggataatac cgcgccacat
6301 agcagaactt taaaagtgtc catcattggg aagcgttctt cggggcgaaa actctcaagg
6361 atcttacccg tgttgagatc cagttcgatg taaccacac gagcacccaa ctgatcttca
6421 gcatctttta ctttaccag cgtttctggg tgagcaaaaa cagggaaggca aaatgccgca
6481 aaaaagggaa taaggcgac acggaaatgt tgaalactca tacttctctc ttttcaatat
6541 tattgaaqca tttatcaggg ttattgtctc atgagcggat acatatattga atgtatttag
6601 aaaaataaac aaataggggt tccgcgcaca tttcccgaa aagtgcaccc tgagggtctaa
6661 gaaaccatta ttatcatgac attaacctat aaaaataggc gtatcacgag gccctttctt
6721 ctccgcggtt tcggtgatga cggtgaaaac ctctgacaca tgcagctccc ggatacggtc
6781 acagcttgtc tglagcgga tgcggggagc agacaagccc gtcaggcgcc gtcagcggt
6841 gttgcggggt gtcgggctg gcttaagctg agctaactat gactctctta aggtagccaa
6901 atctgcaggc cagctgcgct ctcgctcgct cactgaggcc gcccgggcaa agcccgggcg
6961 tcgggcgacc tttggtcgcc cgcctcagtc gagcgaagca gcgcgcagag agggagtggc
7021 caactccatc actaggggtt cct

```

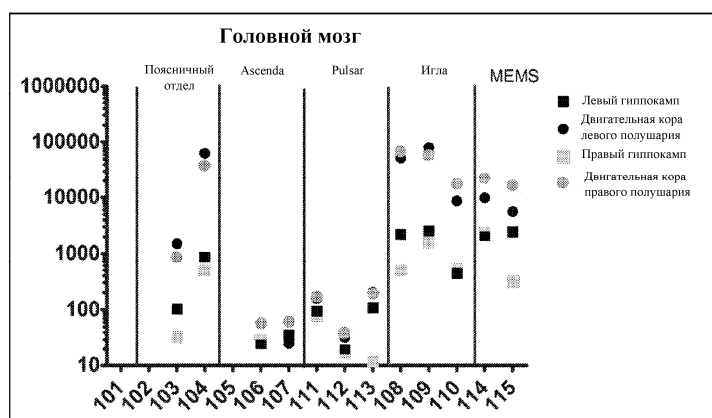
Фиг. 20В



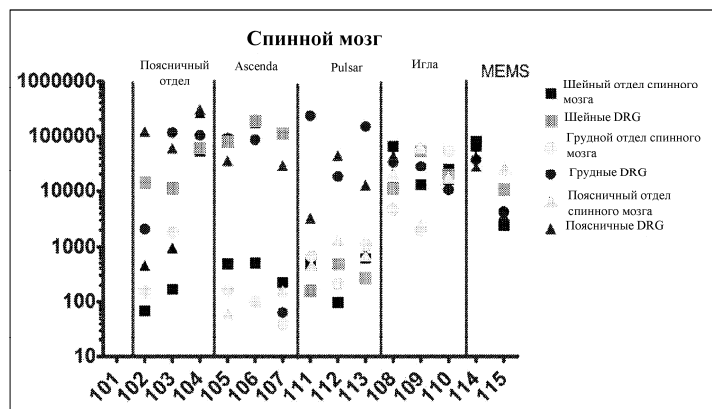
Фиг. 21



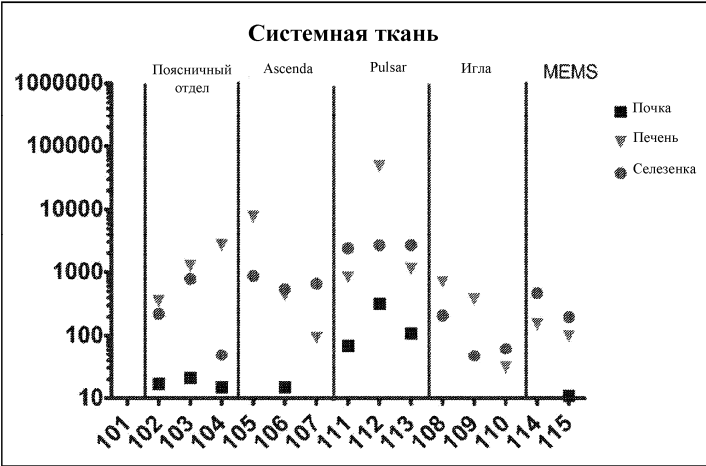
Фиг. 22



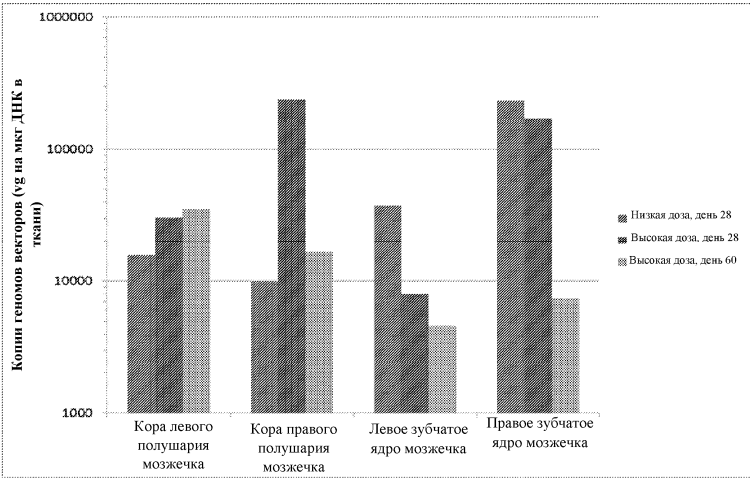
Фиг. 23



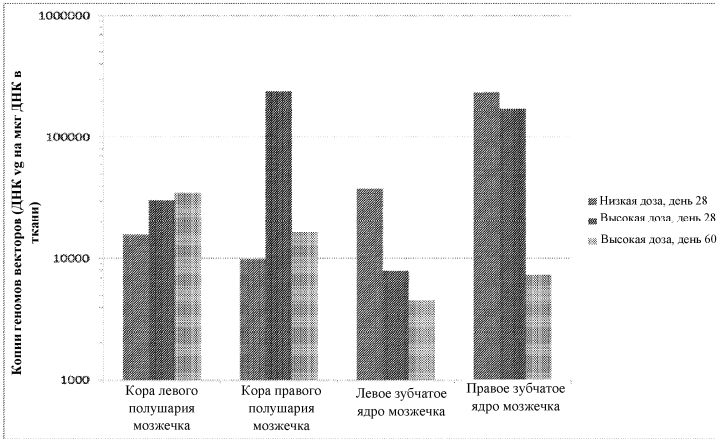
Фиг. 24



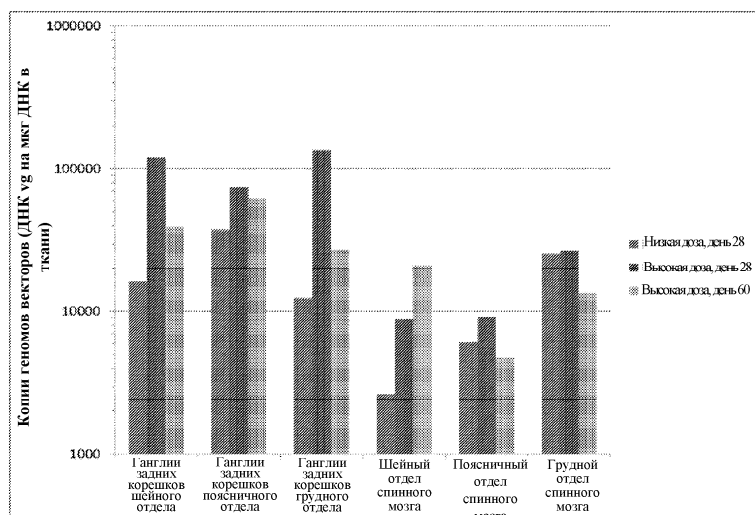
Фиг. 25



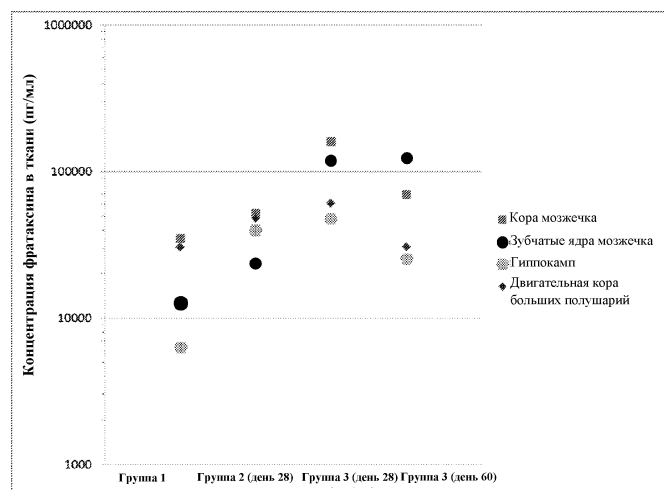
Фиг. 26



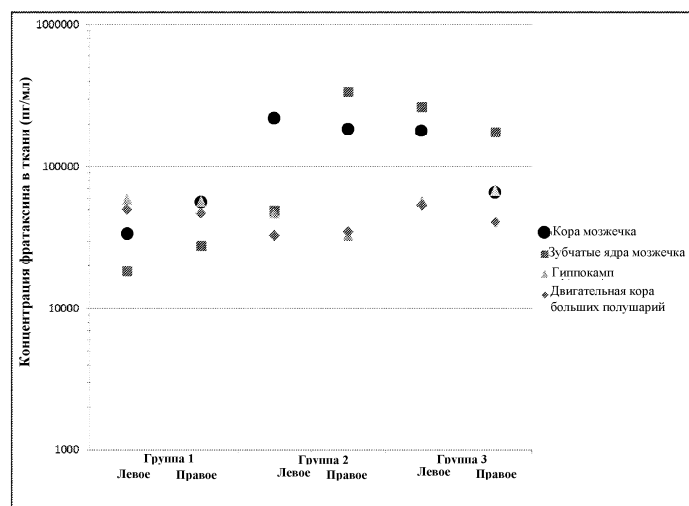
Фиг. 27



Фиг. 28



Фиг. 29



Фиг. 30

