

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202192801** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2022.02.24

(51) Int. Cl. *A61K 48/00* (2006.01)
A61K 35/76 (2015.01)
C12N 15/861 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.04.10

(54) **КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ВВЕДЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ**

(31) **62/833,447**

(32) **2019.04.12**

(33) **US**

(86) **PCT/US2020/027682**

(87) **WO 2020/210633 2020.10.15**

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

(72) Изобретатель:

Бель Арчана, Тальятела Стефани
(US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) В изобретении представлены способы введения вектора, содержащего регуляторный элемент, селективный к клеточному типу. Такие способы введения включают введение одной или нескольких молекул нуклеиновой кислоты в центральную нервную систему с использованием таких способов, как интрацеребровентрикулярное введение, интратекальное введение или внутривенное введение.

202192801
A1

202192801
A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-571281EA/032

КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ВВЕДЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

По настоящей заявке испрашивается приоритет предварительной заявки на патент США № 62/833 447, поданной 12 апреля 2019 г, которая включена в настоящий документ посредством ссылки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Значительный потенциал генной терапии и терапии антисмысловыми олигонуклеотидами давно признан для лечения неврологических заболеваний или нарушения. Вместо того, чтобы полагаться на хирургическое вмешательство или лекарственные средства, которые лечат только симптомы неврологического заболевания или нарушения, пациентов, особенно с первопричинными генетическими факторами, можно лечить, напрямую воздействуя на причину основного заболевания/нарушения. Кроме того, будучи направленными на первопричинные генетические причины неврологического заболевания или нарушения, генная терапия и терапевтические подходы на основе антисмысловых олигонуклеотидов могут обеспечить устойчивое лечение в течение более длительного периода времени, чем стандартные фармацевтические терапии, и обладают потенциалом эффективного лечения пациентов. Тем не менее, несмотря на это, клиническое применение генной терапии и терапевтических подходов на основе антисмысловых олигонуклеотидов к неврологическим нарушениям все еще требует улучшений в нескольких аспектах. Одной из проблем, вызывающих озабоченность при использовании этих способов лечения, является эффективная доставка терапевтического средства в центральную нервную систему. Было показано, что такие векторы, как AAV9, преодолевают гематоэнцефалический барьер при внутривенном введении мышам, но внутривенная доставка этих векторов более крупным животным затруднена из-за чрезвычайно высокой дозы вектора, необходимой для эффективности, и высокой трансдукции в периферических органах, что может быть связано с токсичностью. Другой путь введения, интрапаренхимальные инъекции, требует меньших доз вектора и эффективен для трансдукции целевой области центральной нервной системы (ЦНС). Однако внутривенные инъекции могут не подходить для лечения нарушений, требующих доставки вектора по ЦНС.

Таким образом, существует потребность в идентификации элементов и способов их использования для таргетирующей генной терапии или экспрессии генов на ткань или тип клеток, представляющих интерес, в ЦНС, что может снизить эффекты вне мишени, повысить терапевтическую эффективность в ткани-мишени и/или клеточном типе, и/или повысить безопасность и переносимость у пациента путем снижения эффективной дозы, необходимой для достижения эффективности.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящем документе представлены композиции и способы, которые, в

некоторых вариантах осуществления, могут быть использованы для лечения нейрональных заболеваний, таких как синдром Драве.

В некоторых вариантах осуществления, в описании представлен способ введения вектора примату, включающий интрацеребровентрикулярное (ICV) введение вектора примату, где вектор содержит регуляторный элемент, селективный к клеточному типу. В некоторых вариантах осуществления, в описании представлен способ введения вектора примату, включающий интрацеребровентрикулярное (ICV) введение вектора примату, где вектор содержит регуляторный элемент, где регуляторный элемент вызывает повышенную экспрессию трансгена, по меньшей мере, 2-кратную по сравнению с экспрессией трансгена, когда он функционально связан с промотором CMV. В некоторых вариантах осуществления, в описании представлен способ введения вектора примату, включающий интрацеребровентрикулярное (ICV) введение вектора примату, где вектор вводят унилатерально. В некоторых вариантах осуществления, в описании представлен способ введения вектора примату, включающий интрацеребровентрикулярное (ICV) введение вектора примату, где вектор не является самокомплементарным AAV. В некоторых вариантах осуществления, приматом является человек. В некоторых вариантах осуществления, приматом является примат, не являющийся человеком. В некоторых вариантах осуществления приматом, не являющимся человеком, является старосветская мартышка, орангутан, горилла, шимпанзе, макак-крабоед, макак-резус или свинохвостый макак. В некоторых вариантах осуществления, вектор содержит нуклеотидную последовательность, функционально связанную с регуляторным элементом. В некоторых вариантах осуществления, регуляторный элемент селективно экспрессируется в нейрональных клетках. В некоторых вариантах осуществления, нейрональные клетки выбраны из группы, состоящей из униполярных, биполярных, мультиполярных или псевдоуниполярных нейронов. В некоторых вариантах осуществления, нейрональными клетками являются ГАВА-ергические нейроны. В некоторых вариантах осуществления, регуляторный элемент избирательно экспрессируется в глиальных клетках. В некоторых вариантах осуществления, глиальные клетки выбраны из группы, состоящей из астроцитов, олигодендроцитов, эпендимальных клеток, шванновских клеток и амфицитных клеток. В некоторых вариантах осуществления, регуляторный элемент селективно экспрессируется в ненейрональных клетках. В некоторых вариантах осуществления, вектор вводят более чем в один желудочек головного мозга. В некоторых вариантах осуществления, вектор вводят билатерально. В некоторых вариантах осуществления, вектор вводят одновременно. В некоторых вариантах осуществления, вектор вводят последовательно. В некоторых вариантах осуществления, каждую дозу вектора вводят с интервалом, по меньшей мере, 24 часа. В некоторых вариантах осуществления, вектор вводят в один желудочек мозга. В некоторых вариантах осуществления, примату дополнительно вводят вектор внутривенно. В некоторых вариантах осуществления, примат дополнительно получает интратекальное введение вектора. В некоторых вариантах осуществления, интратекальное введение включает

интратекальное цистернальное введение или интратекальное люмбальное введение. В некоторых вариантах осуществления, вектор содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид. В некоторых вариантах осуществления, полипептидом является ДНК-связывающий белок. В некоторых вариантах осуществления, ДНК-связывающий белок выбран из группы, состоящей из цинкового пальца (ZFP), цинк-пальцевой нуклеазы (ZFN) или нуклеазы на основе эффектора, подобного активатору транскрипции (TALEN). В некоторых вариантах осуществления, нуклеотидной последовательностью является кодон-оптимизированный вариант и/или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления, вектор содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую направляющую РНК (нРНК). В некоторых вариантах осуществления, вектор содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую интерферирующую РНК (РНКи), которая снижает экспрессию гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления, РНКи снижает экспрессию гена-мишени, выбранного из группы, состоящей из SOD1, HTT, Тау или альфа-синуклеина. В некоторых вариантах осуществления, вектор содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую антисмысловой олигонуклеотид, который снижает экспрессию гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления, вектор выбран из группы, состоящей из лентивируса, ретровируса, плазмиды или вируса простого герпеса (HSV). В некоторых вариантах осуществления, вектором является аденоассоциированный вирусный (AAV) вектор. В некоторых вариантах осуществления, AAV является одноцепочечный AAV. В некоторых вариантах осуществления, AAV является самокомплементарный AAV. В некоторых вариантах осуществления, аденоассоциированным вирусным вектором является любой из AAV1, scAAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, scAAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, scAAV9, AAV10, AAV11, AAV12, rh10, AAV птицы, AAV крупного рогатого скота, AAV собаки, AAV лошади, AAV приматов, AAV не приматов, AAV овец или любые их гибриды. В некоторых вариантах осуществления, вектором AAV является AAV5. В некоторых вариантах осуществления, вектором AAV является AAV9. В некоторых вариантах осуществления, вектор содержит последовательность инвертированного концевого повтора (ITR) 5' AAV и ITR-последовательность 3' AAV. В некоторых вариантах осуществления, вектор вводят в фармацевтически приемлемом носителе. В некоторых вариантах осуществления, вектор вводят в комбинации с контрастным агентом. В некоторых вариантах осуществления, вектор не вводят в комбинации с контрастным агентом. В некоторых вариантах осуществления, введение осуществляют путем инъекции. В некоторых вариантах осуществления, введение осуществляют путем инфузии.

В некоторых вариантах осуществления, в описании представлен способ экспрессии представляющего интерес гена или его биологически активного варианта и/или его фрагмента, включающий введение примату терапевтически эффективного количества аденоассоциированного вирусного вектора 1 (AAV1) или аденоассоциированного вирусного вектора 5 (AAV5), кодирующий представляющий интерес ген, где путь

введения выбран из группы, состоящей из внутривенного введения, интратекального введения, интрацеребровентрикулярного введения, интрапаренхимального введения или их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления, приматом является человек. В некоторых вариантах осуществления, приматом является примат, не являющийся человеком. В некоторых вариантах осуществления, приматом, не являющимся человеком, является старосветская мартышка, орангутан, горилла, шимпанзе, макак-крабоед, макак-резус или свинохвостый макак. В некоторых вариантах осуществления, вектор AAV1 или вектор AAV5 содержит нуклеотидную последовательность, функционально связанную с регуляторным элементом. В некоторых вариантах осуществления, регуляторный элемент является селективным к клеточному типу. В некоторых вариантах осуществления, регуляторный элемент селективно экспрессируется в нейрональной клетке. В некоторых вариантах осуществления, нейрональные клетки выбраны из группы, состоящей из униполярных, биполярных, мультиполярных или псевдоуниполярных нейронов. В некоторых вариантах осуществления, нейрональными клетками являются ГАВА-ергические нейроны. В некоторых вариантах осуществления, регуляторный элемент селективно экспрессируется в глиальных клетках. В некоторых вариантах осуществления, глиальные клетки выбраны из группы, состоящей из астроцитов, олигодендроцитов, эндимальных клеток, шванновских клеток и амфицитных клеток. В некоторых вариантах осуществления, регуляторный элемент селективно экспрессируется в ненейрональных клетках. В некоторых вариантах осуществления, AAV1 или AAV5 вводят более чем в один желудочек мозга. В некоторых вариантах осуществления, AAV1 или AAV5 вводят билатерально. В некоторых вариантах осуществления, AAV1 или AAV5 вводят одновременно. В некоторых вариантах осуществления, AAV1 или AAV5 вводят последовательно. В некоторых вариантах осуществления, каждую дозу AAV1 или AAV5 вводят с интервалом, по меньшей мере, 24 часов. В некоторых вариантах осуществления, AAV1 или AAV5 вводят в один желудочек мозга. В некоторых вариантах осуществления, AAV1 или AAV5 содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид. В некоторых вариантах осуществления, полипептидом является ДНК-связывающий белок. В некоторых вариантах осуществления, ДНК-связывающий белок выбран из группы, состоящей из цинкового пальца (ZFP), цинк-пальцевой нуклеазы (ZFN) или нуклеазы на основе эффектора, подобного активатору транскрипции (TALEN). В некоторых вариантах осуществления, нуклеотидной последовательностью является кодон-оптимизированный вариант и/или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления, вектор содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую направляющую РНК (нРНК). В некоторых вариантах осуществления, AAV1 или AAV5 содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую интерферирующую РНК (РНКи), которая снижает экспрессию гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления, РНКи снижает экспрессию гена-мишени, выбранного из группы, состоящей из SOD1, НТТ, Тау или альфа-синуклеина. В некоторых вариантах осуществления, AAV1 или AAV5 содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую антисмысловой олигонуклеотид,

который снижает экспрессию гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления, вектор выбран из группы, состоящей из лентивируса, ретровируса, плазмиды или вируса простого герпеса (HSV). В некоторых вариантах осуществления, AAV1 или AAV5 вводят в фармацевтически приемлемом носителе. В некоторых вариантах осуществления, вектор вводят в сочетании с контрастным агентом. В некоторых вариантах осуществления, вектор не вводят в сочетании с контрастным агентом. В некоторых вариантах осуществления, введение осуществляют путем инъекции. В некоторых вариантах осуществления, введение осуществляют путем инфузии.

В некоторых вариантах осуществления, в описании представлен способ ингибирования или лечения одного или нескольких симптомов, связанных с заболеванием нейронов, у приматов, нуждающихся в этом, включающий введение аденоассоциированного вектора (AAV), выбранного из группы, состоящей из аденоассоциированного вектора 1 (AAV1) или аденоассоциированного вектора 5 (AAV5) примату, где путь введения выбран из группы, состоящей из внутривенного введения, интратекального введения, интрацеребровентрикулярного введения, интрапаренхимального введения или их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления, заболевание нейронов выбрано из группы, состоящей из лизосомной болезни накопления, синдрома Драве, болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, болезни Хантингтона, бокового амиотрофического склероза (ALS), спинальной мышечной атрофии (SMA), эпилепсии, нейродегенерации, моторных нарушений, двигательных нарушений или расстройств настроения. В некоторых вариантах осуществления, приматом является человек. В некоторых вариантах осуществления, приматом является примат, не являющийся человеком. В некоторых вариантах осуществления, приматом, не являющимся человеком, является старосветская мартышка, орангутан, горилла, шимпанзе, макак-крабоед, макак-резус или свинохвостый макак.

В некоторых вариантах осуществления, в описании представлен способ введения вектора примату, включающий интрацеребровентрикулярное (ICV) введение вектора примату, где вектор содержит трансген, и где ICV введение приводит к повышенной экспрессии трансгена в центральной нервной системе (ЦНС), по меньшей мере, в 1,25 раза по сравнению с экспрессией трансгена при введении вектора любым другим путем. В некоторых вариантах осуществления, ICV введение дает, по меньшей мере, 1,5-кратное, 1,75-кратное, 2-кратное, 3-кратное, 5-кратное, 10-кратное, 15-кратное, 20-кратное, 25-кратное, 30-кратное, 35-кратное, 40-кратное, 45-кратное, 50-кратное, 55-кратное, 60-кратное, 65-кратное, 70-кратное или 75-кратное, или, по меньшей мере, 20-90 кратное, 20-80 кратное, 20-70-кратное, 20-60-кратное, 30-90-кратное, 30-80-кратное, 30-70-кратное, 30-60-кратное, 40-90-кратное, 40-80-кратное, 40-70-кратное, 40-60-кратное, 50-90-кратное, 50-80-кратное, 50-70-кратное, 50-60-кратное, 60-90-кратное, 60-80-кратное, 60-70-кратное, 70-90-кратное, 70-80-кратное, 80-90-кратное увеличение экспрессии последовательности трансгена в центральной нервной системе (ЦНС) по сравнению с экспрессией трансгена при введении вектора любым другим путем. В некоторых вариантах осуществления,

введение ICV приводит к переносу гена по всему мозгу. В некоторых вариантах осуществления, перенос гена происходит во фронтальной коре, теменной коре, височной коре, гиппокампе, мозговом веществе и затылочной коре. В некоторых вариантах осуществления, перенос гена зависит от дозы. В некоторых вариантах осуществления, вектор дополнительно содержит селективный регуляторный элемент клеточного типа. В некоторых вариантах осуществления, регуляторный элемент селективно экспрессируется в головном мозге. В некоторых вариантах осуществления, регуляторный элемент селективно экспрессируется во фронтальной коре, теменной коре, височной коре, гиппокампе, мозговом веществе и затылочной коре. В некоторых вариантах осуществления, регуляторный элемент селективно экспрессируется в позвоночнике. В некоторых вариантах осуществления, регуляторный элемент селективно экспрессируется в спинном мозге и спинальном ганглии. В некоторых вариантах осуществления, регуляторный элемент селективно экспрессируется в нейрональных клетках. В некоторых вариантах осуществления, нейрональные клетки выбирают из группы, состоящей из униполярных, биполярных, мультиполярных или псевдоуниполярных нейронов. В некоторых вариантах осуществления, нейрональными клетками являются ГАВА-ергические нейроны. В некоторых вариантах осуществления, регуляторный элемент селективно экспрессируется в глиальных клетках. В некоторых вариантах осуществления, глиальные клетки выбраны из группы, состоящей из астроцитов, олигодендроцитов, эпендимальных клеток, шванновских клеток и амфицитных клеток. В некоторых вариантах осуществления, регуляторный элемент селективно экспрессируется в ненейрональных клетках.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Новые признаки изобретения подробно изложены в прилагаемой формуле изобретения. Лучшее понимание особенностей и преимуществ настоящего изобретения будет получено при обращении к нижеследующему подробному описанию, в котором излагаются иллюстративные варианты осуществления, в которых используются принципы изобретения, и прилагаемым чертежам, в которых:

На фиг. 1 показано типовое изображение слоев ткани, собранных из образцов головного мозга, и показано расположение и количество пробоев в ткани, сделанных для каждой из лобной коры, теменной коры, височной коры, гиппокампа, мозжечка, мозгового вещества и затылочной коры. Для каждого типа образца ткани делают пробой в ткани как правого, так и левого полушария, и в некоторых случаях делают отверстия из двух слоев.

На фиг. 2 показано распределение ткани в различных слоях ткани и отверстия для животных, получавших AAV9-CBA-eGFP-KASH в высокой дозе ($1E+13$ копий геномного вектора (гв)/животное) унилатеральным интрацеребровентрикулярным (ICV), внутрь большой цистерны (ICM) и интратекальным люмбальным (IT-люмбальный) путем введения. Данные представлены в виде числа копий вектора на диплоидный геном (VCN/диплоидный геном). Коронарный срез (CS) 2L представляет пробой в ткани из левого полушария среза 2, CS 2R представляет пробой в ткани из правого полушария

среза 2, CS 8L представляет пробой в ткани из верхнего пробоя из левого полушария среза 8 (см. фигуру 1), CS 8L2 представляет пробой в ткани из нижнего пробоя из левого полушария среза 8 (см. фигуру 1 и т. д.).

На фиг. 3 показан средний VCN/диплоидный геном в головном мозге животных, получавших AAV9-CBA-eGFP-KASH в высокой дозе ($1E+13$ гв/животное) унилатеральным ICV, ICM и IT-люмбальным путем введения. Каждое значение представляет VCN/диплоидную нДНК для каждого пробоя ткани, и горизонтальные полосы представляют средний VCN/диплоидный геном для всех пробоев ткани для каждого пути введения. VCN/диплоидный геном, полученный при унилатеральном ICV введении, был статистически значимо выше, чем VCN/диплоидный геном, полученный при ICM или IT-поясничном введении.

На фиг. 4 показан VCN/диплоидный геном в различных областях мозга (например, лобная кора (FC), теменная кора (PC), височная кора (TC), затылочная кора (OC), гиппокамп (Hip), мозжечок (Cb) и мозговое вещество (Med)) животных, получавших AAV9-CBA-eGFP-KASH в высокой дозе ($1E+13$ гв/животное) унилатеральным ICV, ICM и IT-поясничным путем введения.

На фиг. 5 показаны образцы VCN/диплоидного генома в образцах спинного мозга (SC), спинального ганглия (DRG), сердца, печени, почек и селезенки животных, получавших AAV9-CBA-eGFP-KASH в высокой дозе ($1E+13$ гв/животное) унилатеральным ICV, ICM и IT-люмбальным путем введения. C2 относится к уровню 2 шейной области, T1 и T8 относятся к уровням T1 и T8 грудной области, а L4 относится к уровню 4 поясничной области спинного мозга.

На фиг. 6 показано распределение в ткани в различных срезах ткани и пробоях животных, получавших AAV9-CBA-eGFP-KASH или AAV9-SEQ ID 76-eGFP-WPRE в низкой дозе ($2,4E+12$ гв/животное) односторонним интрацеребровентрикулярным (ICV), внутрь большой цистерны (ICM), интратекальным люмбальным (IT-люмбальным) и внутривенным (инъекция в хвостовую вену) путем введения. Данные представлены как VCN/диплоидный геном. Для унилатерального ICV введения значения являются средними значениями для трех леченных животных. Одно животное лечат AAV9-CBA-eGFP-KASH, как описано в примере 1, и два животных лечат AAV9-SEQ ID 76-EGFP-WPRE, как описано в примере 2. Пробои ткани помечены как отмечено выше для фиг.2 Один пробой (отмечен на фигуре), полученный из ткани мозгового вещества в срезе 12, имеет очень высокие уровни VCN/диплоидного генома, что, как полагают, связано с близостью пробоя к месту введения ICM.

На фиг. 7 показан средний VCN/диплоидный геном в головном мозге животных, получавших AAV9-CBA-eGFP-KASH или AAV9-SEQ ID 76-eGFP-WPRE в низкой дозе ($2,4E+12$ гв/животное) унилатеральным ICV, ICM, IT-люмбальным и ВВ путем введения. Каждое значение представляет VCN/диплоидный геном для каждого пробоя ткани, и горизонтальные полосы представляют средний VCN/диплоидный геном для всех пробоев ткани для каждого пути введения. VCN/диплоидный геном, полученный при

унилатеральном ICV введении, статистически значимо выше, чем VCN/диплоидный геном, полученный при ICM, IT-люмбальном и внутривенном введении. Для унилатерального ICV введения значения представляют среднее значение для трех леченных животных. Одно животное лечат AAV9-CBA-eGFP-KASH, как описано в Примере 1, и двух животных лечат AAV9-SEQ ID 76-eGFP-WPRE, как описано в Примере 2. Пробой ICM с очень высокими уровнями VCN/диплоидного генома (как показано на фигуре 6) был исключен из этого набора данных.

На фиг. 8 показан VCN/диплоидный геном в различных областях мозга (например, лобной коре (FC), теменной коре (PC), височной коре (TC), затылочной коре (OC), гиппокампе (Hip), мозжечке (Cb) и мозговом веществе (Med)) животных, получавших AAV9-CBA-eGFP-KASH или AAV9-SEQ ID 76-eGFP-WPRE в низкой дозе ($2,4E+12$ вг/животное) унилатеральными ICV, ICM и IT-поясничными способами введения. Для унилатерального ICV введения значения представляют среднее значение для трех леченных животных. Одно животное лечат AAV9-CBA-eGFP-KASH, как описано в Примере 1, и двух животных лечат AAV9-SEQ ID 76-eGFP-WPRE, как описано в Примере 2.

На фиг.9 показаны образцы VCN/диплоидного генома в спинном мозге (SC), спинальном ганглии (DRG), сердце, печени, почках и селезенке животных, получавших AAV9-CBA-eGFP-KASH или AAV9-SEQ ID 76-eGFP-WPRE в низкой дозе ($2,4E+12$ гв/животное) унилатеральным ICV, ICM, IT-поясничным и внутривенным путем введения. Для унилатерального ICV введения значения представляют среднее значение для трех леченных животных. Одно животное лечат AAV9-CBA-eGFP-KASH, как описано в Примере 1, и двух животных лечат AAV9-SEQ ID 76-eGFP-WPRE, как описано в Примере 2.

На фиг. 10 показано распределение ткани в разных срезах ткани и пробоях животных, получавших AAV9-CBA-eGFP-KASH в высокой дозе ($1E+13$ вг/животное) унилатеральным интрацеребровентрикулярным (ICV) или билатеральным ICV введением. Данные представлены как VCN/диплоидный геном. Тканевые пробои помечены, как указано выше на фигуре 2.

На фиг. 11 показано распределение в ткани по разным срезам ткани и пробоям животных, получавших AAV9-CBA-eGFP-KASH или AAV9-SEQ ID 76-eGFP-WPRE в высокой дозе ($\sim 2,4E+13$ гв/животное) унилатеральным интрацеребровентрикулярным (ICV) или билатеральным ICV введением. Данные представлены как VCN/диплоидный геном. Для унилатерального ICV введения значения представляют среднее значение для трех леченных животных. Одно животное лечили AAV9-CBA-eGFP-KASH, как описано в Примере 1, и двух животных лечили AAV9-SEQ ID 76-eGFP-WPRE, как описано в Примере 2. Пробой ткани помечены, как указано выше на фигуре 2.

На фиг. 12 показан средний VCN/диплоидный геном в головном мозге животных, получавших AAV9-CBA-eGFP-KASH или AAV9-SEQ ID 76-eGFP-WPRE в высокой дозе (ICV-H) $1E+13$ гв/животное или низкой дозе (ICV-L) $2,4E+12$ вг/животное

унилатеральным ICV или билатеральным ICV путем введения. Каждое значение представляет VCN/диплоидный геном для каждого пробоя ткани, и горизонтальные полосы представляют средний VCN/диплоидный геном для всех пробоев ткани для каждого пути введения. VCN/диплоидный геном, полученный при унилатеральном ICV введении, был выше, чем VCN/диплоидный геном, полученный с помощью билатерального ICV, как при высоких, так и при низких дозах. Для унилатерального ICV введения в низкой дозе (ICV-L) значения представляют среднее значение для трех леченных животных. Одно животное лечили AAV9-CBA-eGFP-KASH, как описано в Примере 1, и двух животных лечили AAV9-SEQ ID 76-eGFP-WPRE, как описано в Примере 2.

На фиг. 13 показан VCN/диплоидный геном в различных областях мозга (например, лобная кора (FC), теменная кора (PC), височная кора (TC), затылочная кора (OC), гиппокамп (Hip), мозжечок (Cb) и мозговое вещество (Med)) животных, получавших AAV9-CBA-eGFP-KASH или AAV9-SEQ ID 76-eGFP-WPRE в высокой дозе (ICV-H) $1E+13$ гв/животное или в низкой дозе (ICV-L) $2,4E+12$ гв/животное унилатеральным ICV или билатеральным ICV путем введения. Для унилатерального ICV введения значения представляют среднее значение для трех леченных животных. Одно животное лечили AAV9-CBA-eGFP-KASH, как описано в Примере 1, и двух животных лечили AAV9-SEQ ID 76-eGFP-WPRE, как описано в Примере 2.

На фиг. 14 показаны образцы VCN/диплоидного генома в спинном мозге (SC), спинальном ганглии (DRG), сердце, печени, почках и селезенке для животных, получавших AAV9-CBA-eGFP-KASH или AAV9-SEQ ID 76-eGFP-WPRE в высокой дозе (ICV-H) $1E+13$ гв/животное или низкой дозе (ICV-L) $2,4E+12$ гв/животное унилатеральным ICV или билатеральным ICV путем введения. Для унилатерального ICV введения в низкой дозе (ICV-L) значения представляют среднее значение для трех леченных животных. Одно животное лечили AAV9-CBA-eGFP-KASH, как описано в Примере 1, и двух животных лечили AAV9-SEQ ID 76-eGFP-WPRE, как описано в Примере 2.

На фиг. 15 показана экспрессия зеленого флуоресцентного белка (GFP) через 4 недели после введения дозы AAV9 в коре головного мозга, мозжечке, спинном мозге, спинальном ганглии (DRG), печени и сердце, по данным иммуногистохимического анализа. AAV9 в высоком (HD= $1E+13$ гв/животное) или низком (LD= $\sim 2,4E+12$ гв/животное) титре вводят унилатерально или билатерально интрацеребровентрикулярно (ICV), инъекцией внутрь большой цистерны (ICM), интратекально (IT-люмбально) или внутривенно (BV). Показанные изображения были скорректированы контрастом в одинаковом количестве. Белый столбик 100 мкм показан в нижнем левом углу каждого изображения вместе с ID животного в верхнем левом углу.

На фиг. 16 показано распределение в ткани в различных срезах ткани и пробоях животных, получавших AAV9-CBA-eGFP-KASH, AAV9-SEQ ID 76-eGFP-WPRE, AAV5-CBA-eGFP-KASH или AAV1-CBA-eGFP-KASH в низкой дозе ($\sim 2,4E+12$ гв/животное)

унилатеральным интрацеребровентрикулярным (ICV) введением. Данные представлены как VCN/диплоидный геном. Для унилатерального введения ICV с AAV9, значения представляют среднее значение для трех леченных животных. Одно животное лечили AAV9-CBA-eGFP-KASH, как описано в Примере 1, и двух животных лечили AAV9-SEQ ID 76-eGFP-WPRE, как описано в Примере 2. Тканевые пробы помечены, как указано выше на фигуре 2.

На фиг. 17 показан средний VCN/диплоидный геном в головном мозге животных, получавших AAV9-CBA-eGFP-KASH, AAV9-SEQ ID 76-eGFP-WPRE, AAV5-CBA-eGFP-KASH или AAV1-CBA-eGFP-KASH в низкой дозе ($\sim 2,4E+12$ вг/животное) унилатеральным интрацеребровентрикулярным (ICV) введением. Каждое значение представляет VCN/диплоидный геном для каждого пробы ткани, и горизонтальные полосы представляют средний VCN/диплоидный геном для всех проб тканей для каждого серотипа (например, AAV9, AAV5 и AAV1). Для унилатерального ICV введения с AAV9 значения представляют среднее значение для трех леченных животных. Одно животное лечили AAV9-CBA-eGFP-KASH, как описано в Примере 1, и двух животных лечили AAV9-SEQ ID 76-eGFP-WPRE, как описано в Примере 2.

На фиг. 18 показан VCN/диплоидный геном в различных областях мозга (например, лобной коре (FC), теменной коре (PC), височной коре (TC), затылочной коре (OC), гиппокампе (Hip), мозжечке (Cb) и мозговом веществе (Med)) животных, которым вводили AAV9-CBA-eGFP-KASH, AAV9-SEQ ID 76-eGFP-WPRE, AAV5-CBA-eGFP-KASH или AAV1-CBA-eGFP-KASH в низкой дозе ($\sim 2,4E+12$ вг/животное) унилатеральным интрацеребровентрикулярным (ICV) введением. Для унилатерального ICV введения с AAV9 значения представляют среднее значение для трех леченных животных. Одно животное лечили AAV9-CBA-eGFP-KASH, как описано в Примере 1, и двух животных лечили AAV9-SEQ ID 76-eGFP-WPRE, как описано в Примере 2.

На фиг. 19 показан VCN/диплоидный геном в образцах ткани спинного мозга (SC), спинального ганглия (DRG), сердца, печени, почек и селезенки животных, получавших AAV9-CBA-eGFP-KASH, AAV9-SEQ ID 76.-eGFP-WPRE, AAV5-CBA-eGFP-KASH или AAV1-CBA-eGFP-KASH в низкой дозе ($\sim 2,4E+12$ вг/животное) унилатеральным интрацеребровентрикулярным (ICV) введением. Для унилатерального ICV введения с AAV9 значения представляют среднее значение для трех леченных животных. Одно животное лечили AAV9-CBA-eGFP-KASH, как описано в Примере 1, и двух животных лечили AAV9-SEQ ID 76-eGFP-WPRE, как описано в Примере 2.

На фиг. 20 показана экспрессия GFP через 4 недели после введения разных серотипов AAV в коре головного мозга, мозжечке, спинном мозге, спинальном ганглии (DRG), печени и сердце по данным иммуногистохимического анализа. Животным вводят дозы векторов AAV9, AAV5 или AAV1 унилатеральной интрацеребровентрикулярной (ICV) инъекцией, как указано. Показанные изображения были скорректированы контрастом в одинаковом количестве. Белый столбик 100 мкм показан в нижнем левом углу каждого изображения вместе с ID животного в верхнем левом углу.

На фиг. 21 показан VG/диплоидный геном в образцах ткани фронтальной коры (FC), ростральной теменной коры (Ростральная PC), височной коры (TC), каудальной теменной коры (Каудальная PC), гиппокампа (Hip), мозгового вещества (Med) и затылочной части (OC) животных, получавших AAV9, содержащие кассету экспрессии, кодирующую eTFSCN1A под контролем селективного регуляторного элемента GABA (AAV9-RE^{GABA}-eTF^{SCN1A}) в дозе 4,8E+13 или 8E+13 гв/животное унилатеральным интрацеребровентрикулярным (ICV) введением (Пример 3 и Пример 4). Каждое значение представляет VG/диплоидный геном для образца ткани, и горизонтальные полосы представляют средний VG/диплоидный геном для всех образцов ткани для каждого животного.

На фиг. 22 показаны транскрипты/мкг РНК в образцах ткани фронтальной коры (FC), ростральной теменной коры (Ростральная PC), височной коры (TC), каудальной теменной коры (Каудальная PC), гиппокампа (Hip), мозгового вещества (Med) и затылочной части (OC) животных, получавших AAV9-RE^{GABA}-eTF SCN1A в дозе 4,8E+13 или 8E+13 вг/животное унилатеральным интрацеребровентрикулярным (ICV) введением (Пример 3 и Пример 4). Каждое значение представляет VG/диплоидный геном для образца ткани, и горизонтальные полосы представляют средний VG/диплоидный геном для всех образцов ткани для каждого животного. Средние транскрипты для ARFGAP2 составляли 1,85E+6/мкг РНК и обозначены пунктирной верхней граничной линией. Предел обнаружения обозначен пунктирной нижней граничной линией.

На фиг. 23 показано биораспределение вектора (VG/диплоидный геном) и экспрессия трансгена (транскрипты/мкг РНК) в образцах периферической ткани вне мозга. Показаны образцы периферической ткани: спинной мозг C2/L4 (SC C2/L4), спинномозговой ганглий C2/L4 (DRG C2/L4), печень, селезенка, сердце, почки, легкие, поджелудочная железа и яичко/яичник. Среднее значение VCN (векторное биораспределение) и транскрипта (экспрессия трансгена) в головном мозге приматов показано пунктирной линией.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ОПИСАНИЯ

А. Общие методы

Если в настоящем документе не определено иное, научные и технические термины, изложенные в настоящем документе, имеют значения, которые обычно понимаются специалистами в данной области техники. Как правило, номенклатура, используемая в связи с фармакологией, культурой клеток и тканей, молекулярной биологией, клеточной и онкологической биологией, нейробиологией, нейрохимией, вирусологией, иммунологией, микробиологией, генетикой и химией белков и нуклеиновых кислот, описанными в настоящем документе, хорошо известны и широко используются в данной области техники. В случае противоречия, преимущественную силу имеет настоящее описание, включая определения.

Практика настоящего описания будет использовать, если не указано иное, обычные методы молекулярной биологии (включая рекомбинантные методы), микробиологии,

клеточной биологии, биохимии и иммунологии, которые находятся в пределах квалификации специалиста в данной области техники. Такие методы полностью объяснены в литературе, например, в *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, second edition (Sambrook et al., 1989) Cold Spring Harbor Press; *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait, ed., 1984); *Methods in Molecular Biology*, Humana Press; *Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J.E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; *Animal Cell Culture* (R.I. Freshney, ed., 1987); *Introduction to Cell and Tissue Culture* (J.P. Mather and P.E. Roberts, 1998) Plenum Press; *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* (A. Doyle, J.B. Griffiths, and D.G. Newell, eds., 1993-1998) J. Wiley and Sons; *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J.M. Miller and M.P. Calos, eds., 1987); *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel et al., eds., 1987); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis et al., eds., 1994); Sambrook and Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd. ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (2001); Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (2002); Harlow and Lane *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1998); Coligan et al., *Short Protocols in Protein Science*, John Wiley & Sons, NY (2003); *Short Protocols in Molecular Biology* (Wiley and Sons, 1999).

Ферментативные реакции и методы очистки выполняют в соответствии со спецификациями производителя, как это обычно делается в данной области техники или как описано в настоящем документе. Номенклатуры, используемые в связи с лабораторными процедурами и методами аналитической химии, биохимии, иммунологии, молекулярной биологии, синтетической органической химии, и также медицинской и фармацевтической химии, описанные в настоящем документе, хорошо известны и широко используются в данной области техники. Стандартные методы используют для химического синтеза и химического анализа.

В. Определения

В настоящем описании и вариантах осуществления слово «содержать» или варианты, такие как «содержит» или «содержащий», будет пониматься как означающее включение указанного целого числа или группы целых чисел, но не исключение любого другого целого числа или группы целых чисел.

Понятно, что везде, где в настоящем документе варианты осуществления описаны термином «содержащий», также предусмотрены аналогичные варианты осуществления, описанные терминами «состоящий из» и/или «состоящий по существу из».

Термин «включая» используют для обозначения «включая, но не ограничиваясь ими». «Включая» и «включая, но не ограничиваясь ими» используют взаимозаменяемо.

Любые примеры, следующие за термином «*например*» или «*например*», не являются исчерпывающими или ограничивающими.

Если иное не требуется по контексту, термины в единственном числе должны включать множественное число, а термины во множественном числе должны включать единственное число.

В качестве примера, «элемент» означает один элемент или более одного элемента.

Несмотря на то, что числовые диапазоны и параметры, определяющие широкий объем описания, являются приблизительными, числовые значения, изложенные в конкретных примерах, указаны с максимально возможной точностью. Однако любое числовое значение по своей сути содержит определенные ошибки, обязательно являющиеся результатом стандартного отклонения, обнаруженного в соответствующих испытательных измерениях. Кроме того, следует понимать, что все диапазоны, описанные в настоящем документе, охватывают любые и все входящие в них поддиапазоны. Например, заявленный диапазон от «1 до 10» должен рассматриваться как включающий все и все поддиапазоны между (и включительно) минимальным значением 1 и максимальным значением 10; то есть все поддиапазоны, начинающиеся с минимального значения 1 или более, *например*, от 1 до 6,1, и заканчивающиеся максимальным значением 10 или менее, *например*, от 5,5 до 10.

В тех случаях, когда аспекты или варианты осуществления описания описаны в терминах группы Маркуша или другой группировки альтернатив, настоящее описание охватывает не только всю группу, перечисленную в целом, но и каждого члена группы в отдельности и все возможные подгруппы основной группы, а также в основной группе отсутствует один или несколько членов группы. Настоящее описание также предусматривает явное исключение одного или нескольких членов группы из описания.

Используемые в настоящем документе формы единственного числа предназначены для включения и форм множественного числа, если контекст явно не указывает иное. Кроме того, в той степени, в которой термины «включая», «включает», «имеющий», «имеет», «с» или их варианты используют или в подробном описании и/или в формуле изобретения, такие термины предназначены для включения аналогично термину «содержащий».

Термин «AAV» является сокращением от аденоассоциированного вируса и может использоваться для обозначения самого вируса или его производного. Термин охватывает все серотипы, подтипы, и обе, встречающиеся в природе и рекомбинантные формы, если не требуется иное. Сокращение «rAAV» относится к рекомбинантному аденоассоциированному вирусу. Термин «AAV» включает AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, rh10 и их гибриды, AAV птицы, AAV крупного рогатого скота, AAV собаки, AAV лошади, AAV примата, AAV не примата и AAV овцы. Геномные последовательности различных серотипов AAV, а также последовательности нативных концевых повторов (TR), белков Rep и капсидных субъединиц известны в данной области техники. Такие последовательности можно найти в литературе или в общедоступных базах данных, таких как GenBank. Используемый в настоящем документе термин «вектор rAAV» относится к вектору AAV, содержащему полинуклеотидную последовательность, не происходящую из AAV (*m.e.* полинуклеотид, гетерологичный AAV), обычно последовательность, представляющую интерес для генетической трансформации клетки. Как правило, гетерологичный полинуклеотид

фланкирован, по меньшей мере, одной, и обычно двумя последовательностями инвертированных концевых повторов AAV (ITR). Последовательность ITR является термином, хорошо понятным в данной области техники, и он относится к относительно коротким последовательностям, обнаруживаемым на концах вирусных геномов, которые имеют противоположную ориентацию. Вектор rAAV может быть или одноцепочечным (ssAAV) или самокомплементарным (scAAV). «Вирус AAV» или «вирусная частица AAV» относится к вирусной частице, состоящей, по меньшей мере, из одного капсидного белка AAV и инкапсидированного полинуклеотидного вектора rAAV. Если частица содержит гетерологичный полинуклеотид (*т.е.* полинуклеотид, отличный от генома AAV дикого типа, такой как трансген, который должен быть доставлен в клетку млекопитающего), ее обычно называют «вирусной частицей rAAV» или просто «частицей rAAV».

Термин «примерно» или «приблизительно» означает в пределах приемлемого диапазона ошибок для конкретного значения, как определено обычным специалистом в данной области техники, который будет зависеть отчасти от того, как величина измерена или определена, *т. е.*, ограничений системы измерения. Например, «примерно» может означать в пределах одного или более одного стандартного отклонения в соответствии с практикой в данной области техники. Альтернативно, «примерно» может означать диапазон вплоть до 20%, вплоть до 15%, вплоть до 10%, вплоть до 5% или вплоть до 1% выше и/или ниже данного значения.

Термины «определение», «измерение», «оценка», «оценка», «исследование», «анализ» и их грамматические эквиваленты могут использоваться в настоящем документе взаимозаменяемо для обозначения любой формы измерения и включают определение наличия или отсутствия элемента (например, обнаружение). Эти термины могут включать как количественные, так и/или качественные определения. Оценка может быть относительной или абсолютной.

«Кассета экспрессии» относится к нуклеиновой молекуле, содержащей один или несколько регуляторных элементов, функционально связанных с кодирующей последовательностью (*например*, геном или генами) для экспрессии.

Термин «эффективное количество» или «терапевтически эффективное количество» относится к тому количеству описанной в настоящем документе композиции, которое достаточно для воздействия на предполагаемое применение, включая, но не ограничиваясь ими, лечение заболевания, как определено ниже. Терапевтически эффективное количество может варьироваться в зависимости от предполагаемого лечебного применения (в клетке или *in vivo*) или субъекта и болезненного состояния, которое лечат, *например*, массы тела и возраста субъекта, тяжести болезненного состояния, способа введения и подобных, что может легко определить специалист в данной области техники. Этот термин также применяется к дозе, которая вызовет конкретный ответ в клетке-мишени. Конкретная доза будет варьироваться в зависимости от конкретной выбранной композиции, схемы дозирования, которую необходимо

соблюдать, вводится ли она в комбинации с другими соединениями, времени введения, ткани, в которую ее вводят, и физической системы доставки, в которой она переносится.

«Фрагмент» нуклеотидной или пептидной последовательности относится к фрагменту последовательности, который короче, чем полноразмерная или эталонная последовательность ДНК или белка.

Термин «биологически активный», используемый в настоящем документе для обозначения молекулы, такой как белок, полипептид, нуклеиновая кислота и/или полинуклеотид, означает, что молекула сохраняет, по меньшей мере, одну биологическую активность (функциональную или структурную), которая по существу аналогична биологической активности полноразмерного или эталонного белка, полипептида, нуклеиновой кислоты и/или полинуклеотида.

Термин «in vitro» относится к событию, которое происходит вне тела субъекта. Например, анализ in vitro включает любой анализ, проводимый вне субъекта. Анализы in vitro включают анализы на основе клеток, в которых используют живые или мертвые клетки. Анализы in vitro также включают бесклеточный анализ, в котором не используют интактные клетки.

Термин «in vivo» относится к событию, которое происходит в теле субъекта.

«Выделенная» нуклеиновая кислота относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая была отделена от компонента ее естественной окружающей среды. Выделенная нуклеиновая кислота включает молекулу нуклеиновой кислоты, содержащуюся в клетках, которые обычно содержат молекулу нуклеиновой кислоты, но молекула нуклеиновой кислоты присутствует вне хромосомы, в хромосомной локации, которая отличается от ее естественной хромосомной локации, или содержит только кодирующие последовательности.

Используемые в настоящем документе термины «функционально связанный», «функционально связанный», «функционально связанный» или их грамматические эквиваленты относятся к соседству генетических элементов, *например*, промотора, энхансера, последовательности полиаденилирования и т.д., где элементы находятся во взаимоотношении, позволяющем им функционировать ожидаемым образом. Например, регуляторный элемент, который может включать промоторные и/или энхансерные последовательности, функционально связан с кодирующей областью, если регуляторный элемент помогает инициировать транскрипцию кодирующей последовательности. Между регуляторным элементом и кодирующей областью могут быть промежуточные остатки, пока сохраняется эта функциональная взаимосвязь.

«Фармацевтически приемлемый носитель» относится к ингредиенту фармацевтического состава или композиции, отличному от активного ингредиента, который не токсичен для субъекта. Фармацевтически приемлемый носитель включает, но не ограничен ими, буфер, эксципиент, стабилизатор или консервант.

Термины «фармацевтический состав» или «фармацевтическая композиция» относятся к препарату, который находится в такой форме, которая позволяет

биологической активности содержащегося в нем активного ингредиента быть эффективной, и который не содержит дополнительные компоненты, которые являются неприемлемо токсичными для субъекта, которому будет вводиться состав.

Термин «регуляторный элемент» относится к последовательности нуклеиновой кислоты или генетическому элементу, который способен влиять (*например*, увеличивать, уменьшать или модулировать) экспрессию функционально связанной последовательности, такой как ген. Регуляторные элементы включают, но не ограничены ими, промотор, энхансер, репрессор, сайленсер, инсуляторные последовательности, интрон, UTR, последовательность инвертированного концевой повтора (ITR), последовательность длинного концевой повтора (LTR), элемент стабильности, элемент посттрансляционного ответа или последовательность полиА, или любые их комбинации. Регуляторные элементы могут функционировать на уровне ДНК и/или РНК, *например*, модулируя экспрессию генов в фазе транскрипции, пост-транскрипционной фазе или в трансляционной фазе экспрессии гена; модулируя уровень трансляции (*например*, элементов стабильности, которые стабилизируют иРНК для трансляции), расщепления РНК, сплайсинга РНК и/или терминации транскрипции; рекрутируя транскрипционные факторы в кодирующую область, которые увеличивают экспрессию гена; увеличивая скорость продуцирования РНК транскриптов, увеличивая стабильность продуцируемой РНК и/или увеличивая скорость синтеза белка из РНК транскриптов; и/или предотвращая деградацию РНК и/или повышая ее стабильность для облегчения синтеза белка. В некоторых вариантах осуществления, регуляторный элемент относится к энхансеру, репрессору, промотору или любой их комбинации, в частности, к комбинации энхансера и промотора или комбинации репрессора и промотора. В некоторых вариантах осуществления, регуляторный элемент получают из последовательности человека.

Термины «субъект» и «индивидуум» используют в настоящем документе взаимозаменяемо для обозначения позвоночного животного, предпочтительно, млекопитающего, более предпочтительно, человека. Описанные в настоящем документе способы могут быть полезны в терапии человека, ветеринарии и/или доклинических исследованиях на животных моделях заболевания или состояния.

Используемые в настоящем документе термины «лечить», «лечение», «терапия» и подобные относятся к получению желаемого фармакологического и/или физиологического эффекта, включая, но не ограничиваясь ими, облегчение, отсрочку или замедление прогрессирования, уменьшение эффектов или симптомов, профилактику возникновения, профилактику рецидива, ингибирование, облегчение начала заболевания или нарушения, получение благоприятного или желаемого результата в отношении заболевания, нарушения или медицинского состояния, такого как терапевтический эффект и/или профилактический эффект. «Лечение» в настоящем документе охватывает любое лечение заболевания у млекопитающего, в частности, у человека, и включает: (а) профилактику возникновения заболевания у субъекта, который может быть предрасположен к заболеванию или подвергаться риску приобретения заболевания, но

наличие которого еще не диагностировано; (b) ингибирование заболевания, *т.е.* остановку его развития; и (c) облегчение заболевания, *т.е.* регресса заболевания. Терапевтический эффект включает искоренение или облегчение основного заболевания, подлежащего лечению. Кроме того, терапевтический эффект достигается за счет искоренения или облегчения одного или нескольких физиологических симптомов, ассоциированных с основным заболеванием, так что улучшение наблюдается у субъекта, несмотря на то, что субъект все еще может страдать от основного нарушения. В некоторых случаях, для профилактического эффекта, композиции вводят субъекту с риском развития конкретного заболевания или субъекту, сообщающему об одном или нескольких физиологических симптомах заболевания, даже если диагноз этого заболевания может не быть установлен. Способы настоящего описания можно использовать для любого млекопитающего. В некоторых случаях, лечение может привести к уменьшению или прекращению симптомов. Профилактический эффект включает отсрочку или устранение появления заболевания или состояния, отсрочку или устранение появления симптомов заболевания или состояния, замедление, остановку или обращение вспять прогрессирования заболевания или состояния или любую их комбинацию.

«Вариант» нуклеотидной последовательности относится к последовательности, имеющей генетическое изменение или мутацию по сравнению с наиболее распространенной последовательностью ДНК дикого типа (*например*, кДНК или последовательностью, указанной ее номером доступа в GenBank) или определенной эталонной последовательностью.

Используемый в настоящем документе термин «вектор» относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая может использоваться для опосредования доставки другой молекулы нуклеиновой кислоты, с которой она связана, в клетку, где она может реплицироваться или экспрессироваться. Термин включает вектор как самореплицирующуюся структуру нуклеиновой кислоты, а также вектор, включенный в геном клетки-хозяина, в которую он был введен. Некоторые векторы способны направлять экспрессию нуклеиновых кислот, с которыми они функционально связаны. Такие векторы называют в настоящем документе «векторами экспрессии». Другие примеры векторов включают плазмиды, вирусные векторы и космиды.

В общем, «идентичность последовательностей» или «гомология последовательностей», которые могут использоваться взаимозаменяемо, относятся к точному соответствию нуклеотид-нуклеотид или аминокислота-аминокислота двух полинуклеотидных или полипептидных последовательностей, соответственно. Две или несколько последовательностей (полинуклеотид или аминокислота) можно сравнивать путем определения их «доли идентичности», также называемой «долей гомологии». Доля идентичности к эталонной последовательности (*например*, последовательности нуклеиновой кислоты или аминокислоты) может быть рассчитана как количество точных совпадений между двумя оптимально выровненными последовательностями, деленное на длину эталонной последовательности и умноженное на 100. Консервативные замены не

считаются совпадениями при определении количества совпадений для идентичности последовательности. Следует понимать, что если длина первой последовательности (А) не равна длине второй последовательности (В), доля идентичности последовательности А:В будет отличаться от доли идентичности последовательности В:А. Выравнивание последовательностей, например, с целью оценки доли идентичности, может выполняться любым подходящим алгоритмом или программой выравнивания, включая, но не ограничиваясь ими, алгоритм Нидлмана-Вунша (см., *например*, выравниватель EMBOSS Needle, доступный во интернете по адресу ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/), алгоритм BLAST (см., *например*, инструмент выравнивания BLAST, доступный в интернете по адресу blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi), алгоритм Смита-Уотермана (см., *например*, выравниватель EMBOSS Water, доступный в интернете по адресу ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_water/) и программу выравнивания Clustal Omega (см., *например*, интернет clustal.org/omega/ и F. Sievers et al., Mol Sys Biol. 7: 539 (2011)). Оптимальное выравнивание можно оценить с использованием любых подходящих параметров выбранного алгоритма, включая параметры по умолчанию. Программа BLAST основана на методе выравнивания Karlin and Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268 (1990) и как описано в Altschul, et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990); Karlin and Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877 (1993); and Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 (1997).

Если не указано иное, все термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, что и для специалиста в данной области техники, и в практике настоящего изобретения будут использоваться традиционные методы молекулярной биологии, микробиологии и технологии рекомбинантных ДНК, которые находятся в компетенции специалиста в данной области техники.

С. Конструкции нуклеиновых кислот

В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к способам введения вектора, содержащего селективный к клеточному типу регуляторный элемент. В некоторых вариантах осуществления, вектор содержит регуляторный элемент. В некоторых вариантах осуществления, регуляторный элемент приводит к увеличению экспрессии трансгена, по меньшей мере, 2-кратно по сравнению с экспрессией трансгена, когда он функционально связан с промотором CMV. В некоторых вариантах осуществления, способы включают введение векторов (*например*, AAV9), содержащих нуклеотидную последовательность (*например*, нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид), функционально связанную с регуляторным элементом. Таким образом, в некоторых аспектах, в настоящем документе представлены компоненты нуклеиновых кислот и композиции, полезные для практического применения способов настоящего описания.

В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновой кислотой является молекула ДНК. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновой кислотой является молекула РНК. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновой кислотой является молекула

ДНК в любом из векторов, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, молекула нуклеиновой кислоты содержит любой из трансгенов, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, молекула нуклеиновой кислоты содержит любой из регуляторных элементов, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, нуклеиновой кислотой является молекула ДНК, содержащая любой из трансгенов, описанных в настоящем документе, и любой из регуляторных элементов, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, молекулой нуклеиновой кислоты является молекула нуклеиновой кислоты РНК, содержащая любой из трансгенов, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, молекула РНК транскрибируется с любой из молекул ДНК, описанных в настоящем документе (*например*, молекулой ДНК, содержащей любой из трансгенов и регуляторных элементов, описанных в настоящем документе). В некоторых вариантах осуществления, молекула РНК транскрибируется с любой из молекул ДНК, описанных в настоящем документе (*например*, молекулой ДНК, содержащей любой из трансгенов и регуляторных элементов, описанных в настоящем документе), при этом молекула РНК содержит трансгенную последовательность.

1. Трансгены

В некоторых вариантах осуществления, любая из представленных в настоящем документе молекул нуклеиновых кислот, которые можно использовать в соответствии с настоящими способами, содержит трансгенную последовательность, функционально связанную с регуляторным элементом для использования в описанных в настоящем документе способах. В некоторых вариантах осуществления, трансгены настоящих композиций и способов можно использовать для ингибирования или лечения одного или нескольких симптомов, связанных с нейрональным заболеванием (*например*, синдромом Драве).

Любой представляющий интерес трансген может быть сконструирован и использован в настоящих способах. В некоторых вариантах осуществления, трансген содержит модифицированную нуклеотидную последовательность (*например*, альтернативные кодоны) по сравнению с эталонной нуклеотидной последовательностью. В некоторых вариантах осуществления, трансген может быть сконструирован так, чтобы обладать определенными полезными свойствами, *например*, экспрессируемый трансген специфически экспрессируется в подмножестве клеток, которые терапевтически релевантны заболеванию (*например*, болезни Альцгеймера). В некоторых вариантах осуществления, трансгеном является молекула нуклеиновой кислоты ДНК. В некоторых вариантах осуществления, трансгеном является молекула нуклеиновой кислоты РНК, которая была транскрибирована с любой из молекул нуклеиновой кислоты ДНК, описанных в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления, трансген кодирует терапевтический белок. В некоторых вариантах осуществления, экспрессия терапевтического белка у субъекта (*например*, примата) снижает риск развития заболевания или нарушения (*например*,

неврологического заболевания или нарушения). В некоторых вариантах осуществления, трансген кодирует версию белка дикого типа и может вводиться субъекту, экспрессирующему мутантную версию белка. В некоторых вариантах осуществления, трансген кодирует версию белка дикого типа и может вводиться субъекту для повышения уровней экспрессии версии белка дикого типа у субъекта. В некоторых вариантах осуществления, трансген кодирует мутантную форму белка, где мутантный белок ассоциирован с повышенной или конститутивной активностью по сравнению с версией белка дикого типа. В некоторых вариантах осуществления, трансген кодирует конкретную изоформу белка, где экспрессия конкретной изоформы белка у субъекта ассоциирована со сниженным риском развития заболевания или нарушения (*например*, апополипротеина E2 человека). В некоторых вариантах осуществления, конкретную изоформу белка вводят субъекту, экспрессирующему вредную изоформу того же белка (*например*, апополипротеин E4 человека).

В некоторых вариантах осуществления, трансген содержит последовательность, кодирующую полипептид. В некоторых вариантах осуществления, трансген содержит последовательность, кодирующую полипептид, редактирующий ген. В некоторых вариантах осуществления, полипептидом, кодированным трансгеном, является ДНК-связывающий белок. В некоторых вариантах осуществления, ДНК-связывающий белок выбран из группы, состоящей из цинкового пальца (ZFP), цинк-пальцевой нуклеазы (ZFN) и нуклеазы на основе эффектора, подобного активатору транскрипции (TALEN). В некоторых вариантах осуществления, трансген содержит нуклеотидную последовательность, которая является кодон-оптимизированным вариантом и/или его фрагментом.

В некоторых вариантах осуществления, трансген содержит последовательность, кодирующую направляющую РНК (нРНК). В некоторых вариантах осуществления, трансген содержит последовательность, кодирующую нРНК, функционально связанную с регуляторным элементом. В некоторых вариантах осуществления, направляющая РНК может использоваться в комбинации с РНК-управляемым агентом, связывающим ДНК (*например*, Cas нуклеазой) и донорной конструкцией. В некоторых вариантах осуществления, донорская конструкция может использоваться с системой редактирования генов (*например*, системой CRISPR/Cas; системой ZFN; системой TALEN).

Используемые в настоящем документе термины «направляющая РНК» и «нРНК» используют в настоящем документе взаимозаменяемо для обозначения либо крРНК (также известной как CRISPR РНК), либо комбинации крРНК и трРНК (также известной как тракрРНК). крРНК и трРНК могут быть ассоциированы в виде одной молекулы РНК (одиночная направляющая РНК, онРНК) или в виде двух отдельных молекул РНК (двойная направляющая РНК, днРНК). «Направляющая РНК» или «нРНК» относится к форматам как одинарной направляющей РНК, так и двойной направляющей РНК. трРНК может быть существующей в природе последовательностью или последовательностью трРНК с модификациями или вариациями по сравнению с существующими в природе

последовательностями. Направляющие РНК, такие как онРНК или днРНК, могут включать модифицированные РНК, как описано в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления, трансген содержит последовательность, кодирующую антисмысловой олигонуклеотид. В некоторых вариантах осуществления, трансген содержит последовательность, кодирующую антисмысловой олигонуклеотид, функционально связанный с регуляторным элементом. В некоторых вариантах осуществления, антисмысловой олигонуклеотид снижает экспрессию гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления, трансген кодирует антисмысловой олигонуклеотид, который таргетирует ген, связанный с нарушением ЦНС, такой как, например, потенциалзависимый ионный канал или его субъединицу. Потенциалзависимые ионные каналы включают натриевые каналы, кальциевые каналы, калиевые каналы и протонные каналы. Примеры субъединиц потенциалзависимых натриевых каналов включают SCN1B (NM_001037.4), SCN1A (NM_001165963.1), SCN2B, (NM_004588.4), SCN2A, SNC8A, KV3.1, KV3.2 или KV3.3. В некоторых вариантах осуществления, трансген кодирует антисмысловой олигонуклеотид, который таргетирует пре-иРНК SCN1A или SCN8A, или природный антисмысловой полинуклеотид SCN1A.

В некоторых вариантах осуществления, заявка представляет трансген, кодирующий антисмысловой олигонуклеотид, который таргетирует или способен активировать регулятор нейротрансмиттера. Регулятор нейротрансмиттера может быть вовлечен в регулирование продуцирования или высвобождения нейротрансмиттера в ЦНС. Например, регулятор нейротрансмиттера может способствовать синаптическому слиянию для высвобождения нейротрансмиттеров. Примером регулятора нейротрансмиттера является STXBP1 (NM_001032221.3).

В некоторых вариантах осуществления, в заявке представлены трансгены, кодирующие антисмысловой олигонуклеотид, функционально связанный с селективным к клеточному типу регуляторным элементом, где антисмысловой олигонуклеотид способен активировать экспрессию или функцию представляющего интерес гена, такого как потенциалзависимый ионный канал или его субъединица. В некоторых вариантах осуществления, заявка представляет трансгены, кодирующие антисмысловые олигонуклеотиды, которые способствуют сплайсингу пре-иРНК потенциалзависимого натриевого канала, которая имеет удерживаемый интрон. В другом варианте осуществления, заявка представляет трансгены, кодирующие антисмысловые олигонуклеотиды, которые модулируют сплайсинг пре-иРНК потенциалзависимого натриевого канала. В другом варианте осуществления, заявка представляет трансгены, кодирующие антисмысловые олигонуклеотиды, таргетирующие природные антисмысловые полинуклеотиды потенциалзависимого натриевого канала. В некоторых вариантах осуществления, трансген кодирует антисмысловой олигонуклеотид, который способен активировать экспрессию или функцию SCN1A. В некоторых вариантах осуществления, трансген кодирует антисмысловой олигонуклеотид, который способен подавлять экспрессию или функцию SCN8A.

В некоторых вариантах осуществления, заявка представляет трансгены, кодирующие антисмысловой олигонуклеотид, который способствует проскоку экзона, включению экзона, удалению удерживаемого интрона или эрадикации, деградации или инактивации вредоносных иРНК гена-мишени, или эрадикации, деградации или инактивации природного антисмыслового полинуклеотид гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления, геном-мишенью является SCN1A или SCN8A. Разные антисмысловые олигонуклеотиды, подходящие для использования в связи с описанными в настоящем документе композициями и способами, можно найти, например, в US 2017/0240904, US 9,771,579, WO 2017/106377, US 9,976,143 и WO 2017/106382.

Используемый в настоящем документе термин «антисмысловой олигонуклеотид» относится к олигонуклеотидам (*например*, РНК, ДНК, их миметикам, химерам, аналогам или гомологам), рибозимам, олигонуклеотидам с внешней вспомогательной последовательностью (EGS), соединениям интерферирующей одно- или двухцепочечной РНК (РНКи), таким как короткая интерферирующая РНК (киРНК), микроинтерферирующая РНК (миРНК), малая временная РНК (мвРНК), короткая шпилечная РНК (кшРНК), активация генов, индуцированная малой РНК (РНКа), малая активирующая РНК (маРНК) или малая ядерная РНК (мяРНК), такая как U1 или U7 мяРНК, и другие олигомерные соединения, которые гибридизуются, по меньшей мере, с частью нуклеиновой кислоты-мишени и модулируют ее функцию. По существу, антисмысловым олигонуклеотидом может быть ДНК, РНК, ДНК-подобный, РНК-подобный или их смеси, или может быть миметиком одной или нескольких из них. Антисмысловые олигонуклеотиды могут быть одноцепочечными, двухцепочечными, кольцевыми или шпилечными олигомерными соединениями и могут содержать структурные элементы, такие как внутренние или концевые выпетливания, ошибочные спаривания или петли. Двухцепочечные антисмысловые олигонуклеотиды могут быть образованы гибридизацией двух цепей с образованием полностью или частично двухцепочечного олигонуклеотида или одной цепи с достаточной самокомплементарностью, чтобы позволить гибридизацию и образование полностью или частично двухцепочечного олигонуклеотида. Две нити могут быть связаны внутри, оставляя свободные 3' или 5' концы, или могут быть связаны с образованием непрерывной шпилечной структуры или петли. Шпилечная структура может содержать «липкий» конец на 5' или 3' конце, создающий продолжение одноцепочечного признака. Двухцепочечные антисмысловые олигонуклеотиды необязательно могут включать «липкие» концы на концах. При образовании только одной цепи, дцРНК может принимать форму самокомплементарной шпилечной молекулы, которая удваивается с образованием дуплекса. Таким образом, дцРНК могут быть полностью или частично двухцепочечными. Специфическая модуляция экспрессии генов может быть достигнута за счет стабильной экспрессии антисмысловых олигонуклеотидов РНК в трансгенных клеточных линиях или с помощью генной терапии. При образовании из двух цепей или из одной цепи, которая принимает форму самокомплементарной шпилечной молекулы, удваивающейся с

образованием дуплекса, две цепи (или дуплекс-образующие области одной цепи) являются комплементарными цепями РНК, которые спариваются по Уотсону-Крику. В некоторых вариантах осуществления, антисмысловыми олигонуклеотидами, представленными в настоящем документе, являются одноцепочечные олигонуклеотиды РНК. В некоторых вариантах осуществления, одноцепочечные антисмысловые РНК представлены как часть модифицированной молекулы huU7 мРНК.

В различных вариантах осуществления, антисмысловой олигонуклеотид, кодируемый трансгеном, как представлено в настоящем документе, может быть полностью или частично комплементарным гену-мишени или последовательности-мишени. В некоторых вариантах осуществления, гомология, идентичность последовательностей или комплементарность между антисмысловым олигонуклеотидом и последовательностью-мишенью составляет от примерно 40% до примерно 60%. В некоторых вариантах осуществления, гомология, идентичность последовательностей или комплементарность составляет от примерно 60% до примерно 70%. В некоторых вариантах осуществления, гомология, идентичность последовательностей или комплементарность составляет от примерно 70% до примерно 80%. В некоторых вариантах осуществления, гомология, идентичность последовательностей или комплементарность составляет от примерно 80% до примерно 90%. В некоторых вариантах осуществления, гомология, идентичность последовательностей или комплементарность составляет около 90%, около 92%, около 94%, около 95%, около 96%, около 97%, около 98%, около 99% или около 100%.

В некоторых вариантах осуществления, трансген содержит последовательность, кодирующую РНК (РНКи). В некоторых вариантах осуществления, трансген содержит последовательность, кодирующую РНК, функционально связанную с регуляторным элементом. В некоторых вариантах осуществления, РНКи снижает экспрессию гена-мишени. В некоторых вариантах осуществления, РНКи снижает экспрессию гена-мишени, выбранного из группы, состоящей из SOD1, НТТ, Тау или альфа-синуклеина. Используемый в настоящем документе термин «РНКи» относится к РНК (или ее аналогу), имеющей достаточную комплементарность последовательности с РНК-мишенью, чтобы направлять интерференцию РНК.

2. Регуляторные элементы

Регуляторные элементы могут функционировать на уровне ДНК и/или РНК. Регуляторные элементы могут функционировать для модулирования селективности экспрессии генов в интересующем типе клеток. Регуляторные элементы могут функционировать для модулирования экспрессии генов в фазе транскрипции, посттранскрипционной фазе или в фазе трансляции экспрессии генов. Регуляторные элементы включают, но не ограничиваются ими, промотор, энхансер, интронные или другие не кодирующие последовательности. На уровне РНК регуляция может происходить на уровне трансляции (*например*, элементы стабильности, которые стабилизируют иРНК для трансляции), расщепления РНК, сплайсинга РНК и/или

терминации транскрипции. В некоторых случаях, регуляторные элементы могут рекрутировать факторы транскрипции в кодирующую область, что увеличивает селективность экспрессии генов в представляющем интерес типе клеток. В некоторых случаях, регуляторные элементы могут увеличивать скорость продуцирования РНК транскриптов, повышать стабильность продуцируемой РНК и/или увеличивать скорость синтеза белка из РНК транскриптов.

Регуляторными элементами являются последовательности нуклеиновых кислот или генетические элементы, которые способны влиять (*например*, увеличивать) экспрессию гена (*например*, репортерного гена, такого как EGFP или люцифераза; трансгена; или терапевтического гена) в одном или нескольких типах клеток или ткани. В некоторых случаях, регуляторным элементом может быть трансген, интрон, промотор, энхансер, UTR, последовательность инвертированного концевой повтора (ITR), последовательность длинного концевой повтора (LTR), элемент стабильности, элемент посттрансляционного ответа или последовательность полиА или их комбинация. В некоторых случаях, регуляторным элементом является промотор, энхансер, интронная последовательность или их комбинация. В некоторых случаях, регуляторный элемент получен из последовательности человека (*например*, hg19).

В некоторых случаях, регуляторный элемент по настоящему описанию приводит к высокой или повышенной экспрессии функционально связанного трансгена, где высокая или повышенная экспрессия определяется по сравнению с контролем, *например*, конститутивным промотором, CMV промотором, CAG, супер-коровым промотором (SCP), TTR промотором, Proto 1 промотором, UCL-HLP промотором, minCMV промотором, EFS или CMVe промотором. Другие средства контроля, которые можно использовать для определения высокой или повышенной экспрессии трансгена с помощью описанного в настоящем документе регуляторного элемента, включают только буфер или только вектор. В некоторых случаях, положительный контроль относится к RE с известной активностью экспрессии, такой как SEQ ID NO: 39, которую можно использовать для сравнения. В некоторых случаях, регуляторный элемент управляет сравнимой или более высокой экспрессией трансгена по сравнению с положительным контролем (*например*, SEQ ID NO: 39 или известным промотором, функционально связанный с трансгеном).

В некоторых вариантах осуществления, вектор содержит нуклеотидную последовательность, функционально связанную с регуляторным элементом. В некоторых вариантах осуществления, нуклеотидная последовательность функционально связана с регуляторным элементом, имеющим меньше или равно 400 пар оснований (п.о.), 300 п.о., 250 п.о., 200 п.о., 150 п.о., 140 п.о., 130 п.о., 120 п.о., 110 п.о., 100 п.о., 70 п.о. или 50 п.о. В некоторых вариантах осуществления, регуляторным элементом является любая из или их комбинация: любая из SEQ ID NO: 1-29, CBA, CMV, SCP, SERpE_TTR, Proto1, minCMV, UCL-HLP, CMVe, CAG или EFS. В некоторых вариантах осуществления, регуляторным элементом является любая из или комбинация SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, CBA или minCMV. В некоторых вариантах осуществления, регуляторным элементом

является SEQ ID NO: 33. В некоторых вариантах осуществления, регуляторным элементом является СВА. В некоторых вариантах осуществления, регуляторным элементом является minCMV. В некоторых вариантах осуществления, вектор, описанный в настоящем документе, содержит промотор, имеющий любую из SEQ ID NO: 1-40 (как показано ниже в таблицах 5 и 6), функционально связанную с любым трансгеном, *например*, связывающим ДНК белком. В некоторых вариантах осуществления, регуляторный элемент является селективным к клеточному типу. В некоторых вариантах осуществления, регуляторный элемент селективно экспрессируется в нейрональных клетках. В некоторых вариантах осуществления, регуляторный элемент селективно экспрессируется в нейрональных клетках, выбранных из группы, состоящей из униполярных, биполярных, мультиполярных или псевдоуниполярных нейронов. В некоторых вариантах осуществления, регуляторный элемент селективно экспрессируется в ГАВА-ергических нейронах. В некоторых вариантах осуществления, регуляторный элемент селективно экспрессируется в глиальных клетках. В некоторых вариантах осуществления, глиальной клеткой является любой из следующих типов глиальных клеток: астроциты, олигодендроциты, эпендимальные клетки, шванновские клетки или амфицитные клетки. В некоторых вариантах осуществления, регуляторный элемент селективно экспрессируется в клетках микроглии. В некоторых вариантах осуществления, регуляторный элемент селективно экспрессируется в ненейрональных клетках.

В некоторых вариантах осуществления, регуляторный элемент получен из регуляторного элемента человека. В некоторых вариантах осуществления, считается, что последовательность получена от человека, если она имеет, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 91%, по меньшей мере, 92%, по меньшей мере, 93%, по меньшей мере, 94%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 96%, по меньшей мере, 97%, по меньшей мере, 98%, по меньшей мере, 99% или 100% идентичность с последовательностью человека. В некоторых случаях, регуляторный элемент содержит последовательность, полученную от человека, и последовательность, полученную не от человека, так что в целом регуляторный элемент имеет низкую идентичность последовательности с геномом человека, в то время как часть регуляторного элемента имеет 100% идентичность последовательности (или локальную идентичность последовательности) с последовательностью в геноме человека.

В некоторых вариантах осуществления, в настоящем описании представлено множество регуляторных элементов, которые могут быть функционально связаны с любым трансгеном для увеличения или улучшения селективности экспрессии трансгена в ЦНС, *например*, в PV нейронах. Увеличивая селективность экспрессии гена с использованием одного или нескольких описанных в настоящем документе регуляторных элементов, можно повысить эффективность генной терапии, снизить эффективную дозу, необходимую для достижения терапевтического эффекта, минимизировать побочные эффекты или эффект вне мишени и/или увеличить безопасность и/или толерантность для пациента.

В одном аспекте, один или несколько регуляторных элементов могут быть функционально связаны с любым трансгеном в кассете экспрессии для модулирования экспрессии гена в клетке, например, таргетной экспрессии трансгена в типе клетки-мишени или ткани-мишени (например, в PV клетках) по сравнению с одним или несколькими типами клеток или тканей, не являющихся мишенями (например, не-PV типами клеток ЦНС). В некоторых случаях, таргетная экспрессия трансгена в типе клетки-мишени или ткани-мишени включает повышенную экспрессию гена в типе клетки-мишени или ткани-мишени.

В некоторых случаях, функциональное связывание одного или нескольких регуляторных элементов с геном приводит к таргетной экспрессии гена в ткани-мишени или типе клеток-мишеней в ЦНС, таких как нейрон парвальбумина (PV). В некоторых случаях, один или несколько регуляторных элементов (например, SEQ ID NO: 41-75, или ее функциональный фрагмент или их комбинация, или последовательности, имеющие, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95% или по меньшей мере, 99% идентичность последовательности) повышают селективность экспрессии гена в ткани-мишени или типе клеток-мишеней в ЦНС, таких как PV нейроны. В некоторых случаях, генная терапия включает один или несколько описанных в настоящем документе регуляторных элементов, где регуляторные элементы функционально связаны с трансгеном и управляют селективной экспрессией трансгена в PV нейронах.

В некоторых случаях, селективную экспрессию гена в PV нейронах используют для лечения заболевания или состояния, ассоциированного с гаплонедостаточностью и/или генетическим дефектом в эндогенном гене, где генетический дефект может быть мутацией в гене или дисрегуляцией гена. Такой генетический дефект может привести к снижению уровня генного продукта и/или генного продукта с нарушенной функцией и/или активностью. В некоторых случаях, кассета экспрессии содержит ген, его субъединицу, вариант или функциональный фрагмент, причем экспрессия гена из кассеты экспрессии используют для лечения заболевания или состояния, связанного с генетическим дефектом, нарушенной функцией и/или активностью, и/или дисрегуляцией эндогенного гена. В некоторых случаях, заболеванием или состоянием является синдром Драве, болезнь Альцгеймера, эпилепсия, нейродегенерация, таупатия, гиповозбудимость нейронов и/или судороги.

В некоторых случаях, любой один или несколько регуляторных элементов, описанных в настоящем документе, дают повышенную селективность экспрессии гена в клетке парвальбумина. В некоторых случаях, описанные в настоящем документе регуляторные элементы являются селективными к PV-клеткам. В некоторых случаях, селективные регуляторные элементы PV-клеток ассоциированы с селективной экспрессией генов в PV-клетках в большей степени, чем экспрессией в не-PV-клетках ЦНС. В некоторых случаях, селективные регуляторные элементы PV-клеток ассоциированы со сниженной экспрессией генов в не-PV-клетках ЦНС. Неограничивающие примеры регуляторных элементов включают SEQ ID NO: 41-75, как

представлено в таблице 7.

В некоторых вариантах осуществления, вектор содержит нуклеотидную последовательность, функционально связанную с регуляторным элементом, где регуляторный элемент приводит к увеличению экспрессии трансгена, по меньшей мере, 2-кратно по сравнению с экспрессией трансгена, когда он функционально связан с промотором CMV. В некоторых вариантах осуществления, промоторная последовательность дает, по меньшей мере, 5-кратное, 10-кратное, 15-кратное, 20-кратное, 25-кратное, 30-кратное, 35-кратное, 40-кратное, 45-кратное, 50-кратное, 55-кратное, 60-кратное, 65-кратное, 70-кратное или 75-кратное, или, по меньшей мере, 20-90-кратное, 20-80-кратное, 20-70-кратное, 20-60-кратное, 30-90-кратное, 30-80-кратное, 30-70-кратное, 30-60-кратное, 40-90-кратное, 40-80-кратное, 40-70-кратное, 40-60-кратное, 50-90-кратное, 50-80-кратное, 50-70-кратное, 50-60-кратное, 60-90-кратное, 60-80-кратное, 60-70-кратное, 70-90-кратное, 70-80-кратное, 80-90-кратное увеличение экспрессии трансгенной последовательности в клетке млекопитающего по сравнению с уровнем экспрессии той же трансгенной последовательности из промотора CMV в том же типе клетки млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления, промоторная последовательность управляет экспрессией последовательности трансгена в высокой доле нейронных клеток, *например*, по меньшей мере, 20%, 25%, 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или больше, или, по меньшей мере, 20-90%, 20-80%, 20-70%, 30-90%, 30-80%, 30-70%, 40-90%, 40-80%, 40-70%, 50-90%, 50-80%, 50-70%, 60-90%, 60-80%, 60-70%, 70-90%, 70-80%, 80-100%, 80-95%, 80-90%, 90-100% или 90-95% ГАВА-ергических клеток, содержащих вектор, экспрессируют трансген. В некоторых вариантах осуществления, промоторная последовательность управляет экспрессией трансгена в высокой доле глиальных клеток, *например*, по меньшей мере, 20%, 25%, 30%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или больше, или, по меньшей мере, 20-90%, 20-80%, 20-70%, 30-90%, 30-80%, 30-70%, 40-90%, 40-80%, 40-70%, 50-90%, 50-80%, 50-70%, 60-90%, 60-80%, 60-70%, 70-90%, 70-80%, 80-100%, 80-95%, 80-90%, 90-100% или 90-95% олигодендроцитов, содержащих вектор, экспрессируют трансген.

В некоторых аспектах, кассета экспрессии AAV содержит регуляторный элемент человеческого происхождения длиной не более 120 по, функционально связанный с трансгеном размером, по меньшей мере, 3 т.о., где регуляторный элемент приводит к увеличению экспрессии трансгена, по меньшей мере, 2-кратно по сравнению с экспрессией трансгена, когда он функционально связан с промотором CMV. В некоторых случаях, экспрессия трансгена увеличивается, по меньшей мере, 50-кратно. В некоторых случаях, экспрессия трансгена увеличивается, по меньшей мере, 100-кратно. В некоторых случаях, повышенная экспрессия трансгена происходит по меньшей мере, в 2 различных типах клеток (*например*, в возбуждающих нейронах и тормозных нейронах). В некоторых случаях, повышенная экспрессия трансгена происходит, по меньшей мере, в 3 различных

типах клеток (*например*, в возбуждающих нейронах, тормозных нейронах и клетках печени).

В некоторых случаях, такая высокая экспрессия трансгена в клетке или *in vivo* связана с экспрессией трансгена без указанных регуляторных элементов, где экспрессия трансгена с регуляторными элементами является, по меньшей мере, 1,5-кратной, по меньшей мере, 2-кратной, по меньшей мере, 3-кратной, минимум 4-кратной, минимум 5-кратной, по меньшей мере, 6-кратной, по меньшей мере, 7-кратной, по меньшей мере, 8-кратной, по меньшей мере, 9-кратной, по меньшей мере, 10-кратной, по меньшей мере, 15-кратной, по меньшей мере, 20-кратной, по меньшей мере, 25-кратной, по меньшей мере, 50-кратной, по меньшей мере, 100-кратной, по меньшей мере, 150-кратной, по меньшей мере, 200-кратной, по меньшей мере, 250-кратной, по меньшей мере, 300-кратной, по меньшей мере, 400-кратной, по меньшей мере, 500-кратной, по меньшей мере, 600-кратной, по меньшей мере, 700-кратной, по меньшей мере, в 800-кратной, по меньшей мере, в 900-кратной, по меньшей мере, 1000-кратной, по меньшей мере, 1010-кратной, по меньшей мере, 1020-кратной, по меньшей мере, 1030-кратной, по меньшей мере, 1040-кратной или, по меньшей мере, 1050-кратной по сравнению с экспрессией трансгена без регуляторных элементов или по сравнению с экспрессией трансгена отрицательным контролем (*например*, только буфером, одним вектором или вектором, содержащим последовательность, известную отсутствием экспрессионной активности).

В некоторых случаях, один или несколько регуляторных элементов приводят к высокой экспрессии трансгена в, по меньшей мере, 2, по меньшей мере, 3, по меньшей мере, 4, по меньшей мере, 5, по меньшей мере, 6, по меньшей мере, 7, по меньшей мере, 8, по меньшей мере, 9 или по меньшей мере, 10 различных типах клеток. В некоторых случаях, один или несколько регуляторных элементов этого описания функционально связаны с трансгеном для лечения генной терапией, адаптированного для системного введения. В некоторых случаях, один или несколько регуляторных элементов этого описания функционально связаны с трансгеном для лечения генной терапией, адаптированного для введения в центральную нервную систему. В некоторых случаях, один или несколько регуляторных элементов этого описания функционально связаны с трансгеном для лечения генной терапией, адаптированного для введения в спинномозговую жидкость. В некоторых случаях, один или несколько регуляторных элементов этого описания функционально связаны с трансгеном для лечения генной терапией, адаптированного для экспрессии в нейронах или глиии.

D. Векторы

В некоторых вариантах осуществления, в описании представлен вектор (*например*, любой из векторов, описанных в настоящем документе), содержащий любую из молекул нуклеиновой кислоты, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, вектором является вирусный вектор (*например*, аденоассоциированный вирусный вектор). В некоторых вариантах осуществления, вектором является вирусная частица. В некоторых вариантах осуществления, вектором является не вирусный вектор. В

некоторых вариантах осуществления, любой из описанных в настоящем документе способов можно использовать для введения любого из векторов, описанных в настоящем документе, субъекту (*например*, примату).

В некоторых вариантах осуществления, описанные в настоящем документе молекулы нуклеиновой кислоты предоставляются (или доставляются) в клетки или ткань *in vitro* или *in vivo* с использованием различных известных и подходящих способов, доступных в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления, описанные в настоящем документе молекулы нуклеиновой кислоты предоставляются (или доставляются) в клетки или ткань *in vitro* или *in vivo* с использованием описанных в настоящем документе способов. Обычные вирусные и не вирусные способы доставки генов могут применяться для введения описанных в настоящем документе молекул нуклеиновых кислот в клетки (*например*, нейрональные клетки) и ткани-мишени. Не вирусные векторные системы экспрессии включают векторы нуклеиновых кислот, такие как, *например*, линейные олигонуклеотиды и кольцевые плазмиды; искусственные хромосомы, такие как искусственные хромосомы человека (НАС), искусственные хромосомы дрожжей (УАС) и искусственные хромосомы бактерий (ВАС или РАС)); эписомальные векторы; транспозоны (*например*, PiggyBac); и космиды. Системы доставки вирусных векторов включают ДНК и РНК вирусы, такие как, *например*, ретровирусные векторы, лентивирусные векторы, аденовирусные векторы и аденоассоциированные вирусные векторы. Способы включения молекул нуклеиновой кислоты, описанных в настоящем документе, в любую из не вирусных или вирусных систем экспрессии известны специалистам в данной области техники.

Способы и композиции для не вирусной доставки нуклеиновых кислот известны в данной области техники, включая физические и химические способы. Физические способы обычно относятся к способам доставки, использующим физическую силу для противодействия барьеру клеточной мембраны для облегчения внутриклеточной доставки генетического материала. Примеры физических способов включают использование иглы, баллистической ДНК, электропорации, сонопорации, фотопорации, магнитофекции и гидропорации. Химические способы обычно относятся к способам, в которых химические носители доставляют молекулу нуклеиновой кислоты в клетку, и могут включать неорганические частицы, носители на основе жиров, носители на основе полимеров и носители на основе пептидов.

В некоторых вариантах осуществления, не вирусный вектор экспрессии вводят в клетку-мишень с использованием неорганической частицы. Неорганические частицы могут относиться к наночастицам, таким как наночастицы, которые сконструированы для различных размеров, форм и/или пористости для выхода из ретикулоэндотелиальной системы или для защиты захваченной молекулы от разрушения. Неорганические наночастицы могут быть получены из металлов (*например*, железа, золота и серебра), неорганических солей или керамики (*например*, фосфатов или карбонатов кальция, магния или кремния). Поверхность этих наночастиц может быть покрыта для облегчения

связывания ДНК или таргетной доставки генов. Также могут использоваться магнитные наночастицы (*например*, супермагнитный оксид железа), фуллерены (*например*, молекулы растворимого углерода), углеродные нанотрубки (*например*, цилиндрические фуллерены), квантовые точки и супрамолекулярные системы.

В некоторых вариантах осуществления, не вирусный вектор экспрессии вводят в клетку-мишень с использованием катионного жира (*например*, катионной липосомы). Для доставки генов были исследованы различные типы жиров, такие как, например, жировая наноземля (*например*, которая является дисперсией одной несмешиваемой жидкости в другой, стабилизированной эмульгирующим агентом) или твердые жировые наночастицы. В некоторых вариантах осуществления, не вирусный вектор экспрессии может быть доставлен с использованием жировых наночастиц (LNP). В некоторых вариантах осуществления, LNP содержат катионные липиды. В некоторых вариантах осуществления, LNP содержат (9Z,12Z)-3-((4,4-бис(октилокси)бутаноил)окси)-2-(((3-(диэтиламино)пропокси)карбонил)окси)метил)пропил(октадека-9,12-диеноат, также называемый 3-((4,4-бис(октилокси)бутаноил)окси)-2-(((3-(диэтиламино)пропокси)карбонил)окси)метил)пропил(9Z,12Z)-октадека-9,12-диеноат) или другой ионизируемый жир. См., *например*, жиры из WO2017/173054, WO2015/095340 и WO2014/136086, а также ссылки, приведенные в них.

В некоторых вариантах осуществления, не вирусный вектор экспрессии вводят в клетку-мишень с использованием средства доставки на основе пептида. Средства доставки на основе пептидов могут иметь преимущества, заключающиеся в защите доставляемого генетического материала, таргетировании специфических клеточных рецепторов, разрушающих эндосомные мембраны, и доставке генетического материала в ядро. В некоторых вариантах осуществления, не вирусный вектор экспрессии вводят в клетку-мишень с использованием средства доставки на основе полимера. Средства доставки на основе полимеров могут содержать природные белки, пептиды и/или полисахариды или синтетические полимеры. В одном варианте осуществления, средство доставки на основе полимера содержит полиэтиленимин (PEI). PEI может конденсировать ДНК в положительно заряженные частицы, которые связываются с анионными остатками клеточной поверхности и попадают в клетку посредством эндоцитоза. В других вариантах осуществления, средство доставки на основе полимера может содержать поли-L-лизин (PLL), поли (DL-молочную кислоту) (PLA), поли (DL-лактид-ко-гликозид) (PLGA), полиорнитин, полиаргинин, гистоны, протамины, дендримеры, хитозаны, синтетические аминокислотные производные декстрана и/или катионные акриловые полимеры. В некоторых вариантах осуществления, средства доставки на основе полимеров могут содержать смесь полимеров, такую как, например, PEG и PLL.

В некоторых вариантах осуществления, любая из описанных в настоящем документе молекул нуклеиновой кислоты может быть доставлена с использованием любого известного подходящего вирусного вектора, включая, *например*, ретровирусы (*например*, вирусы А-типа, В-типа, С-типа и D-типа), аденовирусы, парвовирус (*например*,

аденоассоциированные вирусы или AAV), коронавирусы, отрицательную цепь РНК-содержащих вирусов, таких как ортомиксовирусы (*например*, вирус гриппа), вирус бешенства (*например*, бешенство и вирус везикулярного стоматита), парамиксовирусы (*например*, корь и Сендай), положительную цепь РНК-содержащих вирусов, таких как пикорнавирус и альфавирус, и двухцепочечные ДНК-содержащие вирусы, включая аденовирус, вирус герпеса (*например*, вирус простого герпеса типов 1 и 2, вирус Эпштейн-Барр, цитомегаловирус) и поксвирус (*например*, коровьей оспы, оспы птиц и канареек). Примеры ретровирусов включают вирус лейкоза-саркомы птиц, Т-лимфотрофный вирус типа 1 (HTLV-1) человека, вирус лейкоза крупного рогатого скота (BLV), лентивирус и спумавирус. Другие вирусы включают, например, вирус Norwalk, тогавирус, флавивирус, реовирусы, паповавирус, гепаднавирус и вирус гепатита. Вирусные векторы могут быть классифицированы на две группы в зависимости от их способности интегрироваться в геном хозяина - интегрирующие и не интегрирующие. Онкоретровирусы и лентивирусы могут интегрироваться в хроматин клетки-хозяина, в то время как аденовирусы, аденоассоциированные вирусы и вирусы герпеса преимущественно сохраняются в ядре клетки в виде внехромосомных эписом.

В некоторых вариантах осуществления, подходящим вирусным вектором является ретровирусный вектор. Ретровирусы относятся к вирусам семейства Retroviridae. Примеры ретровирусов включают онкоретровирусы, такие как вирус лейкоза мышей (MLV), и лентивирусы, такие как вирус иммунодефицита человека 1 (HIV-1). Ретровирусными геномами являются одноцепочечные (оц) РНК и содержат различные гены, которые могут быть в цис- или транс-форме. Например, ретровирусный геном может содержать цис-действующие последовательности, такие как два длинных концевых повтора (LTR), с элементами для экспрессии генов, обратной транскрипции и интеграции в хромосому хозяина. Другие компоненты включают сигнал упаковки (ψ или ψ) для специфической упаковки РНК во вновь образованные вирионы и полипуриновый тракт (PPT), место инициации синтеза положительной цепи ДНК во время обратной транскрипции. Кроме того, в некоторых вариантах осуществления, геном ретровируса может содержать гены *gag*, *pol* и *env*. Ген *gag* кодирует структурные белки, ген *pol* кодирует ферменты, которые сопровождают оцРНК и осуществляют обратную транскрипцию вирусной РНК в ДНК, и ген *env* кодирует вирусную оболочку. Обычно *gag*, *pol* и *env* представлены в транс для вирусной репликации и упаковки.

В некоторых вариантах осуществления, ретровирусный вектор, представленный в настоящем документе, может быть лентивирусным вектором. Распознаются, по меньшей мере, пять серогрупп или серотипов лентивирусов. Вирусы разных серотипов могут по-разному инфицировать определенные типы клеток и/или хозяев. Лентивирусы, например, включают ретровирусы приматов и ретровирусы не приматов. Ретровирусы приматов включают HIV и вирус иммунодефицита обезьян (SIV). Ретровирусы не приматов включают вирус иммунодефицита кошек (FIV), вирус иммунодефицита крупного рогатого скота (BIV), вирус артрита-энцефалита коз (CAEV), вирус инфекционной анемии лошадей

(EIAV) и виснавирус. Лентивирусы или лентивекторы могут быть способны трансдуцировать покоящиеся клетки. Как и в случае онкоретровирусных векторов, конструкция лентивекторов может быть основана на разделении цис- и трансдействующих последовательностей.

В некоторых вариантах осуществления, настоящее описание представляет векторы экспрессии, которые были разработаны для доставки с помощью оптимизированного терапевтического ретровирусного вектора. Ретровирусным вектором может быть лентивирус, содержащий один или несколько из следующих: левый (5') LTR; последовательности, которые способствуют упаковке и/или ядерному импорту вируса; промотор; необязательно, один или несколько дополнительных регуляторных элементов (таких как, например, энхансер или последовательность полиА); необязательно, лентивирусный элемент обратного ответа (RRE); необязательно, инсулятор; и правый (3') ретровирусный LTR.

В некоторых вариантах осуществления, представленным в настоящем документе вирусным вектором является аденоассоциированный вирус (AAV). AAV является небольшим, дефектным по репликации животным вирусом без оболочки, который заражает людей и некоторые другие виды приматов. Не известно, что AAV вызывает заболевание человека и вызывает умеренный иммунный ответ. Векторы AAV могут также инфицировать как делящиеся, так и покоящиеся клетки, не встраиваясь в геном клетки-хозяина.

Геном AAV естественным образом состоит из линейной одноцепочечной ДНК длиной ~4,7 т.о. Геном состоит из двух открытых рамок считывания (ORF), фланкированных последовательностью инвертированного концевого повтора (ITR) длиной около 145 п.о. ITR состоит из нуклеотидной последовательности на 5' конце (5' ITR) и нуклеотидной последовательности, расположенной на 3' конце (3' ITR), которые содержат палиндромные последовательности. ITR функционируют в цис через сворачивание с образованием Т-образных шпильчатых структур за счет комплементарного спаривания оснований, которые действуют как праймеры во время инициации репликации ДНК для синтеза второй цепи. Две открытые рамки считывания кодируют гены гер и сар, которые участвуют в репликации и упаковке вириона. В некоторых вариантах осуществления, вектор AAV, представленный в настоящем документе, не содержит гены гер или сар. Такие гены могут быть представлены в транс для продуцирования вирионов, как описано ниже.

В некоторых вариантах осуществления, вектор AAV может включать спейсерную нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления, спейсерная нуклеиновая кислота может кодировать зеленый флуоресцентный белок или ген устойчивости к антибиотикам, обеспечивающий устойчивость к антибиотикам, таким как канамицин или ампициллин. В некоторых вариантах осуществления, спейсерная нуклеиновая кислота может находиться вне последовательностей ITR (*например*, по сравнению с трансгенной последовательностью и регуляторными последовательностями, которые расположены

между 5' и 3' последовательностями ITR).

В некоторых вариантах осуществления, вектором AAV является любой из AAV1, AAV2, AAV3, AAV3b, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13, AAV-DJ, AAV-DJ8, AAV-DJ9 или химерный, гибридный или вариантный AAV. AAV также может быть самокомплементарным AAV (scAAV). Эти серотипы различаются по своему тропизму или типам клеток, которые они заражают. В некоторых вариантах осуществления, вектор AAV содержит геном и капсиды из множества серотипов (*например*, псевдотипов). Например, AAV может включать геном серотипа 2 (*например*, ITR), упакованный в капсид серотипа 5 или серотипа 9. Псевдотипы могут повышать эффективность трансдукции, а также изменять тропизм. В некоторых вариантах осуществления, AAV является серотип AAV9. В некоторых вариантах осуществления, вектор экспрессии, сконструированный для доставки с помощью AAV, содержит 5' ITR и 3' ITR.

В некоторых вариантах осуществления, ITR серотипа 6 AAV или серотипа 9 AAV можно использовать в любом из векторов AAV, описанных в настоящем документе. Однако могут быть выбраны ITR из других подходящих серотипов. Векторы AAV по настоящему описанию могут быть созданы из множества аденоассоциированных вирусов. Тропизм вектора может быть изменен путем упаковки рекомбинантного генома одного серотипа в капсиды, полученные из другого серотипа AAV. В некоторых вариантах осуществления, ITR вируса rAAV могут быть основаны на ITR любого из AAV1-12, и могут быть объединены с капсидом AAV, выбранным из любого из AAV1-12, AAV-DJ, AAV-DJ8, AAV-DJ9 или других модифицированных серотипов. В конкретных вариантах осуществления, ITR и/или капсиды AAV выбирают на основе клетки или ткани, таргетированной вектором AAV.

В некоторых вариантах осуществления, описание представляет вектор, содержащий любую из нуклеиновых кислот, описанных в настоящем документе, где вектором является вектор AAV, или вирусная частица AAV, или вирион. В некоторых вариантах осуществления, вектор AAV, или вирусная частица AAV, или вирион, может применяться для доставки любой из молекул нуклеиновой кислоты, описанных в настоящем документе, содержащих любой из регуляторных элементов, описанных в настоящем документе, функционально связанных с любым из трансгенов, описанных в настоящем документе, *in vivo*, *ex vivo* или *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления, такой вектор AAV является дефицитным по репликации. В некоторых вариантах осуществления, вирус AAV сконструирован или генетически модифицирован так, что он может реплицироваться и создавать вирионы только в присутствии хелперных факторов.

В некоторых вариантах осуществления, вектор экспрессии, сконструированный для доставки AAV, включает 5' ITR, промотор, молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую регуляторный элемент, функционально связанный с трансгеном (*например*, трансгеном, кодирующим SMNA1), и 3' ITR. В некоторых вариантах осуществления, вектор экспрессии, сконструированный для доставки AAV, включает 5' ITR, энхансер, промотор,

молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую регуляторный элемент, функционально связанный с трансгеном (*например*, трансгеном, кодирующим SMNA1), последовательностью полиА и 3' ITR.

В некоторых вариантах осуществления, настоящее описание представляет вирусный вектор, содержащий любую из нуклеиновых кислот, описанных в настоящем документе. Термины «вирусная частица» и «вирион» используют в настоящем документе взаимозаменяемо, и они относятся к инфекционной и обычно дефектной по репликации вирусной частице, содержащей вирусный геном (*например*, вирусный вектор экспрессии), упакованный внутри капсида и, в зависимости от случая, может быть, *например*, для ретровирусов, жировой оболочкой, окружающей капсид. «Капсид» относится к структуре, в которую упакован вирусный геном. Капсид состоит из нескольких олигомерных структурных субъединиц, состоящих из белков. Например, AAV имеет икосаэдрический капсид, образованный взаимодействием трех капсидных белков: VP1, VP2 и VP3. В некоторых вариантах осуществления, вирионом, представленным в настоящем документе, является рекомбинантный вирион AAV, полученный путем упаковки вектора AAV, который содержит кандидатный регуляторный элемент, функционально связанный с последовательностью трансгена и штрих-кода, как описано в настоящем документе, в белковой оболочке.

В некоторых вариантах осуществления, рекомбинантный вирион AAV, представленный в настоящем документе, может быть получен путем инкапсидации генома AAV, полученного из определенного серотипа AAV, в вирусную частицу, образованную природными белками Cap, соответствующими AAV того же конкретного серотипа. В других вариантах осуществления, вирусная частица AAV, представленная в настоящем документе, включает вирусный вектор, содержащий ITR данного серотипа AAV, упакованные в белки из другого серотипа. См., *например*, Bunning H et al. J Gene Med 2008; 10: 717-733. Например, вирусный вектор, имеющий ITR из данного серотипа AAV, может быть упакован в: а) вирусную частицу, состоящую из капсидных белков, полученных из одинаковых или разных серотипов AAV (*например*, ITR AAV2 и капсидных белков AAV9; ITR AAV2 и капсидных белков AAV8; и так далее.); б) мозаичную вирусную частицу, состоящую из смеси капсидных белков из различных серотипов или мутантов AAV (*например*, ITR AAV2 с капсидными белками AAV1 и AAV9); в) химерную вирусную частицу, состоящую из капсидных белков, которые были усечены перестановкой доменов между различными серотипами или вариантами AAV (*например*, ITR AAV2 с белками капсида AAV8 с доменами AAV9); или д) вирусную частицу-мишень, сконструированную для дисплея селективных связывающих доменов, обеспечивающих строгое взаимодействие со специфическими рецепторами клетки-мишени (*например*, ITR AAV5 с капсидными белками AAV9, генетически усеченными путем вставки пептидного лиганда; или капсидными белками AAV9, не модифицированными генетически, через связывание пептидного лиганда на поверхности капсида).

Специалист в данной области техники поймет, что вирион AAV, представленный в настоящем документе, может содержать капсидные белки любого серотипа AAV. В одном варианте, вирусная частица содержит капсидные белки из серотипа AAV, выбранного из группы, состоящей из AAV1, AAV2, AAV5, AAV6, AAV8 и AAV9.

В данной области техники известны многочисленные способы получения рекомбинантных вирионов AAV (rAAV), включая трансфекцию, продуцирование стабильных клеточных линий и системы продуцирования инфекционных гибридных вирусов, которые включают гибриды аденовирус-AAV, гибриды герпесвирус-AAV (Conway, J E et al., (1997) J. Virology 71(11):8780-8789) и гибриды бакуловирус-AAV. В некоторых вариантах осуществления, культуры продуцирования rAAV для продуцирования вирусных частиц rAAV включают: 1) подходящие клетки-хозяева, включающие, например, клеточные линии, полученные из человека, такие как клетки HeLa, A549 или 293, или клеточные линии, полученные из насекомых, такие как SF-9, в случае систем продуцирования бакуловирусов; 2) подходящую функцию хелперного вируса, представленную аденовирусом дикого типа или мутантным аденовирусом (таким как чувствительный к температуре аденовирус), вирусом герпеса, бакуловирусом или плазмидной конструкцией, обеспечивающей вспомогательные функции; 3) гены гер и сар AAV и генные продукты; 4) молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую кандидатный регуляторный элемент, функционально связанный с транскриптом (*например*, нуклеотидную последовательность, кодирующую ядерный связывающий домен, функционально связанный с последовательностью репортерного гена, как описано в настоящем документе), фланкированную последовательностями ITR AAV; где молекула нуклеиновой кислоты содержит одну или несколько последовательностей штрих-кода, и 5) подходящие среды и компоненты сред для поддержки продуцирования rAAV.

В некоторых вариантах осуществления, линией клеток-продуцентов является линия клеток насекомых (обычно, клетки Sf9), которые инфицированы векторами экспрессии бакуловируса, которые обеспечивают белки Rep и Cap. Для этой системы не требуются гены-помощники аденовируса (Ayuso E, et al., Curr. Gene Ther. 2010, 10:423-436).

Термин «кэп-белок», используемый в настоящем документе, относится к полипептиду, обладающему, по меньшей мере, одной функциональной активностью нативного кэп-белка AAV (*например*, VP1, VP2, VP3). Примеры функциональной активности кэп-белков включают способность индуцировать образование капсида, способствовать накоплению одноцепочечной ДНК, облегчать упаковку ДНК AAV в капсиды (*т.е.* инкапсидацию), связываться с клеточными рецепторами и облегчать проникновение вириона в клетки-хозяева. В принципе, любой кэп-белок может применяться в контексте настоящего описания.

Сообщалось, что кэп-белки влияют на тропизм хозяина, клеточную, тканевую или органную специфичность, использование рецепторов, эффективность инфекции и иммуногенность вирусов AAV. Соответственно, кэп AAV для использования в rAAV

может быть выбран с учетом, например, вида субъекта (*например*, человека или не человека), иммунологического состояния субъекта, пригодности субъекта для длительного или краткосрочного лечения или конкретного терапевтического применения (*например*, лечения конкретного заболевания или нарушения или доставки в конкретные клетки, ткани или органы). В некоторых вариантах осуществления, кэп-белок получают из AAV группы, состоящей из серотипов AAV1, AAV2, AAV5, AAV6, AAV8 и AAV9.

В некоторых вариантах осуществления, кэп AAV для использования в способах, представленных в настоящем документе, может быть получен мутагенезом (*т.е.* вставками, делециями или заменами) одного из вышеупомянутых кэпов AAV или кодирующей его нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления, кэп AAV, по меньшей мере, на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% или более аналогичен одному или нескольким из вышеупомянутых кэпов AAV.

В некоторых вариантах осуществления, кэп AAV является химерным, содержащим домены из двух, трех, четырех или более из вышеупомянутых кэпов AAV. В некоторых вариантах осуществления, кэп AAV является мозаикой мономеров VP1, VP2 и VP3, происходящих из двух или трех различных AAV или рекомбинантного AAV. В некоторых вариантах осуществления, композиция гAAV содержит более одного из вышеупомянутых кэпов.

В некоторых вариантах осуществления, кэп AAV для использования в вирионе гAAV сконструирован таким образом, чтобы он содержал гетерологичную последовательность или другую модификацию. Например, последовательность пептида или белка, придающая селективное таргетирование или уклонение от иммунного надзора, может быть сконструирована в кэп-белок. Альтернативно или дополнительно, кэп может быть химически модифицирован так, чтобы поверхность гAAV была полиэтиленгликолированной (*т.е.* пегилированной), что может способствовать уклонению от иммунного ответа. Кэп белок также может быть мутагенизирован (*например*, для удаления его естественного связывания с рецептором или для маскировки иммуногенного эпитопа).

Используемый в настоящем документе термин «гер белок» относится к полипептиду, обладающему, по меньшей мере, одну функциональную активность нативного гер белка AAV (*например*, гер 40, 52, 68, 78). Примеры функциональной активности гер белка включают любую активность, связанную с физиологической функцией белка, включая облегчение репликации ДНК через распознавание, связывание и никование AAV происхождения репликации ДНК, а также активности ДНК геликазы. Дополнительные функции включают модулирование транскрипции из AAV (или других гетерологичных) промоторов и сайт-специфическую интеграцию ДНК AAV в хромосому хозяина. В некоторых вариантах осуществления, гены гер AAV могут происходить из серотипов AAV1, AAV2, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10 или AAVrh10.

В некоторых вариантах осуществления, белок гер AAV для использования в

способе по настоящему изобретению может быть создан мутагенезом (*т.е.* вставками, делециями или заменами) одного из вышеупомянутых гер AAV или его кодирующей нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления, гер AAV по меньшей мере, на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% или более аналогична одному или нескольким из вышеупомянутых гер AAV.

Выражения «хелперные функции» или «хелперные гены» в контексте настоящего описания относятся к вирусным белкам, от которых зависит репликация AAV. Хелперные функции включают те белки, которые необходимы для репликации AAV, включая, но не ограничиваясь ими, те белки, которые вовлечены в активацию транскрипции гена AAV, специфический к стадии сплайсинг иРНК AAV, репликацию ДНК AAV, синтез продуктов экспрессии кэпа и сборку капсида AAV. Дополнительные функции на основе вирусов могут быть получены из любого из известных хелперных вирусов, таких как аденовирус, вирус герпеса (кроме вируса простого герпеса типа 1) и вирус осповакцины. Хелперные функции включают, но не ограничены ими, аденовирус E1, E2a, VA и E4 или вирус герпеса UL5, ULB, UL52 и UL29 и полимеразу вируса герпеса. В предпочтительном варианте осуществления, белки, от которых зависит репликация AAV, получены из аденовируса.

В некоторых вариантах осуществления, вирусный белок, от которого зависит репликация AAV, для использования в способе по настоящему изобретению, может быть получен путем мутагенезом (*т.е.* вставками, делециями или заменами) одного из вышеупомянутых вирусных белков или кодирующей его нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления, вирусный белок на, по меньшей мере, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% или более аналогичен одному или нескольким из вышеупомянутых вирусных белков.

Способы анализа функций кэп белков, гер белков и вирусных белков, от которых зависит репликация AAV, хорошо известны в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления, вирусный вектор экспрессии может быть ассоциирован с носителем для доставки жиров (*например*, катионными липосомами или LNP, как описано в настоящем документе) для введения в клетку-мишень.

Различные системы доставки, содержащие молекулы нуклеиновой кислоты, описанные в настоящем документе или известные в данной области техники, могут быть введены в организм для доставки в клетки *in vivo* или введены в клетку или культуру клеток *ex vivo*. Введение осуществляют любым из способов, обычно используемых для введения молекулы в непосредственный контакт с кровью, жидкостью или клетками, включая, но не ограничиваясь ими, инъекцию, инфузию, местное нанесение и электропорацию. Подходящие способы введения таких нуклеиновых кислот доступны и известны специалистам в данной области техники.

Молекулы нуклеиновой кислоты могут быть доставлены *in vivo* или *ex vivo* для таргетирования различных клеток и/или тканей. В некоторых вариантах осуществления, доставка может быть направлена на различные органы/ткани и соответствующие клетки,

например, в мозг, сердце, скелетные мышцы, печень, почки, селезенку или желудок. В некоторых вариантах осуществления, молекулы нуклеиновой кислоты доставляют к одной или обеим нейрональной клетке или глиальной клетке. В некоторых вариантах осуществления, доставка может быть направлена на больные клетки, такие как, *например*, опухолевые или раковые клетки. В некоторых вариантах осуществления, доставка может быть направлена на стволовые клетки, клетки крови или иммунные клетки.

В некоторых вариантах осуществления, в описании представлена смесь любого из векторов, описанных в настоящем документе, или любой из нуклеиновых кислот, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, смесь или молекулы нуклеиновой кислоты содержат примерно 10, примерно 50, примерно 100, примерно 250, примерно 500, примерно 750, примерно 1000, примерно 1250, примерно 1500, примерно 1750, примерно 2000, примерно 2500, примерно 3000, примерно 3500, примерно 4000, примерно 4500, примерно 5000, примерно 5500, примерно 6000, примерно 6500, примерно 7000, примерно 7500, примерно 8000, примерно 8500, примерно 9000, примерно 9500, примерно 10000 или более различных регуляторных элементов.

Е. Фармацевтические композиции

В некоторых вариантах осуществления, в описании представлены композиции, содержащие любую из конструкций нуклеиновых кислот, векторов экспрессии, вирусных векторов или вирусных частиц, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, в описании представлены композиции, содержащие вирусный вектор или вирусную частицу, которая содержит нуклеотидную последовательность, функционально связанную с регуляторным элементом. В конкретных вариантах осуществления, такие композиции подходят для применения в генной терапии. Фармацевтические композиции предпочтительно являются стерильными и стабильными в условиях производства и хранения. Стерильные растворы могут быть получены, например, фильтрацией через стерильные фильтрующие мембраны.

Приемлемые носители и эксципиенты в фармацевтических композициях предпочтительно являются не токсичными для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях. Приемлемые носители и эксципиенты могут включать буферы, такие как фосфат, цитрат, HEPES и TAE, антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота и метионин, консерванты, такие как хлорид гексаметония, хлорид октадецилдиметилбензиламмония, резорцин и хлорид бензалкония, белки, такие как сывороточный альбумин человека, желатин, декстран и иммуноглобулины, гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон, аминокислоты, такие как глицин, глутамин, гистидин и лизин, и углеводы, такие как глюкоза, манноза, сахароза и сорбит. Фармацевтические композиции по настоящему описанию можно вводить парентерально в форме инъекционного состава. Фармацевтические композиции для инъекций могут быть составлены с использованием стерильного раствора или любой фармацевтически приемлемой жидкости в качестве носителя. Фармацевтически приемлемые носители включают, но не ограничиваются ими, стерильную воду и физиологический солевой

раствор.

Фармацевтические композиции по описанию могут быть приготовлены в микрокапсулах, таких как гидроксилметилцеллюлозные или желатиновые микрокапсулы и полиметилметакрилатные микрокапсулы. Фармацевтические композиции по настоящему описанию также могут быть приготовлены в других системах доставки лекарств, таких как липосомы, микросферы альбумина, микроэмульсии, наночастицы и нанокапсулы. Фармацевтическая композиция для генной терапии может быть в приемлемом разбавителе, или может содержать матрицу с медленным высвобождением, в которую встроены носитель для доставки гена.

Представленные в настоящем документе фармацевтические композиции могут быть составлены для парентерального введения, подкожного введения, внутривенного введения, системного введения, внутримышечного введения, внутриартериального введения, интрапаренхимального введения, интратекального введения, интратекального цистернального введения (также известного как введение внутрь большой цистерны), интратекального люмбального введения, интрацеребровентрикулярного введения или внутрибрюшинного введения. В конкретном варианте осуществления, фармацевтическая композиция составлена для интрацеребровентрикулярного введения. В одном из вариантов осуществления, фармацевтическая композиция составлена для интратекального введения. В одном варианте осуществления, фармацевтическая композиция составлена для интратекального цистернального введения. В одном из вариантов осуществления, фармацевтическая композиция составлена для интратекального люмбального введения. В одном варианте осуществления, фармацевтическая композиция составлена для внутривенного введения. В одном из вариантов осуществления, фармацевтическая композиция составлена для системного введения.

Фармацевтическая композиция может быть составлена для или вводиться через носовое, спреем, пероральное, аэрозольное, ректальное или вагинальное введение. Ткань-мишень может быть специфической, например, центральной нервной системой, или она может быть комбинацией нескольких тканей, например центральной нервной системы и тканей печени. Типовая ткань или другие мишени могут включать печень, скелетную мышцу, сердечную мышцу, жировые отложения, почки, легкие, эндотелий сосудов, эпителиальные, гемопоэтические клетки, нейрональные клетки, глиальные клетки, центральную нервную систему и/или СМЖ. В конкретном варианте осуществления, представленную в настоящем документе фармацевтическую композицию вводят в СМЖ, *т.е.* интрацеребровентрикулярной инъекцией, интратекальной цистернальной инъекцией или интратекальной люмбальной инъекцией. Один или несколько из этих способов можно использовать для введения фармацевтической композиции по настоящему описанию.

В некоторых вариантах осуществления, фармацевтическая композиция, представленная в настоящем документе, содержит «эффективное количество» или «терапевтически эффективное количество». В контексте настоящего описания, такие количества относятся к количеству, эффективному в дозировках и в течение периодов

времени, необходимых для достижения желаемого терапевтического результата.

Дозировка фармацевтических композиций по описанию зависит от факторов, включая способ введения, заболевание, подлежащее лечению, и физические характеристики (*например*, возраст, массу тела, общее состояние здоровья) субъекта. Дозировка может быть скорректирована для обеспечения оптимального терапевтического ответа. Обычно дозировка может представлять собой количество, которое эффективно лечит заболевание, не вызывая значительной токсичности. В одном варианте осуществления, вектор AAV, представленный в настоящем документе, можно вводить пациенту для лечения нейронального заболевания (включая, например, синдром Драве) в количестве или дозе в диапазоне от 5×10^{10} до 1×10^{14} гк/кг (копий генома на килограмм массы тела пациента (гк/кг)). В более конкретном варианте осуществления, вектор AAV вводят в количестве, находящемся в диапазоне от примерно 5×10^{10} гк/кг до примерно 1×10^{13} гк/кг, или от примерно 1×10^{11} до примерно 1×10^{15} гк/кг, или от примерно 1×10^{11} до примерно 1×10^{14} гк/кг, или от примерно 1×10^{11} до примерно 1×10^{13} гк/кг, или от примерно 1×10^{11} до примерно 1×10^{12} гк/кг, или от примерно 1×10^{12} до примерно 1×10^{14} гк/кг, или от примерно 1×10^{12} до примерно 1×10^{13} гк/кг, или примерно 5×10^{11} гк/кг, 1×10^{12} гк/кг, $1,5 \times 10^{12}$ гк/кг, $2,0 \times 10^{12}$ гк/кг, $2,5 \times 10^{12}$ гк/кг, 3×10^{12} гк/кг, $3,5 \times 10^{12}$ гк/кг, 4×10^{12} гк/кг, $4,5 \times 10^{12}$ гк/кг, 5×10^{12} гк/кг, $5,5 \times 10^{12}$ гк/кг, 6×10^{12} гк/кг, $6,5 \times 10^{12}$ гк/кг, 7×10^{12} гк/кг, $7,5 \times 10^{12}$ гк/кг, 8×10^{12} гк/кг, $8,5 \times 10^{12}$ гк/кг, 9×10^{12} гк/кг, $9,5 \times 10^{12}$ гк/кг, 1×10^{13} гк/кг, $1,5 \times 10^{13}$ гк/кг, $2,0 \times 10^{13}$ гк/кг, $2,5 \times 10^{13}$ гк/кг, 3×10^{13} гк/кг, $3,5 \times 10^{13}$ гк/кг, 4×10^{13} гк/кг, $4,5 \times 10^{13}$ гк/кг, 5×10^{13} гк/кг, $5,5 \times 10^{13}$ гк/кг, 6×10^{13} гк/кг, $6,5 \times 10^{13}$ гк/кг, 7×10^{13} гк/кг, $7,5 \times 10^{13}$ гк/кг, 8×10^{13} гк/кг, $8,5 \times 10^{13}$ гк/кг, 9×10^{13} гк/кг или $9,5 \times 10^{13}$ гк/кг. Гк/кг можно определить, например, с помощью кПЦР или цифровой капельной ПЦР (цкПЦР) (см., *например*, M. Lock et al, Hum Gene Ther Methods. 2014 Apr; 25(2): 115-25). В другом варианте осуществления, вектор AAV, представленный в настоящем документе, можно вводить пациенту для лечения нейронального заболевания (включая, например, синдром Драве) в количестве или дозе в диапазоне от 1×10^9 до 1×10^{11} ие/кг (инфекционных единиц вектора (ие)/массу тела субъекта или пациента (кг)). В некоторых вариантах осуществления, фармацевтическая композиция может быть приготовлена в виде стандартной дозы, при необходимости. Такие отдельные дозированные единицы могут содержать от примерно 1×10^9 гк до примерно 1×10^{15} гк.

Фармацевтические композиции по настоящему описанию можно вводить субъекту, нуждающемуся в этом, например, один или несколько раз (*например*, 1-10 раз или более) ежедневно, еженедельно, ежемесячно, два раза в год, ежегодно или по медицинским показаниям. В типовом варианте осуществления, достаточно однократного введения. В одном из вариантов осуществления, фармацевтическая композиция подходит для использования у людей и вводится интрацеребровентрикулярным путем. В одном варианте осуществления, фармацевтическая композиция подходит для использования у людей и вводится интрацеребровентрикулярным введением, внутривенным введением, интратекальным введением, интрапаренхиматозным введением или их комбинацией. В

одном варианте осуществления, фармацевтическая композиция доставляется через периферическую вену путем болюсной инъекции. В других вариантах осуществления, фармацевтическая композиция доставляется через периферическую вену путем инфузии в течение примерно 10 минут (± 5 минут), в течение примерно 20 минут (± 5 минут), в течение примерно 30 минут (± 5 минут), в течение примерно 60 минут (± 5 минут) или более 90 минут (± 10 минут). В одном варианте осуществления, фармацевтическая композиция доставляется в СМЖ болюсной инъекцией. В других вариантах осуществления, фармацевтическая композиция доставляется в СМЖ инфузией в течение примерно 10 минут (± 5 минут), в течение примерно 20 минут (± 5 минут), в течение примерно 30 минут (± 5 минут), в течение примерно 60 минут (± 5 минут) или примерно 90 минут (± 10 минут).

В другом аспекте, в описании дополнительно представлен набор, содержащий конструкцию нуклеиновой кислоты, вирусный вектор, вирусную частицу или фармацевтическую композицию, как описано в настоящем документе, в одном или нескольких контейнерах. Набор может включать инструкции или упаковочные материалы, которые описывают, как вводить пациенту молекулу нуклеиновой кислоты, вектор или вирион, содержащиеся в наборе. Контейнеры из набора могут быть из любого подходящего материала, *например*, стекла, пластика, металла и т.д., и иметь любой подходящий размер, форму или конфигурацию. В некоторых вариантах осуществления, наборы могут включать одну или несколько ампул или шприцев, которые содержат конструкцию нуклеиновой кислоты, вирусный вектор, вирусную частицу или фармацевтическую композицию в подходящей жидкой или растворенной форме.

Г. Способы введения

В некоторых вариантах осуществления, в описании представлены способы введения любых конструкций нуклеиновых кислот, вирусных векторов, вирусных частиц и/или фармацевтических композиций, описанных в настоящем документе, субъекту (*например*, примату), нуждающемуся в этом, любым из путей введения, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, способ включает введение любых конструкций нуклеиновых кислот, вирусных векторов, вирусных частиц и/или фармацевтических композиций, описанных в настоящем документе, интрацеребровентрикулярным введением. В некоторых вариантах осуществления, способ включает введение любой из конструкций нуклеиновой кислоты, вирусных векторов, вирусных частиц и/или фармацевтических композиций, описанных в настоящем документе, внутривенным введением. В некоторых вариантах осуществления, способ включает введение любой из конструкций нуклеиновой кислоты, вирусных векторов, вирусных частиц и/или фармацевтических композиций, описанных в настоящем документе, интратекальным введением. В некоторых вариантах осуществления, способ включает введение любой из конструкций нуклеиновой кислоты, вирусных векторов, вирусных частиц и/или фармацевтических композиций, описанных в настоящем документе, интрапаренхимальным введением. Способы введения любого из описанных в

настоящем документе векторов более подробно обсуждаются ниже. Эти способы также можно использовать для введения любых конструкций нуклеиновых кислот, вирусных частиц и/или фармацевтических композиций, описанных в настоящем документе.

В настоящем описании рассматриваются способы введения вектора примату (*например*, человеку), включающие внутричерепноventрикулярное (ICV) введение вектора. В настоящем документе также описаны композиции и способы экспрессии представляющего интерес гена или его биологически активного варианта и/или фрагмента, включающие введение примату терапевтически эффективного количества вектора аденоассоциированного вируса 1 (AAV1) или вектора аденоассоциированного вируса 5 (AAV5), кодирующего представляющий интерес ген, где путь введения выбран из группы, состоящей из внутривенного введения, интратекального введения, интрачерепноventрикулярного введения, интрапаренхимального введения или их комбинаций. Кроме того, в настоящем документе описаны композиции и способы ингибирования или лечения одного или нескольких симптомов, связанных с нейрональным заболеванием у приматов, нуждающихся в этом, включающие введение примату AAV, выбранного из группы, состоящей из AAV1 или AAV5, где путь введения выбран из группы, состоящей из внутривенного введения, интратекального введения, интрачерепноventрикулярного введения, интрапаренхимального введения или их комбинаций.

В некоторых вариантах осуществления, в описании представлены способы введения любого из векторов, описанных в настоящем документе, субъекту (*например*, примату) интратекальным введением или интрачерепноventрикулярным введением. Интратекальным пространством, в которое доставляется вектор по настоящему изобретению в случае интратекального введения, является пространство, расположенное вокруг спинного мозга и заполненное спинномозговой жидкостью. Это пространство окружено двухслойной мембраной, состоящей из паутинной оболочки и твердой мозговой оболочки. Интратекальным пространством является пространство под паутинной оболочкой, внутренним слоем двухслойной мембраны, и поэтому интратекальное введение означает введение в субарахноидальное пространство. Пространство вокруг головного мозга и пространство вокруг спинного мозга заполнены СМЖ, и желудочки головного мозга также заполнены СМЖ. Желудочки головного мозга, перичеребральное пространство и интратекальное пространство соединены в одно непрерывное пространство, в котором циркулирует СМЖ. Следовательно, интрачерепноventрикулярное введение и интратекальное введение рассматривают как способы введения любого из векторов, описанных в настоящем документе, в СМЖ.

В некоторых вариантах осуществления, в описании представлены способы введения любого из векторов, описанных в настоящем документе, субъекту (*например*, примату). В некоторых вариантах осуществления, вектор доставляется в ЦНС. В некоторых вариантах осуществления, вектор доставляется в спинномозговую жидкость. В некоторых вариантах осуществления, вектор вводят в паренхиму головного мозга. В

некоторых вариантах осуществления, вектор доставляют примату интрацеребровентрикулярным введением. В некоторых вариантах осуществления, вектор доставляют субъекту (*например*, примату) внутривенным введением. В некоторых вариантах осуществления, вектор доставляют субъекту (*например*, примату) интратекальным введением, *например*, интратекальным цистернальным или интратекальным люмбальным введением. В некоторых вариантах осуществления, вектор доставляют в субарахноидальную цистерну, *например*, в большую цистерну. В некоторых вариантах осуществления, вектор доставляют в люмбальное субарахноидальное пространство, окружающее спинномозговые нервы. В некоторых вариантах осуществления, вектор доставляют субъекту (*например*, примату) интрапаренхимальным введением. Широкое распространение описанных в настоящем документе векторов в центральной нервной системе может быть достигнуто с помощью интрапаренхимального введения, интратекального введения или интрацеребровентрикулярного введения.

В некоторых вариантах осуществления, любой из описанных в настоящем документе векторов вводят субъекту (*например*, примату) в комбинации с контрастным агентом, *например*, гадолинием или гадотеридолом. В других вариантах осуществления, вектор не вводят в комбинации с контрастным агентом, *например*, гадолинием или гадотеридолом.

В некоторых вариантах осуществления, любой из описанных в настоящем документе векторов вводят интрацеребровентрикулярным (ICV) введением в любой один или несколько желудочков головного мозга. В некоторых вариантах осуществления, вектор вводят ICV введением в унилатеральном порядке в один желудочек, *например*, в левый боковой желудочек или правый боковой желудочек. В некоторых вариантах осуществления, вектор вводят ICV введением в унилатеральном порядке в левый боковой желудочек. В некоторых вариантах осуществления, вектор вводят ICV введением в унилатеральном порядке в правый боковой желудочек. В некоторых вариантах осуществления, вектор вводят ICV введением с двух сторон, *например*, в левый и правый боковой желудочек. В некоторых вариантах осуществления, вектор вводят ICV введением в один желудочек мозга, *например* только в левый желудочек. В некоторых вариантах осуществления, вектор вводят ICV введением только в левый боковой желудочек. В некоторых вариантах осуществления, вектор вводят ICV введением только в правый боковой желудочек. В некоторых вариантах осуществления, вектор вводят ICV введением только в третий желудочек. В некоторых вариантах осуществления, вектор вводят ICV введением только в четвертый желудочек. В некоторых вариантах осуществления, вектор вводят ICV введением в более чем один желудочек мозга, *например*, в левый желудочек, правый желудочек и третий желудочек. В некоторых вариантах осуществления, вектор вводят ICV введением одновременно, *например*, в левый и правый желудочки в один и тот же момент времени. В некоторых вариантах осуществления, вектор вводят ICV введением последовательно, *например*, в левый и правый желудочки в разные моменты времени. В некоторых вариантах осуществления, каждую дозу вектора вводят ICV введением с

интервалом, по меньшей мере, 24 часа.

В некоторых вариантах осуществления, в описании представлен способ введения вектора примату, включающий интрацеребровентрикулярное (ICV) введение вектора примату, где вектор содержит трансген, и где ICV введение приводит к повышенной экспрессии трансгена в центральной нервной системе (ЦНС), по меньшей мере, 1,25-кратно по сравнению с экспрессией трансгена при введении вектора любым другим путем. В некоторых вариантах осуществления, введение ICV дает, по меньшей мере, 1,5-кратное, 1,75-кратное, 2-кратное, 3-кратное, 5-кратное, 10-кратное, 15-кратное, 20-кратное, 25-кратное, 30-кратное, 35-кратное, 40-кратное, 45-кратное, 50-кратное, 55-кратное, 60-кратное, 65-кратное, 70-кратное или 75-кратное, или, по меньшей мере, 20-90-кратное, 20-80-кратное, 20-70-кратное, 20-60-кратное, 30-90-кратное, 30-80-кратное, 30-70-кратное, 30-60-кратное, 40-90-кратное, 40-80-кратное, 40-70-кратное, 40-60-кратное, 50-90-кратное, 50-80-кратное, 50-70-кратное, 50-60-кратное, 60-90-кратное, 60-80-кратное, 60-70-кратное, 70-90-кратное, 70-80-кратное, 80-90-кратное увеличение экспрессии трансгенной последовательности в центральной нервной системе (ЦНС) по сравнению с экспрессией трансгена при введении вектора любым другим путем введения. В некоторых вариантах осуществления, ICV введение приводит к переносу гена по всему мозгу. В некоторых вариантах осуществления, перенос гена происходит во фронтальной коре, теменной коре, височной коре, гиппокампе, мозговом веществе и затылочной коре. В некоторых вариантах осуществления, перенос гена зависит от дозы. В некоторых вариантах осуществления, вектор дополнительно содержит селективный регуляторный элемент клеточного типа. В некоторых вариантах осуществления, регуляторный элемент селективно экспрессируется в головном мозге. В некоторых вариантах осуществления, регуляторный элемент селективно экспрессируется во фронтальной коре, теменной коре, височной коре, гиппокампе, мозговом веществе и затылочной коре. В некоторых вариантах осуществления, регуляторный элемент селективно экспрессируется в позвоночнике. В некоторых вариантах осуществления, регуляторный элемент селективно экспрессируется в спинном мозге и спинальном ганглии. В некоторых вариантах осуществления, регуляторный элемент селективно экспрессируется в нейрональных клетках. В некоторых вариантах осуществления, нейрональные клетки выбраны из группы, состоящей из униполярных, биполярных, мультиполярных или псевдоуниполярных нейронов. В некоторых вариантах осуществления, нейрональными клетками являются ГАВА-ергические нейроны. В некоторых вариантах осуществления, регуляторный элемент селективно экспрессируется в глиальных клетках. В некоторых вариантах осуществления, глиальные клетки выбраны из группы, состоящей из астроцитов, олигодендроцитов, эпендимальных клеток, шванновских клеток и амфицитных клеток. В некоторых вариантах осуществления, регуляторный элемент селективно экспрессируется в ненейрональных клетках.

В некоторых вариантах осуществления, в описании представлено введение любого из векторов, описанных в настоящем документе, с помощью нескольких путей введения

субъекту (*например*, примату). В некоторых вариантах осуществления, в описании представлены способы введения любого из векторов, описанных в настоящем документе, одним путем введения (*например*, внутрицеребровентрикулярным введением) и того же вектора(ов) также другим путем введения (*например*, внутривенным введением). В некоторых вариантах осуществления, в описании представлены способы введения любого из векторов, описанных в настоящем документе, путем внутрицеребровентрикулярного введения и того же вектора(ов) также путем внутривенного введения. В некоторых вариантах осуществления, в описании представлены способы введения любого из описанных в настоящем документе векторов путем интратекального введения, и того же вектора(ов) также путем внутривенного введения. В некоторых вариантах осуществления, в описании представлены способы введения любого из векторов, описанных в настоящем документе, одним путем введения (*например*, внутрицеребровентрикулярным введением) и дополнительного терапевтического агента (*например*, любого из дополнительных терапевтических агентов, описанных в настоящем документе) другим путем введения (*например*, внутривенным введением). В некоторых вариантах осуществления, в описании представлены способы введения любого из векторов, описанных в настоящем документе, интрацеребровентрикулярным введением, и дополнительного терапевтического агента внутривенным введением. В некоторых вариантах осуществления, в описании представлены способы введения любого из описанных в настоящем документе векторов интратекальным введением и дополнительного терапевтического агента внутривенным введением. В некоторых вариантах осуществления, в описании представлены способы введения любого из описанных в настоящем документе векторов внутривенным введением и дополнительного терапевтического агента интрацеребровентрикулярным введением. В некоторых вариантах осуществления, в описании представлены способы введения любого из описанных в настоящем документе векторов внутривенным введением и дополнительного терапевтического агента интратекальным введением. В некоторых вариантах осуществления, интратекальное введение включает интратекальное цистернальное введение. В некоторых вариантах осуществления, интратекальное введение включает интратекальное люмбальное введение. В некоторых вариантах осуществления, путем введения является любой один или комбинация внутривенного введения, интратекального введения, интрацеребровентрикулярного введения или интрапаренхимального введения. В некоторых вариантах осуществления, путем введения является любой один или комбинация подкожного введения, внутримышечного введения, внутриартериального введения, внутрибрюшинного введения или внутричерепного введения.

В некоторых вариантах осуществления, введение включает введение посредством инъекции. В некоторых вариантах осуществления, введение включает введение через канюлю. В некоторых вариантах осуществления, вектор вводят в виде болюса, *например*, в виде однократной инъекции. В некоторых вариантах осуществления, вектор вводят непрерывно, *например*, инфузией с использованием шприцевого насоса.

В некоторых вариантах осуществления, интрацеребровентрикулярное (ICV) введение включает введение канюли через отверстие в черепе, через ткань мозга в желудочек мозга, заполненный СМЖ. В некоторых вариантах осуществления, вставляют одну канюлю (*например*, в любой из двух боковых желудочков). В некоторых вариантах осуществления, могут быть вставлены две канюли (в оба боковых желудочка). В некоторых вариантах осуществления, канюля может быть подсоединена к шприцу или инфузионному насосу для одноразового введения или к контролируемому устройству, например резервуару Омтауа. В некоторых вариантах осуществления, в описании представлено введение любого из векторов, описанных в настоящем документе, в один или несколько боковых желудочков субъекта. Из-за опасности нервно-сосудистого повреждения и внутричерепного кровоизлияния, повторные «проколы» желудочка обычно не выполняются. Исключением из этого правила могут быть недоношенные новорожденные, у которых при патологических состояниях часто наблюдаются очень большие желудочки, тонкая кортикальная мантия и открытый родничок, что снижает совокупный риск повторных проколов в этой популяции.

Инtrateкальные интрацистернальные инфузии у людей выполняются реже из-за близости цистерн к жизненно важным тканям мозга. Однако в некоторых вариантах осуществления, устройства для инtrateкальной инфузии (*например*, устройства Medtronic) могут быть вставлены в люмбальное субарахноидальное пространство, а катетер продлен вверх по направлению к черепу для введения. В некоторых вариантах осуществления, инtrateкальное введение человеку включает хирургическое введение катетера примерно в щели L4/L5 и введение либо (i) болюсной дозы (через шприц или резервуара Омтауа), (ii) краткосрочной инфузии (через помпу) или (iii) длительной инфузии (через имплантируемую программируемую помповую систему, например Synchromed II, Medtronic, где помпу помещают в подкожный карман где-нибудь в теле, например, в брюшной полости). См., *например*, Hamza M, et al. *Neuromodulation*, 2015;18(7):636-48).

В некоторых вариантах осуществления, инtrateкальное введение любого из векторов, описанных в настоящем документе, включает введение вектора(ов) в люмбальную цистерну посредством люмбальной пункции. В некоторых вариантах осуществления, спинномозговой прокол может выполняться у постели больного с использованием местного анестетика в стерильных условиях. В некоторых вариантах осуществления, спинномозговую иглу вводят в текальный мешок через межслойное пространство в нижнем люмбальном отделе позвоночника. В некоторых вариантах осуществления, доступ в люмбальную цистерну подтверждают при получении СМЖ. См., *например*, Cook AM, et al. *Pharmacotherapy*. 2009;29(7):832-45.

В некоторых вариантах осуществления, любой из векторов, описанных в настоящем документе, вводят субъекту (*например*, примату) инъекцией вектора(ов) через спинномозговую иглу. Этот метод часто используют для введения химиотерапевтических препаратов. Преимущества этого метода включают относительно низкий риск и

возможность выполнения у постели больного под местной анестезией. Основным недостатком этого метода является то, что отдельную пункцию необходимо проводить каждый раз, когда вводят дозу, что приводит к кумулятивному риску занесения инфекции, развития кожной ликворной фистулы, повреждения нервных корешков и возникновения внутрипозвоночного кровоизлияния. В некоторых вариантах осуществления, чтобы обойти эту проблему, можно установить временный полостный катетер, используя аналогичную технику с более крупной иглой Touhy.

В некоторых вариантах осуществления, любой из описанных в настоящем документе векторов может быть введен субъекту (*например*, примату) путем продвижения катетера в текальный мешок субъекта через центр иглы, где иглу впоследствии извлекают. В некоторых вариантах осуществления, катетер затем туннелируют подкожно через кожу, где к нему можно получить стерильный доступ для запланированных доз выбранного интратекального лекарственного средства. Основным недостатком этого метода является риск инфицирования при длительном размещении катетера и нарушения функции катетера из-за окклюзии, перегиба или смещения. Однако этот недостаток можно уменьшить, удалив или заменив катетер через несколько дней (*например*, 1-4 дня).

В некоторых вариантах осуществления, любой из описанных в настоящем документе векторов вводят через устройство на основе катетера. В некоторых вариантах осуществления, имплантируют постоянное устройство на основе катетера. В некоторых вариантах осуществления, имплантируют временное устройство на основе катетера. В некоторых вариантах осуществления, для постоянного доступа имплантируют катетер, который соединен с подкожным резервуаром (*например*, резервуаром Omaya). В некоторых вариантах осуществления, катетер соединен с резервуаром Omaya. Доступ к резервуару Omaya можно получить неоднократно у постели больного с помощью стерильной пункции через кожу головы в резервуар с применением иглы 25 калибра. В некоторых вариантах осуществления, перед инъекцией терапевтического агента отбирают несколько миллилитров СМЖ. Загрязнение и инфицирование резервуара Omaya является риском, хотя и менее вероятным, чем при использовании других способов доступа к внутрижелудочковому компартменту (примерно у 10% пациентов в конечном итоге СМЖ заражена бактериями). Уровень инфицирования часто оказывается выше в серии случаев, сообщающих об инфекционных осложнениях с резервуарами Omaya, из-за продолжительности имплантации (часто >1 года) по сравнению с другими устройствами временного доступа. Другие редкие осложнения, которые могут возникнуть с резервуарами Omaya, включают лейкоэнцефалопатию, некроз белого вещества и внутримозговое кровоизлияние.

В ситуациях, когда требуется ограниченный доступ к пространству СМЖ, может быть размещена вентрикулостомия. При использовании этого метода, катетер вводят под кожу из трепанационного отверстия. Катетер обычно подключают к стерильной камере для сбора. Доступ к катетеру можно получить стерильно, если это необходимо для введения любого из векторов, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах

осуществления, вектор можно вводить путем инъекции раствора в наиболее проксимальный порт вентрикулостомии и промывания раствора в мозге небольшим количеством изотонического раствора (3-5 мл). После этой инстилляции, трубки вентрикулостомии обычно зажимают не менее чем на 15 минут, чтобы введенный инъекцией раствор уравнился в СМЖ, прежде чем снова открыть дренаж. Пациенты со стойко повышенным внутричерепным давлением могут не переносить резкое прекращение дренажа СМЖ, поэтому зажим вентрикулостомии должен выполняться с осторожностью и тщательным наблюдением за пациентом. Вентрикулостомия идеальна для состояния, которое требует ограниченного периода времени для дренирования СМЖ или внутрижелудочкового введения любого из векторов, описанных в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления, в описании представлены способы введения любого из векторов, описанных в настоящем документе, субъекту, где субъектом является примат. В некоторых вариантах осуществления, приматом является человек. В некоторых вариантах осуществления, приматом является примат, не являющийся человеком. В некоторых вариантах осуществления, приматом, не являющимся человеком, является старосветская мартышка, орангутан, горилла, шимпанзе, макак-крабоед, макак-резус или свинохвостый макак.

Г. Способы лечения

Настоящее описание рассматривает способы лечения субъекта (*например*, примата, такого как человек или яванский макак), нуждающегося в этом, включающие введение субъекту любой из нуклеиновых кислот, векторов, вирусных частиц и/или композиций, описанных в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления, в описании представлены способы лечения примата (*например*, человека или яванского макака), включающие интрацеребровентрикулярное (ICV) введение любого из векторов, описанных в настоящем документе, примату. В конкретных вариантах осуществления, в описании представлены композиции и способы экспрессии представляющего интерес гена или его биологически активного варианта и/или фрагмента, включающие введение примату (*например*, человеку или яванскому макаку), нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества вектора аденоассоциированного вируса 1 (AAV1) и/или вектора аденоассоциированного вируса 5 (AAV5), кодирующего представляющий интерес ген. В некоторых вариантах осуществления, вектор AAV1 или AAV5 вводят примату внутривенным введением, интратекальным введением, интрацеребровентрикулярным введением, интрапаренхимальным введением или их комбинацией. В описании также представлены композиции и способы ингибирования или лечения одного или нескольких симптомов, связанных с нейрональным заболеванием или нарушением у примата (*например*, человека или яванского макака), нуждающегося в этом, включающие введение аденоассоциированного вектора (AAV), выбранного из группы, состоящей из аденоассоциированного вектора 1 (AAV1) или аденоассоциированного вектора 5 (AAV5),

указанному примату. В некоторых вариантах осуществления, вектор AAV1 или AAV5 вводят примату внутривенным введением, интратекальным введением, интрацеребровентрикулярным введением, интрапаренхимальным введением или их комбинацией.

В некоторых вариантах осуществления, в описании представлены способы лечения нейрональных заболеваний или нарушений. Нейрональные заболевания или нарушения, подходящие для лечения, включают, но не ограничены ими, синдром Драве, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, болезнь Хантингтона, боковой амиотрофический склероз (ALS), спинальную мышечную атрофию (SMA), эпилепсию, нейродегенеративные нарушения, моторные нарушения, нарушения движения, расстройства настроения, заболевания двигательных нейронов, прогрессирующую мышечную атрофию (PMA), прогрессирующий бульбарный паралич, псевдобульбарный паралич, первичный боковой склероз, неврологические последствия СПИД, нарушения развития, рассеянный склероз, нейрогенетические нарушения, инсульт, травмы спинного мозга и черепно-мозговые травмы.

В некоторых вариантах осуществления, в описании представлены способы лечения нейронального заболевания или нарушения у субъекта (*например*, примата), нуждающегося в этом, включающие введение субъекту терапевтически эффективного количества любой из конструкций нуклеиновых кислот, вирусных векторов, вирусных частиц и/или фармацевтических композиций, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, у такого субъекта диагностировано нейрональное заболевание или нарушение или имеется риск их возникновения, где нейрональным заболеванием или нарушением является любое одно или несколько из: синдрома Драве, болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, болезни Хантингтона, бокового амиотрофического склероза (ALS), спинальной мышечной атрофии (SMA), эпилепсии, нейродегенеративных нарушений, моторных нарушений, двигательных нарушений, расстройств настроения, заболевания двигательных нейронов, прогрессирующей мышечной атрофии (PMA), прогрессирующего бульбарного паралича, псевдобульбарного паралича, первичного бокового склероза, неврологических последствий СПИД, нарушений развития, рассеянного склероза, нейрогенетических нарушений, инсульта, травм спинного мозга и черепно-мозговых травм.

В некоторых случаях, лечение с использованием конструкции нуклеиновой кислоты, вектора, вирусного вектора, вирусной частицы или фармацевтической композиции, описанных в настоящем документе, приводит к улучшению симптомов, связанных с нейрональным заболеванием или нарушением. Например, пациент с болезнью Паркинсона может отслеживаться симптоматически на предмет улучшения моторных функций, что указывает на положительный ответ на лечение. Введение терапии с использованием описанного в настоящем документе способа субъекту с риском развития нейронального нарушения может предотвратить развитие или замедлить прогрессирование одного или нескольких симптомов.

В некоторых вариантах осуществления, способы и композиции по настоящему описанию можно использовать для лечения субъекта, у которого было диагностировано нейрональное заболевание, например синдром Драве. В различных вариантах осуществления, любое из нейрональных заболеваний или нарушений, описанных в настоящем документе, вызвано известным генетическим событием (*например*, любой из мутаций SCN1A, известных в данной области техники) или имеет неизвестную причину.

В некоторых вариантах осуществления, способы и композиции по настоящему описанию можно использовать для лечения субъекта, который находится в группе риска развития заболевания или нарушения. В некоторых вариантах осуществления, может быть известно, что субъект предрасположен к заболеванию, например нейрональному заболеванию (*например*, синдрому Драве). В некоторых вариантах осуществления, субъект может быть предрасположен к заболеванию из-за генетического события или из-за известных факторов риска. Например, субъект может нести мутацию в SCN1A, которая ассоциирована с синдромом Драве.

В некоторых вариантах осуществления, один или несколько дополнительных терапевтических агентов (*например*, фармацевтические соединения) вводят совместно с любыми конструкциями нуклеиновых кислот, вирусными векторами, вирусными частицами и/или фармацевтическими композициями, описанными в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, дополнительный терапевтический агент(ы) создан для лечения того же заболевания, нарушения или состояния, что и любая из конструкций нуклеиновых кислот, вирусных векторов, вирусных частиц и/или фармацевтических композиций, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, дополнительный терапевтический агент(ы) предназначены для лечения другого заболевания, нарушения или состояния, чем любая из конструкций нуклеиновых кислот, вирусных векторов, вирусных частиц и/или фармацевтических композиций, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, дополнительные терапевтические агенты(ы) предназначены для лечения нежелательного побочного эффекта одной или нескольких любых конструкций нуклеиновых кислот, вирусных векторов, вирусных частиц и/или фармацевтических композиций, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, любые конструкции нуклеиновой кислоты, вирусные векторы, вирусные частицы и/или фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, вводят в комбинации с дополнительным фармацевтическим агентом для лечения нежелательного эффекта дополнительного фармацевтического агента. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько терапевтических агентов вводят совместно с любыми конструкциями нуклеиновых кислот, вирусными векторами, вирусными частицами и/или фармацевтическими композициями, описанными в настоящем документе, для получения комбинированного эффекта. В некоторых вариантах осуществления, один или несколько терапевтических агентов вводят совместно с любыми конструкциями нуклеиновых кислот, вирусными векторами, вирусными частицами и/или фармацевтическими композициями, описанными

в настоящем документе, для получения синергетического эффекта у подвергаемого лечению субъекта (*например*, примата).

В некоторых вариантах осуществления, любые конструкции нуклеиновых кислот, вирусные векторы, вирусные частицы и/или фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, и дополнительный терапевтический агент вводят одновременно. В некоторых вариантах осуществления, любые конструкции нуклеиновых кислот, вирусные векторы, вирусные частицы и/или фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, и дополнительный терапевтический агент вводят в разное время. В некоторых вариантах осуществления, любые конструкции нуклеиновой кислоты, вирусные векторы, вирусные частицы и/или фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, и дополнительный терапевтический агент готовят вместе в едином составе. В некоторых вариантах осуществления, любые конструкции нуклеиновых кислот, вирусные векторы, вирусные частицы и/или фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, и дополнительный терапевтический агент готовят отдельно.

В некоторых вариантах осуществления, терапевтические агенты, которые можно вводить совместно с любыми конструкциями нуклеиновых кислот, вирусными векторами, вирусными частицами и/или фармацевтическими композициями, описанными в настоящем документе, включают антипсихотические агенты, такие как, *например*, галоперидол, хлорпромазин, клозапин, кветапин, и оланзапин; антидепрессанты, такие как, *например*, флуоксетин, сертралина гидрохлорид, венлафаксин и нортриптилин; транквилизаторы, такие как, *например*, бензодиазепины, клоназепам, пароксетин, венлафаксин и бета-блокаторы; агенты, стабилизирующие настроение, такие как, *например*, литий, вальпроат, ламотриджин и карбамазепин; паралитические агенты, такие как, *например*, ботулинический токсин; и/или другие экспериментальные агенты, включая, но не ограничиваясь ими, тетрабеназин (Ксеназин), креатин, коэнзим Q10, трегалозу, докозагексановую кислоту, ACR16, этил-EPA, атомоксетин, циталопрам, димебон, мемантин, фенилбутират натрия, рамелтеон, урсодиол, ципрекса, ксеназин, тиоприд, рилузол, амантадин, [123I]MNI-420, атомоксетин, тетрабеназин, дигоксин, детрометорфан, варфарин, альпрозам, кетоконазол, омепразол, ингибиторы холинэстеразы, донепезил, ривастигамин, галантамин, леводопа и миноциклин.

В некоторых вариантах осуществления, одну или несколько конструкций нуклеиновых кислот, вирусных векторов, вирусных частиц и/или фармацевтических композиций, описанных в настоящем документе, вводят в комбинации с осмолитом, *например*, маннитом или сорбитом. В некоторых вариантах осуществления, осмолитом является полиол/многоатомный спирт, *например*, маннит и сорбит. В некоторых вариантах осуществления, осмолитом является сахар, *например*, сахароза или мальтоза. В некоторых вариантах осуществления, осмолитом является аминокислота или ее производное, *например*, глицин или пролин. В некоторых вариантах осуществления, осмолит совместно вводят в СМЖ инъекцией или инфузией. В некоторых вариантах осуществления, осмолит вводят внутрисосудистой инъекцией или инфузией,

интрацеребровентрикулярной инъекцией или инфузией, интратекальной цистернальной инъекцией или инфузией, или интратекальной поясничной инъекцией или инфузией. В некоторых вариантах осуществления, введение осмолита может быть одновременным с введением любой из конструкций нуклеиновых кислот, вирусных векторов, вирусных частиц и/или фармацевтических композиций, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, осмолит может быть введен в СМЖ перед введением любой из конструкций нуклеиновых кислот, вирусных векторов, вирусных частиц и/или фармацевтических композиций, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, осмолит может быть введен в СМЖ после введения любой из конструкций нуклеиновых кислот, вирусных векторов, вирусных частиц и/или фармацевтических композиций, описанных в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления, как только осмолит (*например*, маннит) и терапевтический агент (*например*, любая из конструкций нуклеиновых кислот, вирусных векторов, вирусных частиц и/или фармацевтических композиций, описанных в настоящем документе) приготовлены в виде раствора для введения субъекту, его вводят в СМЖ. В некоторых вариантах осуществления, приготовленный раствор вводят такими способами, как внутрисосудистая инъекция или инфузия, интрацеребровентрикулярная инъекция или инфузия, интратекальная цистернальная инъекция или инфузия, или интратекальная поясничная инъекция или инфузия. В некоторых вариантах осуществления, инъекции или инфузии осуществляют в течение периода времени и со скоростью потока, подходящих для конкретной конструкции нуклеиновой кислоты, вирусного вектора, вирусной частицы и/или фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления, может быть более желательным предварительное введение раствора осмолита (*например*, маннита) интратекально, чтобы он мог воздействовать на местную среду до интратекального введения терапевтического средства.

Н. Примеры

Генная терапия с использованием аденоассоциированных вирусных (AAV) векторов обладает трансформационным потенциалом для лечения заболеваний, влияющих на центральную нервную систему. Исследования на моделях мелких животных показали, что доставка векторов AAV в спинномозговую жидкость (СМЖ) может успешно приводить к переносу генов в клетки по всему головному и спинному мозгу, делая неврологические заболевания поддающимися генной терапии. Существенным для внедрения этого подхода в клинику является определение безопасных и эффективных путей доставки AAV в СМЖ в моделях крупных животных.

В этом исследовании напрямую сравнивают эффективность биораспределения и трансдукции AAV9 по пяти разным путям доставки СМЖ в контролируемой дозе: унилатеральный интрацеребровентрикулярный (ICV), билатеральный ICV, интратекальный люмбальный (IT-люмбальный) пути и в большую цистерну (ICM) молодым, отрицательным по нейтрализующим антителам (NAb) самцам яванского макака (*Macaca fascicularis*). Пути введения в СМЖ дополнительно сравнивают с внутривенной

(BB) инъекцией в аналогичной дозе. Также систематически количественно оценивают биораспределение и эффективность трансдукции клинически подтвержденных серотипов AAV, включая серотип 9 AAV (AAV9), серотип 5 AAV (AAV5) и серотип 1 AAV (AAV1) ICV введением.

Используют векторы AAV, экспрессирующие зеленый флуоресцентный белок (eGFP), управляемый промотором бета-актина курицы (CBA) через тройную трансфекцию клеток НЕК293. Векторы титруют с помощью цифровой капельной ПЦР (цкПЦР). Биораспределение оценивают по тканям ЦНС и периферических органов.

Таким образом, в этом многослойном исследовании демонстрируется эффективность различных способов введения и серотипов AAV в отношении доставки вируса к разным структурам мозга. Открытия говорят о выборе пути внутрь-СМЖ введения и выборе AAV серотипа капсида для клинической трансляции ЦНС-направленной генной терапии.

ПРИМЕР 1: Исследование пути введения на яванских макаках

Целью этого исследования является сравнение биораспределения в центральной нервной системе (ЦНС) яванского макака при пяти различных путях введения: унилатеральный интрацеребровентрикулярный (ICV), билатеральный ICV, интратекальный (IT) люмбальный, в большую цистерну (ICM) или внутривенной (BB) инъекцией. Каждому животному вводят инъекцией AAV9, содержащий кассету экспрессии, кодирующую eGFP-KASH, под контролем промотора бета-актина курицы (CBA) (называемого AAV9-CBA-eGFP-KASH). Частицы AAV9 составляют в PBS+0,001% PF-68 и вводят либо в высокой дозе (1,0E+13 гв/животное), либо в низкой дозе (2,4E+12 гв/животное). Каждому животному вводят 2 мл составленных вирусных частиц независимо от пути введения. Дизайн исследования представлен ниже в Таблице 1.

Таблица 1. Дизайн исследования для изучения пути введения.

№ животного	Группа	Вектор	ROA	День окончания	Доза (ВГ/животное)
4001	1А	AAV9-CBA-eGFP-KASH	Унилатеральный ICV	28	1,0E+13
1005	1А		Унилатеральный ICV	28	2,4E+12
1002	1В		Билатеральный ICV	29	1,0E+13
1003	1В		Билатеральный ICV	29	2,4E+12
1006	1С		IT	27	1,0E+13
1001	1С		IT	27	2,4E+12

1008	1D	ICM	29	1,0E+13
1007	1D	ICM	28	2,4E+12
1009	1E	BB	27	2,5E+12

В этом исследовании используют экспериментально наивных самцов яванского макака (*Macaca fascicularis*). В начале введения дозы животные имеют возраст от 10 до 11 месяцев и весят $1,4 \pm 0,2$ кг. Животных распределяют в исследуемые группы с помощью простой процедуры рандомизации. Перед началом исследования образцы крови животных тестируют на уровни титра нейтрализующих антител (Nab) к AAV9, AAV5 и AAV1. Для исследования выбирают животных с низкими или отрицательными результатами на антитела.

Интрацеребровентрикулярное введение

Животных анестезируют, готовят к операции и помещают в стереотаксическую рамку, совместимую с МРТ (Kopf). Для определения координат мишени проводят базовую МРТ. Делают разрез, и сверлят одно отверстие в черепе над локацией-мишенью. Иглу опускают на место, и вектор AAV9-CBA-eGFP-KASH вводят в боковой желудочек. Для проверки введения иглы в желудочек используют инъекции контрастного вещества и рентгеноскопию. AAV9-CBA-eGFP-KASH вливают со скоростью 0,1 мл/мин в течение 10 минут для каждой левой и правой билатеральной ICV обработки и 0,1 мл/мин в течение 20 минут для унилатеральной ICV обработки. Иглу оставляют на месте от 1 до 2 минут после завершения инфузии. После завершения дозирования кожу закрывают стандартным образом, и животным дают возможность восстановиться.

Инtrateкальная (IT) люмбальная инъекция

Животных анестезируют изофлураном и помещают в положение лежа на боку. Доступ к люмбальной цистерне осуществляют через иглу для чрескожного введения. Иглу вставляют между L3/L4, что подтверждают рентгеноскопией с контрастным красителем. После установки иглы подтверждают положительный ток СМЖ. Шприц, содержащий AAV9-CBA-eGFP-KASH, присоединяют к игле, и вектор медленно вливают вручную в течение 1 минуты. После завершения инъекции, шприц удаляют и подтверждают отток СМЖ. Животных помещают в положение Тренделенбурга на 10 минут после завершения дозирования.

Инъекция в большую цистерну (ICM)

Животных анестезируют изофлураном и помещают в положение лежа на боку. Доступ к большой цистерне осуществляют через иглу для чрескожного введения. Иглу вводят между основанием черепа и C1. Шприц, содержащий AAV9-CBA-eGFP-KASH, присоединяют к игле, и вектор медленно вводят вручную в течение 1 минуты. После завершения инъекции, шприц удаляют и подтверждают отток СМЖ.

Внутривенная инъекция

Животным вводят AAV9-CBA-eGFP-KASH с помощью болюсной инъекции в хвостовую вену.

После введения дозы за животными регулярно наблюдают на протяжении всего исследования, и образцы крови собирают еженедельно. Оценивают следующие параметры и конечные точки: смертность, клинические наблюдения, масса тела, физическое обследование, параметры клинической патологии (клиническая химия), анализ образца нейтрализующих антител, РВМС, СМЖ, анализ биораспределения и экспрессии гена, результаты общего вскрытия трупа и гистопатологические исследования.

Результаты этого исследования демонстрируют, что введение исследуемого препарата не связано с какой-либо неожиданной смертностью, клиническими открытиями, изменениями массы тела или макроскопическими наблюдениями. При оценке конечных точек клинической химии у всех животных, которым вводили AAV9-СВА-eGFP, независимо от пути введения, наблюдают повышение индивидуальной активности аланинаминотрансферазы (ALT), аспартатаминотрансферазы (AST) и/или глутаматдегидрогеназы (GLDH), которое считается связанными с вектором AAV и свидетельствуют о гепатоцеллюлярных эффектах.

Все животные доживают до запланированного вскрытия трупа. После эвтаназии и перфузии физиологического раствора головной мозг извлекают и разрезают на коронарные срезы от 4 до 5 мм (см. фиг. 1), и образцы кПЦР собирают с ровных срезов, билатерально, с использованием 8 мм иглы для биопсии. Для каждого сайта используют новую иглу. Каждую иглу для биопсии разрезают пополам (одну половину для кПЦР, а другую половину для РВ-кПЦР). Образцы ткани, взятые из головного мозга, включают: 4 области коры ((лобная, теменная, височная и затылочная), 2 секции, если возможно), гиппокамп (2 секции, если возможно), мозговое вещество и мозжечок.

Для исследований биораспределения с использованием кПЦР образцы ткани (от 100 до 200 мг на образец ткани, за исключением селезенки) собирают из сердца, печени, легких, почек (обеих), головного мозга, спинного мозга (SC), спинальных ганглиев (DRG), семенников и селезенки (от 50 до 100 мг). Спинной мозг и DRG собирают из шейного (C2), грудного (T1 и T8) и поясничного (L4) участков. Образцы собирают в индивидуально промаркированные криопробирки, мгновенно замораживают в жидком азоте и помещают на сухой лед. Образцы хранят в замороженном состоянии при от -60°C до -90°C .

Для исследований экспрессии генов с использованием РВ-ПЦР, образцы тканей собирают из сердца, печени, легких, почек (обеих), селезенки, лимфатического узла, головного мозга, спинного мозга, DRG и яичек. Спинной мозг и DRG собирают из (C3, C4, T2, T3, T9, T10, L2 и L5). Образцы индивидуально помещают в предварительно промаркированные криопробирки, содержащие РНК-Later, и охлаждают (от 2°C до 8°C) от 24 до 48 часов. Образцы вынимают из холодильника и хранят замороженными при температуре от -60°C до -90°C .

Коллекция гистопатологии ткани. После сбора образцов кПЦР и РВ-кПЦР всю оставшуюся ткань головного мозга, спинной мозг и DRG, периферические органы (легкие, наполненные на 4%) фиксируют в 4% параформальдегиде (PFA) в течение 24-48 часов

при комнатной температуре, а затем переносят в 70% этанол.

Анализ числа копий вектора

Число копий вектора (VCN) определяют в различных областях головного мозга, спинном мозге, спинальном ганглии, сердце, печени, почках и селезенке. Для образцов головного мозга используют пробы ткани (см. фиг. 1) из различных областей мозга, например, лобной коры (2 пробы, по 1 от каждого полушария среза 2), теменной коры (4 пробы, по 1 от каждого полушария срезов 4 и 8), височной коры (2 пробы, по 1 от каждого полушария среза 6), гиппокампа (4 пробы, по 1 от каждого полушария срезов 8 и 10), мозжечка (2 пробы, по 1 от каждого полушария среза 12), мозгового слоя (2 пробы, по 1 от каждого полушария среза 12) и затылочной коры (2 пробы, по 1 от каждого полушария среза 14). Все образцы тканей обрабатывают, как изложено ниже.

ДНК ткани выделяют с помощью наборов DNeasy Blood & Tissues (Qiagen). Количество ДНК определяют и нормализуют с помощью УФ-спектрофотометра. 100 нг ДНК ткани добавляют к 50 мкл реакции вместе с TaqPath ProAmp Multiplex Master Mix (Thermo Fisher Scientific) и TaqMan праймеров и зондов, направленных против областей eGFP. Стандартные кривые плазмиды получают линейризацией рестрикционного фермента и очисткой с помощью набора DNA Clean & Concentrator (Zymo Research). Линейризованную ДНК оценивают количественно с помощью УФ спектрофотометрии и 10-кратно серийно разводят от 10^6 до 50 копий на 10 мкл. Разведенные стандартные кривые добавляют в 50 мкл реакции, как для образцов ткани. TaqMan кПЦР проводят с использованием системы Lightcycler 96 (Roche, Life Science), чтобы определить количество копий вектора в тканях для исследований биораспределения, с использованием протокола двухстадийной цикличности (начальная денатурация/активация фермента: 95°C в течение 10 минут, 40 циклов: 95°C в течение 15 секунд, 60°C в течение 60 секунд). Последовательность геномного альбумина обезьяны (Alb) служит внутренним контролем содержания геномной ДНК и ее амплифицируют в отдельной реакции. Образцы считают подходящими, если значение Alb Ct меньше 26.

Последовательности зондов eGFP праймеров:

FW: AACCGCATCGAGCTGAAGG;

RV: GCCATGATATAGACGTTGTGGC;

Зонд: AGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCA

Последовательности альбумина яванского макака:

FW: GCTGTTATCTCTTGTGGGCTGT

RV: AAATCATGGGAGCTGCCGGTT

Зонд: CCACACAATCTCTCCCTGGCATTG

Результаты анализа числа копий вектора показывают, что ICV введение более эффективно для доставки AAV в мозг, чем ICM введение, и ICV значительно более эффективно при доставке AAV в мозг, чем IT-люмбальное или внутривенное введение (см. фигуры 2-9). Кроме того, результаты показывают, что унилатеральное ICV введение сравнимо или более эффективно при доставке AAV в мозг, чем билатеральное ICV

введение (см. фигуры 10-14).

Определение титра анти-AAV нейтрализующего антитела (NAb) в сыворотках приматов, не являющихся человеком

Определяют титр нейтрализующих антител до и после обработки вирусными векторами. Клеточную линию 293AAV приобретают у Cell Biolabs, Inc. (San Diego, CA) и культивируют в среде DMEM с добавлением 10% инактивированного нагреванием FBS. Используют Nano-Glo® Luciferase Assay System и GloMax®-Multi+ Microplate Multimode Reader (Promega (Madison, WI)). Сыворотки NHP получают из анализов крови, полученных до введения дозы и на 1, 14 и 28 дни после введения дозы. Образцы сыворотки инактивируют нагреванием при 56°C в течение 30 минут перед использованием.

В день-1 анализа, 293AAV клетки высевают в 96-луночный плоскодонный планшет для культивирования при $1 \times 10^4/100$ мкл (AAV1 и AAV5) или $1,5 \times 10^4/100$ мкл (AAV9), и инкубируют в течение ночи при 37°C, 5% CO₂. На второй день проводят серийные разведения образцов сыворотки NHP перед смешиванием образцов с векторами AAV-CMV_NLuc, и инкубируют при 37°C в течение 1 часа. Для каждого планшета также создают 100% контроль векторной трансдукции и 0% контроль трансдукции (фоновый сигнал). Наконец, совместно инкубированные смеси переносят в 96-луночный плоскодонный планшет для культивирования для достижения MOI (множественности заражения) 1000, 2000 и 10000 для AAV1, AAV5 и AAV9, соответственно. После 48-часовой инкубации при 37°C, Nano-Glo® Luciferase Assay Reagent готовят согласно инструкции производителя и добавляют в планшет, и измеряют люминесценцию в Greiner Bio-One White Polystyrene LUMITRAC 200 Microplate (Greiner Bio-One)).

Результаты анализа показаны в таблице 2 ниже. Титр анти-AAV нейтрализующих антител определяют как обратную величину наибольшему разведению сыворотки, при котором трансдукция AAV снижается >50% по сравнению с отрицательным контролем.

$$\% \text{ ингибирования} = 100 - \left(\frac{RLU \text{ тестируемого образца} - RLU \text{ без вируса}}{RLU \text{ max} - RLU \text{ без вируса}} \times 100 \right)$$

После введения вектора AAV9 все животные имеют измеряемые анти-AAV9 нейтрализующие капсид антитела, которые сохраняются до конца исследования (см. таблицу 2).

Таблица 2. Титры нейтрализующих антител для животных, леченных векторами AAV9.

№ животного	Группа	Вектор	ROA	Доза (ВГ/животное)	Титр нейтрализующих антител			
					Перед введением дозы	1 день	14 день	28 день
4001	1A	AAV9-	Унилатеральный ICV	1,0E+13	<5	<5	80	80

1005	1A	СВА- eGFP - KAS H	Унилатерал ный ICV	2,4E+12	<5	<5	320	1280
1002	1B		Билатеральн ый ICV	1,0E+13	<5	<5	80	80
1003	1B		Билатеральн ый ICV	2,4E+12	<5	<5	320	80
1006	1C		IT	1,0E+13	<5	<5	80	80
1001	1C		IT	2,4E+12	<5	<5	80	80
1008	1D		ICM	1,0E+13	<5	<5	20	5
1007	1D		ICM	2,4E+12	<5	<5	320	1280
1009	1E		BB	2,5E+12	40	5	320	320
11004	4		AAV 9- SEQ	Унилатерал ный ICV	2,7E+12	40	80	20
4002	4	ID 76- eGFP - WPR E	Унилатерал ный ICV	2,7E+12	<5	5	80	80

Иммуногистохимический анализ для исследования пути введения

Уровень экспрессии зеленого флуоресцентного белка (GFP) в различных тканях определяют после введения AAV. После перфузии солевого раствора, ткань фиксируют в 4% параформальдегиде в течение 48 часов, переносят в 70% этанол, заливают парафином и делают срезы толщиной 5 мкм. После удаления парафина с помощью ксилола и спирта, проводят тепловое извлечение в цитратном буфере (pH 6) в течение 20 мин при 95°C. Окрашивание первичного антитела анти-GFP курицы (Aves Labs GFP1020)] проводят в течение ночи при 1:5000, затем определяют с помощью анти-куриного-HRP козы (Thermo A16054) в соотношении 1:1000 в течение 1 ч. TSA-FITC (PerkinElmer) используют в соотношении 1:100 в течение 10 минут, затем окрашивают DAPI. Срезы визуализируют с помощью PE Vectra3 с использованием 10x объектива, и изображения DAPI и FITC окрашивания получают при 4 и 40 мс, соответственно.

Как показано на фигуре 15, животные, которым вводят векторы AAV9 различными путями введения, демонстрируют разную степень экспрессии GFP в областях головного мозга, спинного мозга и спинальных ганглиев.

ПРИМЕР 2: Исследование серотипа AAV на яванских макаках

Целью этого исследования является сравнение биораспределения в центральной

нервной системе (ЦНС) яванского макака с использованием 3 различных серотипов AAV: AAV1, AAV5 и AAV9. Животным вводят вектор AAV (AAV1, AAV5 или AAV9), содержащий кассету экспрессии, кодирующую eGFP-KASH под контролем промотора бета-актина курицы (CBA) (называемого AAVX-CBA-eGFP-KASH) или вектора AAV9, содержащего кассету экспрессии, кодирующую eGFP под контролем промотора, имеющего SEQ ID NO: 76 и содержащего посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурка (WPRE) (называемый AAV9-SEQ ID 76-eGFP-WPRE). Частицы AAV составляют в PBS+0,001% PF-68 и вводят в дозах, перечисленных в таблице ниже. Каждому животному вводят 2 мл составленных вирусных частиц. Дизайн исследования представлен ниже в Таблице 3.

Таблица 3. Дизайн исследования серотипа AAV.

№ животного	Группа	Вектор	ROA	День окончания	Доза (ВГ/животное)
2001	2	AAV5-CBA-eGFP-KASH	Унилатеральный ICV	30	2,8E+12
2002	2		Унилатеральный ICV	30	2,8E+12
3001	3	AAV1-CBA-eGFP-KASH	Унилатеральный ICV	28	2,0E+12
3002	3		Унилатеральный ICV	14	2,0E+12
11004	4	AAV9-SEQ ID 76-eGFP-WPRE	Унилатеральный ICV	29	2,7E+12
4002	4		Унилатеральный ICV	29	2,7E+12

Животным вводят дозу, как указано в примере 1, для унилатеральной инъекции ICV. За животными регулярно наблюдают, и образцы крови собирают еженедельно, как указано в примере 1. Все животные выжили до запланированного вскрытия, за исключением животного 3002. На 14 день отмечают, что животное 3002 является атаксичным с пониженной и аномальной активностью. Животное продолжает ухудшаться, и его усыпляют.

У всех животных, которым вводят AAV9-CBA-eGFP, независимо от способа введения или партии, и у нескольких особей, которым вводят AAV5-CBA-eGFP или AAV1-CBA-eGFP, наблюдают повышение индивидуальной аланинаминотрансферазы (ALT), аспартатаминотрансферазы (AST) и/или активности глутаматдегидрогеназы (GLDH), которые считают связанными с вектором AAV и показывающими на

гепатоцеллюлярные эффекты. Подобные эффекты не наблюдают после введения AAV9-SEQ ID 76-eGFP-WPRE.

После эвтаназии ткани обрабатывают для кПЦР, РВ-кПЦР и гистопатологии, как указано в Примере 1. Число копий вектора определяют, как описано в Примере 1. Результаты показывают, что AAV1, AAV5 и AAV9 показывают сопоставимую трансдукцию вектора в головном мозге, хотя уровни AAV9 были немного выше (см. фигуры 16-19).

Титры нейтрализующих антител также определяют для исследования серотипа, как изложено выше в примере 1. Результаты для векторов AAV9 показаны выше в таблице 2, и результаты для векторов AAV5 и AAV1 показаны ниже в таблице 4.

Таблица 4. Титры нейтрализующих антител для животных, леченных векторами AAV5 и AAV1.

№ животного	Группа	Вектор	ROA	Доза (ВГ/животное)	Титр нейтрализующих антител			
					Перед введением дозы	1 день	14 день	28 день
2001	2	AAV5-	Унилатеральный ICV	2,8E+12	<5	<5	5120	5120
2002	2	СВА-eGFP - KAS Н	Унилатеральный ICV	2,8E+12	<5	<5	5120	5120
3001	3	AAV1-	Унилатеральный ICV	2,0E+12	<5	5	1280	320
3002	3	СВА-eGFP - KAS Н	Унилатеральный ICV	2,0E+12	<5	20	80	Н/Д

После введения векторов AAV1, AAV5 и AAV9 все животные имеют измеряемые анти-AAV капсид нейтрализующие антитела, которые сохраняются до конца исследования (см. таблицы 2 и 4).

ИНС анализ уровней экспрессии GFP также проводят для животных, леченных AAV1, AAV5 и AAV9, как указано выше в примере 1. Как показано на фигуре 20, разная степень экспрессии GFP наблюдается для всех трех серотипов в тканях головного и спинного мозга.

ПРИМЕР 3: Биораспределение eTF^{SCN1A}

Целью данного исследования является сравнение биораспределения eTF^{SCN1A} в центральной нервной системе (ЦНС) молодых яванских макаков при введении в дозе 4,8E+13 вг/животное или 8E+13 вг/животное унилатеральной интрацеребровентрикулярной (ICV) инъекцией. Каждому животному вводят AAV9, содержащий кассету экспрессии, кодирующую eTF^{SCN1A} под контролем GABA селективного регуляторного элемента (RE^{GABA}-eTF^{SCN1A}). Частицы AAV9 составляют в PBS+0,001% плуриноновой кислоты и вводили в дозе 4,8E+13 гв/животное или 8E+13 гв/животное. Каждому животному вводят 2 мл составленных вирусных частиц. Дизайн исследования представлен в таблице 8.

Яванских макаков в возрасте двадцать четыре месяца группируют как показано в таблице 8. Перед началом исследования образцы крови животных тестируют на уровни титра нейтрализующих антител к AAV9 с использованием анализа титра NAb, описанного выше. Для исследования выбирают животных с низкими или отрицательными результатами на антитела. Образцы вводят ICV инъекцией с использованием стандартных хирургических процедур. Размороженный дозируемый материал недолго хранят на влажном льду и нагревают до комнатной температуры непосредственно перед дозированием. Животных анестезируют, готовят к операции и помещают в стереотаксическую рамку, совместимую с MPT (Korff). Для определения координат мишени проводят базовую MPT. Делают разрез и сверлят одно отверстие в черепе над локацией-мишенью. 3 мл шприц BD, прикрепленный к набору для вытяжения с 36” микропросветом готовят с образцом и помещают в инфузионный насос. Выносную линию примируют. Твердую мозговую оболочку вскрывают, и дозирующую иглу продвигают на глубину от 13,0 до 18,1 мм от мягкой мозговой оболочки. Инъекцию контрастного вещества и рентгеноскопию используют для подтверждения введения спинномозговой иглы в правый боковой желудочек. 3,0” 22 г спинальную иглу с наконечником Губера Quinke BD заполняют контрастным веществом для определения положения перед прикреплением заправленной примированной выносной линии и шприца. Настройки насоса составляли 0,1 мл/мин в течение 19-20 минут. Буфер вводят вручную после введения дозы, чтобы очистить выносную линию. Иглу оставляют на месте в течение 1-2 минут после завершения инфузии, и затем иглу извлекают. Носитель и тестируемое вещество вводят один раз в день 1, и субъектов поддерживают в течение 27- или 29-дневного периода восстановления.

Таблица 8. Дизайн исследования биораспределения

Группа	Пол	ID	Доза (ВГ/животное)
Группа 1 (буферный контроль)	М	21001	
	Ф	11501	
2 группа (RE ^{GABA} -eTF ^{SCN1A})	М	2001	4,8E+13
	Ф	2501	4,8E+13

	М	3001	4,8E+13
	М	3002	8E+13

После введения дозы за животными регулярно наблюдают на протяжении всего исследования, и периодически собирают образцы крови. Введение eTF^{SCN1A} не связано с неожиданной смертностью, клиническими данными или макроскопическими наблюдениями. Животные, леченные $AAV9-RE^{GABA}-eTF^{SCN1A}$, выживают до запланированного вскрытия на 28 ± 2 дня. Никаких клинических или поведенческих признаков, повышения температуры тела или снижения массы тела во время ежедневных или еженедельных медицинских осмотров не наблюдают. Наблюдают временное повышение печеночных трансаминаз (ALT и AST) у животных, леченных $AAV9-RE^{GABA}-eTF^{SCN1A}$, но оно полностью исчезает к концу исследования без иммуномодуляции, и не отмечено сопутствующее повышение сывороточного билирубина или щелочной фосфатазы. Никакие другие измеренные результаты клинической химии не были выдающимися. Ни о каких микроскопических наблюдениях не сообщается при гистопатологических исследованиях печени. Лейкоциты СМЖ повышены в конечном сборе по сравнению со значениями до лечения, но сопоставимы между контрольными животными и животными, лечеными $AAV9-RE^{GABA}-eTF^{SCN1A}$. Плеоцитоз, связанный с $AAV9-RE^{GABA}-eTF^{SCN1A}$, не наблюдается. Макрообследования и подробное микрогистопатологическое исследование ненейрональных тканей у всех животных не является примечательным. Ткани включают основные периферические органы (например, сердце, легкие, селезенку, печень и гонады). Макрообследования и подробная микрогистопатология нейрональных тканей не показывает какие-либо заметные результаты. Ткани включают головной, спинной мозг и связанные с ним спинальные ганглии (из шейного, грудного и поясничного отделов). Исследования проводят тремя независимыми патологами, в том числе одним в специализированном центре невропатологии.

Введение ICV AAV9 не предотвращает иммунный ответ после введения дозы в сыворотке, поскольку анти-AAV9 капсид нейтрализующие антитела наблюдают через четыре недели после введения дозы. Однако уровни анти-AAV9 капсид нейтрализующих антител в спинномозговой жидкости остаются неизменными и сравнимыми с уровнями до введения дозы (таблица 9).

Таблица 9: Титр сывороточного NAb AAV9

Номер субъекта	Титр NAb AAV9 в сыворотке			Титр AAV9 NAb в СМЖ	
	Перед скринингом	При инъекции	Через 4 недели после инъекции	При инъекции	Через 4 недели после инъекции
21001	1:5	<1:5	<1:5	<1:5	<1:5
11501	<1:5	<1:5	<1:5	<1:5	<1:5

2001 г.	<1:5	<1:5	1:405	<1:5	1:5
2501	<1:5	<1:5	1:135	<1:5	1:5
3001	<1:5	<1:5	1:1215	<1:5	<1:5
3002	<1:5	<1:5	1:135	<1:5	<1:5

Образцы собирают через 27-29 дней после введения дозы из основных органов (желудочков сердца, долей печени, сердечных долей легких, почек, селезенки, поджелудочной железы и шейных лимфатических узлов) во время планового вскрытия. Биоптаты собирают восьмимиллиметровой иглой и обрабатывают, как описано ниже.

ПРИМЕР 4: Биораспределение eTF^{SCN1A} в головном мозге

цкПЦР используют для измерения биораспределения eTF^{SCN1A} в головном мозге. В образцах различных областей ткани мозга яванского макака (FC: лобная кора; PC: теменная кора; TC: височная кора; Hip: гиппокамп; Med: мозговое вещество; OC: затылочная кора) измеряют количество копий вектора для оценки биораспределения eTF^{SCN1A} под контролем GABA селективного регуляторного элемента (RE^{GABA}-eTF^{SCN1A}) при введении в AAV9 унилатеральным ICV. ДНК ткани выделяют с помощью наборов DNeasy Blood & Tissues (Qiagen). Количество ДНК определяют и нормализуют с помощью УФ спектрофотометра. 20 нанограмм ДНК ткани добавляют к реакционной смеси объемом 20 микролитров вместе с цкПЦР Super Mix for Probes (без dUTP) (Bio-Rad) и праймерами TaqMan и зондами, направленными против областей последовательности eTF^{SCN1A}. Создают капли, и матрицы амплифицируют с использованием автоматического генератора капель и термоциклера (Bio-Rad). После стадии ПЦР планшет загружают и считывают с помощью QX2000 Droplet Reader для определения числа копий вектора в тканях. Ген обезьяньего *альбумина* (MfAlb) служит внутренним контролем для нормализации содержания геномной ДНК и амплифицируется в той же реакции. Праймеры и зонды для eTF^{SCN1A} и MfAlb представлены в таблице 10.

Таблица 10: Праймеры и зонды для eTF^{SCN1A} и MfAlb

Название праймера/зона		Последовательность (5'-3')
eTF ^{SCN1A}	eTF ^{SCN1A} прямой праймер	GAATGTGGGAAATCATTCAGTCGC (SEQ ID NO: 77)
	eTF ^{SCN1A} обратный праймер	GCAAGTTATCCTCTCGTGAGAAGG (SEQ ID NO: 78)
	eTF ^{SCN1A} зонд	GCGACAACCTGGTGAGACATCAACGCACC (SEQ ID NO: 79)
MfАльбумин	MfAlb прямой праймер	GCTGTTATCTCTTGTGGGCTGT (SEQ ID NO: 80)

	MfAlb обратный праймер	AAACTCATGGGAGCTGCCGGTT (SEQ ID NO: 81)
	MfAlb зонд	CCACACAAATCTCTCCCTGGCATTG (SEQ ID NO: 82)

eTF^{SCN1A} широко распределен по всему мозгу при дозировке 4,8E+13 вирусных геномов на животное со средним значением 1,3-3,5 ГВ/диплоидный геном (фиг. 21). Кроме того, при сравнении переноса гена по всему мозгу RE^{GABA}-eTF^{SCN1A} при дозировке 4,8E+13 вирусных геномов на животное, с переносом гена по всему мозгу eGFP, введенного ICV в различных дозах, наблюдают увеличение ГВ/диплоидного генома с увеличением дозы. Это указывает на то, что перенос гена в головном мозге происходит дозозависимым образом при введении в AAV9 посредством ICV.

ПРИМЕР 5: Транскрипция eTF^{SCN1A} в головном мозге

Транскрипцию eTF^{SCN1A} под контролем GABA селективного регуляторного элемента (RE^{GABA}-eTF^{SCN1A}) оценивают путем измерения иРНК eTF^{SCN1A} с использованием анализа экспрессии генов на основе цкПЦР. РНК ткани выделяют с помощью наборов RNeasy Plus Mini (Qiagen) или RNeasy Lipid Tissue Mini (Qiagen) для тканей мозга. Количество РНК определяют и нормализуют с помощью УФ спектрофотометра, и качество РНК (RIN) проверяют с помощью Bioanalyzer РНК Chip. Один микрограмм РНК ткани используют для обработки ДНКазой и синтеза кДНК с помощью набора для синтеза кДНК SuperScript VILO с наборами ezDNaseTM Enzyme (Thermo Fisher). 50 микрограммов РНК превращают в кДНК. кДНК добавляют в реакционную смесь объемом 20 микролитров вместе с цкПЦР Super Mix for Probes (без dUTP) (Bio-Rad) и праймерами TaqMan и зондами, направленными против областей последовательности eTF^{SCN1A} (таблица 11). Создают капли и матрицы амплифицируют с использованием автоматического генератора капель и термоциклера (Bio-Rad). После ПЦР амплификации планшет загружают и считывают с помощью QX2000 Droplet Reader, чтобы получить уровни экспрессии генов в тканях. Ген ARFGAP2 обезьяны (MfARFGAP2) (Thermo Fisher Scientific) служит эндогенным контролем для нормализации уровней экспрессии гена и амплифицирован в той же реакции. Среднее количество транскриптов для ARFGAP2 составляет 1,85E+6 мкг РНК (фиг. 22, верхняя граница). Предел обнаружения обозначен нижней границей.

иРНК eTF^{SCN1A} наблюдают по всему мозгу у всех животных, что указывает на то, что GABA-селективный промотор, RE^{GABA}, транскрипционно активен в ткани мозга для всех макаков, леченных AAV9-RE^{GABA}-eTF^{SCN1A} (фиг. 22). FC: лобная кора; PC: теменная кора; TC: височная кора; Hip: гиппокамп; Med: мозговое вещество; OC: затылочная кора.

Таблица 11: Праймеры и зонды TaqMan, направленные против областей последовательности eTF^{SCN1A}

Название праймера/з	<u>Описание</u>	Последовательность (5'-3')
--------------------------------	------------------------	-----------------------------------

онда		
eTF ^{SCN1A}	eTF ^{SCN1A} прямой праймер	GAATGTGGGAAATCATTCAGTCGC (SEQ ID NO: 83)
	eTF ^{SCN1A} обратный праймер	GCAAGTTATCCTCTCGTGAGAAGG (SEQ ID NO: 84)
	eTF ^{SCN1A} зонд	GCGACAACCTGGTGAGACATCAACGCACC (SEQ ID NO: 85)
MfARFGAP2	Прямой, обратный праймеры, зонд	Thermo Fisher (Кат. №: 4448491)

ПРИМЕР 6: Биораспределение и транскрипция eTF^{SCN1A} в периферических тканях

Число копий вектора дополнительно измеряют в различных органах для оценки трансдукции RE^{GABA}-eTF^{SCN1A} в тканях по всему телу при введении в AAV9 унилатерально ICV. Уровни транскриптов eTF^{SCN1A} также измеряют с помощью цкПЦР для оценки транскрипционной активности eTF^{SCN1A} под контролем GABA-селективного регуляторного элемента RE^{GABA} в тканях по всему телу при введении в AAV9 унилатерально ICV. Оба способа выполняют, как в общем описано выше. Трансдукция RE^{GABA}-eTF^{SCN1A} и транскрипция eTF^{SCN1A} в спинном мозге (SC) и спинальном ганглии (DRG) сопоставимы с уровнями, наблюдаемыми в головном мозге. За исключением печени, трансдукция RE^{GABA}-eTF^{SCN1A} ниже в периферических тканях за пределами мозга (фиг. 23). Трансдукция RE^{GABA}-eTF^{SCN1A} в печени была выше, чем в головном мозге. Транскрипция eTF^{SCN1A} не обнаружена в периферических тканях, включая сердце, легкие и гонады. Однако уровни транскрипта eTF^{SCN1A} в печени были сопоставимы с уровнями eTF^{SCN1A}, измеренными в головном мозге. Кроме того, транскрипция eTF^{SCN1A} в печени является чрезвычайно низкой, если ее нормализовать по количеству имеющихся копий вектора (примерно 1000-кратно ниже по сравнению с транскрипцией eTF^{SCN1A} в головном мозге). В целом это демонстрирует, что транскрипция eTF^{SCN1A} под контролем GABA-селективного регуляторного элемента RE^{GABA} ограничена ЦНС.

I. Последовательности

ТАБЛИЦА 5: Список типовых последовательностей нуклеиновых кислот регуляторного элемента

SEQ ID NO:	Последовательность нуклеиновой кислоты	Длина
1	GTAAGGTAAGAATTGAATTTCTCAGTTGAAGGATGCTTACAC TCTTGTCCATCTAG	56 п.о.
2	GTGTGTATGCTCAGGGGCTGGGAAAGGAGGGGAGGGAGCTC CGGCTCAG	49 п.о.

SEQ ID NO:	Последовательность нуклеиновой кислоты	Длина
3	GTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGG TTTACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCACCCCATTTGACGTCA ATGGGAGTTTGTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAA AATGTCGTAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTA GGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTACCG TAAGGTAAGAATTGAATTTCTCAGTTGAAGGATGCTTACACTC TTGTCCATCTAG	266п. о.
4	GTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGG TTTACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCACCCCATTTGACGTCA ATGGGAGTTTGTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAA AATGTCGTAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTA GGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTACCG TGTGTATGCTCAGGGGCTGGGAAAGGAGGGGAGGGAGCTCC GGCTCAG	259п. о.
5	GTGATGACGTGTCCATAAGGCCCTCGGTCTAAGGCTTCCCT ATTTCTTGGTTCGCCGGCGGCCATTTTGGGTGGAAGCGATAGC TGAGTGGCGGCGGCTGCTGATTGTGTTCTAG	117п. о.
6	GTGATGACGTGTCCATACTTCCGGGTCAGGTGGGCCGGCTG TCTTGACCTTCTTTGCGGCTCGGCCATTTTGTCCCAGTCAGTCC GGAGGCTGCGGCTGCAGAAGTACCGCCTGCG	117п. о.
7	GTGATGACGTGTCCATATTTTCATCTCGCGAGACTTGTGAGC GGCCATCTTGGTCCTGCCCTGACAGATTCTCCTATCGGGGTCA CAGGGACGCTAAGATTGCTACCTGGACTTTC	117п. о.
8	GTGATGACGTGTCCATGGCCTCATTGGATGAGAGGTCCCAC CTCACGGCCCGAGGCGGGGCTTCTTTGCGCTTAAAAGCCGAG CCGGGCCAATGTTCAAATGCGCAGCTCTTAGTC	117п. о.
9	GTGATGACGTGTCCATCCCCCTCACCCCTAGCCCGCGGA GCACGCTGGGATTTGGCGCCCCCTCCTCGGTGCAACCTATAT AAGGCTCACAGTCTGCGCTCCTGGTACACGC	117п. о.
10	CCCCCTCACCCCTAGCCCGCGGAGCACGCTGGGATTTGG CGCCCCCTCCTCGGTGCAACCTATATAAGGCTCACAGTCTGC GCTCCTGGTACACGC	100п. о.

SEQ ID NO:	Последовательность нуклеиновой кислоты	Длина
11	GGCCTCATTGGATGAGAGGTCCCACCTCACGGCCCGAGGCGG GGCTTCTTTGCGCTTAAAAGCCGAGCCGGGCCAATGTTCAAA TGCGCAGCTCTTAGTC	100п. о.
12	GGGTGGGGCCCGCGCGTATAAAGGGGGCGCAGGCGGGCTGG GCGTTCCACAGGCCAAGTGCGCTGTGCTCGAGGGGTGCCGGC CAGGCCTGAGCGAGCGA	100п. о.
13	GGTGCATATTCGGATTGGCTGGAGTCGGCCATCACGCTCCA GCTACGCCACTTCCTTTTCGTGGCACTATAAAGGGTGCTGCAC GGCGCTTGCATCTCT	100п. о.
14	ACTTCCGGGTCAGGTGGGCCGGCTGTCTTGACCTTCTTTGCGG CTCGGCCATTTTGTCCCAGTCAGTCCGGAGGCTGCGGCTGCAG AAGTACCGCCTGCG	100п. о.
15	GCTGAGCGCGCGCATGGGGCGGGAGGTTTGGGGTCAAGGA GCAAACCTCTGCACAAGATGGCGGCGGTAGCGGCAGTGGCGGC GCGTAGGAGGCGGTGAG	100п. о.
16	ATTTTCATCTCGCGAGACTTGTGAGCGGCCATCTTGGTCCTGC CCTGACAGATTCTCCTATCGGGGTACAGGGACGCTAAGATT GCTACCTGGACTTTC	100п. о.
17	TGGGACCCCGGAAGGCGGAAGTTCTAGGGCGGAAGTGGCC GAGAGGAGAGGAGAATGGCGGCGGAAGGCTGGATTTGGCGT TGGGGCTGGGGCCGGCGG	100п. о.
18	AAGGCCCTCGGTCTAAGGCTTCCTATTTCTGGTTCGCCGG CGGCCATTTTGGGTGGAAGCGATAGCTGAGTGGCGGCGGCTG CTGATTGTGTTCTAG	100п. о.
19	AGTGACCCGGAAGTAGAAGTGGCCCTTGCAGGCAAGAGTGCT GGAGGGCGGCAGCGGCGACCGGAGCGGTAGGAGCAGCAATT TATCCGTGTGCAGCCCC	100п. о.
20	GGGAGGGGCGCGCTGGGGAGCTTCGGCGCATGCGCGCTGAG GCCTGCCTGACCGACCTTCAGCAGGGCTGTGGCTACCATGTTC TCTCGCGCGGGTGTCG	100п. о.
21	ACTGCGCACGCGCGGGTCGCACCGATTACGCCCCCTCCG GCGCCTAGAGCACCGCTGCCGCCATGTTGAGGGGGGGACCGC	100п. о.

SEQ ID NO:	Последовательность нуклеиновой кислоты	Длина
	GACCAGCTGGGCCCCT	
22	CCCTCGAGGGGCGGAGCAAAAAGTGAGGCAGCAACGCCTCCT TATCCTCGCTCCCGCTTTCAGTTCTCAATAAGGTCCGATGTTC GTGTATAAATGCTCG	100п. о.
23	CTTGGTGACCAAATTTGAAAAAAAAAAAAAAAAACCGCGCCAАСТ CATGTTGTTTTCAATCAGGTCCGCCAAGTTTGTATTTAAGGAA CTGTTTCAGTTCATA	100п. о.
24	GGCTGAGCTATCCTATTGGCTATCGGGACAAAATTTGCTTGAG CCAATCAAAGTGCTCCGTGGACAATCGCCGTTCTGTCTATAAA AAGGTGAAGCAGCG	100п. о.
25	GGAAGTGCCAGACCGGAGGTGCGTCATTCACCGGCGACGCCG ATACGGTTCCTCCACCGAGGCCATGCGAAGCTTTCCAСТATG GCTTCCAGCACTGTC	100п. о.
26	CCCTCGAGGGGCGGAGCAAAAAGTGAGGCAGCAACGCCTCCT TATCCTCGCTCCCGCTTTCAGTTCTCAATAAGGTCCGATGTTC GTGTATAAATGCTCG	100п. о.
27	CTTGGTGACCAAATTTGAAAAAAAAAAAAAAAAACCGCGCCAАСТ CATGTTGTTTTCAATCAGGTCCGCCAAGTTTGTATTTAAGGAA CTGTTTCAGTTCATA	100п. о.
28	GGCTGAGCTATCCTATTGGCTATCGGGACAAAATTTGCTTGAG CCAATCAAAGTGCTCCGTGGACAATCGCCGTTCTGTCTATAAA AAGGTGAAGCAGCG	100п. о.
29	GGAAGTGCCAGACCGGAGGTGCGTCATTCACCGGCGACGCCG ATACGGTTCCTCCACCGAGGCCATGCGAAGCTTTCCAСТATG GCTTCCAGCACTGTC	100п. о.

ТАБЛИЦА 6: Дополнительные последовательности нуклеиновых кислот, описанные в настоящем документе

SEQ ID NO:	Последовательность нуклеиновой кислоты	Источник/ геномная локация
30	GTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGC GGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTTGA CGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAATCAACGGGAC	промотор CMV

SEQ ID NO:	Последовательность нуклеиновой кислоты	Источник/ геномная локация
	TTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCATGACGCAAA TGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCA GAGCT	
31	TCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCC CCCCCTCCCCACCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTTTAA TTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGG CGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGC GGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGC GGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGC GGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGCGGGCG	промотор СВА
32	GCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACC GCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTAT GTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCATTGACGTC AATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGT ACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGAC GTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGT ACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTAC GTATTAGTCATCGCTATTACCATG	энхансер CMV, применяемы й выше промотора
33	GTACTTATATAAGGGGGTGGGGGCGCGTTCGTCCTCAGTC GCGATCGAACACTCGAGCCGAGCAGACGTGCCTACGGAC C	SCP
34	GGGGAGGCTGCTGGTGAATATTAACCAAGGTCACCCAGT TATCGGAGGAGCAAACAGGGGCTAAGTCCACGCTAGCGT CTGTCTGCACATTTTCGTAGAGCGAGTGTTCCGATACTCTA ATCTCCCTAGGCAAGGTTTCATATTTGTGTAGGTTACTTATT CTCCTTTTGTGACTAAGTCAATAATCAGAATCAGCAGGT TTGGAGTCAGCTTGGCAGGGATCAGCAGCCTGGGTTGGAA GGAGGGGGTATAAAAAGCCCCTTCACCAGGAGAAGCCGTC	SerpE_TTR
35	GTTTGCTGCTTGCAATGTTTGCCCATTTTAGGGTGGACACA GGACGCTGTGGTTTCTGAGCCAGGGCTAGCGGGCGACTCA GATCCCAGCCAGTGGACTTAGCCCCTGTTTGCTCCTCCGAT AACTGGGGTGACCTTGGTTAATATTCACCAGCAGCCTCCC	Proto1

SEQ ID NO:	Последовательность нуклеиновой кислоты	Источник/ геномная локация
	CCGTTGCCCTCTGGATCCACTGCTTAAATACGGACGAGG ACAGGGCCCTGTCTCCTCAGCTTCAGGCACCACCACTGAC CTGGGACAGTGAATCGCCAC	
36	TGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCG GTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCAATTGAC GTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACT TTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAAAT GGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAG AGCT	minCMV
37	GTTTGCTGCTTGCAATGTTTGCCCATTTTAGGGTGGACACA GGACGCTGTGGTTTCTGAGCCAGGGGGCGACTCAGATCCC AGCCAGTGGACTTAGCCCCTGTTTGCTCCTCCGATAACTG GGGTGACCTTGGTTAATATTCACCAGCAGCCTCCCCCGTT GCCCCTCTGGATCCACTGCTTAAATACGGACGAGGACAGG GCCCTGTCTCCTCAGCTTCAGGCACCACCACTGACCTGGG ACAGTGAATC	UCL-HLP
38	CGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCG CCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATG TTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCA ATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTA CATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACG TCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTA CATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACG TATTAGTCATCGCTATTACCATG	CMVe
39	GTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGC CCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGT TCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAA TGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTAC ATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGT CAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTAC ATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGT ATTAGTCATCGCTATTACCATGGGTGCGAGGTGAGCCCCAC	CAG

SEQ ID NO:	Последовательность нуклеиновой кислоты	Источник/ геномная локация
	<p>GTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCTCCCCACCCC CAATTTTGTATTTATTTATTTTAAATTATTTTGTGCAGCGA TGGGGGCGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGC GGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAG GTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGT TTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGGCGGCGGCGGCCCTATAA AAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGAGTCGCTGCGTTGCC TTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCGCCGCCTCGCGCCGCCCG CCCCGGCTCTGACTGACCGCGTACTCCCACAGGTGAGCG GGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTT GGTTTAATGACGGCTCGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAA GCCTTAAAGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGG AGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTGTGTGTGCGTGGGGA GCGCCGCGTGCGGCCCGCGCTGCCCGGCGGCTGTGAGCGC TGCGGGCGCGGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCGTGTGCG CGAGGGGAGCGCGGCCGGGGCGGTGCCCGCGGTTGCGG GGGGGCTGCGAGGGGAACAAAGGCTGCGTGCGGGGTGTG TGCGTGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGGCGGTC GGGCTGTAACCCCCCTGCACCCCCCTCCCCAGTTGCT GAGCACGGCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTGCGGGG CGTGGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGTGGCGG CAGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCCCGCCTCGGGCC GGGGAGGGCTCGGGGAGGGGCGCGGCGGCCCGGAGCG CCGGCGGCTGTGAGGCGCGGCGAGCCGCAGCCATTGCCT TTTATGGTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTG TCCCAAATCTGGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCC GCACCCCCTCTAGCGGGCGCGGGCGAAGCGGTGCGGGCGC CGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTC GCCGCGCCCGCTCCCTTCTCCATCTCCAGCCTCGGGGCT GCCGAGGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGGCAG GGCGGGGTTCGGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGGCTCTAGA GCCTCTGCTAACCATGTTTCATGCCTTCTTTTCTTCTACA</p>	

SEQ ID NO:	Последовательность нуклеиновой кислоты	Источник/ геномная локация
	GCTCCTGGGCAACGTGCTGGTTGTTGTGCTGTCTCATCATT TTGGCAAAGAATT	
40	GCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCCAC AGTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTTCGGCAATTGAAC CGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAG TGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGG GGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTT TTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGG	EFS

ТАБЛИЦА 7: Список дополнительных последовательностей нуклеиновых кислот, описанных в настоящем документе.

SEQ ID NO:	Последовательность нуклеиновой кислоты	Источник/ геномная локация
41	GGAGGAAGCCATCAACTAACTACAATGACTGTAAGATA CAAAATTGGGAATGGTAACATATTTTGAAGTTCTGTTGAC ATAAAGAATCATGATATTAATGCCCATGGAAATGAAAGG GCGATCAACACTATGGTTTGAAAAGGGGGAAATTGTAGA GCACAGATGTGTTTCGTGTGGCAGTGTGCTGTCTCTAGCAA ТАСТCAGAGAAGAGAGAGAACAATGAAATTCTGATTGGC CCCAGTGTGAGCCCAGATGAGGTTTCAGCTGCCAACTTTCT CTTTCACATCTTATGAAAGTCATTTAAGCACAACТААСТТТ TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGAGACAGAGTCTTGCTCTGTTG CCCAGGACAGAGTGCAGTAGTGACTCAATCTCGGCTCACT GCAGCCTCCACCTCCTAGGCTCAAACGGTCCTCCTGCATC AGCCTCCCAAGTAGCTGGAATTACAGGAGTGGCCCACCAT GCCAGCTAATTTTTGTATTTTТААТАGATACGGGGGTTC ACCATATCACCCAGGCTGGTCTCGAACTCCTGGCCTCAAG TGATCCACCTGCCTCGGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTATA GGCGTCAGCCACTATGCCCAACCCGACCAACCTTTTTТАА ААТААТАТТТААААААТТGGTATTTACATATATACTAG Т	человек; hg19: chr2: 171621900- 171622580
42	AGTTTGGACAAGAАСТАТАGTTCTAGCTTTCTCTGGGTCTC	мышь;

SEQ ID NO:	Последовательность нуклеиновой кислоты	Источник/ геномная локация
	CACCTTGCAGAGAATGCAGCTTTCATTATCTCATGAGCCA AACTCTCATCATCTCTTTCCATATATCTGTTCGGTGCTCTTC CATGAGTACTCTAACACACACAGAAGGAGCACTTACACA GGCTGTTGTTTTTCTCTTATTATCATAGCTGTTGTTTCAGAC ATGTGCATTCTGTTCTTGTGCTTCAATGCTAAAGGAGTCT CAGGATATGAGAACTGTACCAGCCGAGGCATCAGGAAAC ATGGGTGGAAATCCCACAGTACTATTTGTTCACTGTGTG ACCTTGGGCCAGTCACATCCCTTTCCTGAGGCTTCGATTCC CCAAGCTATAAAAGAAGCATCTCTTAACCTTTTTTTAGGTC ATGAGTCAGGCCCAGCACACTCTCAGGGAGACTCATGAG AGTACAGATCATTTCCCATAGAAAACCATAGTTTTATAT CCAGAGGCTTTTCTGTAAG	mm10:chr2:3 6053858- 36054359
43	GGTCCAGTTCAGAGGCAGAGCATTTGGGGTTCCCAGTCA GGAGCTTTCCTCTCTCCGCTCCTTAGTTTCCTCTCTTAAA AAAAAATGGGTGATAGTATAGAAAGGAAGCTCTGGGCTC GGGGACCAGGGCCCTGGGATCCCCGCTCCCAGCCACTCGC TCCTGACCCTTCCAGGGACAAGCTCCCCCCCACCCCGTCC TTCCAGGCTGCCACTAGAAGAGATGGGGACGCGTGGTCA GCCGCTTCTGTGCGCCCCCAGGGAACGGTCTCACGCTGGA GGGGGCAGTGCCCTCGGAACAGGACAGTCAGCCCAAGCC AGCCAAGCGCGCGCGGACGTCCTTCACCGCAGAGCAATTG CAGGTACCCCGGGCAAGCCCCGAAGCGTGTGGGCGGGGC TTCGGAGTGGGCGTGGTTGTTTCGGGACTTGTGACTCCGCC CCTTGTGCGGGGACCCGCGTGAGGCCGCTCCAAGGATGAA GCTGCCTGGGGCGTGGCCTCGGACCCTGAGCCTCTGATTG GGCGGAGGTCTCAGGGCCCTTCTGCGCCCCACAGGTTATG CAGGCGCAGTTCGCGCAGGACAACAACCCGGACGCGCAG ACGCTGCAGAAGCTGGCGGACATGACGGGCCTCAGTCGC AGGGTCATCCAGGTGGGGCTCCGGGGTCTCGGCCTTCAGG TCTAGGGTGAACCTTAGGGAAGCGCTGAAGCTCGTAGTGG TACGGATGGTCGCGCGTGCACGTGGCCGCCCTCTCCAGT GTGGCCTAAGGACCCAGTCGGCACGGGTTGACCCTTTTC	мышь; chr2:36,091, 144- 36,091,966

SEQ ID NO:	Последовательность нуклеиновой кислоты	Источник/ геномная локация
	CTTGATTACTGAGAGTGCAGAGGCTGT	
44	TGGTGGGAAGACATGTCCAGGGAAGAAATGGCCTCCAGA GGCCTGAGGTGGGGAAATGCTGGAGGTGGAGAGAGGAAC AACTGACTGAAAATGAGCTTCCACTGTGGCTTAGTAGCCT ATACCAAGTCTAGAGTATAGGGTAGGAGAAGATTAGGAA AGCGATGGGTCTGAGAATGATGTGGCCTGTTGACTTTTGT AAACCCAAAGCACCTTGGACTAAACCCTATGAACAGTGTG GTGCCACCAAAGACTATAATGAGCTCAGGGAACAGAATT CTGTGTGCATGGTGATTTTTTTTTTTTTTTTTCTGCTAACTGC AGTCTGGGTGATGCATTGACAAACCAATCCTGGAAAGTAA GAGGCAAGGGCAGCTGGGACGGTGAGAGGAGCCTGATGG GAACCAGGCCAAGCAGGGCAGCAGAGGCGATGAAGAGG ATGTGGTGCATCCAGAGACTCACTTCATTAGCTGGAGGCA CTGCTGGATAGGGTCTGAAGGTTCTGGTATCTGAGTTGGC GGGCTGGGTGAGTGGTGGCTCTGCTTCCTGAACAGTGTGT GCAAGAGGAAACAGGGTTAAGGGCTAGGACAGTCACAGG TGAGTCAGCCTCACAAGAGCAACCTTCCCCTAGTGCAGA	мышь, chr2:36,095, 396- 36,096,028
45	GGAGGTCTCCTTTTGCCCCGGTCCAACAAGAGAATGCAA GGCTGTATCTCAATTTCTTGAGCCTCTCTGTATTATAGAA GAAAAGTAGGGAAGCCATACGCCCTTCTGAGCTTCAGTG TCTCTGTCTCTGCAAATGAGGCTGGGGAGGCTGGGGGC GGGCGTGAAAGAGGCCCGCGCCAAGCCGACCCCCACCTC TGCCCCCTCCCCAGGTCAACAACCTCATCTGGCACGTGCG GTGCCTCGAGTGCTCCGTGTGTGCGACATCGCTGAGGCAG CAGAATAGCTGCTACATCAAGAACAAGGAGATCTACTGC AAGATGGACTACTTCAGGTAGGCAGCGGCCATCCCGCCAG CAAGCGCTGGAGCATGAACGCCTTGACACGCGTGCCTAG GCCACTTGTGTGGCCTGTGCTCTCCAATTCCTGAGCCCTGC TGTTCAAGAGTGCACAACGCGGCTCAGCGCACTGGCCCCGGC CCTCCTACTCAGCACGTCTTACACAGAAGGGAGCGCCAGT CTCAGCCTGAGTTCTGGCGGGGGATCTGCCTCGGGTTCCT CCGATCTGACAGGCGCTGGCCACGGGTCTGGTTCCATCTC	мышь, mm10:chr2:3 6102524- 36103193

SEQ ID NO:	Последовательность нуклеиновой кислоты	Источник/ геномная локация
	TGGTCTTTTCTGGCCCCGAGCACCAGTGTGTTCTGTTGAGC TCTGATGTCCGAGGCTCTGGCCCCGGATCA	
46	CTCTGGCTACCTCTTATCTTGGGCATTACGACAATTTCTA ATTGCAGGTAGTTTGTGTGTGTGCGCGTGTTTTTTTTCCCC CTCAGAGGCTTGGATTGCAAAGGAACTAAGCGATTACTTC AAGAGCCACGGGTAAAGTGCAGGGAGAGGGGGAGAGAG AGGGAAAAAACC CAATCCAAATTCAAATTGCTTCATTAG AGAGACACCGCTTTTGTGGGGAAGGGCTTTAAATGCCAC TACAAAGTTAGGACTCATTGTTTCAGCGCCGGTTTATATAA CAGGCGAGGGGAGGCGCTGGGCTCTGACAGCTCCGAGCC AGTTCAGCAGCCGCCGTCGCCTGCATTCCCTCCCCCTCCCC CAGGTGATGGCCAGCCAGGGTCCGGCTGCAAAGCGACC ACCCGCTGTCTCGAAGGGACCGCTCCGCCTGCCATGGTGA GTCCTTTCGGTCCTGCTTTCGGCCCCGAGTCCCCCAACAG CACAGGCCAGGGCTTCTGGCTCAGCCTTCCGGCTACCAAC CTCTACCCCTGCGCTGGAAAAGTCCGATAGGAGCCGCCT CTCGTTGAGCCTTGGTTTTTCTGGCCTGGAATGTGAGCTTT GGCTGCTTCCTGCACCCAGGATGCGCTGTGTTAAAAGTTG GGGGCCGTCCCTTCTTCTCCAATAGGTCCTTTCATTCTTGT ACTCCAGCCTAGGGCGCGACATCCCTGGCACATTTCCGGTG TCAGTCGGTGCGCGAGGAAACCAGATTCAACTCTGAGTAC TCGGCTAAGCGCTTCGCTGTTCCCTCTCTCCCATTTCAGGCT CAGTCAGACGCAGAGGCCTTGGCAGGCGCTCTGGACAAG GACGAAGGTAGAGCCTCCCCATGTACGCCAGCACACCGT CTGTCTGCTCGCCGCCCTCTGCTGCCTCTTCCGTGCCGTCT GCCGGCAAGAATATCTGCTCCAGTTGCGGTCTGGAGATCC TGGACCGGTATCTGCTCAAGGTGAGTCAGGGTAGGTGTGC CTGCTTGCCACGGGTGTGGTTTGCAGCCCCAAGAGCTGT	мышь; mm10:chr2:3 6103286- 36104328
47	CAAGACTTTTAAAAGTTTAGATAAATAAACAACATTTGA CGGCTTTCCATCACATCTAGACTATAATCCAAAGATCTAT ATGGTCCCAAACGACTTACACTTAACTACCGTCTCCATA TGGCTTCTCCCCCATCAGTCATTGTCCTCAGCCATAGTGG	мышь; mm10:chr2:3 6114311- 36114817

SEQ ID NO:	Последовательность нуклеиновой кислоты	Источник/ геномная локация
	CCTCCCTGTTCCCTTTGGGTACAAGGGAACAACCTCCCTGAG AGGTTCCATTAGCTGCTGTTGCCTGAGATGCTCTTGAGCCC ACACCATCTGCTCATTCTCTCCTCACGTGTCAGTGATTA GAGGCTGTCCTTGGCCTCCCGTCAAAATTACATCCCTGCC GCTTTCCAATTCTTGCCTTCTTATTTTCTAAATAGAАСТАА CTCACCACTACCCAACATTCTATATAATTGGATATCTGTCC TCTGTTTAAATATAATGTTGACTTCAAGAAAGAACGTTGT CACTGCCCTGTCACCAGACTTTTAAACAGTGCCTATCGTGT GGCACATGCTCAGTGAAATTG	
48	TCAACAGGGGGACACTTGGGAAAGAAGGATGGGGACAGA GCCGAGAGGACTGTTACACATTAGAGAAACATCAGTGACT GTGCCAGCTTTGGGGTAGACTGCACAAAAGCCCTGAGGCA GCACAGGCAGGATCCAGTCTGCTGGTCCCAGGAAGCTAAC CGTCTCAGACAGAGCACAAAGCACCGAGACATGTGCCAC AAGGCTTGTGTAGAGAGGTCAGAGGACAGCGTACAGGTC CCAGAGATCAAАCTCAACCTCACCAGGCTTGGCAGCAAGC CTTTACCAACCCACCCCCACCCACCCACCCTGCACGCGC CCCTCTCCCCTCCCCATGGTCTCCCATGGCTATCTCACTTG GCCCTAAAATGTTTAAAGGATGACACTGGCTGCTGAGTGGA AATGAGACAGCAGAAGTCAACAGTAGATTTTAGGAAAGC CAGAGAAAAAGGCTTGTGCTGTTTTTAGAAAGCCAAGGG ACAAGCTAAGATAGGGCCCAAGTAAT	мышь; mm10:chr15: 78179109- 78179610
49	AAATAGAАCTGTGAGATAGGGGGAGAGGGGGCAGGAAG GACAAGAGACCCCTGTCTCATTGTGATCCCCACCTGTCTG CTCTGTGGGAGGGTACCCATGAGGGCCAGCCCACAGCCCT TAGGTGGACATTGTCTGGTCCCTGTCTCACTGTCCCTCCCAG CAGCCCCAGAGGCCAGGAGACAGGGGTCTCAGTCCTCACT GAGAGATGTGTAАACTGAGGCCCAGTGAATGTTGAGGGC CAGGGCATGCCCTTGGTGGGATGTGACCTGGGTCTCCTTC GCACGGGCTTCCCTCCCCGAAGCCGAGCTGAGCATTGAG TTTGAAATGTTTCCGTAАCTTAGCAATCTGCTCCTCTATTCC CGGGCGGACTTCCGATAGCTCCGGCCTTATGCTGCACTAG	мышь; mm10:chr15: 78195347- 78196134

SEQ ID NO:	Последовательность нуклеиновой кислоты	Источник/ геномная локация
	ATAAGATGGAGCAGGGAGAGGACACGGCACTACTTATGT AACCGGCCTCTTGAAAAATGGAGCAGCGGTCAGGGCGGA ACAAGACGTCCTCTCTCTACGCATCCCTCTCCTTTCCCTGC TAAGGCTGCAGCTGGAGTCAGAGGCAGGGCTGTTCCAATC TGTCTTTGATCAGTAACGCAGCCAGCCTCCAGCCTCCGTC AGCCTCCTCATGGCTGAGACCCGGCCTCAGTTTCCCCCAC TTACATCCCGAGGATCAGAGCCTGTGAGGATGAAATGGG ATAAGGTAGCTGGAACCGTCTGGCAGAGAGCGAGTCCTC AGGACTGTTGATGCCTGTGGCTGCCTGGCTTGACCCCAAG TGACCCCGCCTCCTCATCCTGCAGCAGGAGAA	
50	TCTATAGAATGTGTCCCCAGCCTTGTTTTCCCACTTGATA CGCAAGGAATGCATACCACAGAGAGGGATGAGGGTAGCA TCCAGCCTGCTTCCTGTGTGTCGGGGCGCTACAGCCACAT CTCCCCAGTCCATCTCAGACCGTCACAGAGCTTCGCCGAA TGTATAGCTTTGTTCTCTGTGCAGACAGGGAGACAGAGCC TTGGGAAGCATAGGTGCTTGCTTCTTTGCCCACTGAGTCTT AGCTGGACTTGCACACCACATGCCTCACAGCCGGGCGCAC TTGCATTTGTCACCCAGGCCAGTGATGATGGCTCTGCTTG CTTTGTGCTTTGTGCCAACTACAGCTCCAGCACCTGTGCC TGGGTTTTCACTCCTTTAGTTGAACACGTAGTTACTGGGGT TGTAGGGATGGAGCCTTTCTGCTTCTTCTGGCAAAGTCCT TAGCGGCCTGCTGCGGGGGTGGGGGGTGTTCAGGGGAGT GGTGATGAAGTATGACAG	мышь; mm10:chr15: 78196305- 78196806
51	TCTCCAGTTGGAGAAACAGATGCTGTAACCTGGGGCCACAG TATAAAGAGAGCCCAGACATTGAACTGTCAACACAGAAG CCTGGCACACTGGAACCTGGCAGTCCAGCTGGGAACAAGG GGTAGAGGCTGAGGCCACTAAGTCAACTGAGGCAGGAGA CATAGGAGCTAAAGCAGCTGAAGGGTGCAGGACAGCTGG GGGGTCTGAAGTGGGCCTCATGCCAGAGCTATGAAGTCA GGGGCTGTAGCCTAGGAGCCTTGGAAGCCAGCTGGCAAG CTGTGGCCCAAAGACGCTGACTCACAGGAGGGGGCAGC TGGAGCCAGGCACTCCTAAGGTTTCCAGGAAGGGCAGCCT	мышь; mm10:chr15: 78205234- 78205766

SEQ ID NO:	Последовательность нуклеиновой кислоты	Источник/ геномная локация
	TCCAGGGCTCAGCTAGGGGAGACAGTGTTGACAGCAAGTT GTCAGGCAACTTGAGCTACTGGGCAGCTGGGAAGCTGTCC CTTGGTCCCCAGTATCATCATCACCCCAGACGCTGCCCAC CTGCCTCAGGTCCCACACAGTGATCCTCCCATCTTTAACAC AACACATGACCAGAGAGA	
52	GTCACCCTCCCCCAAACAACCCCTTCTTCTCTGGTTCGAG AAATTACAGGCATGAAAGATATAAATCGGGATGCTTGACT TGGGAATATAAATCACTAAAGCTTGGGGGCAGGGGTGGG CGACCTTTGTGACCGTCCTTGTGCGTGCCAGTAAATCCTGT GGTCCAGGGGAGAAGAAAAGGCTGTGTGGCTTCTGCTCAC AAAGCTGCAGAAACCATTTCTTTAAGCCCAAAGCACTTCC AGAGAGAGCAGAGCATCCCCAGGCTGCTGGCTCAGCAAG TTCAGTGTGCTCAATCTCAGGAAGTGAGGATAAGAGCAGT GCCTGGAGAGTGCCTGGTGCTGAGCTGAGGGTTTCTGAAC ACATTAAGCGGGGAGCATGGACCGGGCCTCAGGAGGGG TGTTGAACATCCCTAGGCAGAGGAGTCTAGCTTCCTGGGA AAAGATATCAGGTTAAGCACACACATGTCCTCTGGAATAA GATAATCTTTCTGATCACACACTATACACACACAAAAGCC TGCTC	мышь; mm10:chr15: 78224841- 78225364
53	GCCCTCTAGGCCACCTGACCAGGTCCCCTCAGTCCCCCCC TTCCCACTCCCACACTCAGCCCCCTCCCCCCCCCCCCGA CCCCTGCAGGATTATCCTGTCTGTGTTCCCTGACTCAGCCTG GGAGCCACCTGGGCAGCAGGGGCCAAGGGTGTCTTAGAA GGGACCTGGAGTCCACGCTGGGCCAAGCCTGCCCTTTCTC CCTCTGTCTTCCGTCCCTGCTTGCGGTTCTGCTGAATGTGG TTATTTCTCTGGCTCCTTTTACAGAGAATGCTGCTGCTAAT TTTATGTGGAGCTCTGAGGCAGTGTAATTGGAAGCCAGAC ACCCTGTCAGCAGTGGGCTCCCGTCCCTGAGCTGCCATGCT TCCTGCTCTCCTCCCGTCCCGGCTCCTCATTTTCATGCAGCC ACCTGTCCCAGGGAGAGAGGAGTCAACCAGGCCCTCAGT CCGCCCTTAAATAAGAAAGCCTCCGTTGCTCGGCACACA TACCAAGCAGCCGCTGGTGCAATCT	мышь; mm10:chr15: 78241348- 78241856

SEQ ID NO:	Последовательность нуклеиновой кислоты	Источник/ геномная локация
54	GTGTTCTTCCCTTCCCCTTTGGACCCCCGAGACAAGCCAAT AAAATACTCGGCAGGGTGGCTTCTCTCCTTTTTTTGCCAGT AATAAACAGACTCAGAGCAAGTTAAGGGTCTGGTCCAAG GTCATGGCTGGGATCAGTGACAGAGCCCAGAAGAGAACC TGAGACTTCTTGCTGAGCCAAGCTGGAGAGGACAGAAAG GAATGCGTCTACTCCATGCATGACCCTCTGCCAGCTTTGCT CCTTCCTAAGGGACCATGAACGATATGTGCACACCGCTCA TACGTATGTGCACACCTGCAAGAGGAGGCATCCCATGTAC ACCTATGAGACGCACAGAGAAACATATATGTAGCCATAG GCTAGAAATTCTTTCTCTTTCTAGGTCTGCCCCTCTGCA	мышь; mm10:chr9:1 07340928- 107341325
55	GGACCACTCAGTGTACACGGAATGTAGAATTGAGTCTGCC ATTGGTCTTCCCTCAAAGTCTTGGAGGCTTGGGACTGATA TTGGGAGCATCTGGGCAGAGAAGGCCACAAAGACAGGGT GGTTTTTCTACACTGGGACATACTCGTGAGCATGCACAGA GGCGTGTCCCCAACTTCCCTGTCACCCCTGTCTCTGCCGG CTAGAGGGGATGCGGGGGTGGACATATGCTGCTATTGGGC AGATATCACATGTTAAGAGGTGGGGGGGGGCTCAAGAGG CGGAGGGCTAGGAGCATCCCATGGGGAGAGGTTCTGGTTT TCTTGCTGCCTCTAGCTGCTATAAATACGTTAGCACTTGAG CAACTGGAAAGCTCTGAGTAATTTAGGATGCACAAAGCTG TAATTTAACTCCAGCATCTCAGTGTGCGAGAGCATTAAAG ATGTAATTAAGATGTTTACACAAAGAGATTGGAGTCTGTG ACACTTGGGGTGCAAAACCCAGGAAGGGACACAATGGG TGAGGTGAGGATCTGTGGGAGGCCTGGGGACAGTCACTTG GATCCCAGCTATGAGATGGCAGGCCACCCAGCTGTTTCTC CTTGGAAATGTTTTGGCCTGGGGGTGGGGGTGGGGCATC ACACTTTGATATGGAGATGGGGCAACAAAGCCTGCAATAT CTGGGGGTGGAGAGGTCAAGTGGATGGAGTCTTTTGAGAT CATGTCAGGAAGAGGGCTCGATCCCCCAAATCATGGTGA CATATGGTGTCTCGGGGTTACAGGAGCTATGTCTAAAAT ACAAAGTAAA	мышь; mm10:chr9:1 07349227- 107350036
56	TCTGCAGAAGCCTGCCATTCCACCATTTAAACCTGTGACT	мышь;

SEQ ID NO:	Последовательность нуклеиновой кислоты	Источник/ геномная локация
	CCAGGCCTTAAGCCTGTTGAAGGTCGAGTCCCAGAAGGGT CATATGTGCAACTGCCTAGGGAGAGTTCCTACTCGCAGGG CCAAGAGGAGTCCCCCGGTCTGAGGTGTGGGGGCGGGGA CGTGCACTGGGCGCTGGGACCACGGCTGGGGCTCAGGACT CGC	mm10:chr9:1 07399438- 107399639
57	TGCCTCAGTTTCTTCGCCTAGAAAGCCGGGTCTAAGGGTA CATGCCCTGATTCTTTTCTGGGGTGTCTCGAATTTTAAACA ACACATACTGTTCTGGGCTGATGACAAGAGGAAGTACTGG TCGGTGGCTGATGGACATCCACCATGGTGGCAACTGGAGG GAGGGGGAACGGACGTTGAAACCCTGCCCTCCTGGAATCT GTCGCATGCACGCACGTTGACAATGCTTGGCACTGGGGAC AGGCTGGGATGGATGGAGCGGAGCGTGAGGAGGAGTGGG CATGCAGGCCCGAGTGTCTGTTTTGCTGATTGCTCCTTTTG CTTTCAAGGAGATTAAACTATTTTTAGTCCATGCCTACTGC TGGTGAGACGCTGGAGGAAGCCTTCCATCGTTGAGATTT TCTGGAAGCTGCCAAGTGTGGTCTTCAGCTCAATTCTGGG AGCCTCCCAGAGTGGGAGGGAGGAACATTTCCATCTGGG GGCTTCGGGGACAGGCTAAGATCTTCCCTGGGGTCCTTGC TGCGCTGGCCTCCTCAAACCACGCTGCCTCGGCCTGCATA AAGCAGTAATCTGATGTGCCCGATGTTTGTAACGCTGTGT TAAAAAAAGTAATTTATTTTCTAATTATTCCTTGTCTTGC ATAACCATGCATTGCCAAAGTGTGCGCTATTTAAAATATTT ATCTCTCCACGCCGAGGAGCAGCTCTGGAGCGTGGAGGG GGAAGAAATAAAAGTCCGCGTGCCAGTCGCAGGCATATT ACTTTGACTCGTCCTGGTGGCTTTGACGTCTCCCTGTAAT ACATTTATTTTTCATTAGGACGTTTCTGAGCTTGTGGCCCC CGGAGAGCGGAGTGATTACGCTGTTTCATCTGCAAGCGATG CAATAGAGGGGTACTCGCAGAATGACTTCCGCCCAGAGC ATCCTGCGCCTGTCT	мышь; mm10:chr9:1 07443292- 107444228
58	TAAAATACCTTATTTTTTCCAGTCTCTAAACTGCTAATCT CCCAGGCTAAGGGATTCTGGGACAAAGGCAAGGCCTGGA AGTGGAATCTGTAAAATTAGCTTCAGCGGTATTAGTGTT	мышь; mm10:chr9:1 07444825-

SEQ ID NO:	Последовательность нуклеиновой кислоты	Источник/ геномная локация
	<p>TGCAGTTGAAGATTGAAAACTGCTTTCCCAGGGCCTGAT TGGAGGCTCCACTCTCCTCCAGGAAGAGGCAAGGACTCTG GGCTGGCACTGAGGACAAATCCTGGGAGGCTGCTATGGG GCCTGGGAGCCAGGCTGCCTTGTGCTAGAGGCCTAGAGAG TGTCTGTGTCCCAAGTCCCAAGCTACCCCCAGCAGCTAAC AGCTTTTCCAGTTCTCAGGCACAGCAGGTGCCAAGATCAC GCTCTGGAGTCCAGCTGGGCCCTTCCTCTTTTTTTTTTT TTTTTTTTTAAGACCTCCTGGACACTGTTCCCTCTCCCCC CCCGTGACCCCCCCTCAGTTCTCAAACACGTGAGGGTT GGGGGAGGGTTCCACAGCCAGAGAGAGGGGCCAGCTCTG GTGCCTGTGGGTACGCCCGCCGTATGGCCATCAGGCCT CTTGTGTGCTTGATTGCCTCTGATTGGCTGCAGCTGAATC AGCAAAGCTATTATTTGCCCTTGATGAGCCAATCAGATG GCCTCATTGGCCATTCAGAGCAGGCACCGGAACCTGAGGG TGGGGTGGGGGGTGGGGGATGGAGATGGGACTCAGTGAG GGGGTGGGAAGCTCTAAAACAGATGCAGGACCTGAGCCT GTCTGTGTCCACCACGACCTTCACACAGGTCACACCCCCT TCCCCTGACTTGTCACCCCAAACCAGGGCTTGTTGCCCAA CCCCACCTCACAATTCCTCACTCTGTAACACCTTTCCATA TACCTCTGCATGTCTAAACCCAAGACTTGCTCTATGAAAT C</p>	107445746
59	<p>AGACCCTGCTTAGCACAGCTCTTAGCGGGTCCTTTAGGGG GTCTCCCAGCGGGCCAGTGGGAATGAGATAAGGAAGGA CACAGCTGTCCATTCTCCCGTGCCTGCTAAGGAGGAAATG GGGCCGCCTTACATAATTGGGGCAATTTGTTCCACTCTTGT CCTCCTGGTATCATGGCTATCACCCCTCCTTGCTCAGGGA GTCCTTGATTGAGCGAGAAGCTCAGGCCTCCCTCTCTCCCT CCTGCTGGGGGTGCTGAACAGAGGGTGTAGGAGCCATA GGCTCTGTCACTGCTGAGATCTGCCAGATGTCTAGGCCAG GAGAAAATGGAAAGGGCTAAGTCACAGCATATGTGGCCA CTCAGGCCTATAGCCCCAAATCTGCCTGGTAACCCATTAT GTCCCCAGAGAATTTGCATGGGCGGACACCCTCATGCCGG</p>	мышь; mm10:chr9:1 07452080- 107452718

SEQ ID NO:	Последовательность нуклеиновой кислоты	Источник/ геномная локация
	GTCTCAGTAAGGGAAGGGGTGGGAGGCAAAAATATCCCT CCCCACCCTGAATCTCCACCCCCTCCCCCAGAAACTGAC ACTTGGCCTTGTCTAAGGATGGGTTTTCCCAAATCCTTCT GAAAAAACAGAATTTCAAGAGTCACTCCCTCCGGGTCTC AGCCTAGAACATATGCAGTATCCCCTGACGTCCATAGGG	
60	AAACTGGCACAGTAATGGCGGGCTGACAGACAAGGGAGT CTGTAGCACCCGCTGCCTCCGCCACCCCTTCTCCGAGCA ATTAAGGTTTATGTGGGGCTGGCAGTGGCTTCTGCC TCCCTTCCATTACGAACATTAAGAGATCTTGACCCTTCCAC TTCCCCGCTCTTGAAAGGAGCTGCAGACACGTGGAGCCA ATTAGGCGCACGCGTGGGCGCCAAGGGCCTGAGCAGCTTT TTCTCCCTGATTGCGGCGTTTACAGCTGATTATTCTCCCCT CACCCAAACAGTGCTGCTTCCCTGGCAAGGTGCCACCCAGA GGAGCCGGCTGGGGGCCCTGGGGACAGGGGAGGACTGG ATTAGTAAATGGGCATCTATCGAATGGCTTTCATATGTGT GGCTGGAAGGGAGAAGGGTAGGGCCAGGAATGGTGGCAG CAAGGGCCAGGTAGCAATGAGGGTTCTTCTAACCACCA TTAGGGATAGCGATCAGAAAAGGGCCCTCGAGGAGGTG ACCTAAATGTGTGTAGAAGCTGACGGCCACTACACACACA CACACACACACACACACATACACAAGCATCCTTGTCTT TGGAGTCGGTCAGCATGAGCAAGAGAAAGATGTTCCCAG TGGCCATGAGAGTGGAGCCCTCCTCCCTACTTACATCCAG GTTGGATGGCCAGGAGATCCTGAGATCCTTCAAGACTCC	мышь; mm10:chr9:1 07470414- 107471129
61	AAGCCACATCCTGGGTGGAAATATATGGCTTCAATTCCCA CTCTTCCGGATGACCTCTGTGGGGAGCCCTGGCTTACCTT GGTCCAGCTTCATCCCTTAGCCTCGCTGCCAGGAAGGCAG TGAGGTCAGAGGCTGGTGTGCTGGCGTG	мышь; mm10:chr9:1 07484887- 107485033
62	CCTACCTGGTGCCCGCCAACATCTGGGGGCCATCCTGGCC AGCGCCAGCGTGGTGGTGAAGGCACTGTGCGCCGTGGTAC TGTTTCTCTACCTGCTTTCCTTCGCTGTGGACACGGGCTGC CTGGCCGTCACCCCAGGCTACCTTTTCCCACCCAACCTTCTG GATCTGGACCCTGGCCACCCACGGGCTCATGGAACAGCAC	мышь; mm10:chr9:1 07534490- 107534786

SEQ ID NO:	Последовательность нуклеиновой кислоты	Источник/ геномная локация
	GTGTGGGACGTGGCCATTAGCCTGGCCACAGTGGTTGTGG CCGGGCGATTACTGGAGCCCCTCTGGGGAGCCTTGGAGCT GCTCATCTTCTTCTC	
63	AAACGGACGGGCCTCCGCTGAACCAGTGAGGCCCCAGAC GTGCGCATAAATAAACCCTGCGTGCTGCACCACCTGGGGA GAGGGGGAGGACCACGGTAAAT	человек; hg19: chr2:171672 063- 171672163
64	GGAGCGAGCGCATAGCAAAGGGACGCGGGGTCCTTTTC TCTGCCGGTGGCACTGGGTAGCTGTGGCCAGGTGTGGTAC TTTGATGGGGCCCAGGGCTGGA	человек; hg19: chr2:171672 697- 171672797
65	GCTCAAGGAAGCGTCGCAGGGTCACAGATCTGGGGGAAC CCCGGGGAAAAGCACTGAGGCAAACCGCCGCTCGTCTC CTACAATATATGGGAGGGGGAGG	человек; hg19: chr2:171672 918- 171673018
66	TTGAGTACGTTCTGGATTACTCATAAGACCTTTTTTTTTTTC CTTCCGGGCGCAAACCGTGAGCTGGATTTATAATCGCCC TATAAAGCTCCAGAGGGCGGTCAGGCACCTGCAGAGGAGC CCCGCCGCTCCGCCGACTAGCTGCCCCCGCGAGCAACGGC CTCGTGATTTCCCCGCCGATCCGGTCCCCGCCTCCCCACTC TGCCCCCGCCTACCCCGGAGCCGTGCAGCCGCCTCTCCGA ATCTCTCTTCTCCTGGCGCTCGCGTGCGAGAGGGAAC AGCGAGAACGAGGAAGCAGCTGGAGGTGACGCCGGGCAG ATTACGCCTGTCAGGGCCGAGCCGAGCGGATCGCTGGGCG CTGTGCAGAGGAAAGGCGGGAGTGCCCGGCTCGCTGTCTG CAGAGCCGAGGTGGGTAAGCTAGCGACCACCTGGACTTCC CAGCGCCCAACCGTGGCTTTTCAGCCAGGTCTCTCCTCCC GCGGCTTCTCAACCAACCCCATCCCAGCGCCGGCCACCCA ACCTCCCGAAATGAGTGCTTCCTGCCC	человек; hg19: chr2:171673 150- 171673696

SEQ ID NO:	Последовательность нуклеиновой кислоты	Источник/ геномная локация
67	CAGCAGCCGAAGGCGCTACTAGGAACGGTAACTGTТАCT TTTCCAGGGGCCGТАGTCGACCCGCTGCCCGAGTTGCTGT GCGACTGCGCGCGCGGGGCTA	человек; hg19: chr2:171673 900- 171674000
68	GAGTGCAAGGTGACTGTGGTTCTTCTCTGGCCAAGTCCGA GGGAGAACGTAAAGATATGGGCCTTTTTCCCCCTCTACC TTGTCTACCAAAGTCCCTAGTCCCCGGAGCAGTTAGCCT CTTTCTTTCCAGGGAATTAGCCAGACACAACAACGGGAAC CAGACACCGAACCCAGACATGCCCGCCCCGTGCGCCCTCCC C	человек; hg19: chr2:171674 400- 171674600
69	GCTCGCTGCCTTTCCCTCCCTCTTGCTCTCCAGAGCCGGAT CTTCAAGGGGAGCCTCCGTGCCCCCGGCTGCTCAGTCCCT CCGGTGTGCAGGACCCCGGAAGTCCTCCCCGCACAGCTCT CGCTTCTCTTTGCAGCCTGTTTCTGCGCCGGACCAGTCGAG GACTCTGGACAGTAGAGGCCCCGGGACGACCGAGCTG	человек; hg19: chr2:171674 903- 171675101
70	AAACGGACGGGCCTCCGCTGAACCAGTGAGGCCCCAGAC GTGCGCATAAATAACCCCTGCGTGCTGCACCACCTGGGGA GAGGGGGAGGACCACGGTAAATGGAGCGAGCGCATAGCA AAAGGGACGCGGGGTCCTTTTTCTCTGCCGGTGGCACTGGG TAGCTGTGGCCAGGTGTGGTACTTTGATGGGGCCCAGGGC TGGAGCTCAAGGAAGCGTCGCAGGGTCACAGATCTGGGG GAACCCCGGGGAAAAGCACTGAGGCAAAACCGCCGCTCG TCTCCTACAATATATGGGAGGGGGAGGTTGAGTACGTTCT GGATTACTCATAAGACCTTTTTTTTTTCTTCCGGGCGCAA AACCGTGAGCTGGATTTATAATCGCCCTATAAAGCTCCAG AGGCGGTCAGGCACCTGCAGAGGAGCCCCGCCGCTCCGC CGACTAGCTGCCCCCGGAGCAACGGCCTCGTGATTTCCC CGCCGATCCGGTCCCCGCCTCCCCACTCTGCCCCCGCCTAC CCCGGAGCCGTGCAGCCGCCTCTCCGAATCTCTCTTCTC CTGGCGCTCGCGTGCGAGAGGGAACTAGCGAGAACGAGG AAGCAGCTGGAGGTGACGCCGGGCAGATTACGCCTGTCA	человек

SEQ ID NO:	Последовательность нуклеиновой кислоты	Источник/ геномная локация
	GGGCCGAGCCGAGCGGATCGCTGGGCGCTGTGCAGAGGA AAGGCGGGAGTGCCCGGCTCGCTGTGCGCAGAGCCGAGGT GGGTAAGCTAGCGACCACCTGGACTTCCCAGCGCCCAACC GTGGCTTTTCAGCCAGGTCCTCTCCTCCC GCGGCTTCTCAA CCAACCCCATCCCAGCGCCGGCCACCCAACCTCCCGAAAT GAGTGCTTCTGCCCCAGCAGCCGAAGGCGCTACTAGGAA CGGTAACCTGTTACTTTTCCAGGGGCGTAGTCGACCCGC TGCCCGAGTTGCTGTGCGACTGCGCGCGCGGGGCTAGAGT GCAAGGTGACTGTGGTTCTTCTCTGGCCAAGTCCGAGGGA GAACGTAAAGATATGGGCCTTTTTCCCCCTCTCACCTTGTC TCACCAAAGTCCCTAGTCCCCGGAGCAGTTAGCCTCTTTCT TTCCAGGGAATTAGCCAGACACAACAACGGGAACCAGAC ACCGAACCAGACATGCCCGCCCCGTGCGCCCTCCCCGCTC GCTGCCTTTCTCCCTCTTGTCTCTCCAGAGCCGGATCTTC AAGGGGAGCCTCCGTGCCCCCGGCTGCTCAGTCCCTCCGG TGTGCAGGACCCCGGAAGTCCTCCCCGCACAGCTCTCGCT TCTCTTTGCAGCCTGTTTCTGCGCCGGACCAGTCGAGGACT CTGGACAGTAGAGGCCCCCGGGACGACCGAGCTG	
71	GGAGGAAGCCATCAACTAAACTACAATGACTGTAAGATA CAAAATTGGGAATGGTAACATATTTTGAAGTTCTGTTGAC ATAAAGAATCATGATATTAATGCCCATGGAAATGAAAGG GCGATCAACACTATGGTTTGAAGAGGGGGAAATTGTAGA GCACAGATGTGTTTCGTGTGGCAGTGTGCTGTCTCTAGCAA TACTCAGAGAAGAGAGAGAACAATGAAATTCTGATTGGC CCCAGTGTGAGCCCAGATGAGGTTTCAGCTGCCAACTTTCT CTTTCACATCTTATGAAAGTCATTTAAGCACAACCTAATTT TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGAGACAGAGTCTTGCTCTGTTG CCCAGGACAGAGTGCAGTAGTGACTCAATCTCGGCTCACT GCAGCCTCCACCTCCTAGGCTCAAACGGTCCTCCTGCATC AGCCTCCCAAGTAGCTGGAATTACAGGAGTGGCCACCAT GCCAGCTAATTTTTGTATTTTAAATAGATACGGGGGTTTC ACCATATCACCCAGGCTGGTCTCGAACTCCTGGCCTCAAG	человек

SEQ ID NO:	Последовательность нуклеиновой кислоты	Источник/ геномная локация
	<p> TGATCCACCTGCCTCGGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTATA GGCGTCAGCCACTATGCCCAACCCGACCAACCTTTTTTAA AATAAATATTTAAAAAATTGGTATTTACATATATACTAG TATTTACATTTATCCACACAAAACGGACGGGCCTCCGCTG AACCAGTGAGGCCCCAGACGTGCGCATAAATAACCCCTGC GTGCTGCACCACCTGGGGAGAGGGGGAGGACCACGGTAA ATGGAGCGAGCGCATAGCAAAAGGGACGCGGGGTCTTTT TCTCTGCCGGTGGCACTGGGTAGCTGTGGCCAGGTGTGGT ACTTTGATGGGGCCCAGGGCTGGAGCTCAAGGAAGCGTC GCAGGGTCACAGATCTGGGGGAACCCCGGGGAAAAGCAC TGAGGCAAACCGCCGCTCGTCTCCTACAATATATGGGAG GGGGAGGTTGAGTACGTTCTGGATTACTCATAAGACCTTT TTTTTTTCTTCCGGGCGCAAAACCGTGAGCTGGATTTATA ATCGCCCTATAAAGCTCCAGAGGCGGTCAGGCACCTGCAG AGGAGCCCCGCCGCTCCGCCGACTAGCTGCCCCCGCGAGC AACGGCCTCGTGATTTCCCCGCCGATCCGGTCCCCGCCTC CCCACTCTGCCCCCGCCTACCCCGGAGCCGTGCAGCCGCC TCTCCGAATCTCTCTCTTCTCCTGGCGCTCGCGTGCGAGAG GGAAGTAGCGAGAACGAGGAAGCAGCTGGAGGTGACGCC GGGCAGATTACGCCTGTCAGGGCCGAGCCGAGCGGATCG CTGGGCGCTGTGCAGAGGAAAGGCGGGAGTGCCCGGCTC GCTGTCGCAGAGCCGAGGTGGGTAAGCTAGCGACCACCT GGAATTCCCAGCGCCCAACCGTGGCTTTTCAGCCAGGTCC TCTCCTCCCGCGGCTTCTCAACCAACCCCATCCCAGCGCC GGCCACCCAACCTCCCGAAATGAGTGCTTCTGCCCCAGC AGCCGAAGGCGCTACTAGGAACGGTAACCTGTTACTTTTC CAGGGGCCGTAGTCGACCCGCTGCCCGAGTTGCTGTGCGA CTGCGCGCGCGGGGCTAGAGTGCAAGGTGACTGTGGTTCT TCTCTGGCCAAGTCCGAGGGAGAACGTAAAGATATGGGC CTTTTTCCCCCTCTCACCTTGTCTCACCAAAGTCCCTAGTC CCCGGAGCAGTTAGCCTCTTTCTTTCCAGGGAATTAGCCA GACACAACAACGGGAACCAGACACCGAACCAGACATGCC </p>	

SEQ ID NO:	Последовательность нуклеиновой кислоты	Источник/ геномная локация
	CGCCCCGTGCGCCCTCCCCGCTCGCTGCCTTTCCTCCCTCT TGTCTCTCCAGAGCCGGATCTTCAAGGGGAGCCTCCGTGC CCCCGGCTGCTCAGTCCCTCCGGTGTGCAGGACCCCGGAA GTCTCCCCGCACAGCTCTCGCTTCTCTTTGCAGCCTGTTT CTGCGCCGGACCAGTCGAGGACTCTGGACAGTAGAGGCC CCGGGACGACCGAGCTG	
72	TCAACAGGGGGACACTTGGGAAAGAAGGATGGGGACAGA GCCGAGAGGACTGTTACACATTAGAGAAACATCAGTGACT GTGCCAGCTTTGGGGTAGACTGCACAAAAGCCCTGAGGCA GCACAGGCAGGATCCAGTCTGCTGGTCCCAGGAAGCTAAC CGTCTCAGACAGAGCACAAAGCACCGAGACATGTGCCAC AAGGCTTGTGTAGAGAGGTCAGAGGACAGCGTACAGGTC CCAGAGATCAAACCTCAACCTCACCAGGCTTGGCAGCAAGC CTTTACCAACCCACCCCCACCCACCCACCCTGCACGCGC CCCTCTCCCCTCCCCATGGTCTCCCATGGCTATCTCACTTG GCCCTAAAATGTTTAAGGATGACACTGGCTGCTGAGTGGA AATGAGACAGCAGAAGTCAACAGTAGATTTTAGGAAAGC CAGAGAAAAGGCTTGTGCTGTTTTTAGAAAGCCAAGGG ACAAGCTAAGATAGGGCCCAAGTAATGCTAGTATTTACAT TTATCCACACAAAACGGACGGGCCTCCGCTGAACCAGTGA GGCCCCAGACGTGCGCATAAATAACCCCTGCGTGCTGCAC CACCTGGGGAGAGGGGGAGGACCACGGTAAATGGAGCGA GCGCATAGCAAAAAGGGACGCGGGGTCTTTTCTCTGCCGG TGGCACTGGGTAGCTGTGGCCAGGTGTGGTACTTTGATGG GGCCCAGGGCTGGAGCTCAAGGAAGCGTCGCAGGGTCAC AGATCTGGGGGAACCCCGGGGAAAAGCACTGAGGCAAAA CCGCCGCTCGTCTCCTACAATATATGGGAGGGGGAGGTTG AGTACGTTCTGGATTA CT CATAAGACCTTTTTTTTTTTCCTT CCGGGCGCAAAACCGTGAGCTGGATTTATAATCGCCCTAT AAAGCTCCAGAGGCGGTCAGGCACCTGCAGAGGAGCCCC GCCGCTCCGCCGACTAGCTGCCCCCGCGAGCAACGGCCTC GTGATTTCCCCGCCGATCCGGTCCCCGCTCCCCACTCTGC	человек и мышь

SEQ ID NO:	Последовательность нуклеиновой кислоты	Источник/ геномная локация
	CCCCCCTACCCCGGAGCCGTGCAGCCGCCTCTCCGAATC TCTCTTCTCCTGGCGCTCGCGTGCGAGAGGGAAGTAGC GAGAACGAGGAAGCAGCTGGAGGTGACGCCGGGCAGATT ACGCCTGTCAGGGCCGAGCCGAGCGGATCGCTGGGCGCT GTGCAGAGGAAAGGCGGGAGTGCCCCGGCTCGCTGTCGCA GAGCCGAGGTGGGTAAGCTAGCGACCACCTGGACTTCCCA GCGCCCAACCGTGGCTTTTCAGCCAGGTCCTCTCCTCCCGC GGCTTCTCAACCAACCCCATCCCAGCGCCGGCCACCCAAC CTCCCGAAATGAGTGCTTCTGCCCCAGCAGCCGAAGGCG CТАCTAGGAACGGTAACTGTTACTTTTCCAGGGGCGGTA GTCGACCCGCTGCCCGAGTTGCTGTGCGACTGCGCGCGCG GGGCTAGAGTGCAAGGTGACTGTGGTTCTTCTCTGGCCAA GTCCGAGGGAGAACGTAAAGATATGGGCCTTTTTCCCCCT CTCACCTTGTCTCACCAAAGTCCCTAGTCCCCGGAGCAGT TAGCCTCTTTCTTTCCAGGGAATTAGCCAGACACAACAAC GGGAAACCAGACACCGAACCAGACATGCCCGCCCCGTGCG CCCTCCCCGCTCGCTGCCTTTCCTCCCTCTTGTCTCTCCAG AGCCGGATCTTCAAGGGGAGCCTCCGTGCCCCCGGCTGCT CAGTCCCTCCGGTGTGCAGGACCCCGGAAGTCCCTCCCCGC ACAGCTCTCGCTTCTCTTTGCAGCCTGTTTCTGCGCCGGAC CAGTCGAGGACTCTGGACAGTAGAGGCCCCCGGGACGACC GAGCTG	
73	ATTTACATTTATCCACACA	человек
74	TGCCGCTGGACTCTCTTCCAAGGAACTAGGAGAACCAAGA TCCGTTTTTCTGCCAAGGGCTGCCCCCCCCACGCCCCAAC CCCCTCACCCCGATCCCCACAGAAAGAAATCTTGAGGTAG CTGGAGCTTCTTCTGTGGGTGTGACAGGACTGCCATTCTCC TCTGTAGTCTGCAGAAGCCTGCCATTCCACCATTTAAACCT GTGACTCCAGGCCTTAAGCCTGTTGAAGGTCGAGTCCCAG AAGGGTCATATGTGCAACTGCCTAGGGAGAGTTCCCACCTC GCAGGGCCAAGAGGAGTCCCCCGGTCTGAGGTGTGGGGG CGGGGACGTGCACTGGGCGCTGGGACCACGGCTGGGGCT	мышь; chr9:107,399 ,268- 107,400,067

SEQ ID NO:	Последовательность нуклеиновой кислоты	Источник/ геномная локация
	<p>CAGGACTCGCGAGCTTGGATTCGGATCGGTTTGC GCGAGC CAGTAGGGCAGGCTCCGGGGTGAACGGGGACGAGGGGCG CGCGGGCACAGGCGGGCGCGTGACCGCGGCGGGGGCGCG CGGAGGCGGGCCGGCCAAGGAGAGGGAGGGAGGGAATG AGGGAGGGAGCGACAGGGGAGGGCGGCGCCGGCAGGTTG GCGGCGGCCGCTATTTGAGCGCAGGTCCCGGGCCAGGCGC TCAAAGCGCTTGGAGCCAGCGCGGCGGGGAGATCGCTGC GCGCAGCCCGCAGAGGCGCTGCGGCCAGTGCAGCCCCGG AGGCCCCGCGCGGAGAAGGAGGTGGAGAAGAGGCCGGCT TTCCGCCCCGCCCGCCCGCGCCCCCCCCACCTCCATCCCGCCG CCGCCGTCCCCCTCCCTCCCCGCGGCGCCGCATCTTGAAT GGAAAC</p>	
75	<p>GAGTAATTCATACAAAAGGACTCGCCCCTGCCTTGGGGAA TCCCAGGGACCGTCGTAAACTCCCACTAACGTAGAACCC AGAGATCGCTGCGTTCCCGCCCCCTCACCCGCCCGCTCTC GTCATCACTGAGGTGGAGAAGAGCATGCGTGAGGCTCCG GTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCC CGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTTCGGCAATTGAACCGGTGC CTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAGTGATGT CGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAA CCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCG CAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGT GGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTACGGGTTATGGCCCTTG CGTGCCTTGAATTA CTCCACGCCCCTGGCTGCAGTACGT GATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTGGAAGTGGGTGGGAG AGTTCGAGGCCTTGCGCTTAAGGAGCCCCTTCGCCTCGTG CTTGAGTTGAGGCCTGGCTTGGGCGCTGGGGCCGCCGCGT GCCAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTG ATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTGGATGACCTGCTGCG ACGCTTTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAATGCGGGCC AAGATCTGCACACTGGTATTTCCGGTTTTTGGGGCCGCGGG CGGCGACGGGGCCCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTCCGGCG</p>	

SEQ ID NO:	Последовательность нуклеиновой кислоты	Источник/ геномная локация
	AGGCGGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGG GGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCC TCGCGCCGCCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCT GGCCCGGTGCGCACACAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCC GCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACG CGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAA AGGAAAAGGGCCTTCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCATGTG ACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTA GTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTTAGGTTGGGGG GAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGG TGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATT CTCCTTGGAAATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGTCA TTCTCAAGCCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTTTCTTCCA TTTCAGGTGTCGTGA	
76	GGAGGAAGCCATCAACTAAACTACAATGACTGTAAGATA CAAAATTGGGAATGGTAACATATTTTGAAGTTCTGTTGAC ATAAAGAATCATGATATTAATGCCCATGGAAATGAAAGG GCGATCAACACTATGGTTTGAAGGGGGAAATTGTAGA GCACAGATGTGTTTCGTGTGGCAGTGTGCTGTCTCTAGCAA TACTCAGAGAAGAGAGAGAACAATGAAATTCTGATTGGC CCCAGTGTGAGCCCAGATGAGGTTTCAGCTGCCAACTTTCT CTTTCACATCTTATGAAAGTCATTTAAGCACAACCTAACTTT TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGAGACAGAGTCTTGCTCTGTTG CCCAGGACAGAGTGCAGTAGTACTCAATCTCGGCTCACT GCAGCCTCCACCTCCTAGGCTCAAACGGTCCTCCTGCATC AGCCTCCCAAGTAGCTGGAATTACAGGAGTGGCCCACCAT GCCAGCTAATTTTTGTATTTTAAATAGATACGGGGGTTTC ACCATATCACCCAGGCTGGTCTCGAACTCCTGGCCTCAAG TGATCCACCTGCCTCGGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTATA GGCGTCAGCCACTATGCCCAACCCGACCAACCTTTTTTAA AATAAATATTTAAAAAATTGGTATTTACATATATACTAG TATTTACATTTATCCACACAAAACGGACGGGCCTCCGCTG	

SEQ ID NO:	Последовательность нуклеиновой кислоты	Источник/ геномная локация
	AACCAGTGAGGCCCCAGACGTGCGCATAAATAACCCCTGC GTGCTGCACCACCTGGGGAGAGGGGGAGGACCACGGTAA ATGGAGCGAGCGCATAGCAAAAGGGACGCGGGGTCTTT TCTCTGCCGGTGGCACTGGGTAGCTGTGGCCAGGTGTGGT ACTTTGATGGGGCCCAGGGCTGGAGCTCAAGGAAGCGTC GCAGGGTCACAGATCTGGGGGAACCCCGGGGAAAAGCAC TGAGGCAAACCGCCGCTCGTCTCCTACAATATATGGGAG GGGGAGGTTGAGTACGTTCTGGATTACTCATAAGACCTTT TTTTTTTCCCTCCGGGCGCAAAACCGTGAGCTGGATTTATA ATCGCCCTATAAAGCTCCAGAGGCGGTCAGGCACCTGCAG AGGAGCCCCGCCGCTCCGCCGACTAGCTGCCCCCGCGAGC AACGGCCTCGTGATTTCCCCGCCGATCCGGTCCCCGCCTC CCCACTCTGCCCCCGCTACCCCGGAGCCGTGCAGCCGCC TCTCCGAATCTCTCTCTTCTCCTGGCGCTCGCGTGCGAGAG GGAAGTAGCGAGAACGAGGAAGCAGCTGGAGGTGACGCC GGGCAGATTACGCCTGTCAGGGCCGAGCCGAGCGGATCG CTGGGCGCTGTGCAGAGGAAAGGCGGGAGTGCCCGGCTC GCTGTGCGCAGAGCCGAGGTGGGTAAGCTAGCGACCACCT GGACTTCCCAGCGCCCAACCGTGGCTTTTCAGCCAGGTCC TCTCCTCCCGCGGCTTCTCAACCAACCCCATCCCAGCGCC GGCCACCCAACCTCCCGAAATGAGTGCTTCCTGCCCCAGC AGCCGAAGGCGCTACTAGGAACGGTAACCTGTTACTTTTC CAGGGGCCGTAGTCGACCCGCTGCCCGAGTTGCTGTGCGA CTGCGCGCGCGGGGCTAGAGTGCAAGGTGACTGTGGTTCT TCTCTGGCCAAGTCCGAGGGAGAACGTAAAGATATGGGC CTTTTTCCCCCTCTCACCTTGTCTCACCAAAGTCCCTAGTC CCCGGAGCAGTTAGCCTCTTTCTTTCCAGGGAATTAGCCA GACACAACAACGGGAACCAGACACCGAACCAGACATGCC CGCCCCGTGCGCCCTCCCCGCTCGCTGCCTTTCCCTCCCTCT TGTCTCTCCAGAGCCGGATCTTCAAGGGGAGCCTCCGTGC CCCCGGCTGCTCAGTCCCTCCGGTGTGCAGGACCCCGGAA GTCTCCCCGCACAGCTCTCGCTTCTCTTTGCAGCCTGTTT	

SEQ ID NO:	Последовательность нуклеиновой кислоты	Источник/ геномная локация
	CTGCGCCGGACCAGTCGAGGACTCTGGACAGTAGAGGCC CCGGGACGACCGAGCTG	
77	GAATGTGGGAAATCATTCAGTCGC	eTF ^{SCN1A} прямой праймер
78	GCAAGTTATCCTCTCGTGAGAAGG	eTF ^{SCN1A} обратный праймер
79	GCGACAACCTGGTGAGACATCAACGCACC	eTF ^{SCN1A} зонд
80	GCTGTTATCTCTTGTGGGCTGT	MfAlb прямой праймер
81	AAACTCATGGGAGCTGCCGGTT	MfAlb обратный праймер
82	CCACACAAATCTCTCCCTGGCATTG	MfAlb зонд
83	GAATGTGGGAAATCATTCAGTCGC	eTF ^{SCN1A} прямой праймер
84	GCAAGTTATCCTCTCGTGAGAAGG	eTF ^{SCN1A} обратный праймер
85	GCGACAACCTGGTGAGACATCAACGCACC	eTF ^{SCN1A} зонд

ВКЛЮЧЕНИЕ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ

Все публикации, патенты и заявки на патенты, упомянутые в настоящем описании, включены сюда посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент или заявка на патент были специально и индивидуально указаны для включения посредством ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ введения вектора примату, включающий интрацеребровентрикулярное (ICV) введение вектора примату, отличающийся тем, что вектор содержит селективный к клеточному типу регуляторный элемент.

2. Способ введения вектора примату, включающий интрацеребровентрикулярное (ICV) введение вектора примату, отличающийся тем, что вектор содержит регуляторный элемент, отличающийся тем, что регуляторный элемент приводит к увеличению экспрессии трансгена по меньшей мере, 2-кратно, по сравнению с экспрессией трансгена, когда он функционально связан с промотором CMV.

3. Способ введения вектора примату, включающий интрацеребровентрикулярное (ICV) введение вектора примату, отличающийся тем, что вектор вводят унилатерально.

4. Способ введения вектора примату, включающий интрацеребровентрикулярное (ICV) введение вектора примату, отличающийся тем, что вектор не является самокомплементарным AAV.

5. Способ по п. 1, отличающийся тем, что приматом является человек.

6. Способ по п. 1, отличающийся тем, что приматом является примат, не являющийся человеком.

7. Способ по п. 6, отличающийся тем, что приматом, не являющимся человеком, является старосветская мартышка, орангутан, горилла, шимпанзе, макак-крабоед, макак-резус или свинохвостый макак.

8. Способ по любому из пп. 3-7, отличающийся тем, что вектор содержит нуклеотидную последовательность, функционально связанную с регуляторным элементом.

9. Способ по пп. 1, 2 или 8, отличающийся тем, что регуляторный элемент селективно экспрессируется в нейрональных клетках.

10. Способ по п. 9, отличающийся тем, что нейрональные клетки выбраны из группы, состоящей из униполярных, биполярных, мультиполярных или псевдоуниполярных нейронов.

11. Способ по п. 9, отличающийся тем, что нейрональными клетками являются GABA-ергические нейроны.

12. Способ по п. 2 или 8, отличающийся тем, что регуляторный элемент селективно экспрессируется в глиальных клетках.

13. Способ по п. 12, отличающийся тем, что глиальные клетки выбраны из группы, состоящей из астроцитов, олигодендроцитов, эпендимальных клеток, шванновских клеток и амфицитных клеток.

14. Способ по п. 2 или 8, отличающийся тем, что регуляторный элемент селективно экспрессируется в ненейрональных клетках.

15. Способ по любому из пп. 1-14, отличающийся тем, что вектор вводят в более чем один желудочек головного мозга.

16. Способ по любому из пп. 1-2 или 4-15, отличающийся тем, что вектор вводят

билатерально.

17. Способ по п. 15 или 16, отличающийся тем, что вектор вводят одновременно.
18. Способ по п. 15 или 16, отличающийся тем, что вектор вводят последовательно.
19. Способ по п. 18, отличающийся тем, что каждую дозу вектора вводят с интервалом по меньшей мере 24 часа.
20. Способ по любому из пп. 1-14, отличающийся тем, что вектор вводят в один желудочек мозга.
21. Способ по любому из пп. 1-20, отличающийся тем, что примат дополнительно получает внутривенное введение вектора.
22. Способ по любому из пп. 1-21, отличающийся тем, что примат дополнительно получает интратекальное введение вектора.
23. Способ по п. 22, отличающийся тем, что интратекальное введение включает интратекальное цистернальное введение или интратекальное люмбальное введение.
24. Способ по любому из пп. 1-23, отличающийся тем, что вектор содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид.
25. Способ по п. 24, отличающийся тем, что полипептидом является ДНК-связывающий белок.
26. Способ по п. 25, отличающийся тем, что ДНК-связывающий белок выбран из группы, состоящей из цинкового пальца (ZFP), цинк-пальцевой нуклеазы (ZFN) или нуклеазы на основе эффектора, подобного активатору транскрипции (TALEN).
27. Способ по любому из пп. 24-26, отличающийся тем, что нуклеотидной последовательностью является кодон-оптимизированный вариант и/или его фрагмент.
28. Способ по любому из пп. 1-23, отличающийся тем, что вектор содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую направляющую РНК (нРНК).
29. Способ по любому из пп. 1-28, отличающийся тем, что вектор содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую интерферирующую РНК (РНКи), которая снижает экспрессию гена-мишени.
30. Способ по п. 29, отличающийся тем, что РНКи снижает экспрессию гена-мишени, выбранного из группы, состоящей из SOD1, НТТ, Тау или альфа-синуклеина.
31. Способ по любому из пп. 1-30, отличающийся тем, что вектор содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую антисмысловый олигонуклеотид, который снижает экспрессию гена-мишени.
32. Способ по любому из пп. 31, отличающийся тем, что вектор выбран из группы, состоящей из лентивируса, ретровируса, плазмиды или вируса простого герпеса (HSV).
33. Способ по любому из пп. 1-3 или 5-31, отличающийся тем, что вектором является вектор аденоассоциированного вируса (AAV).
34. Способ по п. 33, отличающийся тем, что AAV является одноцепочечный AAV.
35. Способ по п. 33, отличающийся тем, что AAV является самокомплементарный AAV.
36. Способ по любому из пп. 33-35, отличающийся тем, что аденоассоциированным

вирусным вектором является любой из AAV1, scAAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, scAAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, scAAV9, AAV10, AAV11, AAV12, rh10, AAV птицы, AAV крупного рогатого скота, AAV собаки, AAV лошади, AAV примата, AAV не примата, AAV овец или любые их гибриды.

37. Способ по любому из пп. 33-36, отличающийся тем, что вектором AAV является AAV5.

38. Способ по любому из пп. 33-36, отличающийся тем, что вектором AAV является AAV9.

39. Способ по любому из пп. 33-38, отличающийся тем, что вектор содержит 5' AAV последовательность инвертированного концевой повтора (ITR) и 3' AAV последовательность ITR.

40. Способ по любому из пп. 1-39, отличающийся тем, что вектор вводят в фармацевтически приемлемом носителе.

41. Способ по любому из пп. 1-40, отличающийся тем, что вектор вводят в комбинации с контрастным агентом.

42. Способ по любому из пп. 1-40, отличающийся тем, что вектор не вводят в комбинации с контрастным агентом.

43. Способ по любому из пп. 1-42, отличающийся тем, что введение осуществляют инъекцией.

44. Способ по любому из пп. 1-43, отличающийся тем, что введение осуществляют инфузией.

45. Способ экспрессии представляющего интерес гена или его биологически активного варианта и/или его фрагмента, включающий введение примату терапевтически эффективного количества вектора аденоассоциированного вируса 1 (AAV1) или вектора аденоассоциированного вируса 5 (AAV5), кодирующего представляющий интерес ген, отличающийся тем, что путь введения выбран из группы, состоящей из внутривенного введения, интратекального введения, интрацеребровентрикулярного введения, интрапаренхимального введения или их комбинаций.

46. Способ по п. 45, отличающийся тем, что приматом является человек.

47. Способ по п. 45, отличающийся тем, что приматом является примат, не являющийся человеком.

48. Способ по п. 47, отличающийся тем, что приматом, не являющимся человеком, является старосветская мартышка, орангутан, горилла, шимпанзе, макак-крабоед, макак-резус или свинохвостый макак.

49. Способ по любому из пп. 45-48, отличающийся тем, что вектор AAV1 или вектор AAV5 содержит нуклеотидную последовательность, функционально связанную с регуляторным элементом.

50. Способ по п. 49, отличающийся тем, что регуляторный элемент является селективным к клеточному типу.

51. Способ по п. 50, отличающийся тем, что регуляторный элемент селективно

экспрессируется в нейрональной клетке.

52. Способ по п. 51, отличающийся тем, что нейрональные клетки выбраны из группы, состоящей из униполярных, биполярных, мультиполярных или псевдоуниполярных нейронов.

53. Способ по п. 51, отличающийся тем, что нейрональными клетками являются ГАВА-ергические нейроны.

54. Способ по п. 50, отличающийся тем, что регуляторный элемент селективно экспрессируется в глиальных клетках.

55. Способ по п. 54, отличающийся тем, что глиальные клетки выбраны из группы, состоящей из астроцитов, олигодендроцитов, эпендимальных клеток, шванновских клеток и амфицитных клеток.

56. Способ по п. 49, отличающийся тем, что регуляторный элемент селективно экспрессируется в ненейрональных клетках.

57. Способ по любому из пп. 45-56, отличающийся тем, что AAV1 или AAV5 вводят в более чем один желудочек мозга.

58. Способ по любому из пп. 45-57, отличающийся тем, что AAV1 или AAV5 вводят билатерально.

59. Способ по п. 57 или 58, отличающийся тем, что AAV1 или AAV5 вводят одновременно.

60. Способ по п. 57 или 58, отличающийся тем, что AAV1 или AAV5 вводят последовательно.

61. Способ по п. 60, отличающийся тем, что каждую дозу AAV1 или AAV5 вводят с интервалом по меньшей мере 24 часов.

62. Способ по любому из пп. 45-56, отличающийся тем, что AAV1 или AAV5 вводят в один желудочек мозга.

63. Способ по любому из пп. 45-62, отличающийся тем, что AAV1 или AAV5 содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид.

64. Способ по п. 63, отличающийся тем, что полипептидом является ДНК-связывающий белок.

65. Способ по п. 64, отличающийся тем, что ДНК-связывающий белок выбран из группы, состоящей из цинкового пальца (ZFP), цинк-пальцевой нуклеазы (ZFN) или нуклеазы на основе эффектора, подобного активатору транскрипции (TALEN).

66. Способ по любому из пп. 63-65, отличающийся тем, что нуклеотидной последовательностью является кодон-оптимизированный вариант и/или его фрагмент.

67. Способ по любому из пп. 45-66, отличающийся тем, что вектор содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую направляющую РНК (нРНК).

68. Способ по любому из пп. 45-68, отличающийся тем, что AAV1 или AAV5 содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую интерферирующую РНК (РНКи), которая снижает экспрессию гена-мишени.

69. Способ по п. 68, отличающийся тем, что РНКи снижает экспрессию гена-

мишени, выбранного из группы, состоящей из SOD1, HTT, Tau или альфа-синуклеина.

70. Способ по любому из пп. 45-69, отличающийся тем, что AAV1 или AAV5 содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую антисмысловой олигонуклеотид, который снижает экспрессию гена-мишени.

71. Способ по любому из пп. 45-70, отличающийся тем, что вектор выбран из группы, состоящей из лентивируса, ретровируса, плазмиды или вируса простого герпеса (HSV).

72. Способ по любому из пп. 45-71, отличающийся тем, что AAV1 или AAV5 вводят в фармацевтически приемлемом носителе.

73. Способ по любому из пп. 45-72, отличающийся тем, что вектор вводят в комбинации с контрастным агентом.

74. Способ по любому из пп. 45-72, отличающийся тем, что вектор не вводят в комбинации с контрастным агентом.

75. Способ по любому из пп. 45-74, отличающийся тем, что введение осуществляют путем инъекции.

76. Способ по любому из пп. 45-74, отличающийся тем, что введение осуществляют путем инфузии.

77. Способ ингибирования или лечения одного или нескольких симптомов, ассоциированных с нейрональным заболеванием у приматов, нуждающихся в этом, включающий введение аденоассоциированного вектора (AAV), выбранного из группы, состоящей из аденоассоциированного вектора 1 (AAV1) или аденоассоциированного вектора 5 (AAV5) примату, отличающийся тем, что путь введения выбран из группы, состоящей из внутривенного введения, интратекального введения, интрацеребровентрикулярного введения, интрапаренхимального введения или их комбинаций.

78. Способ по п. 77, отличающийся тем, что нейрональное заболевание выбрано из группы, состоящей из лизосомной болезни накопления, синдрома Драве, болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, болезни Хантингтона, бокового амиотрофического склероза (ALS), спинальной мышечной атрофии (SMA), эпилепсии, нейродегенерации, моторных нарушений, двигательных нарушений или расстройств настроения.

79. Способ по п. 77 или 78, отличающийся тем, что приматом является человек.

80. Способ по п. 77 или 78, отличающийся тем, что приматом является примат, не являющийся человеком.

81. Способ по п. 80, отличающийся тем, что приматом, не являющимся человеком, является старосветская мартышка, орангутан, горилла, шимпанзе, макак-крабоед, макак-резус или свинохвостый макак.

82. Способ введения вектора примату, включающий интрацеребровентрикулярное (ICV) введение вектора примату, отличающийся тем, что вектор содержит трансген, и отличающийся тем, что введение ICV приводит к повышенной экспрессии трансгена в центральной нервной системе (ЦНС).

83. Способ введения вектора примату, включающий интрацеребровентрикулярное (ICV) введение вектора примату, отличающийся тем, что вектор содержит трансген, и отличающийся тем, что введение ICV приводит к повышенной экспрессии трансгена в центральной нервной системе (ЦНС), по меньшей мере, 1,25-кратно по сравнению с экспрессией трансгена при введении вектора любым другим путем.

84. Способ по п. 82 или 83, отличающийся тем, что введение ICV дает по меньшей мере, 1,5-кратное, 1,75-кратное, 2-кратное, 3-кратное, 5-кратное, 10-кратное, 15-кратное, 20-кратное, 25-кратное, 30-кратное, 35-кратное, 40-кратное, 45-кратное, 50-кратное, 55-кратное, 60-кратное, 65-кратное, 70-кратное или 75-кратное увеличение экспрессии трансгенной последовательности в центральной нервной системе (ЦНС) по сравнению с экспрессией трансгена при введении вектора любым другим путем введения.

85. Способ по п. 82 или 83, отличающийся тем, что введение ICV дает по меньшей мере, 20-90-кратное, 20-80-кратное, 20-70-кратное, 20-60-кратное, 30-90-кратное, 30-80-кратное, 30-70-кратное, 30-кратное, 40-90-кратное, 40-80-кратное, 40-70-кратное, 40-60-кратное, 50-90-кратное, 50-80-кратное, 50-70-кратное, 50-60-кратное, 60-90-кратное, 60-кратное, 70-90, 70-80, 80-90-кратное увеличение экспрессии последовательности трансгена в центральной нервной системе (ЦНС) по сравнению с экспрессией трансгена при введении вектора с помощью любого другого пути введения.

86. Способ по любому из пп. 1-44 или 82-85, отличающийся тем, что введение ICV приводит к переносу гена по всему мозгу.

87. Способ по п. 86, отличающийся тем, что перенос гена происходит во фронтальной коре, теменной коре, височной коре, гиппокампе, мозговом веществе и затылочной коре.

88. Способ по любому из пп. 86 или 87, отличающийся тем, что перенос гена зависит от дозы.

89. Способ по любому из пп. 82-85, отличающийся тем, что вектор дополнительно содержит регуляторный элемент селективный к клеточному типу.

90. Способ по п. 89, отличающийся тем, что регуляторный элемент селективно экспрессируется в головном мозге.

91. Способ по п. 90, отличающийся тем, что регуляторный элемент селективно экспрессируется во фронтальной коре, теменной коре, височной коре, гиппокампе, мозговом веществе и/или затылочной коре.

92. Способ по п. 89, отличающийся тем, что регуляторный элемент селективно экспрессируется в позвоночнике.

93. Способ по п. 92, отличающийся тем, что регуляторный элемент селективно экспрессируется в спинном мозге и/или спинальном ганглии.

94. Способ по п. 89, отличающийся тем, что регуляторный элемент селективно экспрессируется в нейрональных клетках.

95. Способ по п. 94, отличающийся тем, что нейрональные клетки выбраны из группы, состоящей из униполярных, биполярных, мультиполярных или

псевдоуниполярных нейронов.

96. Способ по п. 94, отличающийся тем, что нейрональными клетками являются ГАВА-ергические нейроны.

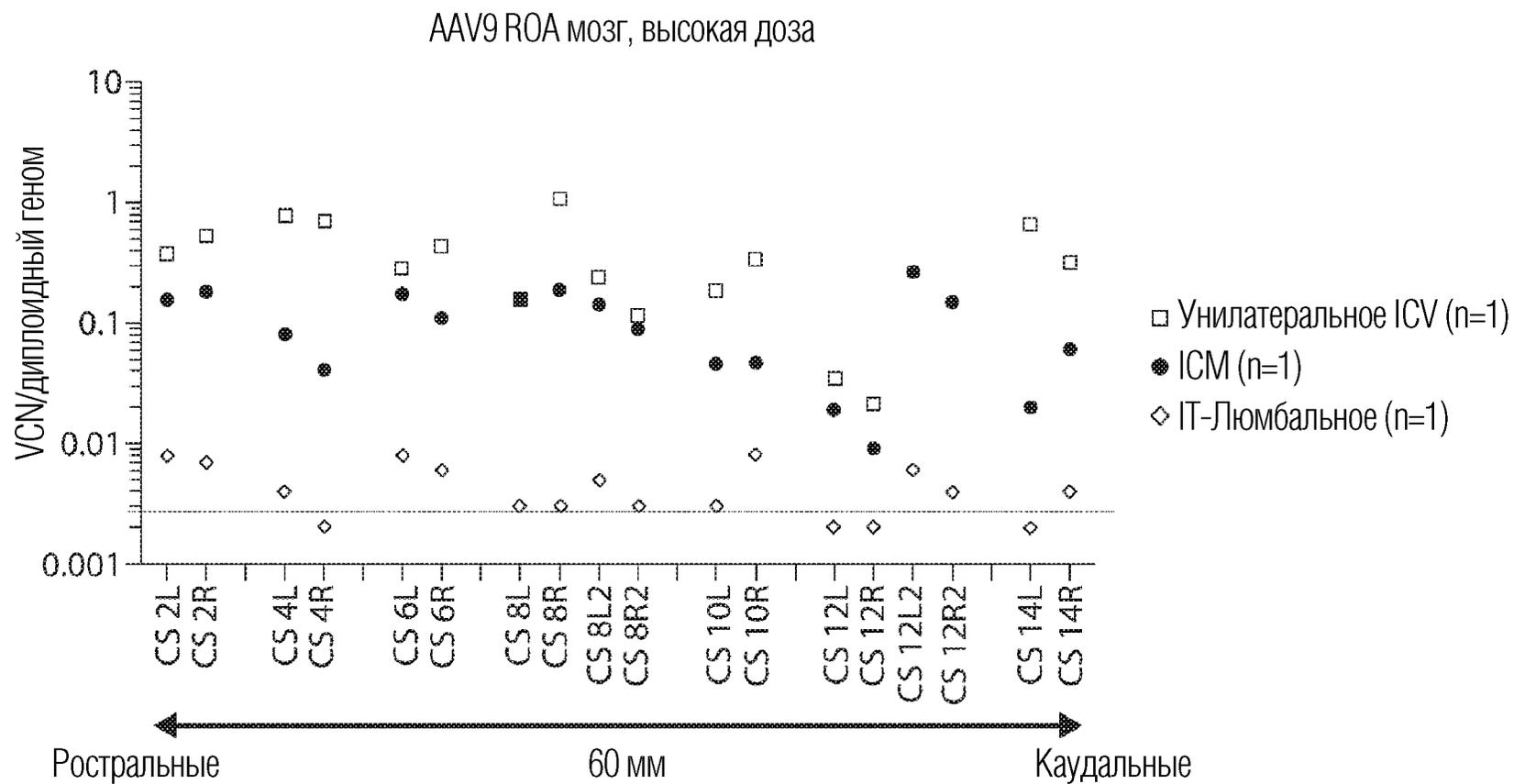
97. Способ по п. 89, отличающийся тем, что регуляторный элемент селективно экспрессируется в ненеурональных клетках.

98. Способ по п. 89, отличающийся тем, что регуляторный элемент селективно экспрессируется в глиальных клетках.

99. Способ по п. 98, отличающийся тем, что глиальные клетки выбраны из группы, состоящей из астроцитов, олигодендроцитов, эпендимальных клеток, шванновских клеток и амфицитных клеток.

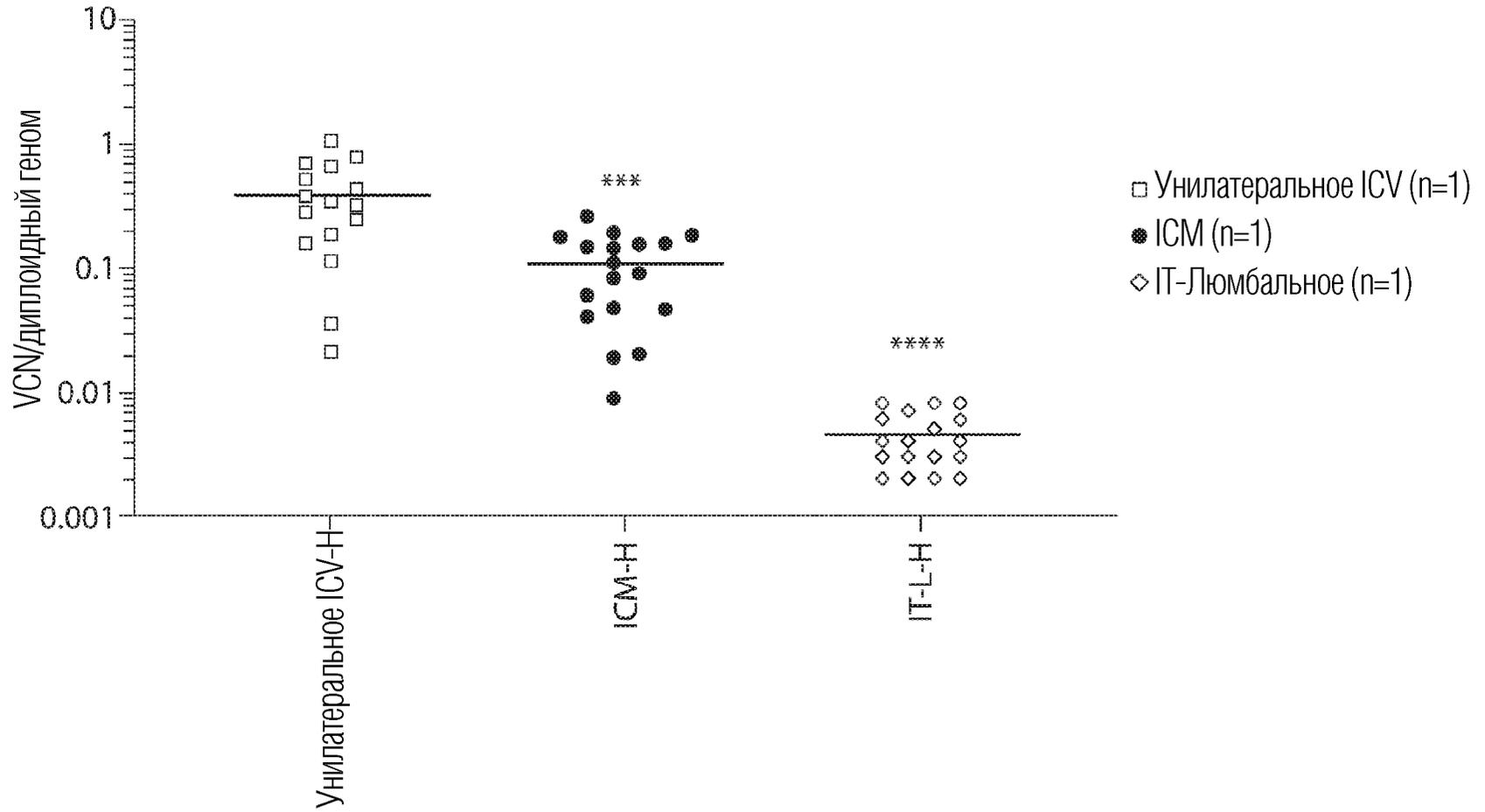


ФИГ. 1



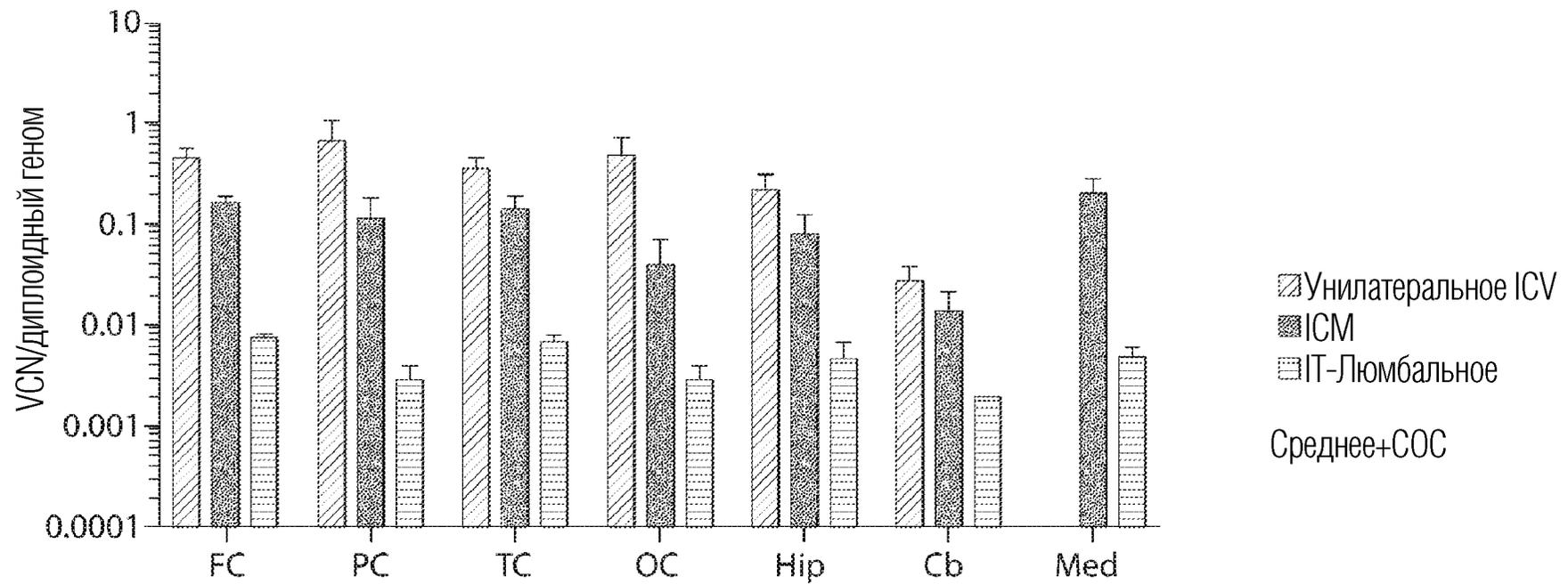
ФИГ. 2

AAV9 ROA мозг, пробои

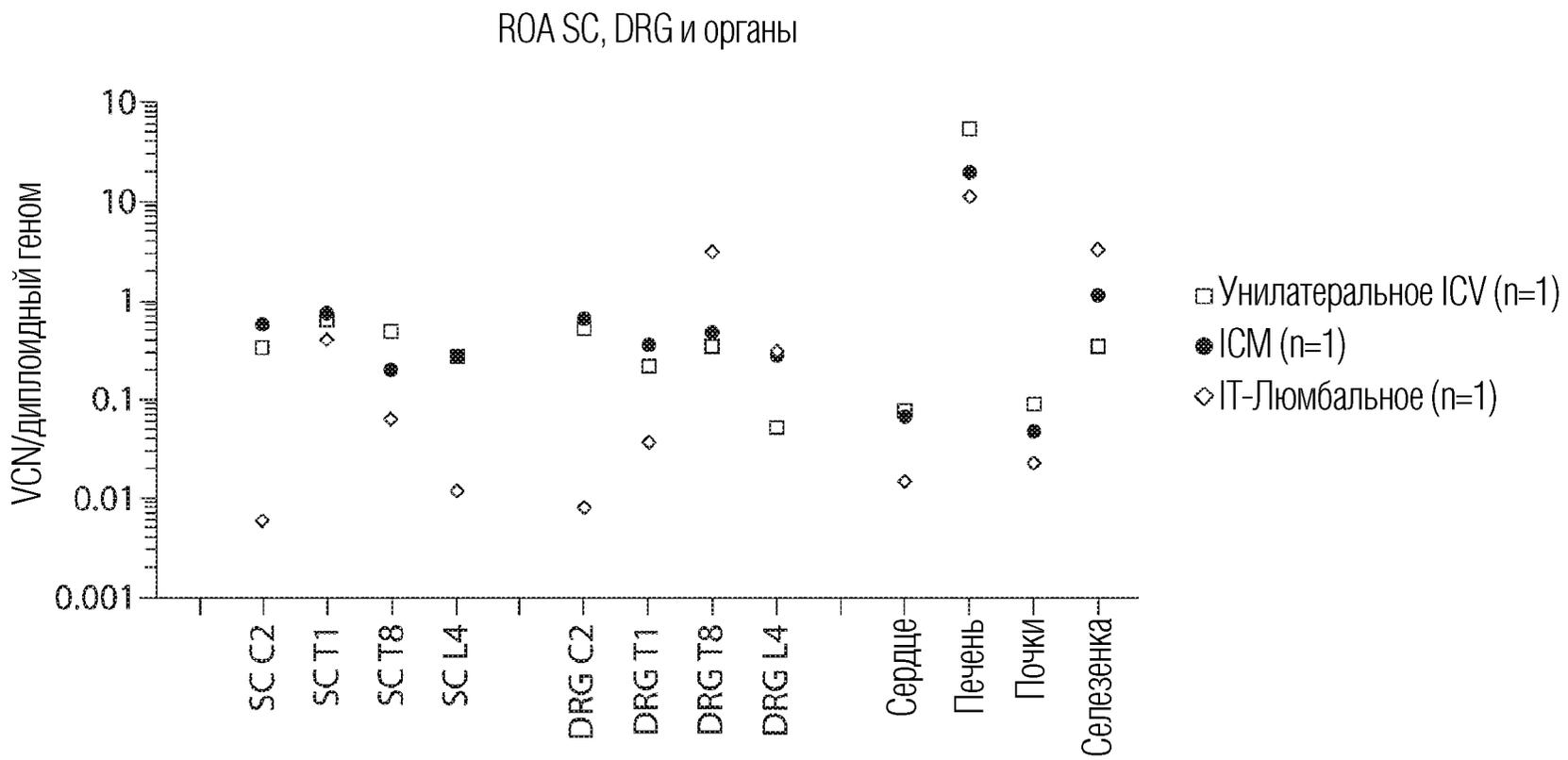


ФИГ. 3

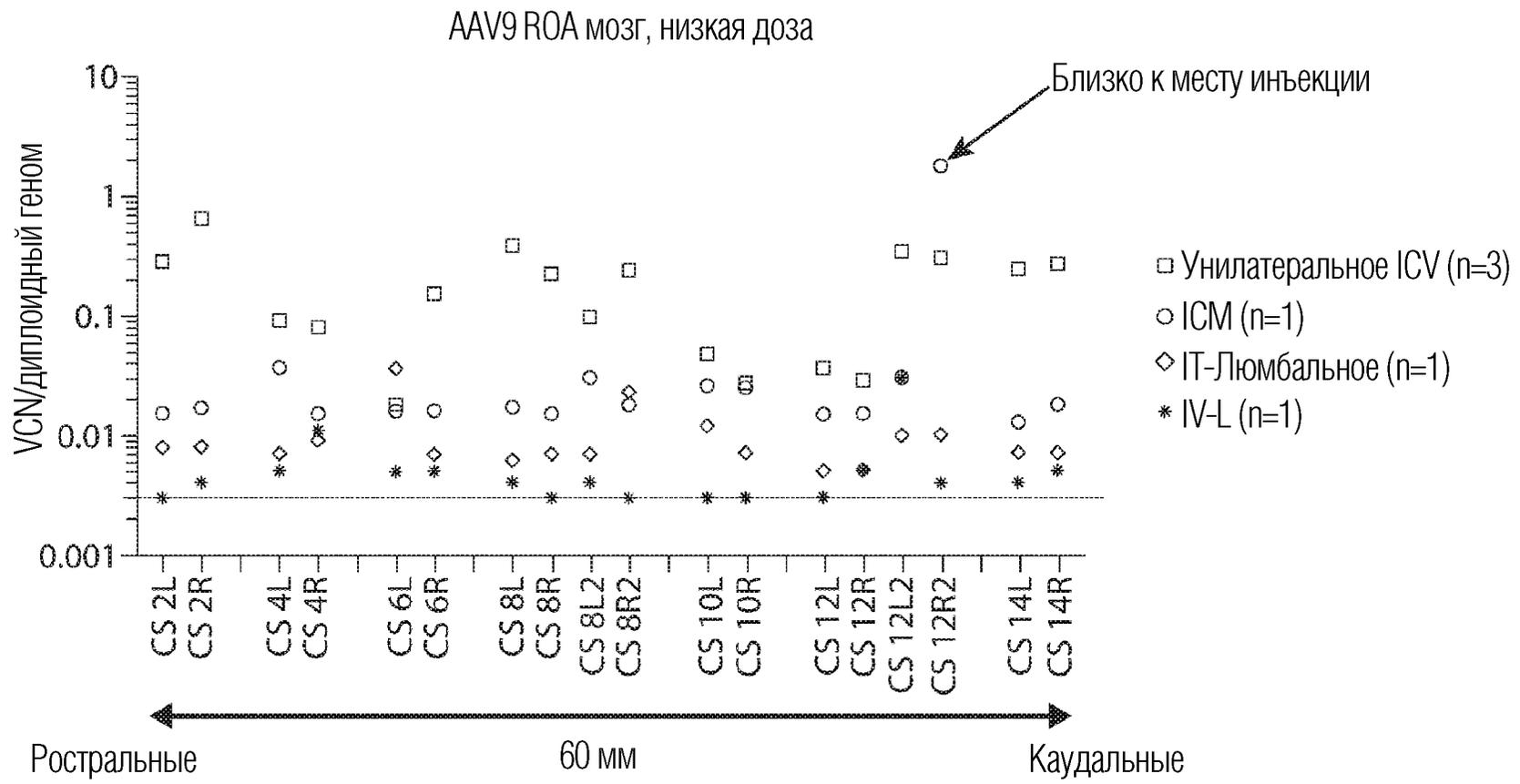
ROA высокая доза, область мозга



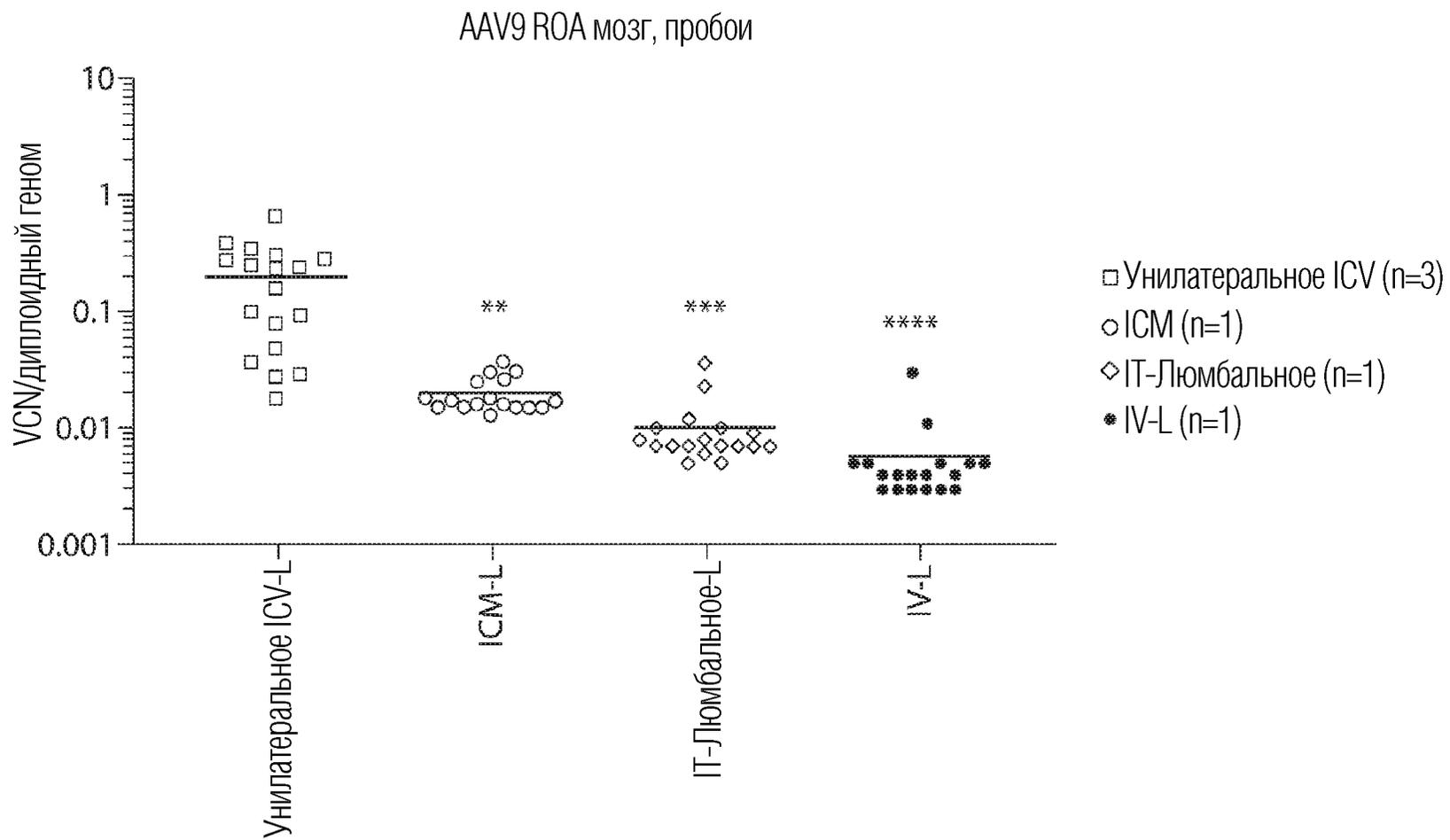
ФИГ. 4



ФИГ. 5

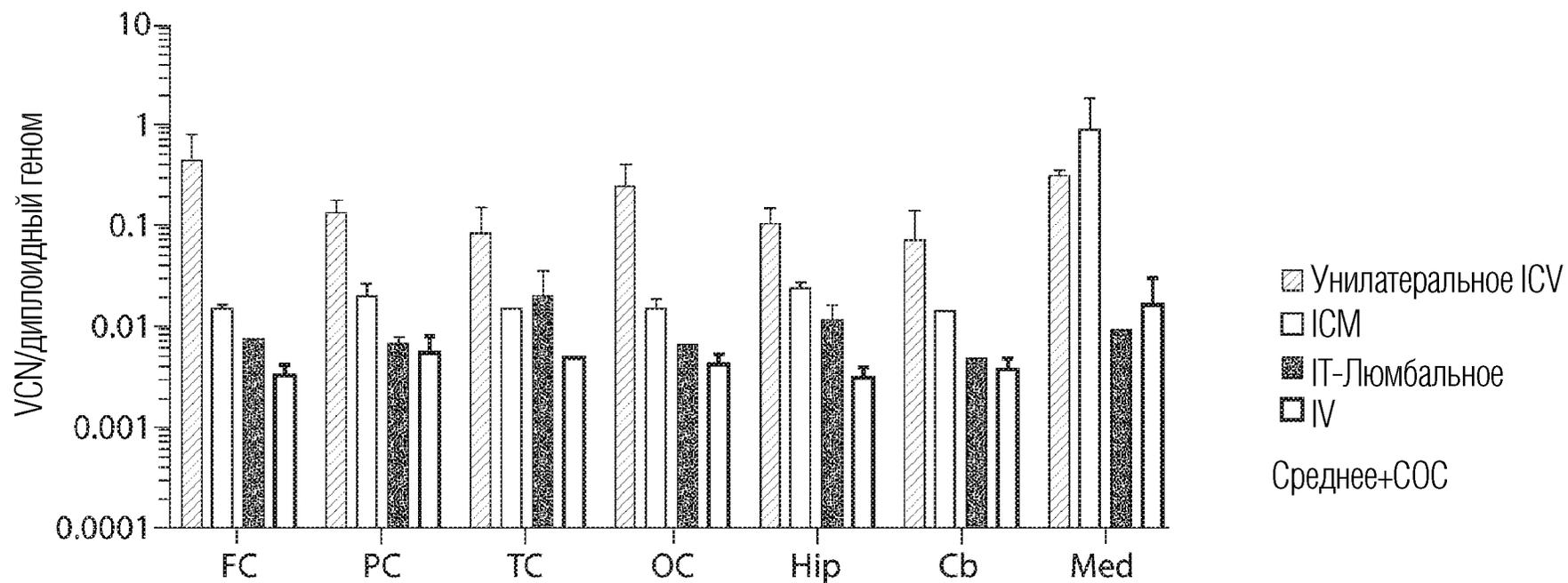


ФИГ. 6

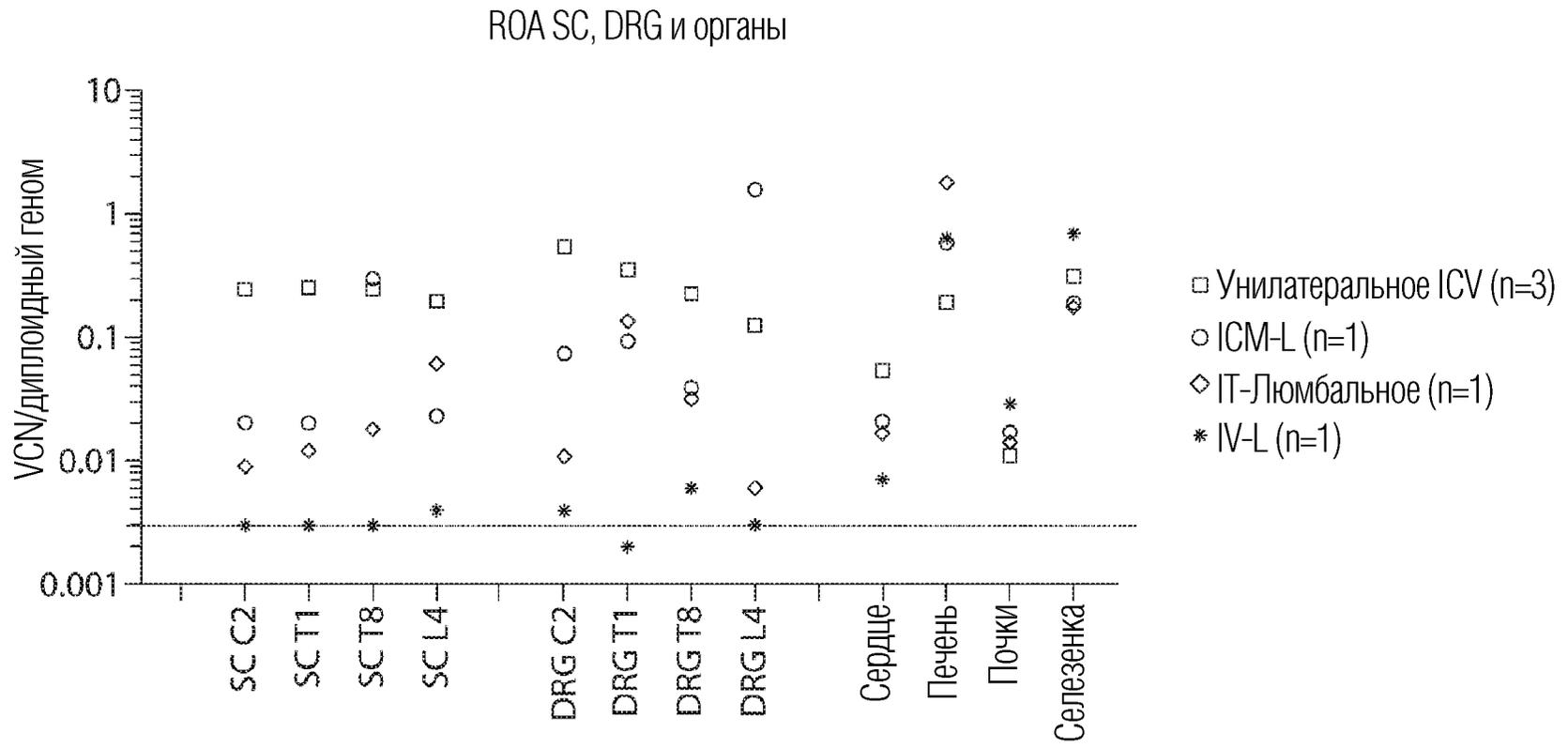


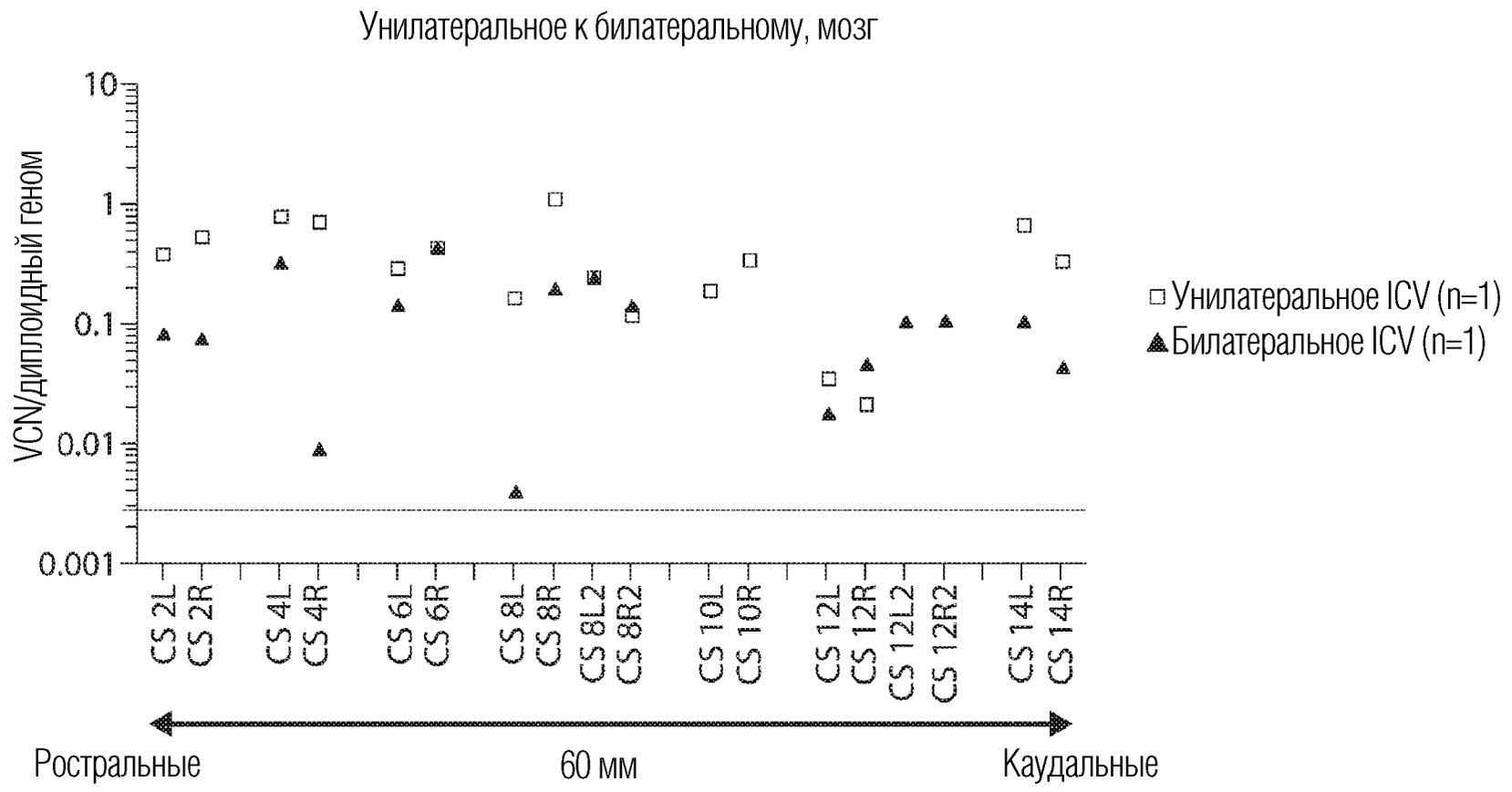
ФИГ. 7

ROA низкая доза, область мозга

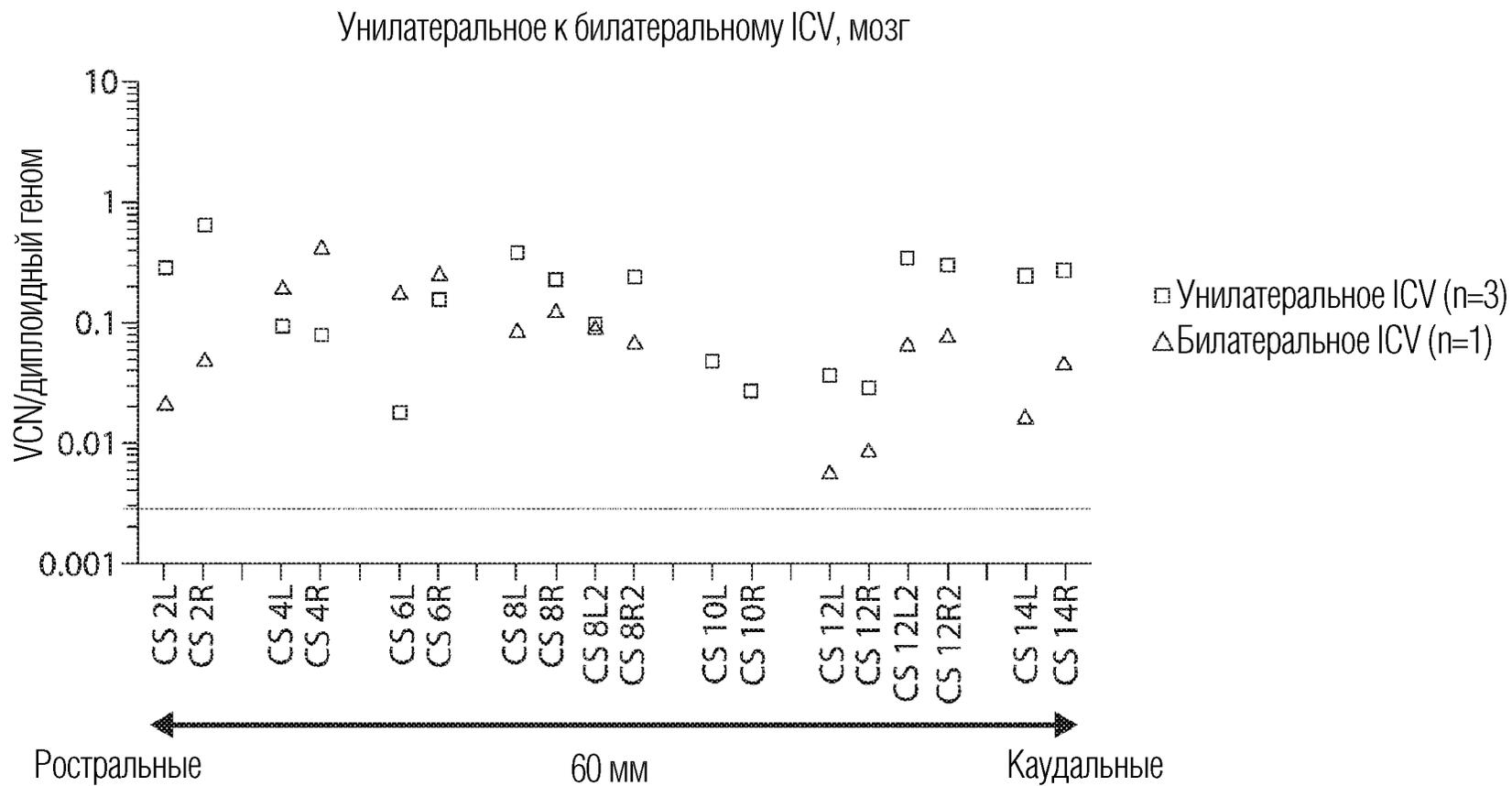


ФИГ. 8

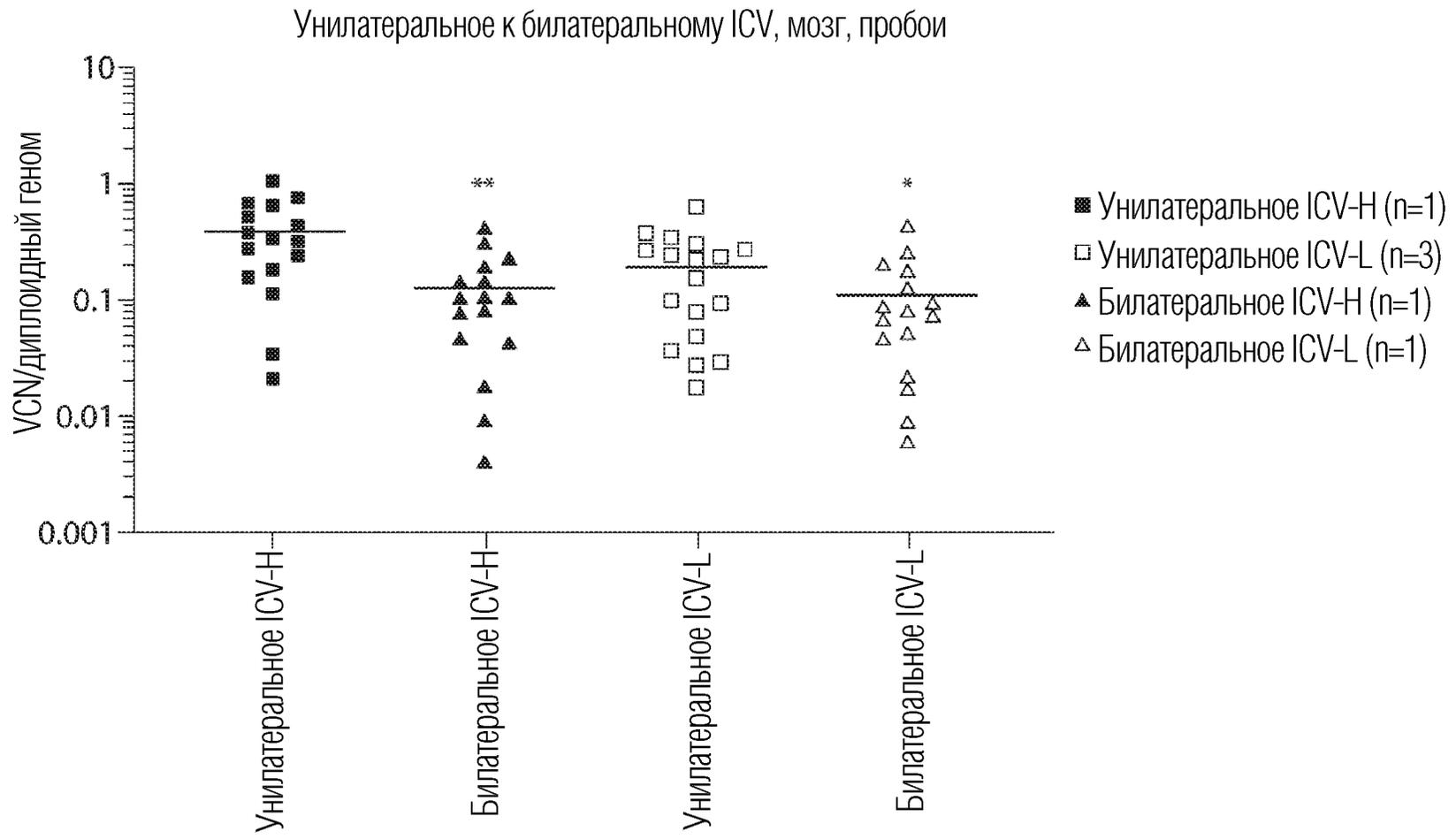




ФИГ. 10

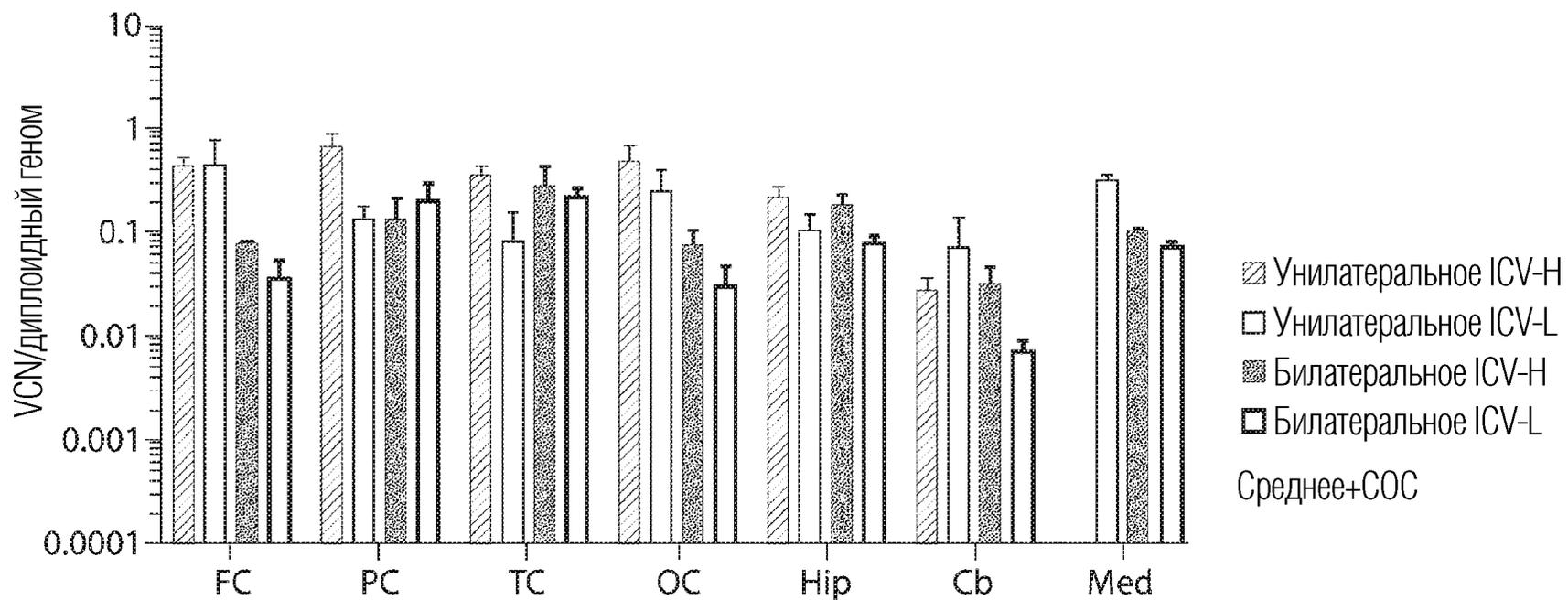


ФИГ. 11



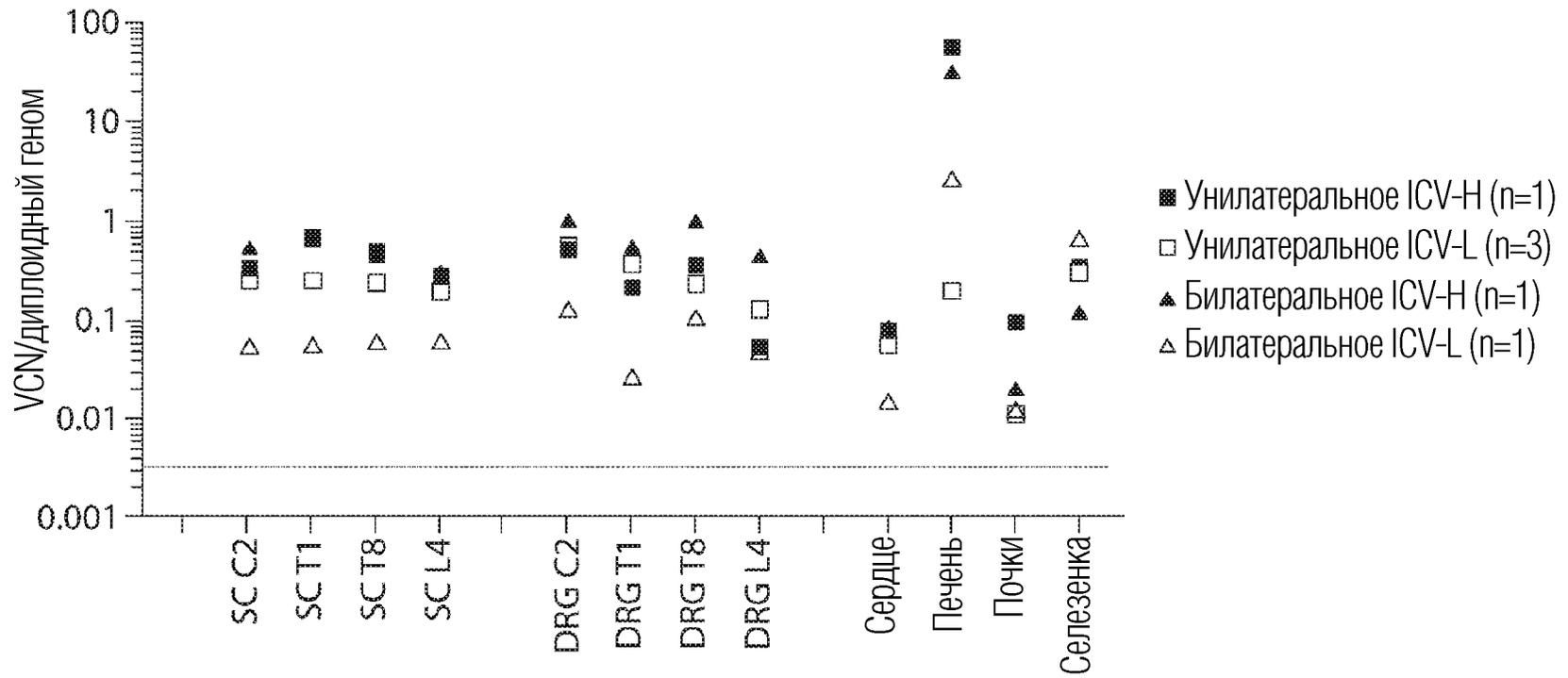
ФИГ. 12

Унилатеральное к билатеральному ICV, области мозга

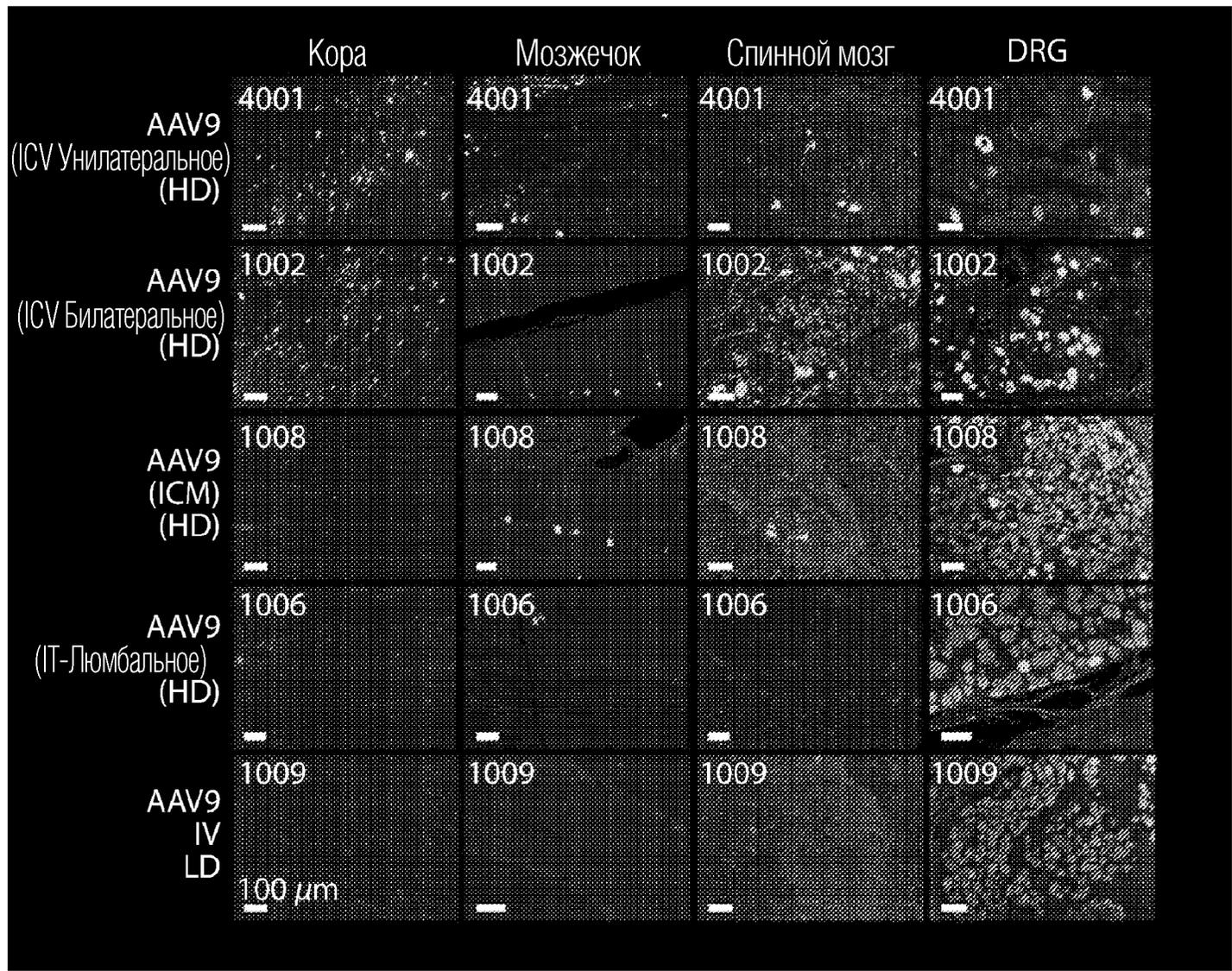


ФИГ. 13

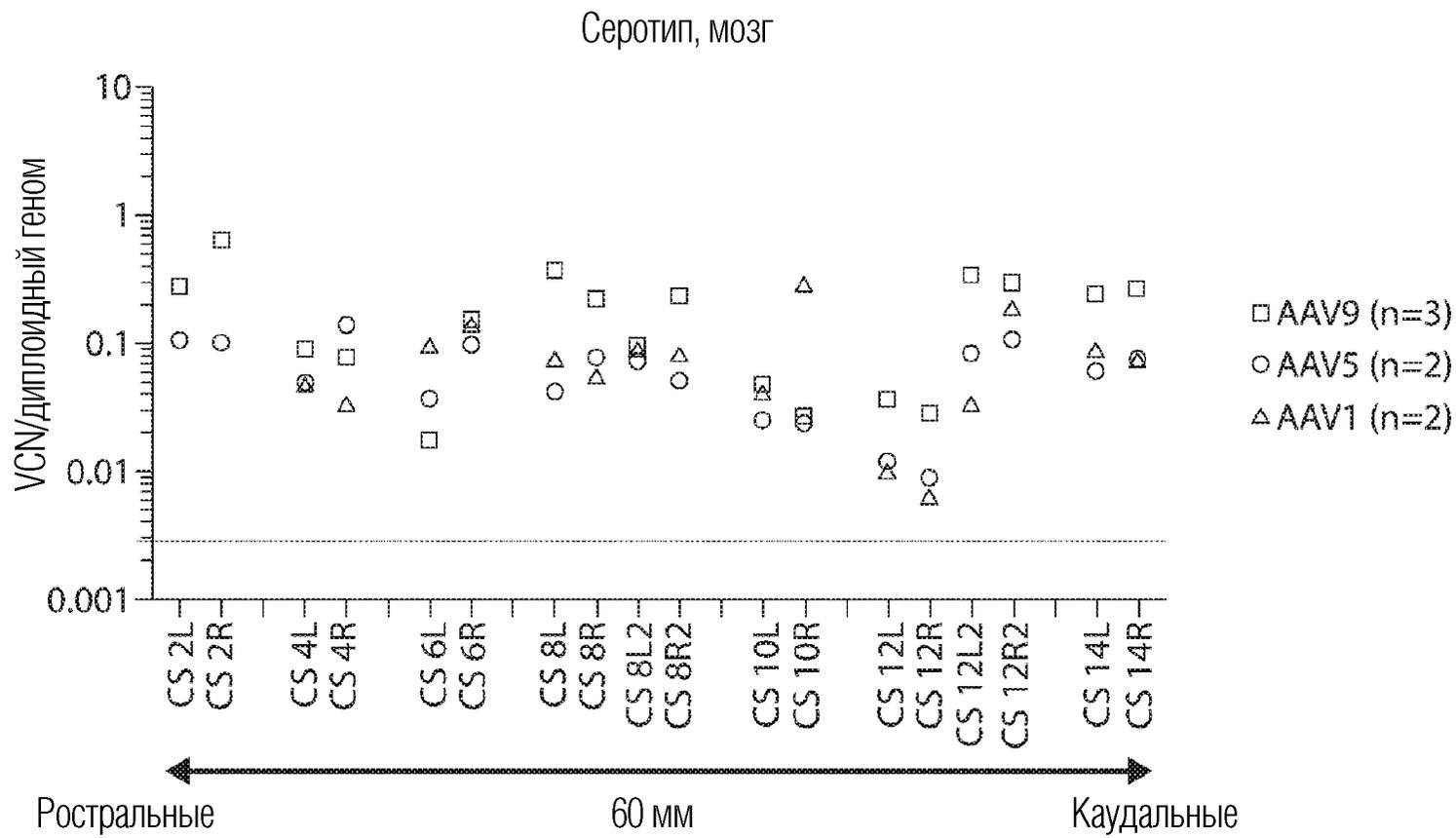
Унилатеральное к билатеральному ICV, спинной мозг, DRG и органы



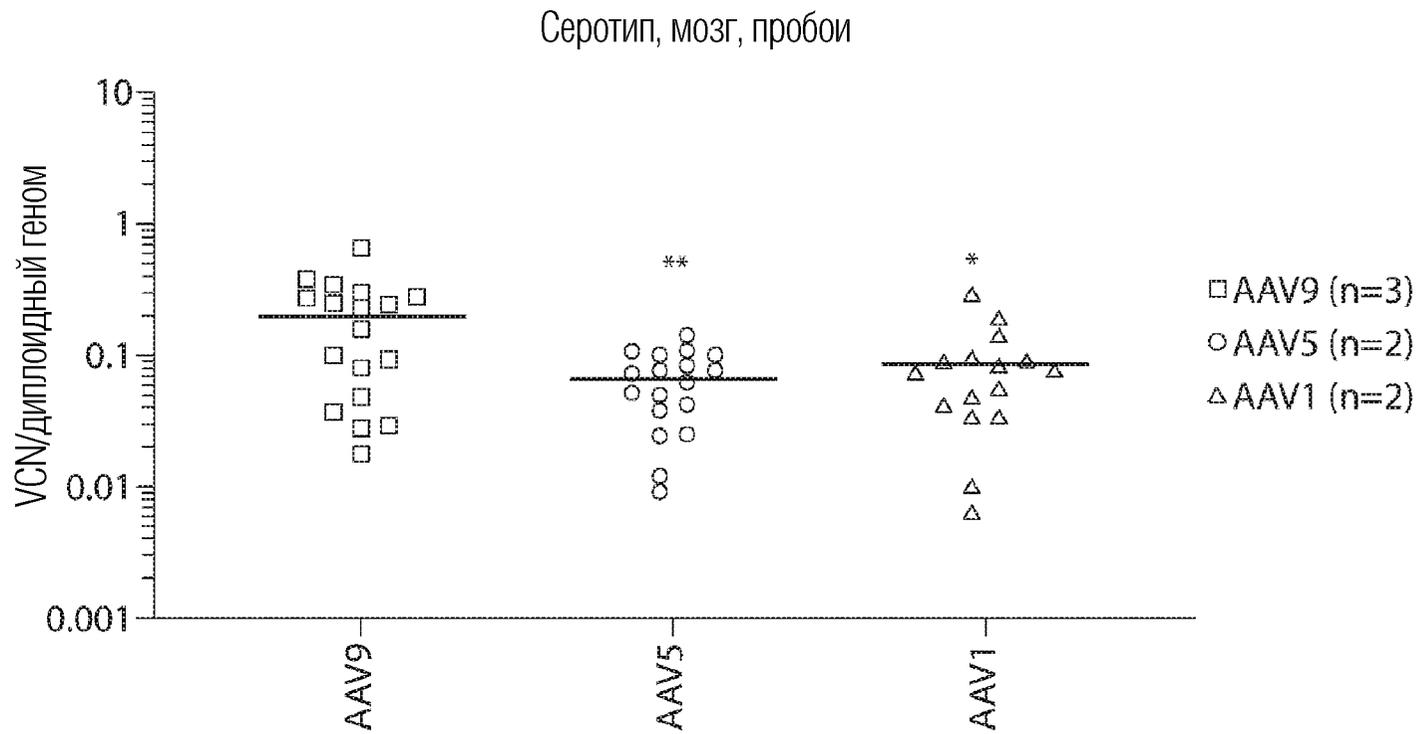
ФИГ. 14

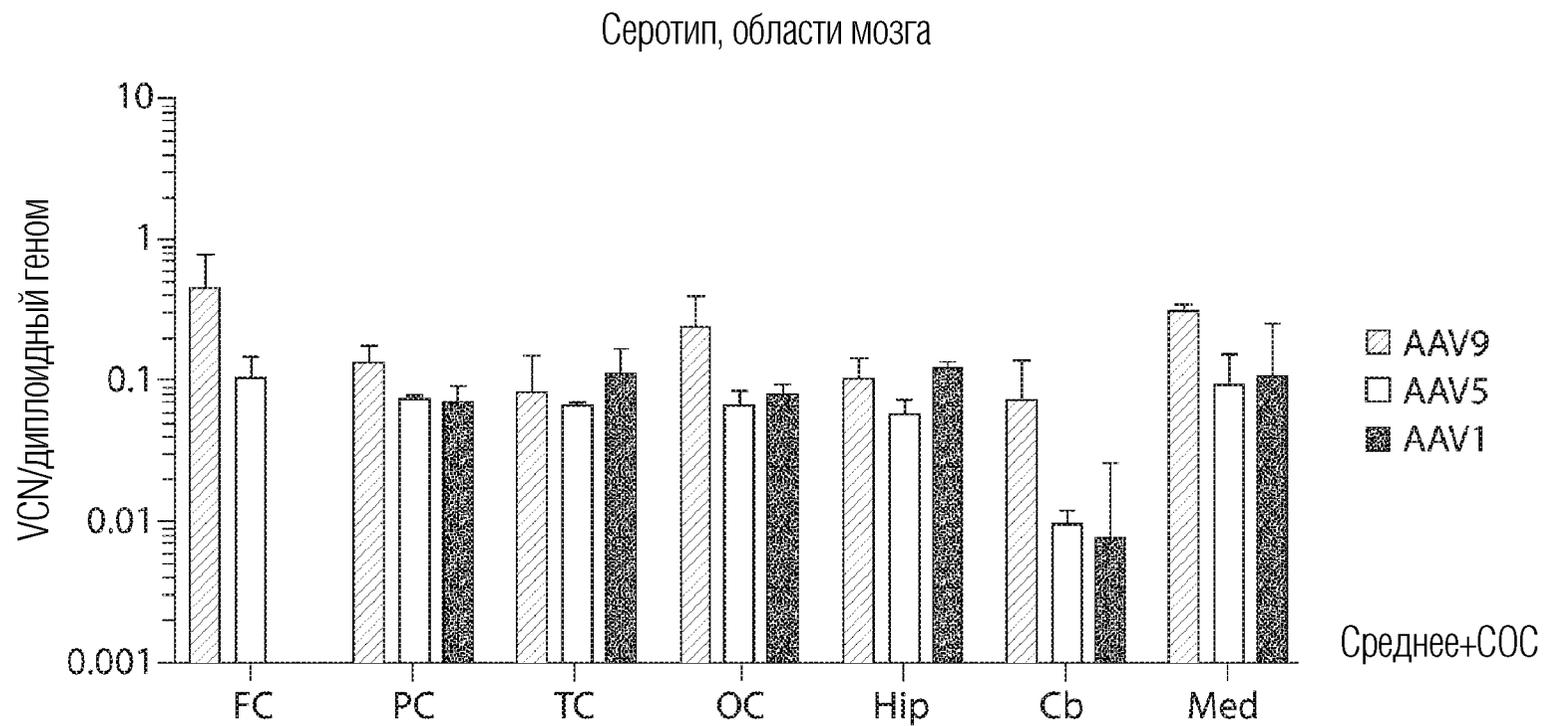


ФИГ. 15

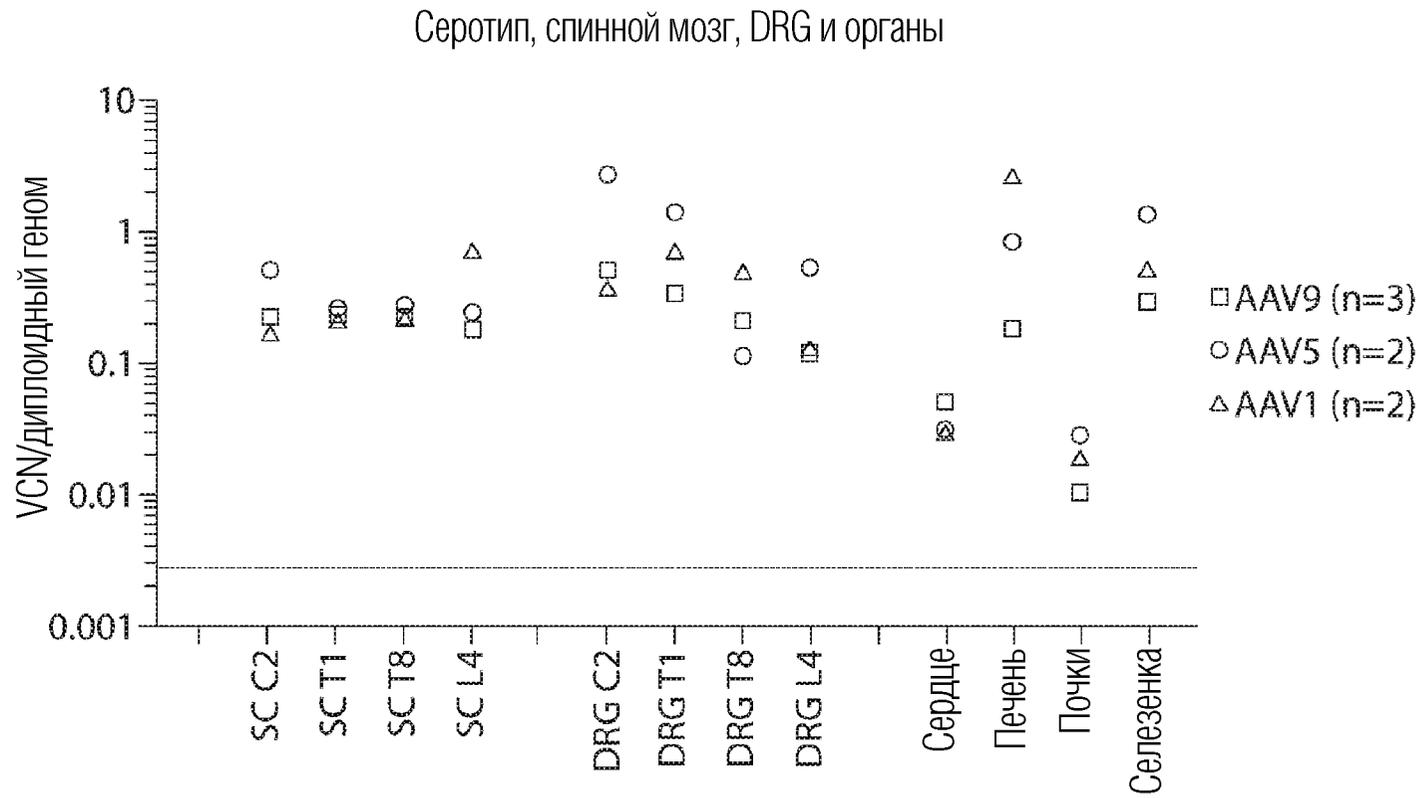


ФИГ. 16

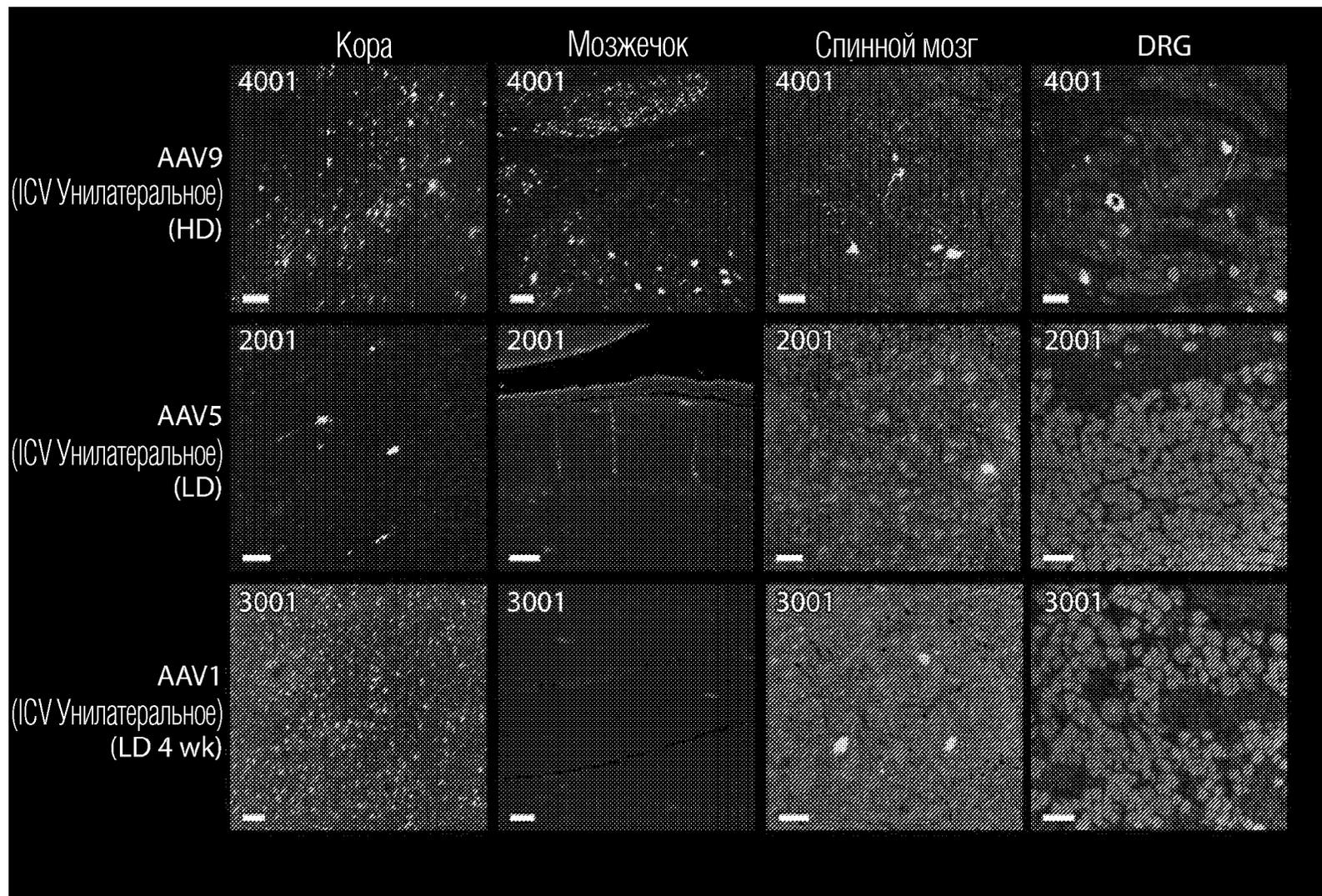




ФИГ. 18

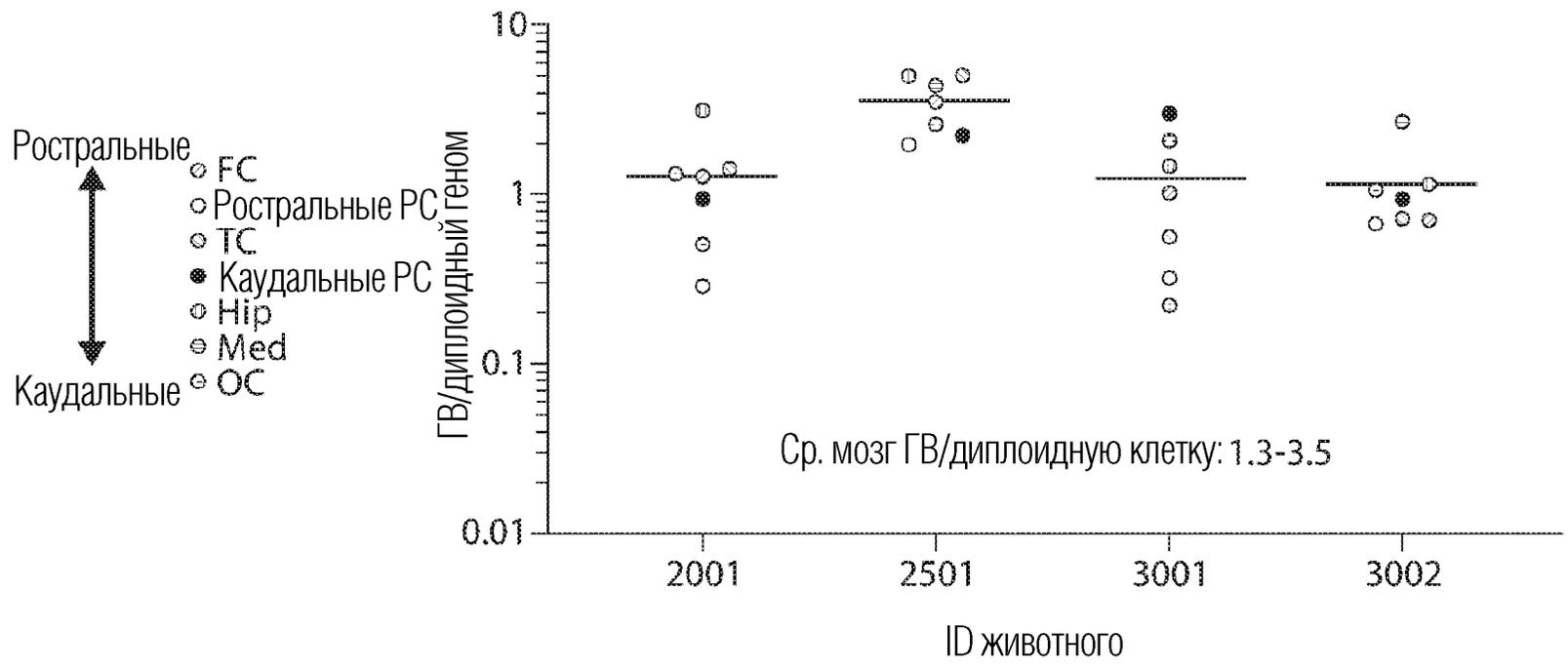


ФИГ. 19

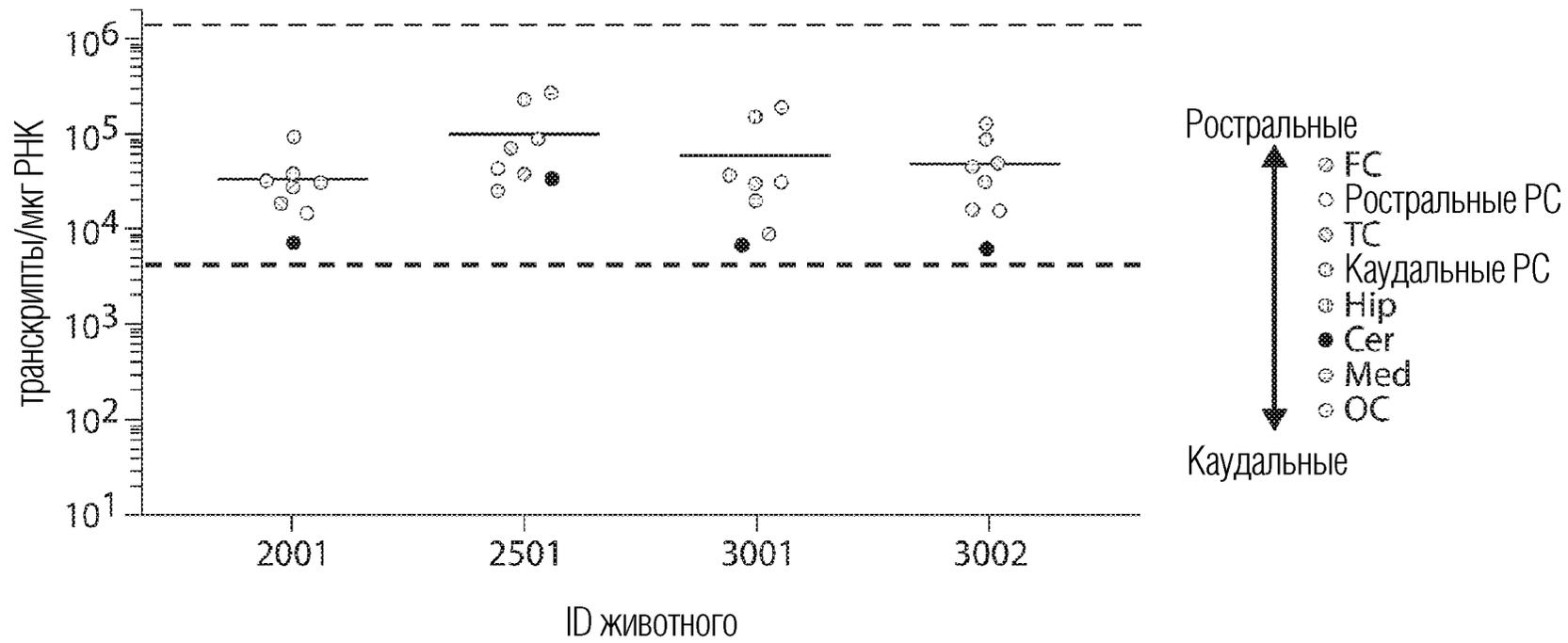


20/23

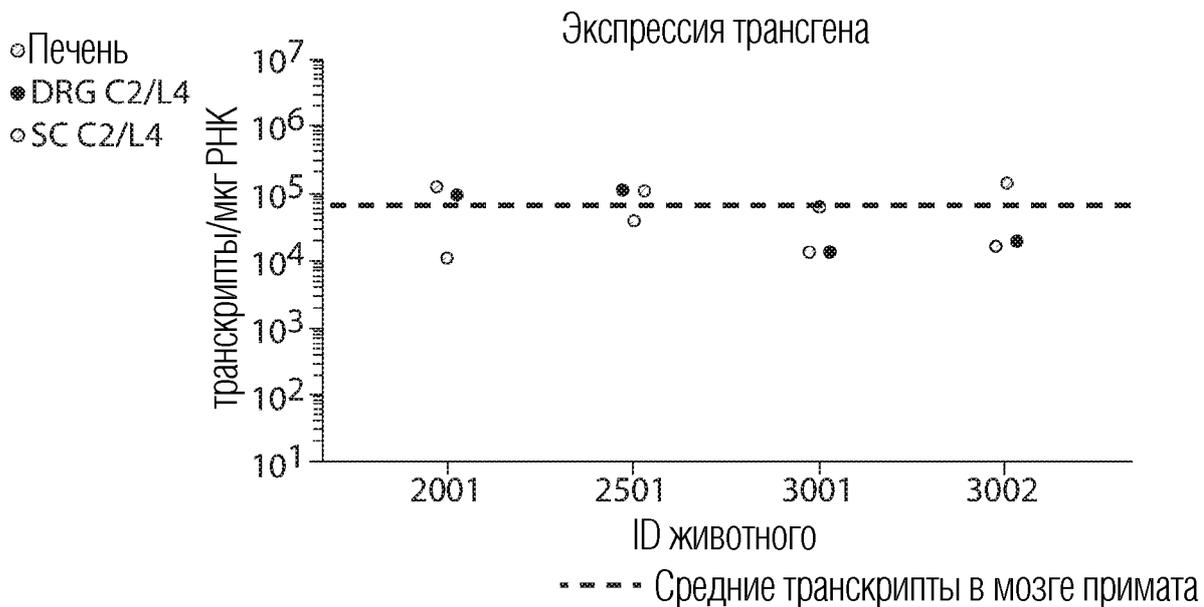
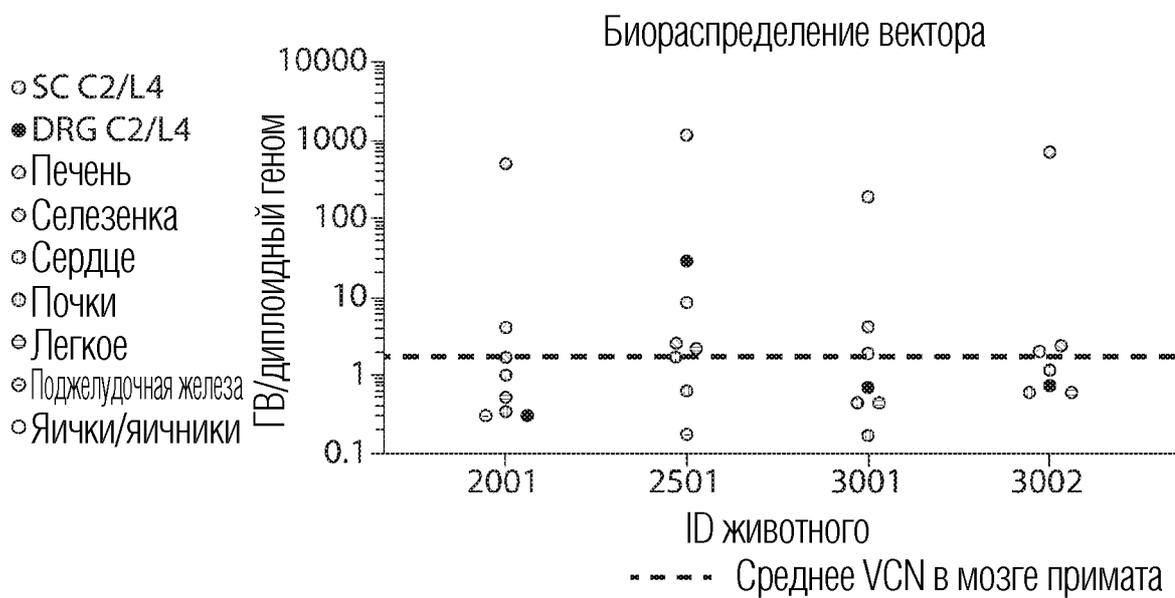
ФИГ. 20



ФИГ. 21



ФИГ. 22



ФИГ. 23