

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202193116 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.04.05

(51) Int. Cl. C12N 15/86 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.05.14

(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ, ОПОСРЕДУЕМЫХ
АТФазой

(31) 62/847,416

(32) 2019.05.14

(33) US

(86) PCT/US2020/032978

(87) WO 2020/232297 2020.11.19

(71) Заявитель:
ДБЮК ЮНИВЕРСИТИ (US)

(72) Изобретатель:

Микати Мохамад, Унанян Арсен,
Кантор Борис, Асокан Аравинд,
Пуранхам Рам, Кёберл Дуайт (US)

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

(57) Настоящее изобретение относится к кластерам для экспрессии нуклеиновых кислот, к векторам, к композициям и к способам лечения заболеваний, опосредуемых АТФазой, у индивидуума.

202193116
A1

202193116

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-571691EA/55

КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ, ОПОСРЕДУЕМЫХ АТФАЗОЙ

Перекрестная ссылка на родственные заявки

[001] В настоящей заявке испрашивается приоритет предварительной заявки на патент США с регистрационным номером 62/847416, поданной 14 мая 2019 г., которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки.

Заявление относительно исследований, спонсируемых Федеральными Органами

[002] Настоящее изобретение было сделано при государственной поддержке в соответствии с грантом № UL1TR002553, предоставленным Национальным Центром Прогрессивных Научных Технологий. Федеральное правительство имеет определенные права на это изобретение.

Описание списка последовательностей, представленного в электронном виде и включенного в настоящее изобретение посредством ссылки

[003] Настоящая заявка содержит список последовательностей, представленный в виде электронного текстового файла под названием «20-489-WO_SequenceListing_ST25.txt», имеющего размер 90 кБ и созданного 14 мая 2020 г. Информация, содержащаяся в этом электронном файле, в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки.

Предпосылки создания изобретения

Область изобретения

[004] Настоящее изобретение относится к кластерам для экспрессии нуклеиновых кислот, к векторам, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую АТФазы, такие как АТФ1А3, и к их композициям, а также к способам генотерапии для лечения заболеваний у индивидуума, опосредуемых АТФазой.

Описание уровня техники

[005] Чередующаяся гемиплегия у детей (АНС) представляет собой опасное нервное расстройство, которое проявляется тяжелыми нарушениями развития, приступами гемиплегии, дистонией, эпилепсией, поведенческими нарушениями, а часто и регрессией. АНС вызывает тяжелые осложнения и часто приводит к летальным исходам, которые по оценкам специалистов составляют 3,2 на 1000 пациентов в год и по меньшей мере 4,5% пациентов в возрасте 29 лет (Panagiotakaki et. al. (2015) Orphanet J Rare Dis. 10: 123). Это заболевание встречается приблизительно у 1 из 1000000 детей. Приблизительно в 80% случаев, это заболевание вызывается мутациями АТР1А3, причем, наиболее распространенной из них является мутация D801N (~ 40% пациентов). АНС является примером заболевания, ассоциированного с АТФазой и вызываемого мутациями АТФазы, и является наиболее распространенным из всех расстройств, вызываемых мутациями АТР1А3. Заболевания, ассоциированные с АТФазой, также включают расстройства со

вторичным дефицитом АТФазы, возникающие в результате развития других заболеваний, таких как нейродегенеративные расстройства, например, болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона.

[006] АТР1А3 является основной субъединицей белка Na/K-АТФазы, который экспрессируется в нейронах, тогда как АТР1А2 экспрессируется в глиальных клетках. АТР1А3 представляет собой фермент, который является фактором передачи сигнала и, что наиболее важно, представляет собой насос, потребляющий 50% энергии головного мозга (Holm et al. (2016) *Biochem Biophys Acta*. 1857(11): 1807-1828). Первичная дисфункция Na/K-АТФазы из-за мутаций АТР1А3 приводит к развитию АНС и других нейрогенетических расстройств. Кроме того, вторичная дисфункция этого насоса, возникающая в результате развития других распространенных нервных расстройств, вносит свой вклад в патофизиологию этих расстройств, включая эпилепсию, инсульт, гипогликемию, острую атаксию, дистонию и гибель нейронов при нейродегенеративных заболеваниях, включая болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона. Мутации, вызывающие АТР1А3-опосредуемое заболевание, включая мутации D801N и I810N, приводят к серьезным нарушениям возбудимости нейронов (Hunanyan et al. (2015) *Epilepsia* 56(1): 82-93; Hunanyan et al. (2018) *Epilepsia* 59(7): 1455-1468; Helseth et al. (2018) *Neurobiol Dis*. 119: 100-112). Несмотря на нормальные уровни экспрессии белка АТР1А3, эти мутации приводят к снижению активности фермента АТФазы в клетках HeLa и в клетках COS (приблизительно до 54% от нормы), а также в головном мозге мышей (приблизительно до 58% от нормы) (Heinzen et al. (2012) *Nat Genet*. 44(9): 1030-1034; Clapcote et al. (2009) *Proc Natl Acad Sci USA*. 106(33): 14085-14090; Kirshenbaum et al. (2013) *PLoS One*. 8(3): e60141).

[007] В настоящее время, единственной доступной терапией АНС является использование блокатора кальциевых каналов, а именно, флунаризина, который вызывает частичное уменьшение приступов гемиплегии, но не оказывает какого-либо воздействия на другие, обычно очень тяжелые симптомы заболевания. Соответственно, существует потребность в разработке новых и эффективных способов лечения заболеваний, опосредуемых АТР1А3, включая АНС. Также существует острая потребность в разработке эффективных способов лечения других заболеваний, возникающих либо в результате вторичного дефицита активности других АТФаз, либо в результате мутаций других АТФаз, таких как мутации АТР1А2, приводящие к развитию тяжелой эпилептической энцефалопатии.

Краткое описание сущности изобретения

[008] Настоящее изобретение, в частности, относится к кластерам для экспрессии нуклеиновых кислот, к векторам, к фармацевтическим композициям, к наборам и к способам лечения заболеваний, опосредуемых АТФазой (например, АНС), у индивидуума.

[009] В одном своем аспекте, настоящее изобретение относится к кластеру для экспрессии нуклеиновой кислоты, содержащему последовательность нуклеиновой

кислоты, кодирующую АТФазу. В некоторых вариантах осуществления изобретения, АТФаза представляет собой АТР1А1, АТР1А2, АТР1А3, АТР2С1, АТР6А1, АТР6V1В1, АТР6V0А4, АТР7А, АТР7В или АТР11С. В некоторых вариантах осуществления изобретения, АТФаза представляет собой АТР1А3.

[0010] В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая АТФазу, включает последовательность, указанную в любой из SEQ ID NO: 01, SEQ ID NO: 02 или SEQ ID NO: 07, или ее фрагмент, изоформу или гомолог, или последовательность, которая по меньшей мере на 50-90% идентична последовательности, представленной в SEQ ID NO: 01, SEQ ID NO: 02 или SEQ ID NO: 07.

[0011] В некоторых вариантах осуществления изобретения, кластер для экспрессии нуклеиновой кислоты дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую АТР1А3, которая была оптимизирована по кодомам для уменьшения числа сайтов метилирования CpG и для ее экспрессии у млекопитающих.

[0012] В некоторых вариантах осуществления изобретения, кластер для экспрессии нуклеиновой кислоты содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую АТР1А3, которая функционально связана с промотором и с последовательностью полиаденилирования. В некоторых вариантах осуществления изобретения, промотор представляет собой тканеспецифический промотор (например, нейрон-специфический промотор или промотор, специфичный для сердца). В некоторых вариантах осуществления изобретения, нейрон-специфический промотор выбран из группы, состоящей из промотора синапсина 1, кальций/кальмодулин-зависимой протеинкиназы II, тубулина альфа 1, нейрон-специфической энолазы и промоторов бета-цепи тромбоцитарного фактора роста.

[0013] В некоторых вариантах осуществления изобретения, промотор представляет собой промотор человеческого синапсина, который может включать проксимальную область промотора синапсона 1 (от -422 до -22). В некоторых вариантах осуществления изобретения, промотор человеческого синапсина содержит последовательность нуклеиновой кислоты, представленную в любой из SEQ ID NO: 04, SEQ ID NO: 05 или SEQ ID NO: 09.

[0014] В некоторых вариантах осуществления изобретения, промотор представляет собой конститутивно активный промотор, такой как человеческий β -актин; человеческий фактор элонгации-1 α ; куриный β -актин, объединенный с ранним энхансером цитомегаловируса; цитомегаловирус (CMV); обезьяний вирус 40 или тимидинкиназа вируса простого герпеса.

[0015] В некоторых вариантах осуществления изобретения, кластер для экспрессии нуклеиновой кислоты содержит сигнал терминации транскрипции, такой как сигнал полиаденилирования бычьего гормона роста (BGHrA), сигнал полиаденилирования обезьяньего вируса 40 (SV40pA) или синтетический сигнал полиаденилирования.

[0016] В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к вектору,

содержащему последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую АТФазу. В некоторых вариантах осуществления изобретения, АТФаза представляет собой АТР1А1, АТР1А2, АТР1А3, АТР2С1, АТР6А1, АТР6V1В1, АТР6V0А4, АТР7А, АТР7В или АТР11С. В других вариантах осуществления изобретения, АТФаза представляет собой АТР1А3.

[0017] В некоторых вариантах осуществления изобретения, вектор представляет собой вирусный вектор или невирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления изобретения, вектор представляет собой рекомбинантный вирусный вектор.

[0018] В некоторых вариантах осуществления изобретения, вирусный вектор выбран из группы, состоящей из аденовирусного вектора, аденоассоциированного вирусного вектора, вектора вируса простого герпеса, ретровирусного вектора, лентивирусного вектора и альфавирусного вектора, флавивирусного вектора, рабдовирусного вектора, вектора вируса кори, вектора вируса ньюкаслской болезни, поксвирусного вектора или пикорнавирусного вектора.

[0019] В некоторых вариантах осуществления изобретения, аденовирусный вектор принадлежит к серотипу AAV, выбранному из группы, состоящей из AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAVrh74, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12 и AAV13. В других вариантах осуществления изобретения, аденовирусный вектор представляет собой вектор серотипа AAV, выбранный из группы, состоящей из AAV1, AAV8 или AAV9. В других вариантах осуществления изобретения, аденовирусный вектор представляет собой AAV9.

[0020] В некоторых вариантах осуществления изобретения, вектор содержит вектор AAV9-hSyn-ATP1A3-p2A-mCherry (pBK828).

[0021] В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая АТФазу, содержится в кластере для экспрессии нуклеиновой кислоты в векторе.

[0022] В некоторых вариантах осуществления изобретения, вектор дополнительно содержит один или более из следующих элементов: (а) последовательность инвертированного концевого повтора (ITR); (b) промотор; (c) терминатор транскрипции; и (d) фланкирующую последовательность инвертированного концевого повтора (ITR).

[0023] В некоторых вариантах осуществления изобретения, вектор содержит тканеспецифический промотор, такой как нейрон-специфический промотор, мышцеспецифический промотор, печень-специфический промотор или кардиоспецифический промотор. В некоторых вариантах осуществления изобретения, вектор содержит промотор, полученный из промотора человеческого синапсина, который может иметь нуклеотидную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 04, SEQ ID NO: 05 или SEQ ID NO: 09.

[0024] В некоторых вариантах осуществления изобретения, вектор содержит конститутивно активный промотор, такой как человеческий β -актин; человеческий фактор элонгации-1 α ; куриный β -актин, объединенный с ранним энхансером цитомегаловируса;

цитомегаловирус (CMV); обезьяний вирус 40; или тимидинкиназа вируса простого герпеса.

[0025] В некоторых вариантах осуществления изобретения, вектор содержит терминатор транскрипции, такой как сигнал полиаденилирования бычьего гормона роста (BGHrA), сигнал полиаденилирования обезьяньего вируса 40 (SV40pA) или синтетический сигнал полиаденилирования.

[0026] В еще одном своем аспекте, настоящее изобретение относится к композиции, содержащей вектор, включающий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую АТФазу.

[0027] В еще одном своем аспекте, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей вектор, включающий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую АТФазу, и фармацевтически приемлемый носитель и/или наполнитель.

[0028] В еще одном своем аспекте, настоящее изобретение относится к способу лечения или профилактики заболевания, опосредуемого АТФазой, у индивидуума, где указанный способ включает введение индивидууму терапевтически эффективного количества описанных здесь кластеров для экспрессии нуклеиновой кислоты, векторов или их композиций в целях лечения или профилактики заболевания, опосредуемого АТФазой, у индивидуума.

[0029] В некоторых вариантах осуществления изобретения, кластеры для экспрессии нуклеиновых кислот, векторы или их композиции вводят способом, выбранным из группы, состоящей из внутримышечной инъекции, системной инъекции, парентеральной инъекции, инфузии или имплантации, интрацеребровентрикулярной инъекции, интрацистеральной инъекции, инъекции вовнутрь гиппокампа и интратекальной инъекции.

[0030] В некоторых вариантах осуществления изобретения, индивидуумом является человек.

[0031] В некоторых вариантах осуществления изобретения, индивидуум имеет мутацию белка АТР1А3, выбранную из группы, состоящей из мутации E815K, мутации D801N, мутации I180N, мутации R756C или мутации V589F.

[0032] В некоторых вариантах осуществления изобретения, заболевание, опосредуемое АТФазой, выбрано из группы, состоящей из быстро развивающейся дистонии-паркинсонизма (RDP), чередующейся детской гемиплегии (АНС), эпилептической энцефалопатии (ЕЕ), мозжечковой атаксии, арефлексии, полрой стопы, синдрома атрофии зрительного нерва и нейросенсорной тугоухости (CAPOS), пароксизмальной слабости и энцефалопатии, вызванной лихорадкой (FIPWE), рецидивирующих приступов мозжечковой атаксии (RECA), шизофрении с ранним развитием, дистонии-дисморфизма лица, энцефалопатии, определенной с помощью МРТ как аномалии без синдрома гемиплегии (D-DEMO), и детской атаксии с быстрым началом развития (CROA). В других вариантах осуществления изобретения, заболевание,

опосредуемое АТФазой, представляет собой АНС.

[0033] В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к применению кластеров для экспрессии нуклеиновых кислот, векторов или их композиций для приготовления лекарственного средства для лечения или профилактики заболевания, опосредуемого АТФазой (например, АНС).

[0034] В еще одном своем аспекте, настоящее изобретение относится к набору для лечения и/или профилактики заболевания, опосредуемого АТФазой, у индивидуума, где указанный набор включает композицию согласно изобретению и инструкции по его применению.

Краткое описание чертежей

[0035] На фиг. 1 схематически представлена репрезентативная выделенная молекула нуклеиновой кислоты, содержащая следующие элементы: 5'-ITR, промотор hSyn, трансген ATP1A3, метку cMyc, метку FLAG, пептид p2A, mCherry, poly-A (pA) и 3'-ITR, которые могут быть использованы в описанных здесь кластерах для экспрессии нуклеиновых кислот, векторах и композициях.

[0036] На фиг. 2 представлена карта конструкции вектора AAV, содержащего pBK828 (AAV9-hSyn-ATP1A3-FLAG-p2a-Cherry-SV40polyA, активного вектора).

[0037] На фиг. 3 представлена карта конструкции вектора AAV, содержащего pBK292 (контрольного вектора).

[0038] На фиг. 4 представлена гистограмма, иллюстрирующая влияние AAV-ATP1A3 на активность АТФазы в гиппокампе взрослых мышей дикого типа (WT), которым инъецировали вирус AAV-ATP1A3-cherry (n=2) в гиппокамп, по сравнению с мышами, которым инъецировали AAV-cherry (n=2) в присутствии и в отсутствии 3 мМ убаина (специфического ингибитора Na/K-АТФазы) в соответствии с одним вариантом осуществления изобретения. AAV вводили в количестве 1 мкл на полушарие, вовнутрь паренхимы, в каждый дорсальный гиппокамп (4×10^{13} ВГ/мл, всего 2 мкл на мышь).

[0039] На фиг. 5 представлен график, иллюстрирующий влияние односторонней интрацеребровентрикулярной (ICV) инъекции активного вектора (AAV9-hSyn-ATP1A3-FLAG-p2a-Cherry-SV40polyA, обозначаемого как AAV9-Tr, в дозе 5 мкл 4×10^{13} ВГ/мл) в боковой желудочек мышей P10 на АТФазную активность, чувствительную к убаину в ипсилатеральной области гиппокампа (нмоль Pi/мг белка/мин.) у мышей P40 дикого типа по сравнению с контрольным вектором, не содержащим трансгена (AAV9-CTL, n=3 в каждой группе).

[0040] На фиг. 6А-6В представлены эпифлуоресцентные изображения, иллюстрирующие трансдукцию AAV9-hSyn-ATP1A3-FLAG-p2a-Cherry-SV40polyA у взрослых Mash1^{+/+}-мышей через 10 дней после инъекции 20×10^{10} ВГ (V=5 мкл 4×10^{13} ВГ/мл) вовнутрь гиппокампай мыши. На фиг. 6А представлено изображение нейронов в пирамидном слое CA1 гиппокампа. На фиг. 6В представлено изображение интернейрона stratum oriens той же мыши.

[0041] На фиг. 7А-7В представлены конфокальные изображения, иллюстрирующие

экспрессию mCherry AAV9-ATP1A3-mCherry-FLAG (4×10^{13} ВГ/мл; V=5 мкл) через 4 недели после ICV-инъекции в правый боковой желудочек мышей P10 в соответствии с одним из вариантов осуществления изобретения. На фиг. 7А показан вентральный гиппокамп CA1. На фиг. 7В показаны клетки Пуркинье мозжечка и глубокое ядро (вставка). Изображения окрашены DAPI (синим). Красный цвет соответствует mCherry. Масштабная шкала=50 мкм. n=3 мыши.

[0042] На фиг. 8 представлен график, иллюстрирующий влияние AAV-ATP1A3-Cherry и AAV-cherry на тестируемые лучи у Mash1^{+/+}-мышей. Одностороннюю инъекцию 20×10^{10} ВГ (объем 5 мкл) активного вектора вводили в гиппокамп 2-3-месячным мышам. Тест проводили через 3 недели после инъекции.

[0043] На фиг. 9А-9F представлены конфокальные изображения, иллюстрирующие векторную трансдукцию, оцененную с помощью метки FLAG, флуоресцирующей в зеленом диапазоне спектра, метки mCherry, флуоресцирующей в красном диапазоне спектра, и метки DAPI (окрашивающей ядро), дающей синюю окраску. Инъекции вводили мышам P10 с умерщвлением на P40. На фиг. 9А представлено изображение, иллюстрирующее векторную трансдукцию области CA3 гиппокампа (односторонняя ICV-инъекция 20×10^{10} ВГ). На фиг. 9В представлено изображение с еще большим увеличением, полученное из области CA3, прямоугольник на фиг. 9А. На фиг. 9С представлено изображение, иллюстрирующее экспрессию в области CA1 гиппокампа после аналогичной инъекции той же ICV-дозы. На фиг. 9D представлено изображение с еще большим увеличением, также полученное из области CA1, после введения такой же ICV-дозы аналогичным образом. На фиг. 9Е представлено изображение, иллюстрирующее окрашивание мозжечка 0,4% трипановым синим через два часа после интрацестеральной инъекции (ICM) и показывающее устойчивое окрашивание мозжечка. На фиг. 9F представлено изображение, иллюстрирующее трансдукцию вектора в мозжечок после ICM-инъекции AAV9-ATP1A3-mcherry (15×10^{10} ВГ). Устойчивый сигнал, указывающий на устойчивую экспрессию, опосредуемую вирусным вектором, наблюдается в клетках Пуркинье мозжечка, но не в более глубоких областях. Масштаб на фиг. 9А, фиг. 9В и фиг. 9С равен 10, на фиг. 9В - 5 мкм, а на фиг. 9Е - 20 мкм.

[0044] На фиг. 10А-10Н проиллюстрирована экспрессия репортерных генов на P40 (конфокальные объединенные изображения во всех областях, FLAG, зеленый; mCherry, красный; DAPI, ядра, окрашенные синим): высокий уровень в гиппокампе (А, В) и в мозжечке рядом с участком ICM-инъекции (Е). Этот уровень экспрессии был ниже в коре головного мозга (С, D) и очень низким, если он вообще наблюдался, в мозжечке, удаленном от участка ICM-инъекции (F), в стволе головного мозга (G) и в таламусе (H) после ICM-инъекции вектора и двусторонней ICM-инъекции в количестве 9×10^{10} для каждой мыши (всего 27×10^{10} ВГ/мышь) на P10. На фиг. 10А представлено изображение, иллюстрирующее экспрессию репортерных генов на P40 в области CA1 гиппокампа. На фиг. 10В представлено изображение, показанное на фиг. 10А, но с еще большим увеличением. На фиг. 10С представлено изображение, иллюстрирующее экспрессию

репортерных генов в коре сенсорно-двигательной области. На фиг. 10D представлено изображение, показанное на фиг. 10C, но с еще большим увеличением. На фиг. 10E представлено изображение, иллюстрирующее экспрессию репортерных генов в мозжечке рядом с участком ICM-инъекции. На фиг. 10F представлено изображение, иллюстрирующее экспрессию репортерных генов в мозжечке на участке, удаленном от участка ICM-инъекции. На фиг. 10G представлено изображение, иллюстрирующее экспрессию репортерных генов в среднем мозге. На фиг. 10H представлено изображение, иллюстрирующее экспрессию репортерных генов в таламусе. Масштаб=100 мкм (A, C), 10 мкм (B, D) и 500 мкм (E-H).

[0045] На фиг. 11 представлен график, иллюстрирующий сравнение гемиплегии, вызванной холодной водой, у нижеследующих групп мышей, получавших ICM- и ICV-инъекции: мышей дикого типа, которым не вводили инъекции («необученных» мышей), мышей дикого типа, которым вводили контрольный вектор (WT CTRL), мышей дикого типа, обработанных активным вектором (обработка WT), *Mash1*^{+/-}-мышей, обработанных контрольным вектором (Het CTRL), и *Mash1*^{+/-}-мышей, обработанных активным вектором (Het-обработка). Мышам вводили ICM-инъекцию и двустороннюю ICV-инъекцию в каждый боковой желудочек на P10 (AAV9-hSyn-ATP1A3-FLAG-P2A-Cherry-SV40polyA, $22,5 \times 10^{10}$ ВГ/животное, или контрольный вектор без трансгена ATP1A3, $7,5 \times 10^{10}$ ВГ в каждом участке). Группы сравнения представляли собой: группы «необученных» мышей WT (n=10), группа WT-CTRL (n=10), группа WT-обработки (n=4), Het-CTRL (n=10), группа Het-обработки (n=9). Данные для этих групп сравнивали с данными, полученными на P40.

[0046] На фиг. 12 представлен график, иллюстрирующий сравнение продолжительности дистонии, индуцированной холодной водой, для *Mash1*^{+/-}-мышей, обработанных контрольным вектором (Het CTRL), и *Mash1*^{+/-}-мышей, обработанных активным вектором посредством ICM- и ICV-инъекции (Het-обработка). Мышам вводили ICM-инъекцию и двустороннюю ICV-инъекцию в каждый боковой желудочек на P10 (AAV9-hSyn-ATP1A3-FLAG-P2A-Cherry-SV40polyA, $22,5 \times 10^{10}$ ВГ/животное, или контрольный вектор без трансгена ATP1A3, $7,5 \times 10^{10}$ ВГ в каждом участке, как описано в [0045]), и данные сравнивали с данными, полученными на P40.

[0047] На фиг. 13 представлен график, иллюстрирующий сравнение продолжительности эпилептических припадков, индуцированных холодной водой, для *Mash1*^{+/-}-мышей, обработанных контрольным вектором (Het CTRL), и *Mash1*^{+/-}-мышей, обработанных активным вектором посредством ICM- и ICV-инъекции (Het-обработка). Мышам вводили ICM-инъекцию и двустороннюю ICV-инъекцию в каждый боковой желудочек на P10, и этих мышей умерщвляли на P40 (AAV9-hSyn-ATP1A3-FLAG-P2A-Cherry-SV40polyA, $22,5 \times 10^{10}$ ВГ/животное, $7,5 \times 10^{10}$ ВГ в каждом участке, как описано в [0045]), и данные сравнивали с данными, полученными на P40.

[0048] На фиг. 14 представлен график, иллюстрирующий сравнение времени равномерного пересечения луча для нижеследующих групп мышей, получавших ICM- и

ICV-инъекции: мышей дикого типа, которым не вводили инъекции («необученных» мышей), мышей дикого типа, которым вводили контрольный вектор (WT CTRL), мышей дикого типа, обработанных активным вектором (обработка WT), Mash1^{+/-}-мышей, обработанных контрольным вектором (Het CTRL), и Mash1^{+/-}-мышей, обработанных активным вектором (Het-обработка). Мышам вводили ICM-инъекцию и двустороннюю ICV-инъекцию в каждый боковой желудочек на P10 (AAV9-hSyn-ATP1A3-FLAG-P2A-Cherry-SV40polyA, $22,5 \times 10^{10}$ ВГ/животное, или контрольный вектор без трансгена ATP1A3, $7,5 \times 10^{10}$ ВГ в каждом участке, как описано в [0045]), и данные сравнивали с данными, полученными на P40.

[0049] На фиг. 15 представлен график, где показана кривая выживаемости Каплана-Мейера, иллюстрирующая сравнение экспериментальных и контрольных групп, демонстрирующих, в основном, положительное влияние на выживаемость мышей, которым инъецировали активный вектор на P10 по указанной выше схеме ICM-инъекции и двусторонней ICV-инъекции активного и контрольного вектора, как описано выше в [0045] ($p=0,009$). Группы включали мышей дикого типа, обработанных контрольным вектором (WT CTRL), мышей дикого типа, обработанных активным вектором (обработка WT), Mash1^{+/-}-мышей, обработанных контрольным вектором (Het CTRL), и Mash1^{+/-}-мышей, обработанных активным вектором (Het-обработка). Мышам вводили ICM-инъекцию и двустороннюю ICV-инъекцию в каждый боковой желудочек на P10 (AAV9-hSyn-ATP1A3-FLAG-P2A-Cherry-SV40polyA, $22,5 \times 10^{10}$ ВГ/животное, или контрольный вектор без трансгена ATP1A3, $7,5 \times 10^{10}$ ВГ в каждом участке, как описано в [0045]), а затем инъекции вводили взрослым животным на P90.

[0050] На фиг. 16 проиллюстрирован Вестерн-блот-анализ для 3 мышей: WT-Tr (в мозжечок), WT-CTL (в мозжечок) и HET-Tr (в гиппокамп). Полоса FLAG соответствует верхней полосе, а β -актин - нижней полосе. Мышам вводили ICM-инъекцию и двустороннюю ICV-инъекцию в каждый боковой желудочек на P10 (AAV9-hSyn-ATP1A3-FLAG-P2A-Cherry-SV40polyA, $22,5 \times 10^{10}$ ВГ/животное, или контрольный вектор без трансгена ATP1A3, $7,5 \times 10^{10}$ ВГ в каждом участке, 9-10 на группу), а затем животных умерщвляли для проведения Вестерн-блот-анализа на P90.

[0051] На фиг. 17 представлен график, иллюстрирующий сравнение результатов денситометрии, проводимой с помощью Вестерн-блот-анализа для экспериментальных и контрольных групп в гиппокампе с комбинированными ICM-инъекциями и двусторонними ICV-инъекциями на P10, и мышей умерщвляли на P90 (AAV9-hSyn-ATP1A3-FLAG-P2A-Cherry-SV40polyA, $22,5 \times 10^{10}$ ВГ/животное, или контрольный вектор без трансгена ATP1A3, $7,5 \times 10^{10}$ ВГ в каждом участке). WT CTRL, n=2 мыши; мыши дикого типа, обработанные активным вектором (обработка WT), n=2 мыши; Mash1^{+/-}-CTRL (Het CTRL), n=2 мыши; Mash1^{+/-}-мыши, обработанные активным вектором (Het-обработка), n=3 мыши.

Подробное описание изобретения

[0052] Для лучшего понимания принципов настоящего изобретения ниже будут

описаны предпочтительные варианты его осуществления, и для их описания будет использоваться конкретная терминология. Тем не менее, следует отметить, что это описание не ограничивает объема изобретения, и предполагается, что в настоящее изобретение могут быть внесены различные изменения и другие модификации, которые будут понятны специалистам в области, к которой относится изобретение.

[0053] Используемые здесь артикли «а» и «an» употребляются здесь для обозначения одного или более, чем одного (то есть, по меньшей мере одного) грамматического объекта описания. Так, например, термин «элемент» означает по меньшей мере один элемент и может включать более, чем один элемент.

[0054] Используемое здесь слово «приблизительно» употребляется для указания на гибкость конечной точки числового диапазона, при условии, что данное значение может быть «немного выше» или «немного ниже» конечной точки, и не будет влиять на желаемый результат. Термин «приблизительно» в сочетании с числовым значением означает, что это числовое значение может отличаться от числового значения на плюс или минус 5% или менее.

[0055] Во всем описании изобретения, если это не оговорено особо, слова «содержать» и «включать» и их варианты (например, «содержит», «содержащий», «включает», «включающий») следует понимать как включение заявленного компонента, признака, элемента, или стадии, или группы компонентов, признаков, элементов или стадий, но не исключение любого другого целого числа, или стадии или группы целых чисел или стадий.

[0056] Используемый здесь термин «и/или» включает и охватывает любые и все возможные комбинации одного или нескольких связанных перечисленных элементов, а также отсутствие комбинаций, которые интерпретируются как альтернативный вариант («или»).

[0057] Используемый здесь переходный термин «состоящий по существу из» (и его грамматические варианты) должен интерпретироваться как охватывающий перечисленные материалы или стадии «и те материалы или стадии, которые существенно не влияют на основные и новые характеристики» заявленного изобретения. Таким образом, используемый здесь термин «состоящий по существу из» не следует интерпретировать как эквивалент термину «содержащий».

[0058] Кроме того, в настоящем изобретении также предполагается, что в некоторых вариантах его осуществления, любой признак или комбинация признаков, изложенных в настоящей заявке, могут быть исключены или опущены. То есть, это означает, что если в описании указано, что комплекс включает компоненты А, В и С, то конкретно подразумевается, что любой из А, В или С, или их комбинация, могут быть опущен и исключены отдельно или в любой их комбинации.

[0059] Перечисление интервалов значений приводится здесь просто как сокращенный метод индивидуальной ссылки на каждое отдельное значение, входящее в этот интервал, если это не оговорено особо, и каждое отдельное значение включено в

настоящее описание так, как если бы оно было отдельно указано в настоящей заявке. Так, например, если интервал концентраций указан как 1% - 50%, то предполагается, что такие значения, как 2% - 40%, 10% - 30% или 1% - 3% и т.п., будут входить в объем настоящего изобретения. Эти значения приводятся здесь лишь в качестве примеров, при этом, следует отметить, что в настоящем изобретении могут быть использованы все возможные комбинации числовых значений между перечисленным наименьшим значением и наибольшим значением включительно.

[0060] Если это не оговорено особо, то все используемые здесь технические термины имеют свое общепринятое значение, известное специалистам в области, к которой относится изобретение.

[0061] Генотерапия заболеваний, опосредуемых АТФазой

[0062] Авторами настоящего изобретения была разработана мышинная модель «нокина» с мутацией D801N (называемой здесь Mashl^{ool}, Mashl или Mashl^{+/-}), которая точно воспроизводит состояние человека, включая реакцию на флунаризин, аналогичную реакции, наблюдаемой у человека. В пользу применения генотерапии для лечения генетического заболевания, опосредуемого АТР1А3, свидетельствует тот факт, что у мышей-моделей, несущих, хотя и отличающуюся, мутацию I810N АТР1А3, отклонения в поведении были устранены путем инъекции бактериальной искусственной хромосомы (ВАС), содержащей ген АТР1А3 дикого типа, в пронуклеусы оплодотворенных ооцитов. Это улучшение поведения было связано с 16% увеличением активности Na⁺,K⁺-АТФазы, специфичной для головного мозга. Альтернативным подходом является применение генотерапии. Этот подход оказался перспективным методом терапии редких и тяжелых нейрогенетических расстройств у мышей-моделей и у человека. Генотерапия, которая может оказаться эффективной для лечения АНС, может иметь последствия при терапии других нервных расстройств, ассоциированных со вторичным дефицитом АТФазы, таких как болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона, поскольку при этих расстройствах, дисфункция АТР1А3, как было показано, ответственна за гибель и дегенерацию нейронов. Это было проиллюстрировано на приведенной выше модели I810N (Clapcote et al. (2006). Proc Natl Acad Sci USA, 106 (33):14085-14090), а также на модели D801N (240 ± 19 у мышей дикого типа и 134 ± 25 нмоль Pi/мин./мг белка у мышей Mashl, n=3 в каждой группе, p=0,002), где мутации АТР1А3 приводят приблизительно к 40% снижению активности АТФазы. Эти мутации также вызывают аномальное возбуждение гиппокампа и поведенческие расстройства у мутантных мышей (Clapcote et al. (2006) Proc Natl Acad Sci USA, 106 (33): 14085-14090; Hunanyan et al. (2015) Epilepsia 56 (1): 82- 93; Hunanyan et al. (2018) Epilepsia 59 (7): 1455-1468; Masoud et al. (2017) Curr Treat Options Neurol.19 (2): 8; Heinzen et al. (2012) Nat Genet. 44 (9): 1030-1034; Helseth et. Al. (2018) Neurobiol Dis. 119: 100-112; Holm et al. (2016) Biochim Biophys Acta. 1857 (11): 1807-1828; Ikeda et al. (2017) Brain Res. 1666: 27-37).

[0063] Гиппокамп является одной из областей головного мозга, имеющих отношение к фенотипу АНС, поскольку у человека (а также у мышей) с мутациями α-

субъединицы возникают эпилептические припадки, связанные с височной долей, и наблюдается ослабление памяти. Другой областью, имеющей отношение к фенотипу АНС, является кора головного мозга. У человека и у мышей с мутациями АНС также наблюдаются эпилептические припадки, возникающие в неокортикальной области, нарушения поведения и нарушения когнитивных функций. Кроме того, поражаются базальные ганглии, мозжечок и таламус из-за дистонии, нарушений контроля движений и атаксии. Областью, представляющей особый интерес, является мозжечок. Это связано с тем, что пациенты с АНС постоянно страдают атаксией, часто имеют гипометаболизм мозжечка при ПЭТ-сканировании и атрофию мозжечка, на что указывает MPT, а также потому, что мозжечок участвует в развитии дистонии (Severino et al. (2020) J. Neurol. 2020 May; 267 (5): 1300-1311; Ghusayni et al. (2020) European J. Ped. Neurol; Feb 13: S1090-3798(20)30032-5; Isaksen et al. (2017) PLoS Genet. 13(5):e1006763). Результаты, описанные здесь в разделе «Примеры», подтверждают терапевтический эффект генотерапии у мышинной модели D801N, аналогичный эффекту, наблюдаемому при исследовании других нейрогенетических расстройств. Описанные здесь результаты являются первой иллюстрацией эффективной генотерапии при любом дефиците АТФазы, и такая генотерапия нацелена на фермент, «насос» и фактор передачи сигнала.

[0064] Используемый здесь термин «заболевание, опосредованное АТФазой» относится к заболеваниям и/или расстройствам, которые характеризуются мутациями в гене, кодирующем АТФазу. Термин «АТФаза» относится к классу ферментов, которые катализируют гидролиз фосфатных связей в аденозинтрифосфате (АТФ) с образованием аденозиндифосфата (АДФ) или обратную реакцию.

[0065] Используемый здесь термин «заболевание, опосредуемое АТР1А3» относится к заболеваниям и/или расстройствам, которые характеризуются мутациями в гене АТР1А3 или дисфункцией белкового насоса АТР1А3.

[0066] Используемый здесь термин «АТР1А3» относится к гену субъединицы альфа-3, переносящей Na^+/K^+ -АТФазу [Homo Sapiens (человека)], где белок, кодируемый этим геном, принадлежит к семейству АТФаз, переносящих катион Р-типа, и к подсемейству Na^+/K^+ -АТФаз. Na^+/K^+ -АТФаза представляет собой интегральный мембранный белок, ответственный за создание и поддержание электрохимических градиентов ионов Na^+ и K^+ в плазматической мембране. В настоящем изобретении описаны полинуклеотиды АТР1А3, которые функционируют вместе или в комбинации с дополнительной(ыми) последовательностью(ями) нуклеиновой кислоты для кодирования белка АТР1А3.

[0067] Используемый здесь термин «полинуклеотид АТР1А3» представляет собой любой полимер нуклеиновой кислоты, который кодирует белок АТР1А3 и, если он присутствует в векторе, в плазмиде или в транслируемой конструкции, экспрессирует такой белок АТР1А3 в клетке, в ткани, в органе или в организме. Полинуклеотиды АТР1А3 включают молекулы-предшественники, которые экспрессируются внутри клетки. Полинуклеотиды АТР1А3 или их процессированные формы могут содержаться в

плазмиде, в векторе, в геноме или в другом векторе для экспрессии нуклеиновых кислот для доставки в клетку. В некоторых вариантах осуществления изобретения, полинуклеотиды АТР1А3 сконструированы как компоненты вирусных геномов AAV и упакованы в вирусные частицы AAV, которые процессируются внутри клетки для экспрессии белка АТР1А3 дикого типа.

[0068] Используемый здесь термин «белок АТР1А3 дикого типа» может означать белок АТР1А3, имеющий UniProtKB No. P13637, или любую из встречающихся в природе изоформ или вариантов, кодируемых геном АТР1А3, включая любые множественные альтернативно сплайсированные варианты транскриптов, которые кодируют варианты транскриптов, кодирующих различные изоформы АТР1А3. Белок АТР1А3 дикого типа может также включать последовательность белка АТР1А3, которая по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85% или 90% идентична природной последовательности белка АТР1А3, которая сохраняет такую же функцию, как и природный белок АТР1А3 или аналогичную функцию.

[0069] Мутации в гене АТР1А3 относятся к изменению полинуклеотидной последовательности АТР1А3 по сравнению с полинуклеотидной последовательностью АТР1А3 дикого типа, что приводит к экспрессии мутантного белка АТР1А3.

[0070] Используемый здесь термин «мутантный белок АТР1А3» относится к белку АТР1А3, имеющему аминокислотную последовательность, в которой по меньшей мере один аминокислотный остаток в белке АТР1А3 дикого типа был утрачен, заменен или добавлен. Примерами мутантов белка АТР1А3, которые могут быть ассоциированы с заболеванием, опосредуемым АТР1А3, являются, но не ограничиваются ими, следующие мутации: E815K, D801N, G947R, I180N, R756C, V589F, E818K, T613M, E277K, D923N, R756H, V589F, F913del, S137F, S137Y, Q140L, D220N, I274N, I274T, V322D, C333F, T335P, G358C, G358V, I363N, T370N, L371P, S684F, G706R, G755A, G755C, G755S, L757P, I758S, T771I, T771N, S772R, N773I, N773S, F780L, D801E, D801Y, L802P, T804I, D805E, D805H, M806K, 806R, P808L, I810F, I810N, I810S, S811P, L839P, G867D, D923N, C927F, C927Y, A955D и D992Y и белковые мутанты АТР1А3, вызывающие любые другие заболевания. В некоторых вариантах осуществления изобретения, белковый мутант АТР1А3 содержит мутацию D801N.

[0071] Мутации в гене АТР1А3 могут вызывать множество нервных заболеваний, двигательных нарушений и эпилепсий. Примерами АТР1А3-опосредуемых заболеваний являются, но не ограничиваются ими, быстро развивающаяся дистония-паркинсонизм (RDP), чередующаяся детская гемиплегия (АНС), эпилептическая энцефалопатия (ЕЕ), мозжечковая атаксия, арефлексия, полая стопа, синдром атрофии зрительного нерва и нейросенсорной тугоухости (CAPOS), пароксизмальная слабость и энцефалопатия, вызванные лихорадкой (FIPWE, также называемая RECA или рецидивирующей энцефалопатией с мозжечковой атаксией), рецидивирующие приступы мозжечковой атаксии (RECA), шизофрения с ранним развитием, дистония-дисморфизм лица, энцефалопатии, определенные с помощью МРТ как аномалии без синдрома гемиплегии

(D-DEMO), и детская атаксия с быстрым началом развития (CROA). В некоторых вариантах осуществления изобретения, этот термин может включать и другие заболевания, которые, вероятно, будут описаны в будущем как заболевания, вызванные другими мутациями АТР1А3 или вызванные аномалиями в структуре или функции белка АТР1А3. В некоторых вариантах осуществления изобретения, АТР1А3-опосредуемое заболевание включает чередующуюся гемиплегию у детей (АНС), эпилепсию, инсульт, гипогликемию, острую атаксию, дистонию и гибель нейронов при нейродегенеративных заболеваниях, включая болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона. В некоторых вариантах осуществления изобретения, использование вектора, содержащего трансген АТР1А3 (например, AAV9-специфический промотор-АТР1А3-FLAG-p2a-Cherry-SV40polyA) или родственной конструкции, может включать терапию расстройств, возникающих в результате мутаций других АТФаз, которая может оказаться благоприятной после введения вектора АТР1А3, нацеленного на конкретную ткань при этом заболевании. Примером такого заболевания могут быть заболевания почек, вызванные снижением функции V-АТФазы из-за мутаций в генах АТФазы АТР6V1B1 или АТР6V0A4.

[0072] В некоторых вариантах осуществления изобретения, кластеры для экспрессии нуклеиновых кислот, векторы или родственные конструкции согласно изобретению могут быть использованы для лечения заболеваний, опосредуемых АТФазой, и возникающих в результате мутаций других генов АТФазы, приводящих к дефициту других АТФаз. В таких случаях, трансген может представлять собой АТФазу, вызывающую это заболевание, а промотором может быть промотор, способный инициировать экспрессию гена *АТФазы* в соответствующей системе органа или в клетке. Примерами заболеваний, опосредуемых АТФазой, являются иммунодефицитные расстройства, вызванные мутациями АТР6А1 и заболевания печени, вызванные мутациями АТР7А или АТР7В. Другим примером являются расстройства центральной нервной системы, такие как гемиплегическая мигрень или эпилептическая энцефалопатия, которые возникают в результате мутаций АТР1А2, или периферическая невропатия и синдром гипомagneмии/умственной отсталости, вызываемые мутациями АТР1А1. Другие примеры включают мутацию в генах *АТФазы*, которые вызывают мышечные заболевания, таких как гены *миозина* и АТР2А1 или мутации, вызывающие гематологические заболевания, такие как мутации АТР11С и мутации АТР2С1, которые вызывают кожные болезни.

[0073] В некоторых вариантах осуществления изобретения, кластеры для экспрессии нуклеиновых кислот, активные векторы или родственные конструкции могут быть применены для лечения расстройств, возникающих в результате других патологических состояний, приводящих к появлению симптомов, вызванных дисфункцией любой АТФазы. В таких случаях, трансген может представлять собой АТФазу, вызывающую это заболевание, а промотором может быть промотор, способный инициировать экспрессию гена *АТФазы* в соответствующей системе органа или в клетке.

Примерами таких заболеваний могут быть мутации гена VMA21, приводящие к неправильной сборке вторичной V-АТФазы и дисфункции V-АТФазы, как это наблюдается при врожденном нарушении гликозилирования с аутофагическим заболеванием печени, и мутации гена WDR72, которые приводят к аномальному транспорту V-АТФазы почки и к повторному развитию болезни почек. Другой пример включает воспалительное заболевание кишечника со вторичной аномальной функцией АТФазы из-за хронического воспаления слизистой оболочки, приводящего к желудочно-кишечным симптомам.

[0074] **Кластеры для экспрессии нуклеиновых кислот**

[0075] Настоящее изобретение, в частности, относится к кластеру для экспрессии нуклеиновой кислоты, содержащему последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую АТФазу (например, АТР1А3), или состоящему или по существу состоящему из этой последовательности.

[0076] Используемый здесь термин «кластер для экспрессии нуклеиновой кислоты» относится к выделенной молекуле нуклеиновой кислоты, которая включает один или более элементов регуляции транскрипции (например, промоторы, энхансеры и/или регуляторные элементы, последовательности полиаденилирования и интроны), которые направляют экспрессию гена в клетках, тканях или в органах одного или более желаемых типов. Кластер для экспрессии нуклеиновой кислоты может содержать трансген, хотя также предполагается, что кластер для экспрессии нуклеиновой кислоты направляет экспрессию эндогенного гена в клетке, в которую встроена последовательность нуклеиновой кислоты.

[0077] Используемый здесь термин «трансген» относится к экзогенным последовательностям нуклеиновых кислот, кодирующим полипептид, который должен экспрессироваться в клетке, в которую вводят трансген. Трансген может включать гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, не встречающуюся в природе в клетке, в которую он был введен; последовательность нуклеиновой кислоты, которая является мутантной формой последовательности нуклеиновой кислоты, присутствующей в природе в клетке, в которую он был введен; или последовательность нуклеиновой кислоты, которая является такой же, как встречающаяся в природе нуклеиновая кислота в клетке, в которую он был введен. Трансген может включать гены того же самого организма, в который он введен, или другого организма.

[0078] Трансген согласно изобретению может включать, но не ограничивается ими, АТР1А1, АТР1А2, АТР1А3, АТР1А4, АТР1В1, АТР1В2, АТР1В3, АТР1В4, АТР2А1, АТР2А2, АТР2А3, АТР2В1, АТР2В2, АТР2В3, АТР2В4, АТР2С1, АТР2С2, АТР3, АТР4, АТР5А1, АТР5В, АТР5С1, АТР5С2, АТР5D, АТР5Е, АТР5F1, АТР5G1, АТР5G2, АТР5G3, АТР5Н, АТР5I, АТР5J, АТР5J2, АТР5L, АТР5L2, АТР5O, АТР5S, АТР6А1, АТР6АP1, АТР6АP2, АТР6V1A, АТР6V1B1, АТР6V1B2, АТР6V1C1, АТР6V1C2, АТР6V1D, АТР6V1E1, АТР6V1E2, АТР6V1F, АТР6V1G1, АТР6V1G2, АТР6V1G3, АТР6V1H, АТР6V0A1, АТР6V0A2, АТР6V0A4, АТР6V0B, АТР6V0C, АТР6V0D1, АТР6V0D2, АТР6V0E, АТР11C, АТР7A,

АТР7В, АТР8А1, АТР8В1, АТР8В2, АТР8В3, АТР8В4, АТР9А, АТР9В, АТР10А, АТР10В, АТР10Д, АТР11А, АТР11В, АТР11С, АТР12А, АТР13А1, АТР13А2, АТР13А3, АТР13А4, АТР13А5, VMA21, V-АТРase или WDR72 или любой ген, кодирующий АТФазу. В некоторых вариантах осуществления изобретения, трансген представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую АТР1А3.

[0079] Термины «последовательность нуклеиновой кислоты», «молекула нуклеиновой кислоты», «полинуклеотид» и «олигонуклеотид» являются синонимами и относятся к полимерной форме нуклеотидов, которые могут иметь различную длину, либо дезоксирибонуклеотидов, либо рибонуклеотидов, либо их аналогов. Молекулы нуклеиновой кислоты могут представлять собой фрагменты дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) или рибонуклеиновой кислоты (РНК), продуцируемые, например, с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) или трансляции *in vitro*, и фрагменты, продуцируемые в результате одной или более из следующих функций: лигирования, расщепления, действия эндонуклеазы или действия экзонуклеазы. Молекулы нуклеиновых кислот могут состоять из мономеров, которые представляют собой встречающиеся в природе нуклеотиды (такие как дезоксирибонуклеотиды и рибонуклеотиды), аналоги встречающихся в природе нуклеотидов (например, α -энантиомерные формы встречающихся в природе нуклеотидов) или их комбинации. Модифицированные нуклеотиды могут иметь модификации или замены сахарных групп или фрагментов пиримидиновых или пуриновых оснований. Мономеры нуклеиновых кислот могут быть связаны фосфодиэфирными связями или аналогами таких связей. Аналоги фосфодиэфирных связей включают фосфортиоат, фосфордитиоат, фосфорселеноат, фосфордиселеноат, фосфоранилотиоат, фосфоранилидат, фосфорамидат, морфолино или т.п. Молекулы нуклеиновой кислоты могут быть одноцепочечными или двухцепочечными (например, оцДНК, дцДНК, оцРНК или дцРНК).

[0080] Термин «нуклеотид» относится к последовательностям с обычными нуклеотидными основаниями, сахарными остатками и межнуклеотидными фосфатными связями, а также к последовательностям, которые содержат модификации любого или всех этих фрагментов. Используемый здесь термин «нуклеотид» включает фрагменты, которые содержат не только природные пуриновые и пиримидиновые основания, такие, как аденин (А), гуанин (G), тимин (Т), цитозин (С) и урацил (U), но также их модифицированные или аналогичные формы. Полинуклеотиды включают последовательности РНК и ДНК из более, чем одного нуклеотида в одной цепи. Используемый здесь термин «модифицированная РНК» или «модифицированная ДНК» означает молекулу нуклеиновой кислоты, в которой один или более компонентов нуклеиновой кислоты, а именно сахара, основания и фосфатные фрагменты, отличаются от фрагментов, которые встречаются в природе.

[0081] Используемый здесь термин «выделенная» молекула нуклеиновой кислоты (например, выделенная ДНК, выделенная кДНК или выделенный векторный геном) означает молекулу нуклеиновой кислоты, отделенную или, по существу, не содержащую

по меньшей мере некоторых других компонентов встречающегося в природе организма или вируса, например, клеточных или вирусных структурных компонентов или других полипептидов или нуклеиновых кислот, обычно связанных с нуклеиновой кислотой.

[0082] Аналогичным образом, термин «выделенный» полипептид означает полипептид, который отделен или, по существу, не содержит по меньшей мере некоторых других компонентов встречающегося в природе организма или вируса, например, клеточных или вирусных структурных компонентов или других полипептидов или нуклеиновых кислот, обычно связанных с этим полипептидом.

[0083] В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая ATP1A3, имеется на сайте ensemble.org (HGNC ID: HGNC: 801, кодирующая белок ATP1A3, соответствующий идентификатору UniProtKB P13637), как указано в SEQ ID NO: 01, и любые ее фрагменты, изоформы, и/или гомологи. В другом варианте осуществления изобретения, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая ATP1A3, включает последовательность нуклеиновой кислоты кДНК, представленную в SEQ ID NO: 02, и любые ее фрагменты, изоформы или гомологи. В другом варианте осуществления изобретения, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая ATP1A3, включает последовательность нуклеиновой кислоты, представленную в SEQ ID NO: 07, и любые ее фрагменты, изоформы или гомологи.

[0084] В других вариантах осуществления изобретения, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая ATP1A3, может представлять собой любую из последовательностей нуклеиновой кислоты, имеющих в GenBank со следующими номерами доступа: BC009282.2, BC015566.2, AK295078.1, AK296557.1, AK295833.1, AK316069.1, BC013763.1, KJ896471.1, JF432325.1, KR710324.1, KR710323.1, или KR710322.1 или в NCBI под номерами доступа: NM_152296.5, XM_016934231.2, NM_001256213.1, XM_004060817.3, NM_001256214.2 или AK223569.1. В других вариантах осуществления изобретения, последовательность нуклеиновой кислоты кодирует белок ATP1A3 дикого типа, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 03 (эталонная последовательность NCBI: P13637-1), или аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 06 или последовательность, которая по меньшей мере на 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности, представленной в SEQ ID NO: 03 или SEQ ID NO: 06.

[0085] В Таблице 1 представлены репрезентативные последовательности, которые ассоциируются с транскриптами согласно изобретению.

[0086] Таблица 1: Последовательности нуклеиновых кислот и аминокислотные последовательности

Репрезентативная последовательность нуклеиновой	ATGGGGGACAAGAAAGATGACAAGGACTCACCCAAGAAGAA CAAGGGCAAGGAGCGCCGGGACCTGGATGACCTCAAGAAGG AGGTGGCTATGACAGAGCACAAGATGTCAGTGGGAAGAGGTCT
---	---

кислоты кодирующая АТР1А3	, GCCGGAATACAACACAGACTGTGTGCAGGGTTTGACCCACA GCAAAGCCCAGGAGATCCTGGCCCCGGGATGGGCCTAACGCAC TCACGCCACCGCCTACCACCCCAGAGTGGGTCAAGTTTTGCCG GCAGCTCTTCGGGGGCTTCTCCATCCTGCTGTGGATCGGGGCT ATCCTCTGCTTCCTGGCCTACGGTATCCAGGCGGGCACCGAGG ACGACCCCTCTGGTGACAACCTGTACCTGGGCATCGTGCTGGC GGCCGTGGTGATCATCACTGGCTGCTTCTCCTACTACCAGGAG GCCAAGAGCTCCAAGATCATGGAGTCCTTCAAGAACATGGTG CCCCAGCAAGCCCTGGTGATCCGGGAAGGTGAGAAGATGCAG GTGAACGCTGAGGAGGTGGTGGTTCGGGGACCTGGTGAGATC AAGGGTGGAGACCGAGTGCCAGCTGACCTGCGGATCATCTCA GCCACGGCTGCAAGGTGGACAACCTCCTCCCTGACTGGCGAA TCCGAGCCCCAGACTCGCTCTCCCGACTGCACGCACGACAAC CCCTTGGAGACTCGGAACATCACCTTCTTTCCACCAACTGTG TGGAAGGCACGGCTCGGGGCGTGGTGGTGGCCACGGGCGACC GCACTGTCATGGGCCGTATCGCCACCCTGGCATCAGGGCTGG AGGTGGGCAAGACGCCCATCGCCATCGAGATTGAGCACTTCA TCCAGCTCATCACCGGCGTGGCTGTCTTCCTGGGTGTCTCCTT CTTCATCCTCTCCCTCATTCTCGGATACACCTGGCTTGAGGCT GTCATCTTCCTCATCGGCATCATCGTGGCCAATGTCCCAGAGG GTCTGCTGGCCACTGTCACTGTGTGTCTGACGCTGACCGCCAA GCGCATGGCCCCGAAGAAGTGCCTGGTGAAGAACCTGGAGGC TGTAGAAACCCTGGGCTCCACGTCCACCATCTGCTCAGATAA GACAGGGACCCTCACTCAGAACCGCATGACAGTCGCCCACAT GTGGTTTGACAACCAGATCCACGAGGCTGACACCACTGAGGA CCAGTCAGGGACCTCATTTGACAAGAGTTCGCACACCTGGGT GGCCCTGTCTCACATCGCTGGGCTCTGCAATCGCGCTGTCTTC AAGGGTGGTCAGGACAACATCCCTGTGCTCAAGAGGGATGTG GCTGGGGATGCGTCTGAGTCTGCCCTGCTCAAGTGCATCGAG CTGTCCTCTGGCTCCGTGAAGCTGATGCGTGAACGCAACAAG AAAGTGGCTGAGATTCCCTTCAATTCCACCAACAAATACCAG CTCTCCATCCATGAGACCGAGGACCCCAACGACAACCGATAC CTGCTGGTGATGAAGGGTGCCCCCGAGCGCATCCTGGACCGC TGCTCCACCATCCTGCTACAGGGCAAGGAGCAGCCTCTGGAC GAGGAAATGAAGGAGGCCTTCCAGAATGCCTACCTTGAGCTC
---------------------------------	---

	GGTGGCCTGGGCGAGCGCGTGCTTGGTTTCTGCCATTATTACC TGCCCGAGGAGCAGTTCCCCAAGGGCTTTGCCTTCGACTGTGA TGACGTGAACTTCACCACGGACAACCTCTGCTTTGTGGGCCTC ATGTCCATGATCGACCCACCCCGGGCAGCCGTCCCTGACGCG GTGGGCAAGTGTCGCAGCGCAGGCATCAAGGTCATCATGGTC ACCGGCGATCACCCCATCACGGCCAAGGCCATTGCCAAGGGT GTGGGCATCATCTCTGAGGGCAACGAGACTGTGGAGGACATC GCCGCCCCGGCTCAACATTCCCGTCAGCCAGGTTAACCCCCGG GATGCCAAGGCCTGCGTGATCCACGGCACCGACCTCAAGGAC TTCACCTCCGAGCAAATCGACGAGATCCTGCAGAATCACACC GAGATCGTCTTCGCCCCGACATCCCCCAGCAGAAGCTCATC ATTGTGGAGGGCTGTCAGAGACAGGGTGCAATTGTGGCTGTG ACCGGGGATGGTGTGAACGACTCCCCCGCTCTGAAGAAGGCC GACATTGGGGTGGCCATGGGCATCGCTGGCTCTGACGTCTCC AAGCAGGCAGCTGACATGATCCTGCTGGACGACAACTTTGCC TCCATCGTCACAGGGGTGGAGGAGGGCCGCCTGATCTTCGAC AACCTAAAGAAGTCCATTGCCTACACCCTGACCAGCAATATC CCGAGATCACGCCCTTCCTGCTGTTTCATCATGGCCAACATCC CGCTGCCCCCTGGGCACCATCACCATCCTCTGCATCGATCTGGG CACTGACATGGTCCCTGCCATCTCACTGGCGTACGAGGCTGCC GAAAGCGACATCATGAAGAGACAGCCCAGGAACCCGCGGAC GGACAAATTGGTCAATGAGAGACTCATCAGCATGGCCTACGG GCAGATTGGAATGATCCAGGCTCTCGGTGGCTTCTTCTCTTAC TTTGTGATCCTGGCAGAAAATGGCTTCTTGCCCGGCAACCTGG TGGGCATCCGGCTGAACTGGGATGACCGCACCGTCAATGACC TGGAAGACAGTTACGGGCAGCAGTGGACATACGAGCAGAGG AAGGTGGTGGAGTTCACCTGCCACACGGCCTTCTTTGTGAGCA TCGTTGTCGTCCAGTGGGCCGATCTGATCATCTGCAAGACCCG GAGGAACTCGGTCTTCCAGCAGGGCATGAAGAACAAGATCCT GATCTTCGGGCTGTTTGAGGAGACGGCCCTGGCTGCCTTCCTG TCCTACTGCCCCGGCATGGACGTGGCCCTGCGCATGTACCCTC TCAAGCCCAGCTGGTGGTTCTGTGCCTTCCCCTACAGTTTCCT CATCTTCGTCTACGACGAAATCCGCAAACATCCTGCGCAGG AACCCAGGGGGTTGGGTGGAGAAGGAAA (SEQ ID NO:07)
Репрезентативная	CGCGCGCACCTACCGAGGCGCGGGCGCTGCAGAGGCTCCCAG

последовательность нуклеиновой кислоты кодирующая АТР1А3	CCCAAGCCTGAGCCTGAGCCCGCCCCGAGGTCCCCGCCCCGC CCGCCTGGCTCTCTCGCCGCGGAGCCGCCAAGATGGGGGACA AGAAAGATGACAAGGACTACCCAAGAAGAACAAGGGCAAG GAGCGCCGGGACCTGGATGACCTCAAGAAGGAGGTGGCTATG ACAGAGCACAAGATGTCAGTGGAAGAGGTCTGCCGGAATAAC AACACAGACTGTGTGCAGGGTTTGACCCACAGCAAAGCCCAG GAGATCCTGGCCCCGGGATGGGCCTAACGCACTCACGCCACCG CCTACCACCCCAGAGTGGGTCAAGTTTTGCCGGCAGCTCTTCG GGGGCTTCTCCATCCTGCTGTGGATCGGGGCTATCCTCTGCTT CCTGGCCTACGGTATCCAGGCGGGCACCGAGGACGACCCCTC TGGTGACAACCTGTACCTGGGCATCGTGCTGGCGGCCGTGGT GATCATCACTGGCTGCTTCTCCTACTACCAGGAGGCCAAGAG CTCCAAGATCATGGAGTCCTTCAAGAACATGGTGCCCCAGCA AGCCCTGGTGATCCGGGAAGGTGAGAAGATGCAGGTGAACGC TGAGGAGGTGGTGGTCGGGGACCTGGTGAGATCAAGGGTGG AGACCGAGTGCCAGCTGACCTGCGGATCATCTCAGCCCACGG CTGCAAGGTGGACAACCTCCTCCCTGACTGGCGAATCCGAGCC CCAGACTCGCTCTCCCGACTGCACGCACGACAACCCCTTGGA GACTCGGAACATCACCTTCTTTCCACCAACTGTGTGGAAGGC ACGGCTCGGGGCGTGGTGGTGGCCACGGGCGACCGCACTGTC ATGGGCCGTATCGCCACCCTGGCATCAGGGCTGGAGGTGGGC AAGACGCCCATCGCCATCGAGATTGAGCACTTCATCCAGCTC ATCACC GGCGTGGCTGTCTTCCTGGGTGTCTCCTTCTTCATCCT CTCCTCATTCTCGGATACACCTGGCTTGAGGCTGTCATCTTC CTCATCGGCATCATCGTGGCCAATGTCCAGAGGGTCTGCTGG CCACTGTCACTGTGTGTCTGACGCTGACCGCCAAGCGCATGGC CCGGAAGAACTGCCTGGTGAAGAACCTGGAGGCTGTAGAAAC CCTGGGCTCCACGTCCACCATCTGCTCAGATAAGACAGGGAC CCTCACTCAGAACCGCATGACAGTCGCCCACATGTGGTTTTGAC AACCAGATCCACGAGGCTGACACCACTGAGGACCAGTCAGGG ACCTCATTTGACAAGAGTTCGCACACCTGGGTGGCCCTGTCTC ACATCGCTGGGCTCTGCAATCGCGCTGTCTTCAAGGGTGGTCA GGACAACATCCCTGTGCTCAAGAGGGATGTGGCTGGGGATGC GTCTGAGTCTGCCCTGCTCAAGTGCATCGAGCTGTCCTCTGGC TCCGTGAAGCTGATGCGTGAACGCAACAAGAAAGTGGCTGAG
--	--

ATTCCCTTCAATTCCACCAACAAATACCAGCTCTCCATCCATG
 AGACCGAGGACCCCAACGACAACCGATACCTGCTGGTGATGA
 AGGGTGCCCCCGAGCGCATCCTGGACCGCTGCTCCACCATCCT
 GCTACAGGGCAAGGAGCAGCCTCTGGACGAGGAAATGAAGG
 AGGCCTTCCAGAATGCCTACCTTGAGCTCGGTGGCCTGGGCG
 AGCGCGTGCTTGGTTTCTGCCATTATTACCTGCCCCGAGGAGCA
 GTTCCCCAAGGGCTTTGCCTTCGACTGTGATGACGTGAACTTC
 ACCACGGACAACCTCTGCTTTGTGGGCCTCATGTCCATGATCG
 ACCCACCCCGGGCAGCCGTCCCTGACGCGGTGGGCAAGTGTC
 GCAGCGCAGGCATCAAGGTCATCATGGTCACCGGCGATCACC
 CCATCACGGCCAAGGCCATTGCCAAGGGTGTGGGCATCATCT
 CTGAGGGCAACGAGACTGTGGAGGACATCGCCGCCCCGGCTCA
 ACATTCCCGTCAGCCAGGTAAACCCCGGGATGCCAAGGCCT
 GCGTGATCCACGGCACCGACCTCAAGGACTTCACCTCCGAGC
 AAATCGACGAGATCCTGCAGAATCACACCGAGATCGTCTTCG
 CCCGCACATCCCCCAGCAGAAGCTCATCATTGTGGAGGGCT
 GTCAGAGACAGGGTGCAATTGTGGCTGTGACCGGGGATGGTG
 TGAACGACTCCCCCGCTCTGAAGAAGGCCGACATTGGGGTGG
 CCATGGGCATCGCTGGCTCTGACGTCTCCAAGCAGGCAGCTG
 ACATGATCCTGCTGGACGACAACCTTTGCCTCCATCGTCACAGG
 GGTGGAGGAGGGCCGCCTGATCTTCGACAACCTAAAGAAGTC
 CATTGCCTACACCCTGACCAGCAATATCCCGGAGATCACGCC
 CTTCTGCTGTTCATCATGGCCAACATCCCGCTGCCCCCTGGGC
 ACCATCACCATCCTCTGCATCGATCTGGGCACTGACATGGTCC
 CTGCCATCTCACTGGCGTACGAGGCTGCCGAAAGCGACATCA
 TGAAGAGACAGCCCAGGAACCCGCGGACGGACAAATTGGTC
 AATGAGAGACTCATCAGCATGGCCTACGGGCAGATTGGAATG
 ATCCAGGCTCTCGGTGGCTTCTTCTCTTACTTTGTGATCCTGGC
 AGAAAATGGCTTCTTGCCCGGCAACCTGGTGGGCATCCGGCT
 GAACTGGGATGACCGCACCGTCAATGACCTGGAAGACAGTTA
 CGGGCAGCAGTGGACATACGAGCAGAGGAAGGTGGTGGAGT
 TCACCTGCCACACGGCCTTCTTTGTGAGCATCGTTGTCGTCCA
 GTGGGCCGATCTGATCATCTGCAAGACCCGGAGGAACCTCGGT
 CTTCCAGCAGGGCATGAAGAACAAGATCCTGATCTTCGGGCT
 GTTTGAGGAGACGGCCCTGGCTGCCTTCCTGTCCTACTGCCCC

	GGCATGGACGTGGCCCTGCGCATGTACCCTCTCAAGCCCAGC TGGTGGTTCTGTGCCTTCCCCTACAGTTTCCTCATCTTCGTCTA CGACGAAATCCGCAAACCTCATCCTGCGCAGGAACCCAGGGGG TTGGGTGGAGAAGGAAACCTACTACTGACCTCAGCCCCACCA CATCGCCCATCTCTTCCCCGTCCCGCAGGCCCAGGACCGCCCC TGTCAGTCCCCCAATTTTGTATTCTGGGGGGAGGAGCCCTCT CTTCCTGTGGCCCCACCTTGGCCCCCACCCCTCCACTATCTC CTGCCGCCCCCACTCTGGCTGGCTTCTCTCCCTGCCCAAAC CTCTCTCCTCTCTCTTTTCTGTGTCAGTTTCTCTCCCTCTCCTCA CCCCTCTATCCATTCTCCCGCCCCAGCCACCTCCCTGGGCTC TTTTTTACTCCCCTTCAGCCCCCGGCTGATGCCATCTCTGGTT CTGGACAATTATCAAATATATCAGTGGGGAGAGAGAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA (SEQ ID NO:02)
Репрезентативная аминокислотная последовательность ATP1A3	MGDKKDDKDS PKKNKGKERR DLDDLKKEVA MTEHKMSVEE VCRKYNTDCV QGLTHSKAQE ILARDGPNAL TPPPTTPEWV KFCRQLFGGF SILLWIGAIL CFLAYGIQAG TEDDPSGDNL YLGIVLAAVV IITGCFSYQ EAKSSKIMES FKNMVPQQAL VIREGEKMQV NAEVVVVDL VEIKGGDRVP ADLRIISAHG CKVDNSSLTG ESEPQTRSPD CTHDNPLETR NITFFSTNCV EGTARGVVVA TGDRTVMGRI ATLASGLEVG KTPIAIEIEH FIQLITGVAV FLGVSFFILS LILGYTWLEA VIFLIGIIVA NVPEGLLATV TVCLTLTAKR MARKNCLVKN LEAVETLGST STICSDKTGT LTQNRMTVAH MWFDNQIHEA DTTEDQSGTS FDKSSHTWVA LSHIAGLCNR AVFKGGQDNI PVLKRDVAGD ASESALLKCI ELSSGSVKLM RERNKKVAEI PFNSTNKYQL SIHETEDPND NRYLLVMKGA PERILDRCS T ILLQGKEQPL DEEMKEAFQN AYLELGGLGE RVLGFCHYYL PEEQFPKGFA FDCDDVNFTT DNLCFVGLMS MIDPPRAAVP DAVGKCRSAG IKVIMVTGDH PITAKAIAKG VGIISEGNET VEDIAARLNI PVSQVNPRDA KACVIHGTDL KDFTSEQIDE ILQNHTEIVF ARTSPQQKLI IVEGCQRQGA IVAVTGDGVN DSPALKKADI GVAMGIAGSD VSKQAADMIL LDDNFASIVT GVEEGRILFD NLKKSIAAYTL TSNIPETPF LLFIMANIPL PLGTITILCI DLGTDMVPAI SLAYEAAESD IMKRQPRNPR TDKLVNERLI

	SMAYGQIGMI QALGGFFSYF VILAENGFLP GNLVGIRLNW DDRTVNDLED SYGQQWTYEQ RKVVEFTCHT AFFVSIVVVQ WADLIICKTR RNSVFQQGMK NKILIFGLFE ETALAAFLSY CPGMDVALRM YPLKPSWWFC AFPYSFLIFV YDEIRKLILR RNPGGWVEKE TYY (SEQ ID NO:03)
Репрезентативная аминокислотная последовательность ATP1A3	MGDKKDDKDSPKKNKGKERRDLDDLKKEVAMTEHKMSVEEV CRKYNTDCVQGLTHSKAQEILARDGPNALTPPPTTPEWVKFCRQ LFGGFSILLWIGAILCFLAYGIQAGTEDDPSGDNLYLGIVLAAVVI ITGCFSYYQEAKSSKIMESFKNMVPQQALVIREGEKMQVNAAEV VVGDLVEIKGGDRVPADLRIISAHGCKVDNSSLTGESEPQTRSPD CTHDNPLETRNITFFSTNCVEGTARGVVVATGDRTVMGRIATLA SGLEVGKTPIAIEIEHFIQLITGVAVFLGVVSFFILSLILGYTWLEAVI FLIGIIVANVPEGLLATVTVCLTLTAKRMARKNCLVKNLEAVETL GSTSTICSDKTGTLTQNRMTVAHMFWDNQIHEADTTEDQSGTSE DKSSHTWVALSHIAGLCNRAVFKGGQDNIPVLKRDVAGDASES ALLKCIELSSGSVKLMRERNKKVAEIPFNSTNKYQLSIHETEDPN DNRYLLVMKGAPERILDRCSILLQGKEQPLDEEMKEAFQNAYL ELGGLGERVLGFCHYYLPEEQFPKGFAFDCDDVNFTTDNLCFVG LMSMIDPPRAAVPDAVGKCRSAGIKVIMVTGDHPITAKAIAKGV GIISEGNETVEDIAARLNIPVSQVNPRDAKACVIHGTDLKDFTSEQ IDEILQNHTEIVFARTSPQQKLIIVEGCQRQGAIVAVTGDGVNDSP ALKKADIGVAMGIAGSDVSKQAADMILLDDNFASIVTGVEEGR IFDNLKKSIA YTLTSNIPEITPFLLFIMANIPLPLGTITILCIDLGTDM VPAISLAYEAAESDIMKRQPRNPRTDKLVNERLISMAYGQIGMIQ ALGGFFSYFVILAENGFLPGNLVGIRLNWDDRTVNDLED SYGQQ WTYEQRKVVVEFTCHT AFFVSIVVVQWADLIICKTRRNSVFQQGM KNKILIFGLFEETALAAFLSYCPGMDVALRM YPLKPSWWFC AFP YSFLIFVYDEIRKLILRRNPGGWVEKE (SEQ ID NO:06)

[0087] Как описано в настоящей заявке и в соответствии с одним вариантом осуществления изобретения, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая ATP1A3, может содержать последовательность, имеющую последовательность, идентичную любой из SEQ ID NO: 01, SEQ ID NO: 02 или SEQ ID NO: 07. Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая ATP1A3, может быть на 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% или 100% идентична последовательностям нуклеиновых кислот, представленным в SEQ ID NO: 01, SEQ ID NO: 02 или SEQ ID NO:

07. Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая ATP1A3, может быть на 1-10%, 10-20%, 30-40%, 50-60%, 50-70%, 50-80%, 50-90%, 50-99%, 50-100%, 60-70%, 60-80%, 60-90%, 60-99%, 60-100%, 70-80%, 70-90%, 70-99%, 70-100%, 80-85%, 80-90%, 80-95%, 80-99%, 80-100%, 90-95%, 90-99% или 90-100% идентична последовательностям нуклеиновых кислот, представленным в SEQ ID NO: 01, SEQ ID NO: 02 или SEQ ID NO: 07. В качестве неограничивающего примера может служить последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая ATP1A3, которая может содержать последовательность, на 80% идентичную последовательностям нуклеиновой кислоты, представленным в SEQ ID NO: 01, SEQ ID NO: 02 или SEQ ID NO: 07. В качестве другого неограничивающего примера может служить последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая ATP1A3, которая может содержать последовательность, на 85% идентичную последовательностям нуклеиновой кислоты, представленным в SEQ ID NO: 01, SEQ ID NO: 02 или SEQ ID NO: 07. В качестве другого неограничивающего примера может служить последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая ATP1A3, которая может содержать последовательность, на 90% идентичную последовательностям нуклеиновой кислоты, представленным в SEQ ID NO: 01, SEQ ID NO: 02 или SEQ ID NO: 07. В качестве другого неограничивающего примера может служить последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая ATP1A3, которая может содержать последовательность, на 95% идентичную последовательностям нуклеиновой кислоты, представленным в SEQ ID NO: 01, SEQ ID NO: 02 или SEQ ID NO: 07. В качестве другого неограничивающего примера может служить последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая ATP1A3, которая может содержать последовательность, на 99% идентичную последовательностям нуклеиновой кислоты, представленным в SEQ ID NO: 01, SEQ ID NO: 02 или SEQ ID NO: 07.

[0088] В другом варианте осуществления изобретения, экспрессионный кластер содержит транскрипт, кодирующий мРНК, которая может транслироваться в аминокислотную последовательность белка ATP1A3, или состоит или по существу состоит из этого транскрипта. В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая ATP1A3, представляет собой последовательность кДНК, которая имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 02, или ее фрагменты, изоформы или гомологи.

[0089] Термин «идентичность последовательностей» относится к количеству идентичных или аналогичных остатков (например, нуклеотидных оснований или аминокислот) при сравнении тестируемой и эталонной нуклеотидной или аминокислотной последовательностей. Идентичность последовательностей может быть определена путем выравнивания последовательностей нуклеиновой кислоты для идентификации областей сходства или идентичности. Как описано в настоящей заявке, идентичность последовательностей обычно определяется путем выравнивания для идентификации идентичных остатков. Между сравниваемыми последовательностями можно выявить совпадения, несоответствия и пробелы. Альтернативно, идентичность последовательности

может быть определена без учета пробелов, как количество идентичных положений/длина общей выровненной последовательности $\times 100$. В одном неограничивающем варианте осуществления изобретения, термин «по меньшей мере на 90% идентична последовательности» относится к проценту идентичности от 90 до 100% по отношению к эталонной нуклеотидной или аминокислотной последовательности. Идентичность на уровне 90% или более указывает на тот факт, что, если в качестве примера предположить, что сравниваются тестируемый и эталонный олигонуклеотиды или их длина составляет 100 нуклеотидов, то не более, чем 10% (то есть, 10 из 100) нуклеотидов в тестируемом олигонуклеотиде будут отличаться от эталонного олигонуклеотида. Различия определяются как замены, инсерции или делеции нуклеиновых кислот или аминокислот.

[0090] В некоторых вариантах осуществления изобретения, экспрессионный кластер содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую АТР1А3, которая была оптимизирована по кодонам для уменьшения числа сайтов метилирования CpG и для экспрессии у млекопитающих (например, экспрессии в клетках человека). В других вариантах осуществления изобретения, кластер для экспрессии нуклеиновой кислоты не содержит последовательностей нуклеиновой кислоты, оптимизированных по кодонам.

[0091] Термин «оптимизированный по кодонам» относится к изменению кодонов в молекулах нуклеиновых кислот для иллюстрации типичного использования кодонов организмом-хозяином (например, млекопитающими, такими как человек) без изменения полипептида, кодируемого ДНК, для повышения экспрессии. Ранее сообщалось о многих методах и программах для оптимизации кодонов. См., например, genomes.urv.es/OPTIMIZER/; Puigbò et al., *Nucleic Acids Res.* (2007) (информация на Web-сервере): W126-W131; Chin et al. (2014) *Bioinformatics*, 30(15):2210-2; Fuglsang, (2003) *Protein Expr Purif.*, 31(2):247-9; Narum et al., (2001) *Infect. Immun.*, 69(12):7250-7253, Outchkourov et al., (2002) *Protein Expr. Purif.*, 24(1):18-24, Humphreys et al., (2000) *Protein Expr. Purif.*, 20(2):252-64.

[0092] Специалистам в данной области очевидно, что кластер для экспрессии нуклеиновой кислоты, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую АТР1А3, может содержать сигналы регуляции транскрипции/трансляции или секреторные сигнальные последовательности, которые могут быть включены в кластер для экспрессии нуклеиновой кислоты или в остов вектора. Так, например, для эффективной трансляции встроенных последовательностей, кодирующих белок, могут потребоваться специфические сигналы инициации. Эти экзогенные последовательности регуляции трансляции, которые могут включать иницирующий кодон АТГ и соседние последовательности, могут иметь различное происхождение, как природное, так и синтетическое.

[0093] Могут быть использованы различные элементы промотора/энхансера в зависимости от желаемого уровня и тканеспецифической экспрессии. Промотор может быть тканеспецифичным или неспецифическим и может быть конститутивным или индуцибельным, в зависимости от типа желаемой экспрессии гена. Промотор может быть

природным или чужеродным и может иметь природную или синтетическую последовательность. Под термином «чужеродный» подразумевается, что область инициации транскрипции не обнаруживается в хозяине дикого типа, в который была введена область инициации транскрипции.

[0094] Промотор может быть выбран так, чтобы он функционировал в представляющей(их) интерес клетке(ах)-мишени(ях). Тканеспецифические промоторы относятся к промоторам, которые обладают активностью только в клетках определенного типа. Использование тканеспецифического промотора в кластере для экспрессии нуклеиновой кислоты позволяет ограничивать нежелательную экспрессию трансгена в непораженных тканях, а также способствовать устойчивой экспрессии трансгена за счет ускользания от индуцированных трансгеном иммунных ответов хозяина. Тканеспецифические промоторы включают, но не ограничиваются ими, нейрон-специфические промоторы, мышцеспецифические промоторы, промоторы, специфичные для печени, промоторы, специфичные для скелетных мышц, и промоторы, специфичные для сердца.

[0095] Нейрон-специфические промоторы включают, но не ограничиваются ими, промотор синапсина I (SYN), промотор кальций/кальмодулин-зависимой протеинкиназы II, промотор тубулина альфа I, промотор нейрон-специфической энолазы и промотор бета-цепи тромбоцитарного фактора роста. В некоторых вариантах осуществления изобретения, нейрон-специфический промотор представляет собой промотор человеческого синапсина. В других вариантах осуществления изобретения, нейрон-специфический промотор представляет собой промотор человеческого синапсина, имеющий последовательность нуклеиновой кислоты, представленную в SEQ ID NO: 04 или последовательность человеческого промотора, представленную в SEQ ID NO: 09, или последовательность мышиноного промотора, представленную в SEQ ID NO: 08. В других вариантах осуществления изобретения, промотор человеческого синапсина включает проксимальную область промотора синапсона 1 (от -422 до -22). В некоторых вариантах осуществления изобретения, проксимальная область промотора синапсина 1 (от -422 до -22) имеет последовательность нуклеиновой кислоты, которая представлена в SEQ ID NO: 05.

[0096] Печень-специфические промоторы включают, но не ограничиваются ими, промотор α 1-микроглобулина/энхансер бикуннина/промотор глобулина, связывающийся с тиреоидным гормоном, промотор человеческого альбумина (hALB), промотор глобулина, связывающийся с тиреоидным гормоном, промотор α -1-анти-трипсина, промотор бычьего альбумина (bAlb), промотор мышиноного альбумина (mAlb), промотор человеческого α 1-антитрипсина (hAAT), промотор ApoEhAAT, состоящий из энхансера ApoE и промотора hAAT, промотор транстиретина (TTR), промотор белка, связывающегося с жирной кислотой печени, промотор вируса гепатита В (HBV), промотор DC172, состоящий из промотора hAAT и энхансера α 1-микроглобулина, промотор DC190, содержащий промотор человеческого альбумина и энхансер протромбина, и другие природные и

синтетические печень-специфические промоторы.

[0097] Мышцеспецифические промоторы включают, но не ограничиваются ими, промотор MHCK7, промотор/энхансер мышечной креатинкиназы (MCK), промотор изоформы тропонина I медленного действия (TnIS), промотор MYODI, промотор MYLK2, промотор SPc5-12, промотор десмина (Des), промотор unc45b и другие природные и синтетические мышцеспецифические промоторы.

[0098] Промоторы, специфичные для скелетных мышц, включают, но не ограничиваются ими, промотор HSA, промотор человеческого α -актина скелета.

[0099] Промоторы, специфичные для сердца, включают, но не ограничиваются ими, промотор MYH6, промотор TNNI3, промотор сердечного тропонина C (cTnC), промотор тяжелой цепи альфа-миозина (α -MHC), промотор легкой цепи 2 миозина (MLC-2) и промотор MYBPC3.

[00100] Конститутивные промоторы относятся к промоторам, которые обеспечивают непрерывную транскрипцию сцепленного с ним гена. Конститутивные промоторы всегда являются активными и могут быть использованы для экспрессии генов в клетках и тканях широкого ряда, включая, но не ограничиваясь ими, печень, почки, скелетную мышцу, сердечную мышцу, гладкую мышцу, мышцу диафрагмы, головной мозг, спинной мозг, эндотелиальные клетки, кишечные клетки, легочные клетки (например, клетки гладких мышц или эпителия), перитонеальные эпителиальные клетки и фибробласты.

[00101] Конститутивные промоторы включают, но не ограничиваются ими, основной предранний энхансер CMV/промотор куриного бета-актина, основной предранний промотор цитомегаловируса (CMV), промотор фактора элонгации 1- α (EF1- α), промотор обезьяньего вакуолизирующего вируса 40 (SV40), промотор AmpR, промотор P_{TK}, промотор гена убихитина C (Ubc) человека, промотор MFG, промотор бета-актина человека, промотор CAG, промотор EGR1, промотор FerH, промотор FerL, промотор GRP78, промотор GRP94, промотор HSP70, промотор β -kin, промотор мышечной фосфоглицераткиназы (mPGK) или промотор PGK человека (hPGK), промотор ROSA, промотор убихитина B человека, промотор вируса саркомы Рауса, или любые другие природные или синтетические конститутивные промоторы. В некоторых вариантах осуществления изобретения, конститутивно активный промотор выбран из группы, состоящей из промотора человеческого β -актина, человеческого фактора элонгации-1 α , куриного β -актина в комбинации с ранним энхансером цитомегаловируса, промотора цитомегаловируса (CMV), вируса обезьяны 40 или тимидинкиназы вируса простого герпеса.

[00102] Индуцибельные промоторы относятся к промоторам, действие которых может регулироваться позитивным или негативным контролем. Факторы, которые могут регулировать индуцибельный промотор, включают, но не ограничиваются ими, химические вещества (например, промотор металлотионеина или индуцируемый гормонами промотор), температуру и свет.

[00103] Тканеспецифические промоторы могут быть функционально связаны с одним или более (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8) энхансерными элементами (например, нейрон-специфическим промотором, связанным с энхансером цитомегаловируса) или объединены с образованием tandemного промотора (например, нейрон-специфического/конститутивного tandemного промотора). Если присутствуют два или более тканеспецифических промотора, то выделенная нуклеиновая кислота может быть нацелена на две или более различных тканей одновременно.

[00104] Энхансерный элемент представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, функция которой заключается в усилении транскрипции.

[00105] В некоторых вариантах осуществления изобретения, экспрессионный кластер содержит последовательность трансгена ATR1A3, функционально связанную с промотором и последовательностью полиаденилирования.

[00106] В других аспектах изобретения, кластер для экспрессии нуклеиновой кислоты согласно изобретению дополнительно содержит сигнал терминации транскрипции. Сигнал терминации транскрипции представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, которая указывает на конец гена во время транскрипции. Примеры сигнала терминации транскрипции включают, но не ограничиваются ими, сигнал полиаденилирования бычьего гормона роста (BGHPA), сигнал полиаденилирования обезьяньего вируса 40 (Sv40 PolyA) и синтетический сигнал полиаденилирования. Последовательность полиаденилирования может включать последовательность нуклеиновой кислоты AATAAA. В некоторых вариантах осуществления изобретения, PolyA Sv40 имеет последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17, или последовательность, которая по меньшей мере на 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности, представленной в SEQ ID NO: 17.

[00107] Используемый здесь термин «интрон» относится к последовательностям нуклеиновой кислоты, которые могут усиливать экспрессию трансгена. Интрон также может быть частью кластера для экспрессии нуклеиновой кислоты, либо он может быть расположен ниже или выше экспрессионного кластера в экспрессионном векторе. Интроны могут включать, но не ограничиваются ими, интрон SV40, интрон 1 гена EF-1alpha или интрон MVM. В некоторых вариантах осуществления изобретения, кластеры для экспрессии нуклеиновых кислот не содержат интрона.

[00108] Используемые здесь термины «усиливать» и «усиление» в отношении экспрессии нуклеиновой кислоты или продуцирования полипептида относятся к увеличению и/или пролонгированию устойчивых уровней указанной нуклеиновой кислоты или полипептида, например, по меньшей мере приблизительно на 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 40%, 50%, 60%, 75%, в 2 раза, в 2,5 раза, в 3 раза, 5 раз, 10 раз, в 15 раз, 20 раз, 30 раз, 50 раз, 100 или более раз.

[00109] В некоторых вариантах осуществления изобретения, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая ATR1A3, используется в качестве «донорной»

матрицы для гомологичной рекомбинации с мутантным геном АТР1А3 в пораженных клетках. Дополнительные варианты осуществления изобретения включают совместное введение последовательности нуклеиновой кислоты с нуклеазами для редактирования генов, выбранными из группы, состоящей из нуклеаз «цинковые пальцы», TALENS, РНК-зависимых нуклеаз, таких как CRISPR/Cas98, и других программируемых эндонуклеаз.

[00110] **Векторы**

[00111] В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к вектору, который содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую АТР1А3, или состоит или, по существу, состоит из этой последовательности. В некоторых вариантах осуществления изобретения, вектор содержит кластер для экспрессии нуклеиновой кислоты, включающий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую АТР1А3, состоит или, по существу, состоит из такого кластера.

[00112] Для специалистов в данной области будет очевидно, что для доставки выделенных нуклеиновых кислот согласно изобретению в представляющую(ие) интерес клетку(и)-мишень(и) или представляющему интерес индивидууму может быть использован любой подходящий вектор. Выбор вектора для доставки может быть проведен на основе ряда факторов, известных специалистам в данной области, включая возраст и вид хозяина для такой доставки, доставку *in vitro* или *in vivo*, желаемый уровень и продолжительность экспрессии, предполагаемую цель (например, для терапии или получения ферментов), клетку или орган-мишень, путь доставки, размер выделенной нуклеиновой кислоты, безопасность и т.п.

[00113] Подходящими векторами, которые известны специалистам в данной области, и которые могут быть использованы для доставки и, необязательно, экспрессии выделенных нуклеиновых кислот согласно изобретению (например, вирусные и невирусные векторы), являются вирусные векторы (например, ретровирус, аденовирус, AAV, лентивирус или вирус простого герпеса), липидные векторы, полилизиновые векторы, синтетические полиаминополимерные векторы, которые используются вместе с молекулами нуклеиновой кислоты, такими как плазмиды, и т.п. В некоторых вариантах осуществления изобретения, невирусный вектор может представлять собой вектор на основе полимера (например, полиэтиленimina (ПЭИ), хитозана, сополимера DL-лактида (PLA) или сополимера DL-лактида-гликозида (PLGA), дендримеров, полиметакрилата), вектор на основе пептидов, вектор на основе липидных наночастиц, твердых липидных наночастиц или катионных липидов.

[00114] Протоколы для получения рекомбинантных вирусных векторов и для использования вирусных векторов для доставки нуклеиновых кислот можно найти в Current Protocols in Molecular Biology; Ausubel, F.M. et al. (eds.) Greene Publishing Associates; (1989) и в других стандартных лабораторных руководствах (например, Vectors for Gene Therapy, In: Current Protocols in Human Genetics, John Wiley and Sons, Inc.; 1997).

[00115] Используемый здесь термин «рекомбинантный» относится к новым комбинациям генетического материала, полученным в результате генной инженерии. Так,

например, рекомбинантный микроорганизм (например, бактерии) может представлять собой микроорганизм, который содержит генетический материал, отличающийся от любого из его родителей, в результате генетической модификации, где рекомбинантная ДНК может представлять собой форму искусственной ДНК; рекомбинантный белок или фермент может быть искусственно получен, и он может представлять собой очищенную форму белка или фермента, а рекомбинантный вирус может представлять собой вирус, образованный путем рекомбинации генетического материала.

[00116] В некоторых вариантах осуществления изобретения, кластеры для экспрессии нуклеиновых кислот и/или трансгены (например, ATR1A3 и его варианты) могут быть включены в рекомбинантный вирусный вектор.

[00117] Используемый здесь термин «вирусный вектор» относится к частице вируса (например, AAV), которая функционирует как носитель для доставки нуклеиновой кислоты, и которая включает векторный геном (например, вирусную ДНК), упакованный в вирион. Альтернативно, в некоторых вариантах осуществления изобретения, термин «вектор» означает только векторный геном/вирусную ДНК.

[00118] В композициях и способах согласно изобретению может быть использован любой рекомбинантный вирусный вектор, подходящий для генотерапии. Примерами таких вирусных векторов являются, но не ограничиваются ими, векторы, происходящие от: Adenoviridae; Birnaviridae; Bunyaviridae; Caliciviridae, группы капиловирусов; группы карлавирусов; группы кармовирусов; группы Caulimovirus; Closterovirus; группы вирусов, вызывающих желтую пятнистость Commelina; группы комовирусов; Coronaviridae; группы фагов PM2; Corbicoviridae; группы вирусов Cryptic; группы Cryptovirus; семейства групп кукумовирусов (группы фагов [PHgr] 6); группы Cysioviridae; группы вирусов, вызывающих кольцевую пятнистость гвоздики; группы диантовирусов; группы вирусов широкого ряда, вызывающих увядание бобов; группы фабавирусов; группы филовирусов; группы флавивирусов; группы фуровирусов; группы герминивирусов; группы Giardavirus; группы Hepadnaviridae; группы герпесвирусов; группы вирусов Хордей, группы илларвирусов; группы Inoviridae; Iridoviridae; Leviviridae; Lipothrixviridae; группы лютеовируса; группы марафивируса; группы вирусов, вызывающих хлоротичную карликовость кукурузы; icosoviridae; Myoviridae; группы некровирусов; группы неповирусов; группы вирусов Papovaviridae; группы Partitiviridae; Parvoviridae; группы вируса мозаики гороха; группы Phycodnaviridae; Picornaviridae; Plasmaviridae; Prodoviridae; Polydnaviridae; Potexvirus; Potyvirus; Poxviridae; Reoviridae; Retroviridae; Rhabdoviridae, Rhizidiovirus, Siphovirus, Sobemovirus, фагов SSV типа 1, Tectiviridae, Tenuivirus; Tetraviridae; группы Tobamovirus; группы Tobavirus; Togaviridae; группы Tombusvirus; группы торовирусов; Totiviridae; группы тимовирусов; и вирусных сателлитов растений.

[00119] В некоторых вариантах осуществления изобретения, рекомбинантный вирусный вектор выбран из группы, состоящей из аденовирусов, аденоассоциированных вирусов (AAV) (например, серотипов AAV и генетически модифицированных вариантов

AAV), вирусов простого герпеса (например, HSV-1, HSV), ретровирусного вектора (например, MMSV, MSCV), лентивирусного вектора (ВИЧ-1, ВИЧ-2) и альфавирусного вектора (например, SFV, SIN, VEE, M1), флавивирусного вектора (например, вируса Kunjin, вируса Западного Нила, вируса денге), рабдовирусного вектора (например, вируса бешенства, VSV), вектора на основе вируса кори (например, MV-Edm), вектора на основе вируса ньюкаслской болезни, поксвирусного вектора (VV) или пикорнавирусного вектора (например, вируса Коксаки). Рекомбинантный вирусный вектор согласно изобретению включает вирусный вектор любого типа, который способен упаковывать и доставлять трансген АТР1А3, или вирусные векторы, которые могут быть сконструированы и созданы способами, известными специалистам в данной области.

[00120] В некоторых вариантах осуществления изобретения, вектор для доставки представляет собой аденовирусный вектор. Используемый здесь термин «аденовирус» охватывает все аденовирусы, включая рода мастаденовирусов и авиаденовирусов.

[00121] Различные области генома аденовируса были картированы и известны специалистам в данной области. Геномные последовательности различных серотипов Ad, а также нуклеотидные последовательности конкретных кодирующих областей генома Ad известны специалистам в данной области и имеются в GenBank и NCBI (см., например, GenBank, номера доступа Nos. J0917, M73260, X73487, AF108105, L19443, NC 003266 и NCBI номера доступа Nos. NC 001405, NC 001460, NC 002067, NC 00454).

[00122] Геном рекомбинантного аденовирусного (rAd) вектора может содержать последовательности концевых повторов аденовируса и сигнал упаковки. «Аденовирусная частица» или «рекомбинантная аденовирусная частица» включает геном аденовирусного вектора или геном рекомбинантного аденовирусного вектора, соответственно, упакованные в капсид аденовируса. Обычно, геном аденовирусного вектора является наиболее стабильным при размерах приблизительно от 28 до 38 т.п.о. (приблизительно от 75% до 105% от размера нативного генома). В случае аденовирусного вектора, содержащего крупные делеции и относительно небольшой трансген, может быть использована «перемежающаяся ДНК» для поддержания общего размера вектора в желаемом интервале способами, известными специалистам в данной области.

[00123] Геном аденовируса может быть модифицирован так, чтобы он кодировал и экспрессировал представляющий интерес генный продукт, но был инактивирован с точки зрения его способности реплицироваться в нормальном литическом жизненном цикле вируса. Подходящие аденовирусные векторы, происходящие от штамма аденовируса Ad типа 5 (Ad5) или от других штаммов аденовируса (например, Ad2, Ad3, Ad7 и т.п.), известны специалистам в данной области.

[00124] В некоторых вариантах осуществления изобретения, вирусный вектор включает рекомбинантные аденоассоциированные вирусы (AAV). AAV представляют собой парвовирусы и имеют небольшие икосаэдрические вирионы и могут содержать одноцепочечную молекулу ДНК размером приблизительно 4,7 т.п.о. (например, приблизительно 4,5 т.п.о., 4,6 т.п.о., 4,8 т.п.о., 4,9 т.п.о. или 5,0 т.п.о.) или менее. Вирусы

содержат либо смысловую, либо антисмысловую цепь молекулы ДНК, и каждая цепь включена в вирион. Две открытые рамки считывания кодируют серию полипептидов Rep и Cap. Полипептиды Rep (например, Rep50, Rep52, Rep68 и Rep78) участвуют в репликации, «спасении» и интеграции генома AAV, хотя значительная активность может наблюдаться в отсутствие всех четырех полипептидов Rep. Белки Cap (например, VP1, VP2, VP3) образуют капсид вириона. Фланкирующие открытые рамки считывания гер и сар на 5'- и 3'-концах генома представляют собой инвертированные концевые повторы (ITR). Обычно, в рекомбинантных векторах AAV (гAAV), все области, кодирующие гер и сар, вырезают и заменяют представляющим интерес трансгеном.

[00125] Для продуцирования вируса, рекомбинантным векторам AAV обычно требуется только концевой(е) повтор(ы) (TR) в цис-ориентации. Все другие вирусные последовательности являются необязательными и могут иметь транс-ориентацию. Обычно, геном вектора гAAV будет сохранять только одну или несколько последовательностей TR, что позволит максимально увеличить размер трансгена, который может быть эффективно упакован вектором. Последовательности, кодирующие структурные и неструктурные белки, могут находиться в транс-ориентации (например, они могут происходить от вектора, такого как плаزمид или могут образовываться посредством стабильной интеграции последовательностей в упаковывающую клетку). В некоторых вариантах осуществления изобретения, геном вектора гAAV содержит по меньшей мере одну последовательность концевого повтора (TR) (например, последовательность AAV TR), и необязательно два TR (например, два AAV TR), которые обычно будут находиться на 5'- и 3'-концах векторного генома и будут фланкировать гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты, но не обязательно будут смежными с ней. TR могут быть одинаковыми или различными.

[00126] Термин «концевой повтор» или «TR» включает любой концевой вирусный повтор или синтетическую последовательность, которая образует структуру шпильки и функционирует как инвертированный концевой повтор (то есть, опосредует желаемые функции, такие как репликация, упаковка вируса, интеграция и/или «спасение» провируса и т.п.). TR может представлять собой AAV TR или не-AAV TR. Так, например, последовательность TR, отличающаяся от AAV, такая как последовательности других парвовирусов (например, собачьего парвовируса (CPV), мышиноного парвовируса (MVM), парвовируса человека B-19) или любая другая подходящая последовательность вируса (например, шпилька SV40, которая служит в качестве ориджина репликации SV40) могут быть использованы в качестве TR, который может быть дополнительно модифицирован путем усечения, замены, делеции, инсерции и/или добавления. Кроме того, TR может быть частично или полностью синтетическим, например, он представлять собой последовательность «DD».

[00127] «Концевой повтор AAV» или «TR AAV» может происходить от любого AAV, включая, но не ограничиваясь ими, серотипы 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или 11 или любой другой AAV, который уже известен или будет обнаружен позже. Концевой повтор

AAV необязательно должен иметь последовательность нативного концевого повтора (например, нативная последовательность TR AAV может быть модифицирована путем инсерции, делеции, усечения и/или миссенс-мутаций), при условии, что концевой повтор будет опосредовать желаемые функции, например, репликацию, упаковку вирусов, интеграцию и/или «спасение» провирусов и т.п. В некоторых вариантах осуществления изобретения, вектор содержит фланкирующие ITR, происходящие от генома AAV2. ITR согласно изобретению могут иметь последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 18, или последовательность, которая по меньшей мере на 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности, представленной в SEQ ID NO:10 или SEQ ID NO: 18.

[00128] AAV дикого типа могут интегрировать свою ДНК в неделящиеся клетки и демонстрировать высокую частоту стабильной интеграции в человеческую хромосому 19. Геном вектора гAAV обычно содержит последовательности концевых повторов AAV и сигнал упаковки.

[00129] «Частица AAV» или «частица гAAV» включает геном вектора AAV или геном вектора гAAV, соответственно, упакованные в капсид AAV. Гены гер/сар AAV могут экспрессироваться в одной плазмиде. Последовательности гер и/или сар AAV могут быть представлены любым вирусным или невирусным вектором. Так, например, последовательности гер/сар могут быть представлены гибридным аденовирусным или герпесвирусным вектором (например, встроенным в области E1a или E3 deletированного аденовирусного вектора). Векторы EBV могут быть также использованы для экспрессии генов сар и гер AAV. Одним из преимуществ этого метода является то, что векторы EBV являются эписомными, но при этом, сохраняют большое число копий на протяжении всех последовательных делений клетки (то есть, стабильно интегрируются в клетку в качестве внехромосомных элементов, называемых «ядерной эписомой на основе EBV», см. Margolski (1992) Curr. Top. Microbiol. Immun. 158: 67). Гены гер и сар AAV могут происходить от любого серотипа AAV, для которого может быть получен рекомбинантный вирус, и могут происходить от серотипа AAV, отличающегося от ITR генома гAAV.

[00130] Однако, сам вектор гAAV необязательно должен содержать гены AAV, кодирующие белки капсида (сар) и Rep. В конкретных вариантах осуществления изобретения, гены гер и/или сар были удалены из генома AAV. В репрезентативном варианте осуществления изобретения, вектор гAAV сохраняет только концевые последовательности AAV (ITR), необходимые для интеграции, вырезания и репликации.

[00131] Источники генов капсида AAV могут включать отдельные природные серотипы, включая, но не ограничиваясь ими, AAV1, AAV2, AAV3 (включая 3a и 3b), AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV13, AAVrh39, AAVrh43, AAVcy.7, а также AAV крупного рогатого скота, козий AAV, собачий AAV, лошадиный AAV, овечий AAV, птичий AAV, AAV приматов, AAV не-приматов и любой другой вирус, классифицированный Международным Комитетом по

Таксономии Вирусов (ICTV) как AAV. В конкретных вариантах осуществления изобретения, капсиды AAV представляют собой химеры, созданные либо посредством эволюции капсида, либо путем рационального конструирования капсида из выделенных естественным образом вариантов AAV для сохранения желаемых свойств серотипа, таких как повышенный или специфический тканевый тропизм и «ускользание» от иммунного ответа хозяина, включая, но не ограничиваясь ими, AAV-DJ, AAV-NAE1, AAV-NAE2, AAVM41, AAV-1829, AAV2 Y/F, AAV2 T/V, AAV2i8, AAV2.5, AAV9.45, AAV9.61, AAV-B1, AAV-AS, AAV9.45A-String (например, AAV9.45-AS), AAV9.45Angiopep, AAV9.47-Angiopep и AAV9.47-AS, AAV-PHP.B, AAV-PHP.eB и AAV-PHP.S.

[00132] Соответственно, если в настоящей заявке упоминается конкретный капсидный белок AAV (например, капсидный белок AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV1 или AAV12), то подразумевается, что он также включает нативный капсидный белок, а также капсидные белки, которые имеют модификации, отличающиеся от модификаций согласно изобретению. Такие модификации включают замены, инсерции и/или делеции.

[00133] В некоторых вариантах осуществления изобретения, рекомбинантный вектор AAV выбран из группы, состоящей из AAV1, AAV8 или AAV9. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рекомбинантный вектор AAV содержит AAV9 из-за его способности легко преодолевать гематоэнцефалический барьер.

[00134] В некоторых вариантах осуществления изобретения, рекомбинантные вирусные векторы (например, rAAV) согласно изобретению обычно содержат один или более из следующих элементов, или состоят, или по существу состоят из них: (1) последовательность инвертированных концевых повторов (ITR); (2) промотор (например, нейрон-специфический промотор); (3) трансген (например, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую ATR1A3, его фрагмент, изоформу или гомолог); (4) терминатор транскрипции (например, сигнал полиаденилирования); и (5) фланкирующую последовательность инвертированного концевого повтора (ITR).

[00135] В некоторых вариантах осуществления изобретения, рекомбинантный вирусный вектор может содержать линкерную последовательность. Используемый здесь термин «линкерная последовательность» означает последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует короткую полипептидную последовательность. Линкерная последовательность может содержать по меньшей мере 6 нуклеотидов, по меньшей мере 15 нуклеотидов, 27 нуклеотидов или по меньшей мере 30 нуклеотидов. В некоторых вариантах осуществления изобретения, линкерная последовательность содержит от 6 до 27 нуклеотидов. В других вариантах осуществления изобретения, линкерная последовательность содержит 6 нуклеотидов, 15 нуклеотидов и/или 27 нуклеотидов. Линкерная последовательность может быть использована для соединения различных кодируемых элементов в векторных конструкциях. Так, например, трансген и метка Мус могут быть функционально связаны посредством линкера, или метка Мус и метка FLAG могут быть функционально связаны посредством линкера, или метка FLAG и метка

mCherry могут быть функционально связаны посредством линкера. Альтернативно, элементы вектора могут быть связаны непосредственно (например, не через линкер). Типичные линкерные последовательности представлены в Таблице 2:

[00136] **Таблица 2: Репрезентативные линкерные последовательности**

Линкерная последовательность (27 нуклеотидов)	ACCTACTACACGCGTACGCGGCCGC TC (SEQ ID NO:11)
Линкерная последовательность (15 нуклеотидов)	GCAGCAAATGATATCCTG (SEQ ID NO:13)
Линкерная последовательность (6 нуклеотидов)	GGATTC (SEQ ID NO:15)

[00137] В некоторых вариантах осуществления изобретения, векторы согласно изобретению могут содержать флуоресцентные белковые метки (например, mCherry, sfGFP и mKikGR) и/или эпитопные метки (например, HA, Мус, FLAG).

[00138] В некоторых вариантах осуществления изобретения, метка mCherry может кодироваться последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной в SEQ ID NO: 16, или последовательностью, которая по меньшей мере на 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности, представленной в SEQ ID NO: 16.

[00139] В некоторых вариантах осуществления изобретения, метка Мус может кодироваться последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной в SEQ ID NO: 12, или последовательностью, которая по меньшей мере на 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности, представленной в SEQ ID NO: 12.

[00140] В некоторых вариантах осуществления изобретения, метка FLAG может кодироваться последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной в SEQ ID NO: 14, или последовательностью, которая по меньшей мере на 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности, представленной в SEQ ID NO: 14.

[00141] В других вариантах осуществления изобретения, векторы могут содержать, но необязательно, саморасщепляющийся пептид 2A (пептид 2A), который принадлежит к классу пептидов, длина которых может составлять приблизительно 18-22 аминокислоты, и которые могут индуцировать расщепление рекомбинантного белка в клетке. Примерами пептидов 2A являются, но не ограничиваются ими, P2A, E2A, F2A и T2A. В некоторых вариантах осуществления изобретения, пептид 2A может представлять собой P2A. В некоторых вариантах осуществления изобретения, P2A может кодироваться последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной в SEQ ID NO: 22, или последовательностью, которая по меньшей мере на 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности, представленной в SEQ ID NO: 22.

[00142] В некоторых вариантах осуществления изобретения, пептид 2A может быть объединен с элементом внутреннего сайта связывания с рибосомой (IRES), что позволяет получить четыре отдельных пептида в одном транскрипте. Элементы IRES могут быть расположены в 5'UTR, но они также могут находиться и в другом положении последовательности нуклеиновой кислоты.

[00143] В некоторых вариантах осуществления изобретения, векторы согласно изобретению содержат, но необязательно, интрон. В других вариантах осуществления изобретения, векторы согласно изобретению не содержат интрон.

[00144] В одном варианте осуществления изобретения, рекомбинантный вектор AAV содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую ATP1A3.

[00145] В некоторых вариантах осуществления изобретения, активный вектор содержит конструкцию, представленную на фиг. 1.

[00146] В некоторых вариантах осуществления изобретения, активный вектор содержит AAV9-pBK828-ATP1A3-cherry (также упоминаемый здесь как AAV9-hSyn-ATP1A3-FLAG-p2a-Cherry-SV40polyA или AAV9-ATP1A3-Cherry или активный вектор) (фиг. 2). Вектор AAV9-hSyn-ATP1A3-FLAG-p2a-Cherry-SV40polyA согласно изобретению может содержать ITR, человеческий промотор Syn, открытую рамку считывания ATP1A3 (OPC), одну или более эпитопных меток (например, метку Мус или метку FLAG), последовательность P2A, одну или более флуоресцентных меток (например, метку mCherry), хвост PolyA Sv40 и фланкирующий ITR (фиг.1). Вектор AAV9-hSyn-ATP1A3-FLAG-p2a-Cherry-SV40polyA также может содержать одну или более линкерных последовательностей между элементами.

[00147] В некоторых вариантах осуществления изобретения, вектор AAV9-hSyn-ATP1A3-FLAG-p2a-Cherry-SV40polyA может содержать нижеследующие элементы, функционально связанные в указанном порядке от 5' до 3': AAV-ITR, человеческий промотор Syn, трансген ATP1A3, линкерную последовательность, метку Мус, линкерную последовательность, метку FLAG, линкерную последовательность, последовательность p2A, линкерную последовательность, метку mCherry, последовательность PolyA Sv40 и AAV-ITR.

[00148] Активный вектор может содержать последовательность нуклеиновой кислоты, представленную в SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 или SEQ ID NO: 21, или последовательность, которая по меньшей мере на 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности, представленной в SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 или SEQ ID NO: 21.

[00149] В другом варианте осуществления изобретения, рекомбинантный контрольный вектор AAV может содержать AAV9-hSyn-mCherry-pBK292-9 (фиг. 3). Этот вектор, не содержащий трансгена, может быть использован в качестве контрольного вектора для вектора AAV9-pBK828-ATP1A3-cherry.

[00150] **Таблица 3: Конструкции нуклеиновых кислот**

Конструкция нуклеиновой кислоты, содержащая нижеследующие элементы в указанном порядке от 5' до 3': AAV-ITR, промотор hSyn, АТР1А3, линкер, метку Мус, линкер, метку Flag, линкер, mCherry, Sv40 PolyA, AAV-ITR	TCCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCCG GGCAAAGTCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTC AGTGAGCGAGCGAGCTGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCAT CACTAGGGGGTTCTAGTGCAAGTGGGTTTTTAGGACCAGGATG AGGCGGGGTGGGGGTGCCTACCTGACGACCGACCCCGGACCCA CTGGACAAGCACCCAACCCCCATTCCCCAAATTGCGCATCCCCT AATCAGAGAGGGGGAGGGGAAACAGGATGCGGCGAGGCGCGT GCGCACTGCCAAGCTTCAGCACCGCGGACAGTGCCTTCGCCCCC GCCTGGCGGCGCGCGCCCACCGCCGCTCAGCACTGAAGGCGC GCTGACGTCACTCGCCGGTCCCCCGACAACTCCCCTTCCCGGC CACCTTGGTCGCGTCCGCGCCGCGCCGGCCCCAGCCGGACCG CACACGCGAGGCGCGAGATAGGGGGGACGGGGCGCGACCCA TCTGCGCTGCGGCGCCGGCGACTCAGCGCTGCCTCAGTCTGCGG TGGGCAAGCGGAGGAGTCGTGTCGTGCCTGAGAGCGCAGTCGA GAAGGTACCGAGGAGATCTGCCGCCATGGGGGACAAGAAAGA TGACAAGGACTCACCCAAGAAGAACAAGGGCAAGGAGCGCCG GGACCTGGATGACCTCAAGAAGGAGGTGGCTATGACAGAGCAC AAGATGTCAGTGGAAGAGGTCTGCCGGAATACAACACAGACT GTGTGCAGGGTTTGACCCACAGCAAAGCCCAGGAGATCCTGGC CCGGGATGGGCCTAACGCACTCACGCCACCGCCTACCACCCCA GAGTGGGTCAAGTTTTGCCGGCAGCTCTTCGGGGGGCTTCTCCAT CCTGCTGTGGATCGGGGCTATCCTCTGCTTCCTGGCCTACGGTA TCCAGGCGGGCACCGAGGACGACCCCTCTGGTGACAACCTGTA CCTGGGCATCGTGCTGGCGGCCGTGGTGATCATCACTGGCTGCT TCTCCTACTACCAGGAGGCCAAGAGCTCCAAGATCATGGAGTC CTTCAAGAACATGGTGCCCCAGCAAGCCCTGGTGATCCGGGAA GGTGAGAAGATGCAGGTGAACGCTGAGGAGGTGGTGGTCGGG GACCTGGTGGAGATCAAGGGTGGAGACCGAGTGCCAGCTGACC TGCGGATCATCTCAGCCCACGGCTGCAAGGTGGACAACCTCCTCC CTGACTGGCGAATCCGAGCCCCAGACTCGCTCTCCCGACTGCAC GCACGACAACCCCTTGGAGACTCGGAACATCACCTTCTTTTCCA CCAAGTGTGTGGAAGGCACGGCTCGGGGCGTGGTGGTGGCCAC GGGCGACCGCACTGTCATGGGCCGTATCGCCACCCTGGCATCA GGGCTGGAGGTGGGCAAGACGCCCATCGCCATCGAGATTGAGC ACTTCATCCAGCTCATCACCGGCGTGGCTGTCTTCTGGGTGTC
--	---

TCCTTCTTCATCCTCTCCCTCATTCTCGGATACACCTGGCTTGAG
 GCTGTCATCTTCCTCATCGGCATCATCGTGGCCAATGTCCCAGA
 GGGTCTGCTGGCCACTGTCACTGTGTGTCTGACGCTGACCGCCA
 AGCGCATGGCCCGGAAGAACTGCCTGGTGAAGAACCTGGAGGC
 TGTAGAAACCCTGGGCTCCACGTCCACCATCTGCTCAGATAAGA
 CAGGGACCCTCACTCAGAACCGCATGACAGTCGCCCACATGTG
 GTTTGACAACCAGATCCACGAGGCTGACACCACTGAGGACCAG
 TCAGGGACCTCATTTGACAAGAGTTCGCACACCTGGGTGGCCCT
 GTCTCACATCGCTGGGCTCTGCAATCGCGCTGTCTTCAAGGGTG
 GTCAGGACAACATCCCTGTGCTCAAGAGGGATGTGGCTGGGGA
 TGCGTCTGAGTCTGCCCTGCTCAAGTGCATCGAGCTGTCCTCTG
 GCTCCGTGAAGCTGATGCGTGAACGCAACAAGAAAGTGGCTGA
 GATTCCCTTCAATTCCACCAACAAATACCAGCTCTCCATCCATG
 AGACCGAGGACCCCAACGACAACCGATACCTGCTGGTGATGAA
 GGGTGCCCCCGAGCGCATCCTGGACCGCTGCTCCACCATCCTGC
 TACAGGGCAAGGAGCAGCCTCTGGACGAGGAAATGAAGGAGG
 CCTTCCAGAATGCCTACCTTGAGCTCGGTGGCCTGGGCGAGCGC
 GTGCTTGGTTTCTGCCATTATTACCTGCCCCGAGGAGCAGTTCCC
 CAAGGGCTTTGCCTTCGACTGTGATGACGTGAACTTCACCACGG
 ACAACCTCTGCTTTGTGGGCCTCATGTCCATGATCGACCCACCC
 CGGGCAGCCGTCCCTGACGCGGTGGGCAAGTGTGCGCAGCGCAG
 GCATCAAGGTCATCATGGTCAACGGCGATCACCCCATCACGGC
 CAAGGCCATTGCCAAGGGTGTGGGCATCATCTCTGAGGGCAAC
 GAGACTGTGGAGGACATCGCCGCCCCGGCTCAACATTCCCGTCA
 GCCAGGTAAACCCCCGGGATGCCAAGGCCTGCGTGATCCACGG
 CACCGACCTCAAGGACTTCACCTCCGAGCAAATCGACGAGATC
 CTGCAGAATCACACCGAGATCGTCTTCGCCCCGCACATCCCCCA
 GCAGAAGCTCATCATTGTGGAGGGCTGTCAGAGACAGGGTGCA
 ATTGTGGCTGTGACCGGGGATGGTGTGAACGACTCCCCCGCTCT
 GAAGAAGGCCGACATTGGGGTGGCCATGGGCATCGCTGGCTCT
 GACGTCTCCAAGCAGGCAGCTGACATGATCCTGCTGGACGACA
 ACTTTGCCTCCATCGTCACAGGGGTGGAGGAGGGCCGCCTGAT
 CTTCGACAACCTAAAGAAGTCCATTGCCTACACCCTGACCAGCA
 ATATCCCGGAGATCACGCCCTTCCTGCTGTTTCATCATGGCCAAC
 ATCCCGCTGCCCCCTGGGCACCATCACCATCCTCTGCATCGATCT

GGGCACTGACATGGTCCCTGCCATCTCACTGGCGTACGAGGCTG
 CCGAAAGCGACATCATGAAGAGACAGCCCAGGAACCCGCGGA
 CGGACAAATTGGTCAATGAGAGACTCATCAGCATGGCCTACGG
 GCAGATTGGAATGATCCAGGCTCTCGGTGGCTTCTTCTTACT
 TTGTGATCCTGGCAGAAAATGGCTTCTTGCCCGGCAACCTGGTG
 GGCATCCGGCTGAACTGGGATGACCGCACCGTCAATGACCTGG
 AAGACAGTTACGGGCAGCAGTGGACATACGAGCAGAGGAAGG
 TGGTGGAGTTCACCTGCCACACGGCCTTCTTTGTGAGCATCGTT
 GTCGTCCAGTGGGCCGATCTGATCATCTGCAAGACCCGGAGGA
 ACTCGGTCTTCCAGCAGGGCATGAAGAACAAGATCCTGATCTTC
 GGGCTGTTTGAGGAGACGGCCCTGGCTGCCTTCCTGTCCTACTG
 CCCC GG CATGGACGTGGCCCTGCGCATGTACCCTCTCAAGCCCA
 GCTGGTGGTTCTGTGCCTTCCCCTACAGTTTCCTCATCTTCGTCT
 ACGACGAAATCCGCAAACCTCATCCTGCGCAGGAACCCAGGGGG
 TTGGGTGGAGAAGGAAAACCTACTACACGCGTACGCGGCCGCT
 CGAGCAGAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGGCAGCAAATGAT
 ATCCTGGATTACAAGGATGACGACGATAAAGGATTCGTGAGCA
 AGGGCGAGGAGGATAACATGGCCATCATCAAGGAGTTCATGCG
 CTTCAAGGTGCACATGGAGGGGCTCCGTGAACGGCCACGAGTTC
 GAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCCGCCCCTACGAGGGCACC
 CAGACCGCCAAGCTGAAGGTGACCAAGGGTGGCCCCCTGCCCT
 TCGCCTGGGACATCCTGTCCCCTCAGTTCATGTACGGCTCCAAG
 GCCTACGTGAAGCACCCCGCCGACATCCCCGACTACTTGAAGCT
 GTCCTTCCCCGAGGGCTTCAAGTGGGAGCGCGTGATGAACTTCG
 AGGACGGCGGCGTGGTGACCGTGACCCAGGACTCCTCCCTGCA
 GGACGGCGAGTTCATCTACAAGGTGAAGCTGCGCGGCACCAAC
 TTCCCCTCCGACGGCCCCGTAATGCAGAAGAAGACCATGGGCT
 GGGAGGCCTCCTCCGAGCGGATGTACCCCGAGGACGGCGCCCT
 GAAGGGCGAGATCAAGCAGAGGCTGAAGCTGAAGGACGGCGG
 CCACTACGACGCTGAGGTCAAGACCACCTACAAGGCCAAGAAG
 CCCGTGCAGCTGCCCCGGCGCCTACAACGTCAACATCAAGTTGG
 ACATCACCTCCCACAACGAGGACTACACCATCGTGGAACAGTA
 CGAACGCGCCGAGGGCCGCGCCACTCCACCGGCGGCATGGACGAG
 CTGTACAAGTAATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCAC
 AACTAGAATGCAGTGAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTG

	ATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTAATAAGCTGCAATAAACAAGTTAGGAACCCCTAGTGATTGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGTGACCAAAGGTCGCCCCGACGCCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGTCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG (SEQ ID NO:19)
Конструкция нуклеиновой кислоты, содержащая нижеследующие элементы в указанном порядке от 5' до 3': AAV-ITR, промотор hSyn, ATP1A3, линкер, метку Мус, линкер, метку Flag, линкер, p2a, линкер, mCherry, Sv40 PolyA, AAV-ITR	TCCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCCGGCAAAGTCCCGGGCGTTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCTGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCTAGTGCAAGTGGGTTTTTTAGGACCAGGATGAGGCGGGGTGGGGGTGCCTACCTGACGACCGACCCCGGACCCA CTGGACAAGCACCCAACCCCCATTCCCCAAATTGCGCATCCCCTAATCAGAGAGGGGGAGGGGAAACAGGATGCGGCGAGGCGCGTGCGCACTGCCAAGCTTCAGCACCGCGGACAGTGCCTTCGCCCCCGCCTGGCGGCGCGCGCCCCACCGCCGCTCAGCACTGAAGGCGCGCTGACGTCACTCGCCGGTCCCCCGACAACTCCCCTTCCCGGCCACCTTGGTCGCGTCCGCGCCGCGCCGGCCCCAGCCGGACCGCACACGCGAGGCGCGAGATAGGGGGGACGGGCGCGACCCA TCTGCGCTGCGGCGCCGGCGACTCAGCGCTGCCTCAGTCTGCGGTGGGCAAGCGGAGGAGTCGTGTCTGCTGAGAGCGCAGTCGA GAAGGTACCGAGGAGATCTGCCGCCATGGGGGACAAGAAAGATGACAAGGACTCACCCAAGAAGAACAAGGGCAAGGAGCGCCGGGACCTGGATGACCTCAAGAAGGAGGTGGCTATGACAGAGCAC AAGATGTCAGTGGAAGAGGTCTGCCGGAAATACAACACAGACTGTGTGCAGGGTTTGACCCACAGCAAAGCCCAGGAGATCCTGGCCGGGATGGGCCTAACGCACTCACGCCACCGCCTACCACCCCA GAGTGGGTCAAGTTTTGCCGGCAGCTCTTCGGGGGGCTTCTCCATCCTGCTGTGGATCGGGGCTATCCTCTGCTTCCTGGCCTACGGTATCCAGGCGGGCACCGAGGACGACCCCTCTGGTGACAACCTGTACCTGGGCATCGTGCTGGCGGCCGTGGTGATCATCACTGGCTGCTTCTCCTACTACCAGGAGGCCAAGAGCTCCAAGATCATGGAGTCTTCAAGAACATGGTGCCCCAGCAAGCCCTGGTGATCCGGGGAAGGTGAGAAGATGCAGGTGAACGCTGAGGAGGTGGTGGTCGGGGACCTGGTGAGATCAAGGGTGGAGACCGAGTGCCAGCTGACCTGCGGATCATCTCAGCCCACGGCTGCAAGGTGGACAACCTCCTCCCTGACTGGCGAATCCGAGCCCCAGACTCGCTCTCCCGACTGCAC

GCACGACAACCCCTTGGAGACTCGGAACATCACCTTCTTTTCCA
 CCAACTGTGTGGAAGGCACGGCTCGGGGCGTGGTGGTGGCCAC
 GGGCGACCGCACTGTCATGGGCCGTATCGCCACCCTGGCATCA
 GGGCTGGAGGTGGGCAAGACGCCCATCGCCATCGAGATTGAGC
 ACTTCATCCAGCTCATCACCGGCGTGGCTGTCTTCCTGGGTGTC
 TCCTTCTTCATCCTCTCCCTCATTCTCGGATACACCTGGCTTGAG
 GCTGTCATCTTCCTCATCGGCATCATCGTGGCCAATGTCCCAGA
 GGGTCTGCTGGCCACTGTCACTGTGTGTCTGACGCTGACCGCCA
 AGCGCATGGCCCGGAAGAACTGCCTGGTGAAGAACCTGGAGGC
 TGTAGAAACCCTGGGCTCCACGTCCACCATCTGCTCAGATAAGA
 CAGGGACCCTCACTCAGAACCGCATGACAGTCGCCCACATGTG
 GTTTGACAACCAGATCCACGAGGCTGACACCACTGAGGACCAG
 TCAGGGACCTCATTTGACAAGAGTTCGCACACCTGGGTGGCCCT
 GTCTCACATCGCTGGGCTCTGCAATCGCGCTGTCTTCAAGGGTG
 GTCAGGACAACATCCCTGTGCTCAAGAGGGATGTGGCTGGGGA
 TGCGTCTGAGTCTGCCCTGCTCAAGTGCATCGAGCTGTCCTCTG
 GCTCCGTGAAGCTGATGCGTGAACGCAACAAGAAAGTGGCTGA
 GATTCCCTTCAATTCCACCAACAAATACCAGCTCTCCATCCATG
 AGACCGAGGACCCCAACGACAACCGATACCTGCTGGTGATGAA
 GGGTGCCCCCGAGCGCATCCTGGACCGCTGCTCCACCATCCTGC
 TACAGGGCAAGGAGCAGCCTCTGGACGAGGAAATGAAGGAGG
 CCTTCCAGAATGCCTACCTTGAGCTCGGTGGCCTGGGCGAGCGC
 GTGCTTGGTTTCTGCCATTATTACCTGCCCCGAGGAGCAGTTCCC
 CAAGGGCTTTGCCTTCGACTGTGATGACGTGAACTTCACCACGG
 ACAACCTCTGCTTTGTGGGCCTCATGTCCATGATCGACCCACCC
 CGGGCAGCCGTCCCTGACGCGGTGGGCAAGTGTGCGCAGCGCAG
 GCATCAAGGTCATCATGGTCACCGGCGATCACCCCATCACGGC
 CAAGGCCATTGCCAAGGGTGTGGGCATCATCTCTGAGGGCAAC
 GAGACTGTGGAGGACATCGCCGCCCGGCTAACATTCCCGTCA
 GCCAGGTTAACCCCCGGGATGCCAAGGCCTGCGTGATCCACGG
 CACCGACCTCAAGGACTTCACCTCCGAGCAAATCGACGAGATC
 CTGCAGAATCACACCGAGATCGTCTTCGCCCCGCACATCCCCCA
 GCAGAAGCTCATCATTGTGGAGGGCTGTCAGAGACAGGGTGCA
 ATTGTGGCTGTGACCGGGGATGGTGTGAACGACTCCCCCGCTCT
 GAAGAAGGCCGACATTGGGGTGGCCATGGGCATCGCTGGCTCT

GACGTCTCCAAGCAGGCAGCTGACATGATCCTGCTGGACGACA
 ACTTTGCCTCCATCGTCACAGGGGTGGAGGAGGGCCGCCTGAT
 CTTCGACAACCTAAAGAAGTCCATTGCCTACACCCTGACCAGCA
 ATATCCCGGAGATCACGCCCTTCTGCTGTTTCATCATGGCCAAC
 ATCCCGCTGCCCCTGGGCACCATCACCATCCTCTGCATCGATCT
 GGGCACTGACATGGTCCCTGCCATCTCACTGGCGTACGAGGCTG
 CCGAAAGCGACATCATGAAGAGACAGCCCAGGAACCCGCGGA
 CGGACAAATTGGTCAATGAGAGACTCATCAGCATGGCCTACGG
 GCAGATTGGAATGATCCAGGCTCTCGGTGGCTTCTTCTCTTACT
 TTGTGATCCTGGCAGAAAATGGCTTCTTGCCCGGCAACCTGGTG
 GGCATCCGGCTGAACTGGGATGACCGCACCGTCAATGACCTGG
 AAGACAGTTACGGGCAGCAGTGGACATACGAGCAGAGGAAGG
 TGGTGGAGTTCACCTGCCACACGGCCTTCTTTGTGAGCATCGTT
 GTCGTCCAGTGGGCCGATCTGATCATCTGCAAGACCCGGAGGA
 ACTCGGTCTTCCAGCAGGGCATGAAGAACAAGATCCTGATCTTC
 GGGCTGTTTGAGGAGACGGCCCTGGCTGCCTTCTGTCCTACTG
 CCCCGGCATGGACGTGGCCCTGCGCATGTACCCTCTCAAGCCCA
 GCTGGTGGTTCTGTGCCTTCCCCTACAGTTTCCTCATCTTCGTCT
 ACGACGAAATCCGCAAACCTCATCCTGCGCAGGAACCCAGGGGG
 TTGGGTGGAGAAGGAAAACCTACTACACGCGTACGCGGCCGCT
 CGAGCAGAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGGCAGCAAATGAT
 ATCCTGGATTACAAGGATGACGACGATAAAGGATTCGCCACGA
 ACTTCTCTCTGTAAAGCAAGCAGGAGACGTGGAAGAAAACCC
 CGGTCCCGGATTTCGTGAGCAAGGGCGAGGAGGATAACATGGCC
 ATCATCAAGGAGTTCATGCGCTTCAAGGTGCACATGGAGGGCT
 CCGTGAACGGCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGG
 GCCGCCCCTACGAGGGCACCCAGACCGCCAAGCTGAAGGTGAC
 CAAGGGTGGCCCCCTGCCCTTCGCCTGGGACATCCTGTCCCCTC
 AGTTCATGTACGGCTCCAAGGCCTACGTGAAGCACCCCGCCGA
 CATCCCCGACTACTTGAAGCTGTCCTTCCCCGAGGGCTTCAAGT
 GGGAGCGCGTGATGAACTTCGAGGACGGCGGCGTGGTGACCGT
 GACCCAGGACTCCTCCCTGCAGGACGGCGAGTTCATCTACAAG
 GTGAAGCTGCGCGGCACCAACTTCCCCTCCGACGGCCCCGTAAT
 GCAGAAGAAGACCATGGGCTGGGAGGCCTCCTCCGAGCGGATG
 TACCCCGAGGACGGCGCCCTGAAGGGCGAGATCAAGCAGAGGC

	TGAAGCTGAAGGACGGCGGCCACTACGACGCTGAGGTCAAGAC CACCTACAAGGCCAAGAAGCCCGTGCAGCTGCCCCGGCGCCTAC AACGTCAACATCAAGTTGGACATCACCTCCCACAACGAGGACT ACACCATCGTGGAACAGTACGAACGCGCCGAGGGCCGCCACTC CACCGGCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAATAAGATACATTG ATGAGTTTGGACAAACCACAACCTAGAATGCAGTGAAAAAATG CTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCAT TATAAGCTGCAATAAACAAGTTAGGAACCCCTAGTGATTGGAG TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGG GTCGACCAAAGGTCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGC CTCAGTGAGTCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG (SEQ ID NO:20)
Конструкция нуклеиновой кислоты, содержащая нижеследующие элементы в указанном порядке от 5' до 3': промотор hSyn и ATP1A3	AGTGCAAGTGGGTTTTTAGGACCAGGATGAGGCGGGGTGGGGG TGCTACCTGACGACCGACCCCGGACCCACTGGACAAGCACCC AACCCCCATTCCCCAAATTGCGCATCCCCTAATCAGAGAGGGG GAGGGGAAACAGGATGCGGCGAGGCGCGTGCGCACTGCCAAG CTTCAGCACCGCGGACAGTGCCTTCGCCCCCGCCTGGCGGGCGCG CGCCACCGCCGCTCAGCACTGAAGGCGCGCTGACGTCCTC GCCGGTCCCCCGACAACTCCCCTTCCCGGCCACCTTGGTCGCG TCCGCGCCGCCGCGGCCCGAGCCGGACCGCACACGCGAGGC GCGAGATAGGGGGGCACGGGCGCGACCCATCTGCGCTGCGGCG CCGGCGACTCAGCGCTGCCTCAGTCTGCGGTGGGCAAGCGGAG GAGTCGTGTCGTGCCTGAGAGCGCAGTCGAGAAGGTACCGAGG AGATCTGCCGCCATGGGGGACAAGAAAGATGACAAGGACTCAC CCAAGAAGAACAAGGGCAAGGAGCGCCGGGACCTGGATGACC TCAAGAAGGAGGTGGCTATGACAGAGCACAAGATGTCAGTGGA AGAGGTCTGCCGGAATAACAACACAGACTGTGTGCAGGGTTTG ACCCACAGCAAAGCCCAGGAGATCCTGGCCCCGGGATGGGCCTA ACGCACTCACGCCACCGCCTACCACCCCAGAGTGGGTCAAGTTT TGCCGGCAGCTCTTCGGGGGCTTCTCCATCCTGCTGTGGATCGG GGCTATCCTCTGCTTCCTGGCCTACGGTATCCAGGCGGGCACCG AGGACGACCCCTCTGGTGACAACCTGTACCTGGGCATCGTGCTG GCGGCCGTGGTGATCATCACTGGCTGCTTCTCCTACTACCAGGA GGCCAAGAGCTCCAAGATCATGGAGTCCTTCAAGAACATGGTG CCCCAGCAAGCCCTGGTGATCCGGGAAGGTGAGAAGATGCAGG

TGAACGCTGAGGAGGTGGTGGTCGGGGACCTGGTGGAGATCAA
 GGGTGGAGACCGAGTGCCAGCTGACCTGCGGATCATCTCAGCC
 CACGGCTGCAAGGTGGACAACTCCTCCCTGACTGGCGAATCCG
 AGCCCCAGACTCGCTCTCCCGACTGCACGCACGACAACCCCTTG
 GAGACTCGGAACATCACCTTCTTTTCCACCAACTGTGTGGAAGG
 CACGGCTCGGGGCGTGGTGGTGGCCACGGGCGACCGCACTGTC
 ATGGGCCGTATCGCCACCCTGGCATCAGGGCTGGAGGTGGGCA
 AGACGCCCATCGCCATCGAGATTGAGCACTTCATCCAGCTCATC
 ACCGGCGTGGCTGTCTTCCTGGGTGTCTCCTTCTTCATCCTCTCC
 CTCATTCTCGGATACACCTGGCTTGAGGCTGTCATCTTCCTCATC
 GGCATCATCGTGGCCAATGTCCCAGAGGGTCTGCTGGCCACTGT
 CACTGTGTGTCTGACGCTGACCGCCAAGCGCATGGCCCGGAAG
 AACTGCCTGGTGAAGAACCTGGAGGCTGTAGAAACCCTGGGCT
 CCACGTCCACCATCTGCTCAGATAAGACAGGGACCCTCACTCA
 GAACCGCATGACAGTCGCCCACATGTGGTTTGACAACCAGATC
 CACGAGGCTGACACCACTGAGGACCAGTCAGGGACCTCATTG
 ACAAGAGTTCGCACACCTGGGTGGCCCTGTCTCACATCGCTGGG
 CTCTGCAATCGCGCTGTCTTCAAGGGTGGTCAGGACAACATCCC
 TGTGCTCAAGAGGGATGTGGCTGGGGATGCGTCTGAGTCTGCC
 CTGCTCAAGTGCATCGAGCTGTCCTCTGGCTCCGTGAAGCTGAT
 GCGTGAACGCAACAAGAAAGTGGCTGAGATTCCCTTCAATTCC
 ACCAACAATAACCAGCTCTCCATCCATGAGACCGAGGACCCCA
 ACGACAACCGATACCTGCTGGTGATGAAGGGTGCCCCCGAGCG
 CATCCTGGACCGCTGCTCCACCATCCTGCTACAGGGCAAGGAG
 CAGCCTCTGGACGAGGAAATGAAGGAGGCCTTCCAGAATGCCT
 ACCTTGAGCTCGGTGGCCTGGGCGAGCGCGTGCTTGGTTTCTGC
 CATTATTACCTGCCCCGAGGAGCAGTTCCCCAAGGGCTTTGCCTT
 CGACTGTGATGACGTGAACTTCACCACGGACAACCTCTGCTTTG
 TGGGCCTCATGTCCATGATCGACCCACCCCGGGCAGCCGTCCCT
 GACGCGGTGGGCAAGTGTCGCAGCGCAGGCATCAAGGTCATCA
 TGGTCACCGGCGATCACCCCATCACGGCCAAGGCCATTGCCAA
 GGGTGTGGGCATCATCTCTGAGGGCAACGAGACTGTGGAGGAC
 ATCGCCGCCCCGGCTCAACATTCCCGTCAGCCAGGTTAACCCCCG
 GGATGCCAAGGCCTGCGTGATCCACGGCACCGACCTCAAGGAC
 TTCACCTCCGAGCAAATCGACGAGATCCTGCAGAATCACACCG

	AGATCGTCTTCGCCCCGCACATCCCCCAGCAGAAGCTCATCATT GTGGAGGGCTGTCAGAGACAGGGTGCAATTGTGGCTGTGACCG GGGATGGTGTGAACGACTCCCCCGCTCTGAAGAAGGCCGACAT TGGGGTGGCCATGGGCATCGCTGGCTCTGACGTCTCCAAGCAG GCAGCTGACATGATCCTGCTGGACGACAACCTTTGCCTCCATCGT CACAGGGGTGGAGGAGGGCCGCCTGATCTTCGACAACCTAAAG AAGTCCATTGCCTACACCCTGACCAGCAATATCCCGGAGATCAC GCCCTTCCTGCTGTTTCATCATGGCCAACATCCCGCTGCCCCTGG GCACCATCACCATCCTCTGCATCGATCTGGGCACTGACATGGTC CCTGCCATCTCACTGGCGTACGAGGCTGCCGAAAGCGACATCA TGAAGAGACAGCCCAGGAACCCGCGGACGGACAAATTGGTCAA TGAGAGACTCATCAGCATGGCCTACGGGCAGATTGGAATGATC CAGGCTCTCGGTGGCTTCTTCTCTTACTTTGTGATCCTGGCAGA AAATGGCTTCTTGCCCGGCAACCTGGTGGGCATCCGGCTGAACT GGGATGACCGCACCGTCAATGACCTGGAAGACAGTTACGGGCA GCAGTGGACATACGAGCAGAGGAAGGTGGTGGAGTTCACCTGC CACACGGCCTTCTTTGTGAGCATCGTTGTCGTCCAGTGGGCCGA TCTGATCATCTGCAAGACCCGGAGGAACCTCGGTCTTCCAGCAG GGCATGAAGAACAAGATCCTGATCTTCGGGCTGTTTGAGGAGA CGGCCCTGGCTGCCTTCCTGTCCTACTGCCCCGGCATGGACGTG GCCCTGCGCATGTACCCTCTCAAGCCCAGCTGGTGGTTCTGTGC CTTCCCCTACAGTTTCCTCATCTTCGTCTACGACGAAATCCGCA AACTCATCCTGCGCAGGAACCCAGGGGGTTGGGTGGAGAAGGA AA (SEQ ID NO:21)
--	--

[00151] В других вариантах осуществления изобретения, рекомбинантный вектор AAV содержит AAV1. В одном варианте осуществления изобретения, рекомбинантный вектор AAV содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую ATP1A3, где указанный вектор содержит AAV1-pBK828-1-ATP1A3-cherry. Вектор AAV1-pBK828-1-ATP1A3-cherry может содержать ITR, человеческий промотор Syn, открытую рамку считывания (ОРС) ATP1A3, линкеры, метку Мус, метку FLAG, последовательность P2A, открытую рамку считывания mCherry, хвост PolyA Sv40 и фланкирующий ITR. В некоторых вариантах осуществления изобретения, вектор AAV1-pBK828-1-ATP1A3-cherry может содержать нижеследующие элементы, функционально связанные в указанном порядке от 5' до 3': AAV-ITR, человеческий промотор Syn, трансген ATP1A3, линкерную последовательность, метку Мус, линкерную последовательность, метку FLAG, линкерную последовательность, метку mCherry, последовательность Sv40 PolyA и AAV-

ITR.

[00152] В еще одном варианте осуществления изобретения, рекомбинантный вектор AAV содержит AAV1-hSyn-mCherry-pBK292-1, который не содержит трансгена и может быть использован в качестве контрольного вектора для вектора AAV1-pBK828-1-ATP1A3-cherry.

[00153] Используемый здесь термин «открытая рамка считывания (ОРС)» относится к частям рамки считывания, которые могут транслироваться. ОРС может представлять собой непрерывную цепь кодонов, которая начинается со старт-кодона (например, ATG) и заканчивается стоп-кодоном (например, TAA, TAG, TGA). Рамка считывания представляет собой последовательность нуклеотидов, которые считываются как кодоны, определяющие аминокислоты.

[00154] В некоторых вариантах осуществления изобретения, вектор AAV подвергают псевдотипированию, как это принято в практике создания гибридов определенных штаммов AAV в целях уточнения взаимодействия с нужными клетками-мишенями. Гибридный AAV может быть создан путем взятия капсида из одного штамма и генома из другого штамма. Так, например, AAV2/5, гибрид с геномом AAV2 и капсидом AAV5, может быть использован для достижения большей точности и диапазона в клетках головного мозга, чем это может быть достигнуто в случае негибридизованного AAV2. Получение псевдотипированного rAAV описано, например, в WO01/83692.

[00155] Также рассматриваются и другие типы вариантов rAAV, например, rAAV с мутациями капсида. См., например, Marsic et al., *Molecular Therapy*, 22 (11): 1900-1909 (2014). Следует отметить, что нуклеотидные последовательности геномов различных серотипов AAV известны специалистам в данной области.

[00156] Примеры рекомбинантного AAV, который может быть сконструирован так, чтобы он содержал молекулы нуклеиновой кислоты согласно изобретению, представлены в Международной патентной заявке № PCT/US2012/047999 (WO 2013/016352), которая в полном объеме включена в настоящее описание посредством ссылки.

[00157] Для получения векторов AAV может быть применен любой подходящий метод, известный специалистам в данной области. В одном конкретном способе, исходные штаммы AAV могут быть получены путем котрансфекции векторной плазмиды гер/сар, кодирующей функции упаковки AAV, и векторной плазмиды, содержащей рекомбинантный геном AAV, в клетки человека, инфицированные аденовирусом-помощником. Общие принципы получения рекомбинантных AAV рассмотрены, например, в публикациях Carter, 1992, *Current Opinions in Biotechnology*, 1533-539; and Muzyczka, (1992) *Curr. Topics in Microbial. and Immunol.*, 158:97-129). Различные подходы описаны в публикациях Ratschin et al., *Mol. Cell. Biol.* 4:2072 (1984); Hermonat et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6466 (1984); Tratschin et al., *Mol. Cell. Biol.* 5:3251 (1985); McLaughlin et al., *J. Virol.*, 62:1963 (1988); и Lebkowski et al., 1988 *Mol. Cell. Biol.*, 7:349 (1988); Samulski et al. (1989, *J. Virol.*, 63:3822-3828); в патенте США No. 5173414; в патенте США No. 5658776; в WO 95/13392; WO 96/17947; WO 97/09441; WO 97/08298;

WO 97/21825; WO 97/06243; WO 99/11764; Perrin et al. (1995) *Vaccine* 13:1244-1250; Paul et al. (1993) *Human Gene Therapy* 4:609-615; Clark et al. (1996) *Gene Therapy* 3:1124-1132; в патентах США No. 5786211; 5871982 и 6258595. Вышеупомянутые документы в полном объеме включены в настоящее описание посредством ссылки, причем, особый акцент делается на те разделы документов, которые относятся к получению рекомбинантного AAV.

[00158] Рекомбинантные вирусные векторы (например, гAAV) могут быть очищены стандартными методами, такими как колоночная хроматография или центрифугирование в градиенте хлорида цезия. Способы очистки рекомбинантных вирусных векторов от вируса-помощника известны специалистам в данной области.

[00159] Нуклеиновая кислота, кодирующая АТР1А3, может быть доставлена в клетку любым способом, известны специалистам в данной области. Так, например, матрица может доставляться невирусным (например, плазмидным) или вирусным вектором.

[00160] Гены гер и/или сар AAV могут альтернативно обеспечиваться упаковывающей клеткой, которая стабильно экспрессирует эти гены. Метод создания упаковывающей клетки заключается в создании клеточной линии, которая стабильно экспрессирует все необходимые компоненты для продуцирования вирусных (например, AAV) частиц. Так, например, в одном варианте осуществления изобретения, плазида (или несколько плазмид), содержащая вирусный геном гAAV, не содержащий генов гер и сар AAV, гены гер и сар AAV, отделенные от генома гAAV, и селективный маркер, такой как ген резистентности к неомицину, интегрированы в геном клетки. Геномы AAV были введены в бактериальные плазмиды с помощью таких процедур, как образование GC-хвоста (Samulski et al., 1982, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79: 2077-2081), добавление синтетических линкеров, содержащих сайты расщепления рестриктирующими эндонуклеазами (Laughlin et al., 1983, *Gene*, 23: 65-73) или прямое лигирование с затуплением концов (Senapathy & Carter, 1984, *J. Biol. Chem.*, 259: 4661-4666). Затем упаковывающую клеточную линию инфицируют вирусом-помощником, таким как аденовирус. Преимущества этого метода заключаются в том, что клетки могут быть выбраны так, чтобы они подходили для крупномасштабного продуцирования гAAV. В других примерах подходящих способов, для введения геномов гAAV и/или генов гер и сар в упаковывающие клетки используют аденовирус или бакуловирус, но не плазмиды.

[00161] В одном варианте осуществления изобретения, упаковывающие клетки могут представлять собой стабильно трансформированные раковые клетки, такие как клетки HeLa, клетки 293 и клетки PerC.6 (родственная линия 293). В другом варианте осуществления изобретения, упаковывающие клетки представляют собой клетки, которые не являются трансформированными раковыми клетками, такие как клетки 293 с низким числом пересевов (клетки почек плода человека, трансформированные E1 аденовируса), клетки MRC-5 (фибробласты плода человека), клетки WI-38 (фибробласты плода человека), клетки Vero (клетки почек обезьяны) и клетки FRhL-2 (клетки легких плода

макак-резуса).

[00162] В других вариантах осуществления изобретения, вектор для доставки представляет собой гибридный вектор для доставки Ad-AAV. Вкратце, гибридный вектор Ad-AAV включает геном аденовирусного вектора, содержащий (i) 5'- и 3'-цис-элементы аденовируса для вирусной репликации и инкапсидации, и, кроме того, (ii) геном рекомбинантного вектора AAV, содержащий 5'- и 3'-инвертированные концевые повторы AAV (ITR), последовательность упаковки AAV и гетерологичную(ые) последовательность(и), фланкированную(ые) ITR AAV, где геном рекомбинантного вектора AAV фланкирован 5'- и 3'-цис-элементами аденовируса. Геном аденовирусного вектора может быть также deletирован как описано выше.

[00163] Другой вектор для использования в настоящем изобретении включает вирус простого герпеса (HSV). HSV может быть модифицирован для доставки трансгенов в клетки путем создания вектора, который обладает только латентной функцией, для длительного сохранения гена. Векторы HSV являются подходящими для доставки нуклеиновых кислот, поскольку они позволяют вводить крупную ДНК-вставку размером до или более 20 тысяч оснований и могут продуцироваться с очень высокими титрами, и как было показано, экспрессируют трансгены в течение длительного периода времени в центральной нервной системе при условии, что не будет происходить литический цикл.

[00164] Вирус герпеса может быть также использован в качестве вируса-помощника в способах упаковки AAV. Гибридные герпесвирусы, кодирующие белок (белки) AAV Rep, могут преимущественно способствовать созданию масштабируемых схем продуцирования вектора AAV. Был описан вектор гибридного вируса простого герпеса типа I (HSV-1), экспрессирующий гены гер и сар AAV-2 (Conway et al. (1999) Gene Therapy 6: 986 и WO 00/17377).

[00165] В других вариантах осуществления изобретения, представляющим интерес вектором для доставки является ретровирус. Ретровирусы обычно связываются с видоспецифическим рецептором клеточной поверхности, например, с CD4 (для ВИЧ); CAT (для MLV-E; экотропного вируса лейкоза мышей E); RAM1/GLVR2 (для вируса мышинового лейкоза A; MLV-A); GLVR1 (для вируса лейкоза человекообразных обезьян (GALV) и вируса лейкоза кошек B (FeLV-B)). Разработка специализированных клеточных линий (называемых «упаковывающими клетками»), которые продуцируют только ретровирусы, дефектные по репликации, позволяет с большим успехом применять ретровирусы для генотерапии, и такие дефектные ретровирусы были охарактеризованы на возможность их использования в переносе генов для генотерапии. Ретровирус с дефектом репликации может быть упакован в вирионы, которые могут быть использованы для заражения клетки-мишени с помощью вируса-помощника стандартными методами.

[00166] Еще одним подходящим вектором является лентивирусный вектор. Лентивирусы представляют собой подтип ретровирусов, но они обладают уникальной способностью инфицировать неделящиеся клетки и, следовательно, могут иметь широкий спектр потенциальных применений.

[00167] Еще одним подходящим вектором является поксвирусный вектор. Эти вирусы содержат более 100 белков. Внеклеточные формы такого вируса имеют две мембраны, а внутриклеточные частицы имеют только внутреннюю мембрану. Внешняя поверхность вируса состоит из липидов и белков, окружающих двояковогнутую сердцевину. Поксвирусы имеют очень сложную антигенную структуру, и после инфицирования, они индуцируют вырабатывание как специфических, так и перекрестно реагирующих антител. Поксвирус может инфицировать широкий спектр клеток. Экспрессия гена поксвируса хорошо изучена, поскольку она представляет интерес с точки зрения использования вируса осповакцины в качестве вектора для экспрессии трансгенов.

[00168] В другом репрезентативном варианте осуществления изобретения, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая ATR1A3, обеспечивается реплицирующимся вирусом rAAV. В других вариантах осуществления изобретения, провирус AAV, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую ATR1A3, может быть стабильно интегрирован в хромосому клетки.

[00169] Для повышения титров вируса, в клетку могут быть введены вирусы-помощники с определенными функциями (например, аденовирус или герпесвирус), которые способствуют продуктивному AAV-инфицированию. Последовательности вируса-помощника, необходимые для репликации AAV, известны специалистам в данной области. Обычно, эти последовательности обеспечиваются вектором вируса-помощника или герпесвируса. Альтернативно, последовательности аденовируса или герпесвируса могут обеспечиваться другим не-вирусным или вирусным вектором, например, в виде неинфекционной миниплазмиды аденовируса, которая несет все гены-помощники, способствующие эффективному продуцированию AAV.

[00170] Кроме того, функции вируса-помощника могут обеспечиваться упаковывающей клеткой с последовательностями помощника, встроенными в хромосому или поддерживаемыми в качестве стабильного внехромосомного элемента. Обычно, последовательности вируса-помощника не могут быть упакованы в вирионы AAV, например, они не фланкированы TR.

[00171] Помимо методов переноса вируса, таких как способы, проиллюстрированные выше, могут также применяться и невирусные методы. Многие невирусные методы переноса генов основаны на нормальных механизмах, используемых клетками млекопитающих для захвата и внутриклеточного транспорта макромолекул. В конкретных вариантах осуществления изобретения, невирусные системы доставки основаны на эндоцитарных путях захвата молекулы нуклеиновой кислоты клеткой-мишенью. Репрезентативные системы доставки нуклеиновых кислот этого типа включают системы, происходящие от липосом, конъюгаты полилизина и искусственные вирусные оболочки.

[00172] В конкретных вариантах осуществления изобретения, плазмидные векторы используют для практического осуществления настоящего изобретения. «Оголенные» плазмиды могут быть введены в клетки путем их инъекции в ткань. Экспрессия может

длиться в течение многих месяцев. Катионные липиды могут способствовать введению ДНК в некоторые клетки в культуре. Инъекция катионных липидных комплексов плазмидной ДНК в кровотоки мышей может приводить к экспрессии ДНК в органах (например, в легких). Одним из преимуществ плазмидной ДНК является то, что ее можно вводить в нереплицирующиеся клетки.

[00173] В репрезентативном варианте осуществления изобретения, молекула нуклеиновой кислоты (например, плазида) может быть захвачена липидной частицей, несущей положительные заряды на ее поверхности, и, необязательно, была помечена антителами против антигенов клеточной поверхности ткани-мишени.

[00174] Липосомы, которые состоят из амфифильных катионных молекул, являются подходящими невирусными векторами для доставки нуклеиновых кислот *in vitro* и *in vivo*. Считается, что положительно заряженные липосомы образуют комплекс с отрицательно заряженными нуклеиновыми кислотами посредством электростатических взаимодействий с образованием комплексов «липид:нуклеиновая кислота». Комплексы липид:нуклеиновая кислота имеют несколько преимуществ в качестве векторов для переноса генов. В отличие от вирусных векторов, комплексы липид:нуклеиновая кислота могут быть использованы для переноса экспрессионных кластеров практически неограниченного размера. Поскольку в этих комплексах отсутствуют белки, то они могут вызывать меньше иммуногенных и воспалительных реакций. Более того, они не могут реплицироваться или рекомбинировать с образованием инфекционного агента и имеют низкую частоту интеграции.

[00175] Комплексы «амфифильный катионный липид:нуклеиновая кислота» могут быть использованы для трансфекции *in vivo* как у животных, так и у человека, и они могут быть приготовлены для длительного хранения.

[00176] Кроме того, векторы согласно изобретению могут быть использованы в методах диагностики и скрининга, где нуклеиновая кислота, кодирующая ATR1A3, будет временно или стабильно экспрессироваться в системе культивирования клеток, или, альтернативно, в способах скрининга с применением трансгенного животного-модели, где представляющая интерес нуклеиновая кислота будет временно или стабильно экспрессироваться в системе культивирования клеток или, альтернативно, с применением трансгенного животного-модели.

[00177] Векторы согласно изобретению могут быть также использованы для различных нетерапевтических целей, включая, но не ограничиваясь ими, использование в протоколах для оценки нацеливания гена, клиренса, транскрипции, трансляции и т.п., как известно специалистам в данной области. Векторы могут быть также использованы для оценки безопасности (распространения, токсичности, иммуногенности и т.п.). Такие данные, например, рассматриваются Управлением по контролю качества пищевых продуктов и медикаментов США как предварительное одобрение Регуляторных Органов перед оценкой клинической эффективности.

[00178] **Способы генотерапии, фармацевтические препараты и способы**

ВВЕДЕНИЯ

[00179] В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к композиции, к фармацевтическому препарату, содержащему вектор, включающий трансген *АТФазы* (например, АТР1А3) и/или описанные здесь кластеры для экспрессии нуклеиновой кислоты, или состоящему или по существу состоящему из этого вектора.

[00180] В некоторых вариантах осуществления изобретения, композиции согласно изобретению содержат, состоят или по существу состоят из них: рекомбинантный вирусный вектор (например, гAAV) и/или фармацевтически приемлемый носитель и/или наполнитель, и, необязательно, другие лекарственные средства, фармацевтические средства, стабилизирующие агенты, буферы, носители, адъюванты, разбавители и т.п. В случае инъекции, носитель обычно является жидкостью. В других способах введения, носитель может быть твердым или жидким. Для введения путем ингаляции, носитель должен быть пригодным для вдыхания и может иметь, но необязательно, твердую или жидкую форму в виде частиц.

[00181] Под «фармацевтически приемлемым» подразумевается вещество, которое не является нежелательным с биологической или иной точки зрения, то есть, это вещество может быть введено индивидууму вместе с выделенной нуклеиновой кислотой или вектором, без каких-либо нежелательных биологических эффектов, таких как токсичность. Таким образом, такая фармацевтическая композиция может быть использована, например, для трансфекции клетки *ex vivo* или для введения выделенной нуклеиновой кислоты или вектора непосредственно индивидууму.

[00182] Композиции могут также включать другие ингредиенты, такие как разбавители и адъюванты. Приемлемые носители, разбавители и адъюванты являются нетоксичными для реципиентов, а предпочтительно инертными в используемых дозах и концентрациях и могут включать буферы, такие как фосфат, цитрат или другие органические кислоты; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота; низкомолекулярные полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатообразующие агенты, такие как EDTA; спирты ряда сахаров, такие как маннит или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как Твин, плюроники или полиэтиленгликоль (ПЭГ).

[00183] Фармацевтические носители, разбавители или наполнители, подходящие для инъекций, включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для немедленного приготовления стерильных растворов или дисперсий для инъекций. Во всех случаях, такая форма должна быть стерильной и должна быть жидкой до такой степени, чтобы ее можно было легко набрать в шприц. Такая форма должна быть стабильной в условиях приготовления и хранения и должна быть защищена от загрязняющих воздействий микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Носитель

может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащую, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль и т.п.), их подходящие смеси и растительные масла. Подходящую текучесть можно поддерживать, например, за счет использования покрытия, такого как лецитин, путем поддержания необходимого размера частиц в случае дисперсии, и за счет использования поверхностно-активных веществ. Предотвращение действия микроорганизмов может быть достигнуто с помощью различных антибактериальных и противогрибковых средств, например, парабенов, хлорбутанола, фенола, сорбиновой кислоты, тимеросала и т.п. Во многих случаях может оказаться предпочтительным включение изотонических агентов, например, сахаров или хлорида натрия. Продолжительное всасывание композиций для инъекций может быть достигнуто с использованием агентов, замедляющих абсорбцию, например, моностеарата алюминия и желатина.

[00184] В некоторых вариантах осуществления изобретения, стерильные растворы для инъекций готовят путем включения рекомбинантного вирусного вектора (например, rAAV) в необходимом количестве в соответствующем растворителе с различными другими ингредиентами, перечисленными выше, и при необходимости, с последующей стерилизацией фильтрованием. Обычно, дисперсии получают путем включения стерилизованного активного ингредиента в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных растворов для инъекций, предпочтительными способами приготовления являются вакуумная сушка и метод лиофилизации, которые позволяют получить порошок активного ингредиента плюс любой дополнительный желаемый ингредиент из предварительно стерильно отфильтрованного раствора.

[00185] Для внутримышечной инъекции могут быть использованы растворы в адьюванте, таком как кунжутное или арахисовое масло, или в водном пропиленгликоле, а также стерильные водные растворы. При желании, такие водные растворы могут быть забуферены, а жидкий разбавитель сначала можно сделать изотоническим с помощью физиологического раствора или глюкозы. Растворы рекомбинантного вирусного вектора (например, rAAV) в виде свободной кислоты (ДНК содержит кислые фосфатные группы) или фармакологически приемлемой соли могут быть приготовлены в воде, подходящей для смешивания с поверхностно-активным веществом, таким как гидроксипропилцеллюлоза. Дисперсия рекомбинантного вирусного вектора (например, rAAV) также может быть приготовлена в глицерине, жидких полиэтиленгликолях и их смесях, а также в маслах. В обычных условиях хранения и применения, эти препараты содержат консервант, предотвращающий рост микроорганизмов. В этой связи, все используемые стерильные водные среды могут быть легко получены стандартными методами, хорошо известными специалистам в данной области.

[00186] Фармацевтические композиции могут быть приготовлены в виде

препаратов для инъекций или препаратов для местного применения для доставки индивидууму посредством трансдермального введения. Ранее были разработаны многочисленные составы как для внутримышечной инъекции, так и для трансдермального введения, и их можно практически использовать в соответствии с настоящим изобретением. Рекомбинантный вирусный вектор может быть использован вместе с любым фармацевтически приемлемым носителем и/или наполнителем для простоты введения и работы с ним.

[00187] Титры рекомбинантных вирусных векторов (например, гAAV), вводимых в соответствии со способами согласно изобретению, будут варьироваться в зависимости, например, от конкретного рекомбинантного вирусного вектора, способа введения, цели лечения, индивидуума и типа клетки(ок)-мишени(ей) и могут быть определены стандартными методами.

[00188] В случае вирусного вектора, вирусные частицы могут быть подвергнуты контактированию с клетками при соответствующей множественности инфицирования в соответствии со стандартными методами трансдукции, подходящими для конкретных клеток-мишеней. Титры вируса для введения могут варьироваться в зависимости от типа клетки-мишени и конкретного вирусного вектора и могут быть определены специалистами в данной области. Обычно, в клетку вводят по меньшей мере приблизительно 10^3 вирусных частиц, по меньшей мере приблизительно 10^5 частиц, по меньшей мере приблизительно 10^7 частиц, по меньшей мере приблизительно 10^9 частиц, по меньшей мере приблизительно 10^{11} частиц или по меньшей мере приблизительно 10^{12} частиц. В репрезентативных вариантах осуществления изобретения, в клетку вводят от приблизительно 10^7 до приблизительно 10^{15} частиц, от приблизительно 10^7 до приблизительно 10^{13} частиц, от приблизительно 10^8 до приблизительно 10^{12} частиц, от приблизительно 10^{10} до приблизительно 10^{15} частиц, от приблизительно 10^{11} до приблизительно 10^{15} частиц, от приблизительно 10^{12} до приблизительно 10^{14} частиц или от приблизительно 10^{12} до приблизительно 10^{13} частиц. Дозы могут быть также выражены в единицах вирусных геномов (ВГ).

[00189] Клетки, в которые могут быть введены векторы согласно изобретению, могут представлять собой клетки любого типа, включая, но не ограничиваясь ими, нейроны (включая клетки периферической и центральной нервной систем), клетки сетчатки, эпителиальные клетки (включая клетки дермы, кишечника, дыхательных путей, мочевого пузыря и легких, перитонимальные клетки и эпителиальные клетки ткани молочной железы), клетки мышц (включая клетки сердца, клетки гладких мышц, включая клетки гладких мышц легких, скелетных мышц и мышц диафрагмы), клетки поджелудочной железы (включая островковые клетки), клетки почек, клетки печени (включая клетки паренхимы), клетки кишечника, фибробласты (например, фибробласты кожи, такие как фибробласты кожи человека), клетки, происходящие от фибробластов, эндотелиальные клетки, клетки кишечника, зародышевые клетки, клетки легких (включая клетки бронхов и альвеолярные клетки), клетки предстательной железы, стволовые

клетки, клетки-предшественники, дендритные клетки и т.п. Кроме того, клетки могут иметь любое происхождение, как указано выше.

[00190] В настоящем изобретении рассматриваются способы трансдукции клетки-мишени вектором согласно изобретению. Используемый здесь термин «трансдукция» относится к введению/доставке трансгена АТФазы в клетку реципиента либо *in vivo*, либо *in vitro* посредством рекомбинантного вирусного вектора, дефектного по репликации (например, гAAV) согласно изобретению, что приводит к экспрессии АТФазы клеткой-реципиентом. Таким образом, настоящее изобретение относится к способам введения эффективной дозы (или доз, вводимых по существу одновременно, или доз, вводимых с интервалами) рекомбинантного вирусного вектора (например, гAAV), кодирующего АТР1А3, индивидууму, нуждающемуся в этом.

[00191] Способы трансдукции *in vivo* включают стадию введения эффективной дозы или нескольких эффективных доз кластера для экспрессии нуклеиновой кислоты или композиции, содержащей рекомбинантный вирусный вектор согласно изобретению, животному (включая человека), нуждающемуся в этом. Если дозу вводят до развития расстройства/заболевания, то такое введение является профилактическим. Если дозу вводят после развития расстройства/заболевания, то такое введение является терапевтическим. В некоторых вариантах осуществления изобретения, эффективная доза представляет собой дозу, которая ослабляет (устраняет или снижает) по меньшей мере один симптом, ассоциированный с расстройством/патологическим состоянием, подвергаемым лечению; замедляет или предотвращает прогрессирование расстройства/патологического состояния; уменьшает степень тяжести заболевания; приводит к ремиссии (частичной или полной) заболевания и/или продлевает продолжительность жизни. Примером заболевания, которое необходимо предотвратить или лечить способами согласно изобретению, является АНС.

[00192] Трансдукция рекомбинантным вирусным вектором (например, гAAV) может быть также осуществлена *in vitro*. В одном варианте осуществления изобретения, нужные клетки-мишени берут у индивидуума, трансдуцируют рекомбинантным вирусным вектором (например, гAAV) и повторно вводят индивидууму. Альтернативно, могут быть использованы сингенные или ксеногенные клетки-мишени, при условии, что эти клетки не будут вызывать нежелательный иммунный ответ у индивидуума.

[00193] Подходящие способы трансдукции рекомбинантным вирусным вектором (например, гAAV) или повторного введения трансдуцированных клеток индивидууму известны специалистам в данной области. В одном варианте осуществления изобретения, клетки могут быть трансдуцированы *in vitro* путем объединения рекомбинантного вирусного вектора (например, гAAV) с клетками-мишенями, например, в подходящей среде, и скрининга этих клеток, несущих представляющую интерес ДНК, с применением обычных методов, таких как Саузерн-блот-анализ и/или ПЦР, или с использованием селективных маркеров. Затем, рекомбинантный вирусный вектор (например, гAAV) или трансдуцированные клетки могут быть включены в фармацевтические композиции, и эти

композиции вводят индивидууму различными способами, такими как внутримышечная, внутривенная, подкожная и внутрибрюшинная инъекция, инъекция в гладкую и сердечную мышцу с помощью, например, катетера, и интратекальное, интрацистеральное, внутривентрикулярное введение или введение в паренхиму головного мозга.

[00194] Трансдукция клеток рекомбинантным вирусным вектором (например, rAAV) согласно изобретению может приводить к устойчивой экспрессии АТР1А3 или другого гена *АТФазы*. Таким образом, настоящее изобретение относится к способам введения/доставки рекомбинантного вирусного вектора (например, rAAV), который экспрессирует, например, АТР1А3, индивидууму (например, пациенту-человеку). Эти способы включают трансдукцию тканей (включая, но не ограничиваясь ими, ткани, такие как нервная система и мышцы, органы, такие как головной мозг, сердце, печень и железы, такие как слюнные железы) одним или более рекомбинантными вирусными векторами (например, rAAV) согласно изобретению. Трансдукция может быть осуществлена с помощью генных кластеров, содержащих тканеспецифические регуляторные элементы, как описано в настоящей заявке.

[00195] В некоторых вариантах осуществления изобретения, редактирование гена осуществляют путем трансдукции клеток нуклеазой, такой как нуклеаза(ы) «цинковые пальцы» или CRISPR/Cas9, плюс нормальные последовательности АТФазы, фланкирующие мутацию АТФазы, в качестве донорной матрицы. В таких вариантах осуществления изобретения, трансдукция нуклеазой расщепляет ген АТФазы рядом с патогенным вариантом/мутацией с последующей гомологически направленной репарацией для коррекции варианта/мутации, вызывающих симптомы у отдельного пациента, и тем самым для лечения и/или профилактики заболеваний, ассоциированных с АТФазой.

[00196] Выделенные нуклеиновые кислоты, векторы и композиции согласно изобретению могут быть дополнительно использованы в различных способах.

[00197] В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к способу лечения или профилактики заболевания, опосредуемого АТФазой, у индивидуума, где указанный способ включает, состоит или по существу состоит из него, введение индивидууму терапевтически эффективного количества кластера для экспрессии нуклеиновой кислоты, вектора, композиции или фармацевтических композиций, содержащих нуклеиновую кислоту, кодирующую АТФазу (например, АТФ1А3), как описано в настоящей заявке, в целях профилактики заболевания, опосредуемого АТФазой, у индивидуума.

[00198] Используемые здесь термины «индивидуум» и «пациент» являются синонимами и относятся к человеку, и к животным, не являющимся человеком. Используемый здесь термин «животные, не являющиеся человеком» включает всех позвоночных, например, млекопитающих и не-млекопитающих, таких как приматы, не являющиеся человеком, овцы, собаки, кошки, лошади, коровы, куры, земноводные, рептилии и т.п. Индивидуумом может быть человек, который находится в группе риска

или страдает от АТР1А3- опосредуемого заболевания. Индивидуумом может быть также человек, который находится в группе риска или страдает заболеванием, вызываемым мутацией в гене АТР1А3. Таким пациентом может быть человек любого возраста (например, младенец, ребенок или взрослый).

[00199] Используемые здесь термины «лечение» или «терапия» означают клиническое вмешательство, проводимое в ответ на заболевание, расстройство или физиологическое состояние, которое проявляется у пациента, или к которому пациент может быть восприимчивым. Целью лечения является ослабление или предотвращение симптомов, замедление или прекращение прогрессирования или обострения заболевания, расстройства или патологического состояния и/или ремиссия заболевания, расстройства или патологического состояния.

[00200] Используемый здесь термин «эффективное количество» или «терапевтически эффективное количество» означает количество, которое обеспечивает терапевтический или профилактический эффект. Эффективные количества молекул нуклеиновых кислот и/или композиций и/или фармацевтических композиций могут быть определены врачом с учетом индивидуальных различий в возрасте, массе и состоянии здоровья пациента (индивидуума).

[00201] Эффективным количеством терапевтического средства является количество, которое уменьшает или ослабляет симптомы обычно по меньшей мере на 10%, предпочтительно по меньшей мере на 20%, более предпочтительно по меньшей мере на 30%, более предпочтительно по меньшей мере на 40%, более предпочтительно по меньшей мере на 50%, более предпочтительно по меньшей мере на 60%, более предпочтительно по меньшей мере на 70%, более предпочтительно по меньшей мере на 80%, более предпочтительно по меньшей мере на 90%, более предпочтительно по меньшей мере на 95%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 99%, а наиболее предпочтительно по меньшей мере на 99,9%.

[00202] Используемый здесь термин «заболевание» включает, но не ограничивается ими, любое аномальное состояние и/или нарушение структуры или функции, которые влияют на органы организма. Это может быть вызвано внешним фактором, таким как инфекционное заболевание, или внутренними дисфункциями, такими как рак, метастазы рака и т.п.

[00203] Термин «введение» или «вводить», используемый здесь применительно к человеку, примату, млекопитающему, животному, индивидууму, которому вводят плацебо, индивидууму для исследования, индивидууму, подвергаемому лечению, к клетке, ткани, органу или биологической жидкости, относится, но не ограничивается ими, к контактированию экзогенного лиганда, реагента, плацебо, небольшой молекулы, фармацевтического средства, терапевтического агента, диагностического средства или композиции с индивидуумом, клеткой, тканью, органом или биологической жидкостью и т.п. Термин «ведение» может относиться, например, к терапевтическим, фармакокинетическим, диагностическим, исследовательским методам, плацебо-методам и

к экспериментальным методам. Обработка клетки включает воздействие на клетку реагента (например, молекулы нуклеиновой кислоты), а также контактирование реагента с жидкостью, если такая жидкость контактирует с клеткой. «Введение» также включает обработку *in vitro* и *ex vivo*, например, клетки реагентом, диагностическим средством, связывающей композицией или другой клеткой.

[00204] Введение эффективной дозы выделенных нуклеиновых кислот, векторов и композиций может быть осуществлено стандартными способами, включая, но не ограничивая ими, интратекальное введение, интрацистернальное введение, интрацеребровентрикулярное введение, введение в гиппокамп, внутримышечное введение, парентеральное, внутривенное, пероральное, трансбуккальное, интраназальное, внутрилегочное, внутричерепное, интрапаренхимальное, внутрикостное или внутриглазное введение. Введение в гиппокамп может включать инъекцию выделенной нуклеиновой кислоты, вектора или композиции в субстанцию гиппокампа головного мозга (вовнутрь паренхимы). Интрацеребровентрикулярное введение может включать инъекцию выделенной нуклеиновой кислоты, вектора или композиции в желудочек, который заполнен спинномозговой жидкостью и находится рядом с гиппокампом, но не является его частью.

[00205] Способ(ы) введения и серотип(ы) вирусных (например, AAV) компонентов рекомбинантного вирусного вектора (например, rAAV, а в частности, ITR AAV и капсидного белка) согласно изобретению может(могут) быть выбран(ы) и/или подобран(ы) специалистами в данной области с учетом патологического состояния, подвергаемого лечению, и клеток/тканей-мишеней, которые должны экспрессировать АТР1А3.

[00206] Настоящее изобретение также охватывает местное введение и системное введение эффективной дозы rAAV и композиций согласно изобретению, включая описанную здесь комбинированную терапию. Так, например, системное введение представляет собой введение в кровоток, так, чтобы оно оказывало воздействие на весь организм. Системное введение включает энтеральное введение, такое как всасывание через желудочно-кишечный тракт, и парентеральное введение посредством инъекции, инфузии или имплантации.

[00207] В частности, фактическое введение вектора (например, rAAV) согласно изобретению может быть осуществлено с применением любого физического метода, который позволяет переносить вектор в ткань-мишень индивидуума.

[00208] Вирусные векторы и вирусные капсиды могут быть введены в ткани ЦНС (например, в головной мозг, в глаза), и такое введение может преимущественно приводить к более широкому распространению вирусного вектора или капсида, чем это наблюдалось бы с применением стандартных методов.

[00209] Введение согласно изобретению включает, но не ограничивается ими, инъекцию в желудочки, в большую цистерну, в капсулу спинного мозга, в мышцу, в кровоток и/или непосредственно в головной мозг.

[00210] В некоторых вариантах осуществления изобретения, молекулы нуклеиновой кислоты, векторы и/или композиции согласно изобретению могут быть введены в ЦНС (например, в головной мозг или в глаза). Вирусный вектор и/или капсид могут быть введены в спинной мозг, в ствол головного мозга (в продолговатый мозг, мост), средний мозг (гипоталамус, таламус, эпифиз, гипофиз, черное вещество, шишковидную железу), мозжечок, конечный мозг (в полосатое тело, головной мозг, включая затылочную, височную, теменную и лобную долю коры, базальные ганглии, гиппокамп и в «ворота» миндалин), лимбическую систему, неокортекс, полосатое тело, большой мозг и нижние холмики. Молекулы нуклеиновой кислоты, векторы и/или композиции согласно изобретению могут быть также введены в различные области глаз, такие как сетчатка, роговица и/или зрительный нерв.

[00211] Молекулы нуклеиновой кислоты, векторы и/или композиции могут быть доставлены в спинномозговую жидкость (например, с помощью люмбальной пункции) для более дисперсного распределения доставляемого вектора.

[00212] Молекулы нуклеиновых кислот, векторы и/или композиции могут быть введены в нужную(ые) область(и) ЦНС любым известным способом, включая, но не ограничиваясь ими, интрацеребровентрикулярное, интракостальное, интрапаренхимальное, внутричерепное, интратекальное, внутриглазное, внутримозговое, желудочковое, внутривенное введение (например, в присутствии сахара, такого как маннит), интраназальное, внутриушное, внутриглазное введение (например, введение вовнутрь стекловидного тела, в субретинальную область, в переднюю камеру) и перикулярное введение (например, в субтенозовую область), а также внутримышечную доставку с обратной доставкой в двигательные нейроны.

[00213] В других вариантах осуществления изобретения, молекулы нуклеиновой кислоты, векторы и/или композиции могут быть введены в виде жидкой композиции путем прямой инъекции (например, стереотаксической инъекции) в нужную область или в нужный отдел ЦНС. В других вариантах осуществления изобретения, вирусный вектор может быть введен путем местного нанесения на нужную область или путем интраназального введения аэрозольной композиции. Введение в глаза может быть осуществлено путем местного закапывания капель. В качестве дополнительной альтернативы, вирусный вектор и/или капсид могут быть введены в виде твердого препарата с замедленным высвобождением.

[00214] В других вариантах осуществления изобретения может быть применен более, чем один способ введения (например, посредством ICV- и ICM-введения).

[00215] Так, например, ресуспендирование рекомбинантного вирусного вектора (например, gAAV) в забуференном фосфатом физиологическом растворе (PBS) может быть достаточным для обеспечения носителя, подходящего для экспрессии в мышечной ткани, при этом, могут быть использованы, без каких-либо ограничений, любые носители или другие компоненты, которые могут быть введены вместе с рекомбинантным вирусным вектором (например, gAAV, хотя, обычно, при использовании gAAV следует

избегать применения композиций, которые расщепляют ДНК). В случаях, когда рекомбинантный вирусный вектор включает гAAV, капсидные белки гAAV могут быть модифицированы так, чтобы гAAV был нацелен на конкретную представляющую интерес ткань-мишень, такую как мышца.

[00216] Дозы будут зависеть от способа введения, тяжести заболевания или состояния, подвергаемого лечению, состояния здоровья индивидуума, конкретного вектора и доставляемого гена, и могут быть определены стандартным способом. В некоторых вариантах осуществления изобретения, выделенную молекулу нуклеиновой кислоты или вектор вводят индивидууму в терапевтически эффективном количестве, как это было определено выше.

[00217] Доза вектора (например, гAAV) для введения описанными здесь способами будет варьироваться в зависимости, например, от конкретного рекомбинантного вирусного вектора, способа введения, цели лечения, индивидуума и типа(ов) клеток-мишеней, и может быть определена стандартными методами. Титры каждого вводимого рекомбинантного вирусного вектора (например, гAAV) могут варьироваться от приблизительно 1×10^6 , приблизительно 1×10^7 , приблизительно 1×10^8 , приблизительно 1×10^9 , приблизительно 1×10^{10} , приблизительно 1×10^{11} , приблизительно 1×10^{12} , приблизительно 1×10^{13} , приблизительно 1×10^{14} или до приблизительно 1×10^{15} или более на мл. Дозы также могут быть выражены в единицах вирусных геномов (ВГ) (то есть, 1×10^7 ВГ, 1×10^8 ВГ, 1×10^9 ВГ, 1×10^{10} ВГ, 1×10^{11} ВГ, 1×10^{12} ВГ, 1×10^{13} ВГ, 1×10^{14} ВГ, 1×10^{15} ВГ, соответственно). Дозы также могут быть выражены в единицах вирусных геномов (ВГ) на килограмм (кг) массы тела (то есть, 1×10^9 ВГ/кг, 1×10^{10} ВГ/кг, 1×10^{11} ВГ/кг, 1×10^{12} ВГ/кг, 1×10^{13} ВГ/кг, 1×10^{14} ВГ/кг, 1×10^{15} ВГ/кг, соответственно). Способы титрования вирусных векторов, таких как AAV, описаны у Clark et al., Hum. Gene Ther., 10: 1031-1039 (1999).

[00218] В некоторых вариантах осуществления изобретения, может быть проведено более, чем одно введение (например, два, три, четыре или более введений) для достижения желаемого уровня экспрессии гена в течение периода времени с различными интервалами, например, ежедневно, еженедельно, ежемесячно или ежегодно.

[00219] Доставка в ткань-мишень может быть также осуществлена путем введения депо-препарата, содержащего вирусный вектор и/или капсид. В репрезентативных вариантах осуществления изобретения, депо-препарат, содержащий вектор и/или капсид, имплантируют в ткань скелета, сердечной мышцы и/или диафрагмы, либо эта ткань может быть подвергнута контактированию с пленкой или с другим матриксом, содержащим вирусный вектор и/или капсид.

[00220] В настоящем изобретении также рассматриваются комбинированные терапии. Используемая здесь комбинация включает как одновременное, так и последовательное лечение. В частности, рассматриваются комбинации способов согласно изобретению со стандартными лечебными процедурами, а также комбинации с альтернативными векторами, упомянутыми выше, новыми векторами, которые были

сконструированы и созданы для усиления эффекта терапии и новых способов терапии.

[00221] **Наборы**

[00222] В других своих аспектах, настоящее изобретение относится к набору для профилактики и/или лечения рака у индивидуума, где указанный набор включает, состоит или по существу состоит из них, композиции согласно изобретению и инструкции по их применению.

[00223] В еще одном своем аспекте, настоящее изобретение относится ко всем раскрытым и проиллюстрированным здесь вариантам.

[00224] Представленные ниже примеры приводятся лишь в целях иллюстрации и не должны рассматриваться как ограничение настоящего изобретения.

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Мышиная модель, воспроизводящая проявления АНС, доказывает возможность применения генотерапии в медицине

[00225] В настоящее время существует шесть мышиных моделей мутаций ATP1A3. (Clapcote et al. (2006) Proc. Natl. Acad. Sci USA, 106(33):14085-14090; Hunanyan et al. (2015) Epilepsia 56(1): 82-93; Hunanyan et al. (2018) Epilepsia 59(7): 1455-1468; Masoud et al. (2017) Curr Treat Options Neurol. 19(2): 8; Heinzen et al. (2012) Nat Genet. 44(9): 1030-1034; Helseth et al. (2018) Neurobiol Dis. 119: 100-112; Holm et al. (2016) Biochim Biophys Acta. 1857 (11): 1807-1828; Ikeda et al. (2017) Brain Res. 1666: 27-37). Гетерозиготные мышиные модели Mashloul и Matoub представляют собой модели, которые воспроизводят все проявления АНС (Hunanyan et al. (2015) Epilepsia 56(1):82-93; Helseth et. al. (2018) Neurobiol Dis. 119:100-112). Как уже сообщалось, каждая из этих «нокаутированных» мышей несет одну из двух наиболее распространенных мутаций по сравнению с обычными мышами C57BL/6J. Mashloul (Mashl^{+/-}) несет мутацию D801N, которая является наиболее распространенной мутацией (у 40% пациентов с АНС), вызывающей АНС средней степени тяжести у человека. Мышь Matoub (Matb^{+/-}) несет мутацию E815K, которая является второй по распространенности мутацией (у 26% пациентов с АНС) и вызывает наиболее тяжелый фенотип АНС у человека. У мышей Mashloul и Matoub наблюдаются спонтанные, а также вызванные стрессом (воздействием холодной воды) гемиплегии, дистонии и эпилептические припадки. Обе мутации, по аналогии с человеческим фенотипом, снижают индуцированную гемиплегию в ответ на флунаризин, но это лекарственное средство не дает других эффектов (Hunanyan et al. (2015) Epilepsia 56(1):82-93; Hunanyan et al. (2018) Epilepsia 59(7): 1455-1468; Masoud et al. (2017) Curr Treat Options Neurol. 19(2):8; Mikati et al. (2000) Pediatr Neurol. 23(2):134-141; Helseth et al. (2018) Neurobiol Dis. 119:100-112). Реакция на флунаризин является еще одним уникальным подтверждением этих двух моделей, и эта реакция не была продемонстрирована ни на одной другой модели.

[00226] В описанных здесь примерах, для исследования был выбран мутант D801N (Mashl^{+/-}), поскольку он представляет собой наиболее распространенную мутацию у человека по сравнению с мутантом E815K (Matb^{+/-}), который приводит к высокой

смертности, ограничивающей возможность поддерживать быстро растущую колонию и проводить длительные эксперименты. В дополнение к пароксизмальным приступам, препубертатные и взрослые мыши D801N также проявляют поведенческие аномалии, которые очень похожи на аномалии при АНС у человека. К ним относятся повышенная смертность, а также появление психических расстройств, импульсивность, потеря памяти и изменение походки. (Hunanyan et al. (2015) *Epilepsia* 56(1):82-93; Hunanyan et al. (2018) *Epilepsia* 59(7):1455-1468). Мыши D801N также имеют предрасположенность к распространяющейся деполяризации, повышенной возбудимости нейронов и к нарушению активации интернейронов, продуцирующих GABA и подавляющих быстрое возбуждение нейронов. (Hunanyan et al. (2015) *Epilepsia* 56(1):82-93; Hunanyan et al. (2018) *Epilepsia* 59 (7):1455-1468). Таким образом, модель D801N (*Mash1^{+/-}*) может быть использована для разработки новых методов лечения, которые могут быть применены в клинической практике для лечения АНС и других заболеваний, ассоциированных с АТР1А3 и упомянутых выше. В большинстве описанных здесь экспериментов, для исследования была выбрана возрастная группа P10, поскольку она соответствует младенчеству у людей, то есть, возрасту, в котором появляются симптомы АНС. Поведенческое тестирование проводили в возрасте приблизительно P40, что соответствует подростковому возрасту у людей, то есть, возрасту, в котором проявления АНС были установлены в течение по меньшей мере 10 лет.

Пример 2: Интрацеребровентрикулярная (ICV) инъекция активного вектора AAV9 приводит к устойчивому повышению активности АТФазы в областях головного мозга, смежных с участком инъекции

[00227] Для того, чтобы определить, может ли ICV-инъекция активного вектора AAV9 приводить к повышению активности чувствительной к убаину АТФазы в областях головного мозга, авторами настоящего изобретения были проведены анализы на активность фермента АТФазы, как было описано ранее (Clapcote et al. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106(33): 14085-14090; Ye et al. (2017) *EMBO J.*, 36(16):2419-2434).

[00228] Вкратце, мышам дикого типа вовнутрь гиппокампа вводили 4×10^{10} ВГ (по 1 мкл с каждой стороны) AAV9-hSyn-АТР1А3-FLAG-p2a-Cherry-SV40polyA (фиг. 1) или аналогичную дозу контрольного вектора (вектора, не содержащего трансгена АТР1А3). При этом, наблюдалось 22% увеличение общей активности АТФазы в гиппокампе у мышей, которым вводили AAV9-Syn-АТР1А3-p2a-Cherry-SV40polyA (n=2), по сравнению с мышами, которым вводили контрольный вектор (n=2), и даже выше (375%) во фракции, чувствительной к убаину (фиг. 4). При этом, какого-либо увеличения во фракции, не чувствительной к убаину, не наблюдалось, что указывает на то, что увеличение общей активности было связано с увеличением фракции, чувствительной к убаину, как было вычислено и показано на фиг. 4 (фракция, чувствительная к AAV-АТР1А3-убаину=0,93-0,55=0,38; фракция, чувствительная к AAV-cherry-убаину=0,74-0,66=0,08; отношение=0,38/0,08, увеличение в 4,75 раза или 375% увеличение). AAV вводили в дозе 1 мкл/полушарие, вовнутрь паренхимы, в каждый дорсальный гиппокамп (4×10^{13} ВГ/мл,

всего 2 мкл на мышь).

[00229] У мышей дикого типа P40, которым односторонне вводили ICV-инъекцию в возрасте P10, с активным вектором (AAV9-hSyn-ATP1A3-FLAG-p2a-Cherry-SV40polyA, V=5 мкл, 4×10^{13} ВГ/мл, n=3/группу), наблюдалось, по сравнению с контрольным вектором (вектором без трансгена ATP1A3), что активность АТФазы, чувствительная к убаину, была на 102% выше в ипсилатеральном гиппокампе (фиг. 5, $p=0,046$, как было определено с помощью одностороннего t-критерия Стьюдента). В других ипсилатеральных областях, изменения не достигали статистически значимых различий (количество мышей составляло только 3 на группу), но в областях, примыкающих к гиппокампу, наблюдалась повышенная активность чувствительной к убаину АТФазы по сравнению с активностью при введении контрольного вектора. Эти изменения были на 37% выше в коре головного мозга, на 26% выше в базальных ганглиях/таламусе, на 16% выше в стволе головного мозга и отсутствовали в мозжечке (все сравнения, $p > 0,05$) после вышеупомянутой односторонней ICV-инъекции.

Пример 3: Трансдукция после односторонних инъекций в гиппокамп и после интрацеребровентрикулярных инъекций, оцениваемая по экспрессии mCherry

[00230] Инъекции 4×10^{10} ВГ (V=5 мкл 4×10^{13} ВГ/мл AAV9-Syn-ATP1A3-p2a-mCherry-SV40polyA (AAV9-ATP1A3) в гиппокамп вводили 24 мышам, а именно, Mash1^{+/-}-мышам и однопаметным мышам дикого типа в возрасте P0-P10 и взрослым мышам. Этих мышей умерщвляли через один месяц.

[00231] Результаты продемонстрировали превосходную эффективность трансдукции активного вирусного вектора для всех возрастов, как было обнаружено по сигналу mCherry и проиллюстрировано в гиппокампе взрослой мыши дикого типа (фиг. 6А-6В). Соответственно, процент нейронов, экспрессирующих mCherry, в СА1 был >90%, а в СА3 ~70%. Экспрессия была устойчивой как в пирамидных клетках, так и в интернейронах.

[00232] Кроме того, односторонняя интрацеребровентрикулярная инъекция (ICV) AAV9-ATP1A3 (4×10^{10} ВГ/мл; V=5 мкл) мышам в возрасте ~P10 показала превосходную экспрессию mCherry на P40, наблюдаемую в цитоплазме в различных областях головного мозга, включая гиппокамп, базальные ганглии, таламус, кора головного мозга и даже в относительно отдаленном мозжечке (фиг. 7А-7В).

Пример 4: Восстановление двигательной активности в тесте на равномерное пересечение луча у мутантных мышей

[00233] Для того, чтобы определить, может ли односторонняя инъекция AAV9-Syn-ATP1A3-p2a-Cherry-SV40polyA в гиппокамп восстанавливать двигательные функции у мутантных мышей, был проведен тест на равномерное пересечение луча. Взрослых мутантных Mash1^{+/-}-мышей (2-3-месячных мышей) обрабатывали AAV9-Syn-ATP1A3-P2A-Cherry-SV40polyA (20×10^{10} ВГ в 5 мкл 4×10^{13} , n=6 мышей) путем инъекции в гиппокамп и тестировали через 21 день после инъекции. У Mash1^{+/-}-мышей, обработанных AAV-Syn-ATP1A3-P2A-Cherry-SV40polyA (n=3), наблюдалась более высокая активность

(то есть, они пересекали луч быстрее), чем Mashl^{+/+}-мыши, обработанные контрольным вектором AAV-cherry (n=3 на группу, p=0,053, односторонний t-критерий Стьюдента) (фиг. 8). Инъекцию AAV вводили 2-3-месячным мышам.

Пример 5: ICV-инъекции и интрацистернальные (ICM) инъекции активного вектора AAV9 дают устойчивую экспрессию репортерного гена FLAG в областях головного мозга, примыкающих к участкам инъекции

[00234] Для того, чтобы определить степень экспрессии репортерного гена после ICV- и ICM-инъекций, авторами были введены следующие инъекции: 1) односторонняя ICV-инъекция 20×10^{10} ВГ на P10 с умерщвлением животных на P40 (фиг. 9A-9D); 2) ICM-инъекция 15×10^{10} ВГ на P10 с умерщвлением животных на P40 (фиг. 9F). Затем проводили исследование с увеличением доз комбинированных ICM-инъекций и двусторонних ICV-инъекций с использованием трех доз одного и того же активного вектора AAV, вводимого на P10 с последующим умерщвлением животных на P40 (AAV9-hSyn-ATP1A3-FLAG-P2A-Cherry-SV40polyA, 4 мыши дикого типа/дозу, фиг. 10A-10H). Три исследуемые дозы составляли 3×10^{10} ВГ в каждый участок (в область цистерны и в два боковых желудочка, всего 9×10^{10} ВГ/мышь), 6×10^{10} ВГ в каждый участок (всего 18×10^{10} ВГ/мышь) и 9×10^{10} ВГ в каждый участок (всего 27×10^{10} ВГ/мышь).

[00235] Надежная экспрессия трансгена наблюдались при более высоких дозах (фиг. 9A-9D, 9F и фиг. 10A-10H), но не с двумя более низкими дозами в исследовании с увеличением доз. Для оценки экспрессии трансгена использовали два репортерных гена FLAG, расположенных за 3'-концом ДНК ATP1A3, за которыми следует метка mCherry с сайтом расщепления между ними. В частности, гиппокамп обнаруживал экспрессию FLAG почти в 100% клеток в областях гиппокампа CA3 и CA1 в случае ICV-инъекций, независимо от того, были ли эти инъекции односторонними или двусторонними (фиг. 9A-9D и фиг. 10A-10B). После односторонних ICV-инъекций наблюдалась минимальная экспрессия на контралатеральной стороне. При комбинированной ICM-инъекции и двусторонней ICV-инъекции, в коре головного мозга и в мозжечке наблюдалась экспрессия приблизительно в 10% клеток от общего числа клеток, причем, гораздо больший процент наблюдался в областях, близких к участкам инъекций: почти все клетки в этих областях обнаруживали устойчивую экспрессию (фиг. 10A-10E), тогда как в более удаленных областях наблюдался очень низкий уровень экспрессии, если он вообще наблюдался. Глубокие структуры головного мозга, включая базальные ганглии, таламус и ствол головного мозга, также почти не обнаруживали какой-либо экспрессии (фиг. 10F-10H).

[00236] В этих экспериментах, метка mCherry была обнаружена в цитоплазме, поскольку она отщеплялась от ATP1A3-FLAG, тогда как слитый белок ATP1A3-FLAG был обнаружен в клеточной мембране функциональной области насоса (фиг. 9A-9F и фиг. 10A-10H). Это указывает на то, что трансген ATP1A3 не только экспрессируется, но также и то, что белок ATP1A3 транспортируется к своему функциональному участку, то есть, к клеточной мембране. В случае активного вектора, ожидается, что поскольку

последовательность ДНК, кодирующая FLAG, находится на 3'-конце кодирующей последовательности ATP1A3, то она будет транскрибироваться только после того, как будет транскрибирована кодирующая последовательность ATP1A3. Таким образом, демонстрация положительного сигнала для FLAG указывает на экспрессию и транскрипцию экзогенного ATP1A3 посредством активного вектора.

[00237] Было проведено исследование для того, чтобы определить, будет ли введение всей высокой дозы путем односторонней ICV-инъекции повышать уровень трансдукции непосредственно за пределами смежных областей при использовании двух доз, одна из которых почти втрое превышает другую. Две дозы составляли: $7,5 \times 10^{10}$ ВГ, вводимая путем односторонней ICV-инъекции, и 20×10^{10} ВГ, вводимая путем односторонней ICV-инъекции. В обоих случаях, почти 100% нейронов гиппокампа экспрессировали FLAG на той стороне, которая является ипсилатеральной по отношению к месту инъекции, при этом, экспрессия наблюдалась приблизительно на уровне 10% в коре головного мозга и практически не наблюдалась в других областях. Эти данные показали, что при этой схеме введения, доза, обеспечивающая наивысший уровень экспрессии трансгена без использования ненужного дополнительного вектора, составляла приблизительно $7,5 \times 10^{10}$ ВГ/участок инъекции, и что необходимо вводить ICM-инъекции и двусторонние ICV-инъекции. Это подтвердило эффективность использования комбинации ICM-дозы и двусторонней ICV-дозы в количестве $7,5 \times 10^{10}$ ВГ в каждом участке, что в целом составляет $22,5 \times 10^{10}$ ВГ/животное в исследованиях на выживаемость и поведенческие реакции.

Пример 6: Комбинированные ICV- и ICM-инъекции активного вектора приводят к улучшению Mashl^{+/-}-фенотипа

[00238] Эффекты активного вектора и контрольного вектора, вводимых с помощью ICM-инъекций и двусторонних ICV-инъекций ($22,5 \times 10^{10}$ ВГ/животное, $7,5 \times 10^{10}$ в каждом участке) на P10, сравнивали с эффектами на P40. Исследуемые группы представляли собой необработанные группы дикого типа («необученные» животные дикого типа, n=10), контрольные группы дикого типа (WT-CTL, n=10), группы обработки дикого типа (WT-Tr, n=4), группы мутантного контроля (Het-CTL, n=10) и группы обработки мутантом (Het-Tr, n=9).

[00239] Было обнаружено, что Mashl^{+/-}-мыши, обработанные активным вектором, испытывали значительно меньшее число приступов гемиплегии (фиг.11, $p=0,0128$; Het-контроль, n=4, Het-обработка, n=6), и наблюдалась тенденция к снижению продолжительности приступов дистонии (фиг.12), вызванных в тесте с погружением в холодную воду ($p=0,00359$ для сравнения всех групп с использованием однофакторного дисперсионного анализа ANOVA; и $p=0,062$ для сравнения групп Het-обработки и Het-контроля с использованием одностороннего t-критерия Стьюдента, Het-контроль n=4, Het-обработка, n=6). Ни у одной из мышей трех групп дикого типа не наблюдалось дистонии, а поэтому эти группы не показаны на фиг. 12. Кроме того, ни у одной из мышей, получавших активный вектор, не было эпилептических припадков, вызванных холодной

водой, в то время как у 25% мышей, получавших контрольный вектор, эти припадки наблюдались (фиг. 13, Het-контроль, n=4, Het-обработка, n=6). Последнее сравнение не имело статистической значимости ($p > 0,05$), но в первых двух случаях были проиллюстрированы значения p , представленные выше.

[00240] Также были отмечены значительные улучшения при испытании в тесте на равномерное пересечение луча диаметром 8 мм. В частности, мутантные *Mash1*^{+/-}-мыши, получавшие активный вектор, показывали значительно более короткое время пересечения луча (фиг.14, $p \leq 0,001$ для сравнений между группами с использованием ANOVA, $p=0,0105$, двусторонний t-критерий Стьюдента для сравнения между группами Het-Tr и Het-CTRL, «необученными» животными дикого типа, n=6; WT-CTRL, n=10; WT-Tr, n=4; Het-CTRL, n=6, Het-Tr n=9).

Пример 7. Комбинированные ICV- и ICM-инъекции активных векторов приводят к долгосрочному увеличению выживаемости

[00241] При наблюдении вышеупомянутых групп взрослых мышей в возрасте P90, группа, обработанная активным вектором, показала гораздо лучшую и статистически значимую ($p=0,009$) выживаемость по сравнению с мутантной группой, которой вводили инъекцию контрольного вектора (HET-CTL) (фиг. 15). После умерщвления животных на P90, Вестерн-блот-анализ показал экспрессию антитела против FLAG в гиппокампе и в мозжечке у мышей, которым вводили активный вектор, как было проиллюстрировано на образцах Вестерн-блот-анализа (фиг. 16) и сравнительного денситометрического анализа (фиг. 17, $p=0,032$). Вестерн-блот-анализы, представленные на фиг. 17, показали наличие непрерывной экспрессии трансгена FLAG в мозжечке и гиппокампе взрослых мышей на P90. Интенсивность полосы FLAG в лизате гиппокампа была намного выше, чем в лизатах мозжечка (фиг. 16). График, показанный на фиг. 17; (WT-CTRL, n=2; WT-Tr, n=2; Het-CTRL, n=2, Het-Tr n=3, $p=0,032$ для сравнения контрольной группы и групп обработки с использованием однофакторного ANOVA с применением апостериорного метода Стьюдента-Ньюмана-Кейла) проиллюстрировал дальнейшую экспрессию трансгена FLAG у взрослых животных на P90 у групп дикого типа и групп Het-обработки.

Пример 8: AAV-опосредуемая генотерапия чередующейся гемиплегии (АНС) у детей

[00242] Примеры 1-8 продемонстрировали эффективность AAV-опосредуемой генотерапии у *Mash1*^{+/-}-мышей, которые имеют мутацию D801N, то есть, наиболее часто встречающуюся мутацию у человека, страдающего АНС. Эти результаты показали, что AAV-опосредуемая генотерапия трансгеном *ATP1A3* представляет собой терапевтический способ лечения человека, страдающего *ATP1A3*-опосредуемыми заболеваниями, включая АНС.

[00243] Для того, чтобы продемонстрировать эффективность и безопасность этой AAV-опосредуемой генотерапии у человека, были проведены следующие стадии:

[00244] 1. Оптимизация вектора, дозы и способа доставки.

[00245] 2. Дальнейшая оптимизация схем введения доз и начало проведения

исследований на токсичность.

[00246] 3. Составление плана исследования с участием человека. Научно-исследовательский Центр Duke представляет собой ведущий Центр Международного консорциума по исследованию АНС с участием свыше 100 пациентов на базе данных программы по исследованию АНС.

[00247] Специалисту в данной области очевидно, что настоящее изобретение хорошо адаптировано для выполнения задач и достижения упомянутых целей, а также присущих ему преимуществ. Описанное здесь изобретение, представленное своими репрезентативными предпочтительными вариантами, приводится лишь в иллюстративных целях и не должно рассматриваться как ограничение объема изобретения. В настоящее изобретение могут быть внесены различные изменения и другие варианты, которые входят в объем настоящего изобретения, определяемый формулой изобретения.

[00248] При этом, не допускается, что любая ссылка, включая любой непатентный или патентный документ, цитируемый в этом описании, составляет предшествующий уровень техники. В частности, следует отметить, что, если это не оговорено особо, то ссылка на какой-либо упомянутый здесь документ не является признанием того, что любой из этих документов составляет часть общих знаний в данной области в Соединенных Штатах или в любой другой стране. Любое обсуждение ссылок указывает на то, что утверждают их авторы, и заявитель оставляет за собой право оспорить точность и актуальность любого из цитируемых здесь документов. Все цитируемые здесь документы в полном объеме включены в настоящее описание посредством ссылки, если это не оговорено особо.

[00249] В случае возникновения каких-либо разночтений между любыми определениями и/или описанием, имеющимися в цитируемых документах, предпочтение следует отдать определениям или описанию, приведенным в настоящей заявке.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Кластер для экспрессии нуклеиновой кислоты, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую АТФазу.
2. Кластер для экспрессии нуклеиновой кислоты по п. 1, где АТФаза выбрана из группы, состоящей из АТР1А1, АТР1А2, АТР1А3, АТР2С1, АТР6А1, АТР6V1В1, АТР6V0А4, АТР7А, АТР7В или АТР11С.
3. Кластер для экспрессии нуклеиновой кислоты по п. 1, где последовательность нуклеиновой кислоты включает последовательность, представленную в SEQ ID NO: 01, или ее фрагмент, изоформу или гомолог.
4. Кластер для экспрессии нуклеиновой кислоты по п. 2, где последовательность нуклеиновой кислоты содержит последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности, представленной в SEQ ID NO: 01.
5. Кластер для экспрессии нуклеиновой кислоты по п. 1, где последовательность нуклеиновой кислоты содержит последовательность SEQ ID NO: 02 или ее фрагмент, изоформу или гомолог.
6. Кластер для экспрессии нуклеиновой кислоты по п. 4, где последовательность нуклеиновой кислоты содержит последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности, представленной в SEQ ID NO: 02.
7. Кластер для экспрессии нуклеиновой кислоты по п. 1, где последовательность нуклеиновой кислоты содержит последовательность SEQ ID NO: 07 или ее фрагмент, изоформу или гомолог.
8. Кластер для экспрессии нуклеиновой кислоты по п. 4, где последовательность нуклеиновой кислоты содержит последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности, представленной в SEQ ID NO: 07.
9. Кластер для экспрессии нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-7, где указанный экспрессионный кластер дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую АТР1А3, которая оптимизирована по кодонам для снижения числа сайтов метилирования CpG и для экспрессии у млекопитающих.
10. Кластер для экспрессии нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-8, где последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая АТР1А3, функционально связана с промотором и с последовательностью полиаденилирования.
11. Кластер для экспрессии нуклеиновой кислоты по п. 9, где промотор содержит нейрон-специфический промотор.
12. Кластер для экспрессии нуклеиновой кислоты по п. 10, где нейрон-специфический промотор выбран из группы, состоящей из промотора синапсина 1, кальций/кальмодулин-зависимой протеинкиназы II, тубулина альфа 1, нейрон-специфической энолазы и бета-цепи тромбоцитарного фактора роста.
13. Кластер для экспрессии нуклеиновой кислоты по п. 11, где промотор представляет собой промотор человеческого синапсина.
14. Кластер для экспрессии нуклеиновой кислоты по п. 12, где промотор

человеческого синапсина включает проксимальную область промотора синапсона 1 (от -422 до -22).

15. Кластер для экспрессии нуклеиновой кислоты по п. 13, где промотор человеческого синапсина включает последовательность нуклеиновой кислоты, представленную в SEQ ID NO: 05.

16. Кластер для экспрессии нуклеиновой кислоты по п. 12, где промотор человеческого синапсина содержит последовательность нуклеиновой кислоты, представленную в SEQ ID NO: 04 или SEQ ID NO: 09.

17. Кластер для экспрессии нуклеиновой кислоты по п. 9, где промотор выбран из группы конститутивно активных промоторов.

18. Кластер для экспрессии нуклеиновой кислоты по п. 16, где конститутивно активный промотор выбран из группы, состоящей из человеческого β -актина; человеческого фактора элонгации-1 α ; куриного β -актина в комбинации с ранним энхансером цитомегаловируса; цитомегаловируса (CMV); обезьяньего вируса 40; и тимидинкиназы вируса простого герпеса.

19. Кластер для экспрессии нуклеиновой кислоты по любому из пп. 1-17, где кластер для экспрессии нуклеиновой кислоты дополнительно содержит сигнал терминирования транскрипции, выбранный из группы, состоящей из сигнала полиаденилирования бычьего гормона роста (BGHrA), сигнала полиаденилирования обезьяньего вируса 40 (SV40pA) и синтетического сигнала полиаденилирования.

20. Вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую АТФазу.

21. Вектор по п. 19, где вектор представляет собой вирусный вектор или не-вирусный вектор.

22. Вектор по п. 20, где вектор представляет собой рекомбинантный вирусный вектор.

23. Вектор по п. 20, где вирусный вектор выбран из группы, состоящей из аденовирусного вектора, аденоассоциированного вирусного вектора, вектора вируса простого герпеса, ретровирусного вектора, лентивирусного вектора и альфавирусного вектора, флавивирусного вектора, рабдовирусного вектора, вектора на основе вируса кори, вектора на основе вируса ньюкаслской болезни, поксвирусного вектора или пикорнавирусного вектора.

24. Вектор по п. 21, где аденовирусный вектор представляет собой серотип AAV, выбранный из группы, состоящей из AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAVrh74, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12 и AAV13.

25. Вектор по п. 23, где аденовирусный вектор представляет собой серотип AAV, выбранный из группы, состоящей из AAV1, AAV8 или AAV9.

26. Вектор по п. 23, где аденовирусный вектор содержит вектор AAV9.

27. Вектор по п. 23, где аденовирусный вектор содержит вектор AAV8.

28. Вектор по п. 23, где аденовирусный вектор содержит вектор AAV1.

29. Вектор по п. 19, где указанный вектор содержит вектор AAV9-hSyn-ATP1A3-p2A-mCherry (pBK828).

30. Вектор по п. 28, где указанный вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, представленную в SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 или SEQ ID NO: 21.

31. Вектор по п. 28, где указанный вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности, представленной в SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 или SEQ ID NO: 21.

32. Вектор по п. 20, где невирусный вектор выбран из группы, состоящей из вектора на основе полимера, вектора на основе пептида, липидной наночастицы, твердой липидной наночастицы или вектора на основе катионного липида.

33. Вектор по п. 19, где последовательность нуклеиновой кислоты содержится в кластере для экспрессии нуклеиновой кислоты.

34. Вектор по п. 19, где последовательность нуклеиновой кислоты содержит последовательность SEQ ID NO: 1 или ее фрагмент, изоформу или гомолог.

35. Вектор по п. 19, где последовательность нуклеиновой кислоты содержит последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 01.

36. Вектор по п. 19, где последовательность нуклеиновой кислоты содержит последовательность SEQ ID NO: 02 или SEQ ID NO: 07 или ее фрагмент, изоформу или гомолог.

37. Вектор по п. 19, где последовательность нуклеиновой кислоты содержит последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 02 или SEQ ID NO: 07.

38. Вектор по п. 19, где последовательность нуклеиновой кислоты содержит последовательность SEQ ID NO: 6 или ее фрагмент, изоформу или гомолог.

39. Вектор по п. 19, где последовательность нуклеиновой кислоты содержит последовательность, которая по меньшей мере на 80% идентична последовательности SEQ ID NO: 06.

40. Вектор по любому из пп. 19-38, дополнительно содержащий один или более из следующих элементов: (a) последовательность инвертированного концевой повтора (ITR); (b) промотор; (c) терминатор транскрипции; и (d) фланкирующую последовательность инвертированного концевой повтора (ITR).

41. Вектор по п. 40, где промотор включает нейрон-специфический промотор.

42. Вектор по п. 40, где нейрон-специфический промотор выбран из группы, состоящей из промотора синапсина 1, кальций/кальмодулин-зависимой протеинкиназы II, тубулина альфа 1, нейрон-специфической энolahзы и бета-цепи тромбоцитарного фактора роста.

43. Вектор по п. 40, где промотор происходит от промотора человеческого синапсина.

44. Вектор по п. 42, где промотор человеческого синапсина включает проксимальную область промотора синапсона 1 (от -422 до -22).

45. Вектор по п. 42, где промотор человеческого синапсина содержит последовательность нуклеиновой кислоты, представленную в SEQ ID NO: 04.

46. Вектор по п. 42, где промотор человеческого синапсина содержит последовательность нуклеиновой кислоты, представленную в SEQ ID NO: 05 или SEQ ID NO: 09.

47. Вектор по п. 40, где промотор является конститутивно активным промотором.

48. Вектор по п. 46, где конститутивно активный промотор выбран из группы, состоящей из человеческого β -актина; человеческого фактора элонгации-1 α ; куриного β -актина в комбинации с ранним энхансером цитомегаловируса; цитомегаловируса (CMV); обезьяньего вируса 40 и тимидинкиназы вируса простого герпеса.

49. Вектор по п. 39, где терминатор транскрипции выбран из группы, состоящей из сигнала полиаденилирования бычьего гормона роста (BGHpA), сигнала полиаденилирования обезьяньего вируса 40 (SV40pA) и синтетического сигнала полиаденилирования.

50. Композиция, содержащая вектор по любому из пп. 20-48.

51. Фармацевтическая композиция, содержащая вектор по любому из пп. 20-48 и фармацевтически приемлемый носитель и/или наполнитель.

52. Способ профилактики заболевания у индивидуума, опосредуемого АТФазой, где указанный способ включает введение индивидууму терапевтически эффективного количества вектора по любому из пп. 20-48, или композиции по п. 50, или фармацевтической композиции по п. 51 в целях профилактики заболевания, опосредуемого АТФазой, у индивидуума.

53. Способ лечения заболевания у индивидуума, опосредуемого АТФазой, где указанный способ включает введение индивидууму терапевтически эффективного количества вектора по любому из пп. 20-48, или композиции по п. 50, или фармацевтической композиции по п. 51 в целях лечения заболевания, опосредуемого АТФазой, у индивидуума.

54. Способ по любому из пп. 52 или 53, где вектор или его композицию вводят способом, выбранным из группы, состоящей из внутримышечной инъекции, системной инъекции, парентеральной инъекции, инфузии или имплантации, интрацеребровентрикулярной инъекции, инъекции вовнутрь большой цистерны, инъекции вовнутрь гиппокампа и интратекальной инъекции.

55. Способ по любому из пп. 52 или 53, где вектор или его композицию вводят путем интрацеребровентрикулярной инъекции и инъекции вовнутрь большой цистерны.

56. Способ по любому из пп. 52 или 53, где индивидуумом является человек.

57. Способ по любому из пп. 52 или 53, где индивидуум имеет мутацию белка АТР1А3, выбранную из группы, состоящей из мутации E815K, мутации D801N, мутации I180N, мутации R756C или мутации V589F.

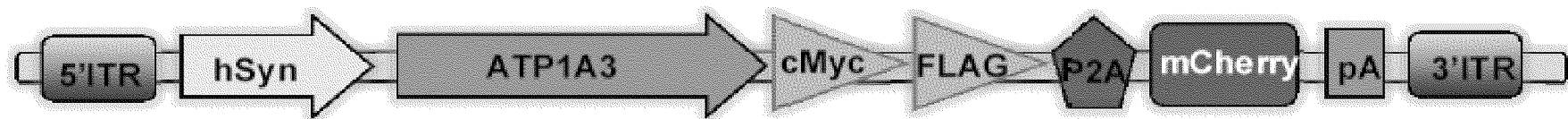
58. Способ по любому из пп. 52 или 53, где заболевание, опосредуемое АТФазой, выбрано из группы, состоящей из быстро развивающейся дистонии-паркинсонизма (RDP), чередующейся детской гемиплегии (АНС), эпилептической энцефалопатии (ЕЕ), мозжечковой атаксии, арефлексии, поллой стопы, синдрома атрофии зрительного нерва и нейросенсорной тугоухости (CAPOS), пароксизмальной слабости и энцефалопатии, вызванной лихорадкой (FIPWE), рецидивирующих приступов мозжечковой атаксии (RECA), шизофрении с ранним развитием, дистонии-дисморфизма лица, энцефалопатии, определенной с помощью МРТ как аномалии без синдрома гемиплегии (D-DEMO), и детской атаксии с быстрым началом развития (CROA).

59. Способ по любому из пп. 52 или 53, где заболевание, опосредуемое АТФазой, представляет собой АНС.

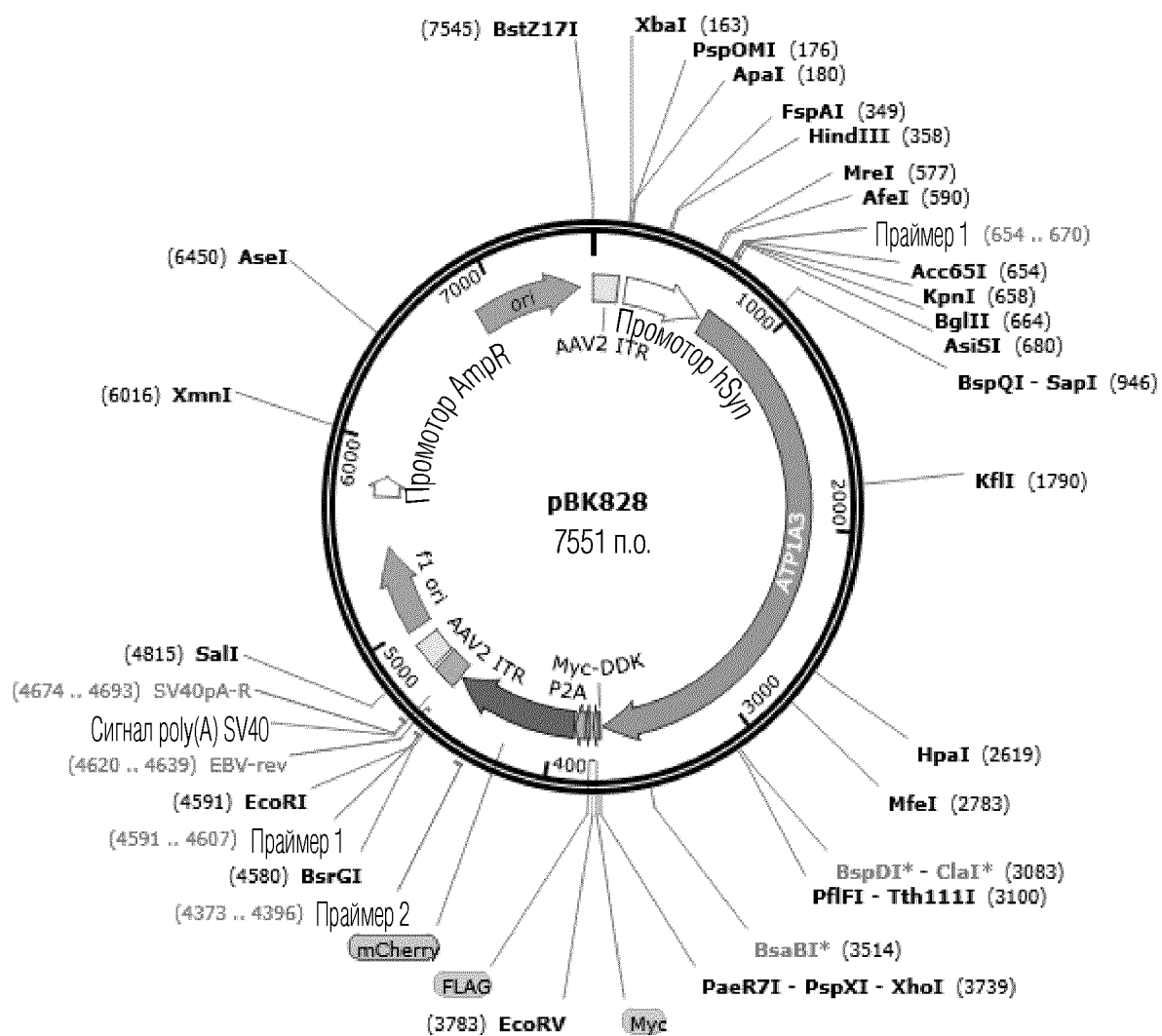
60. Применение вектора по любому из пп. 20-48, или композиции по п. 50, или фармацевтической композиции по п. 51 в целях приготовления лекарственного средства для лечения или профилактики АНС.

61. Набор для лечения и/или профилактики заболевания, опосредуемого АТФазой, у индивидуума, где указанный набор содержит композицию по любому из пп. 50-51 и инструкции по его применению.

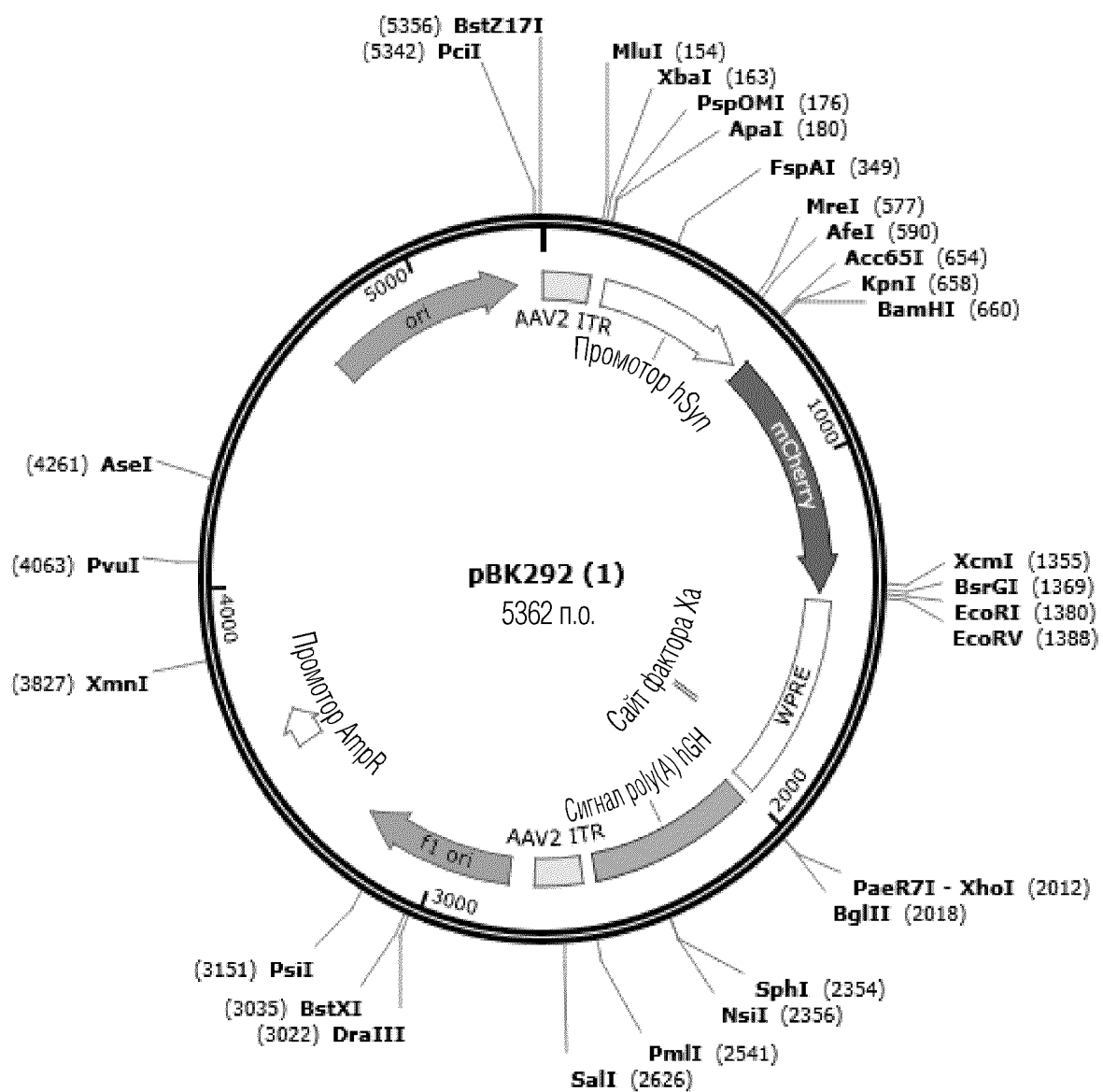
По доверенности



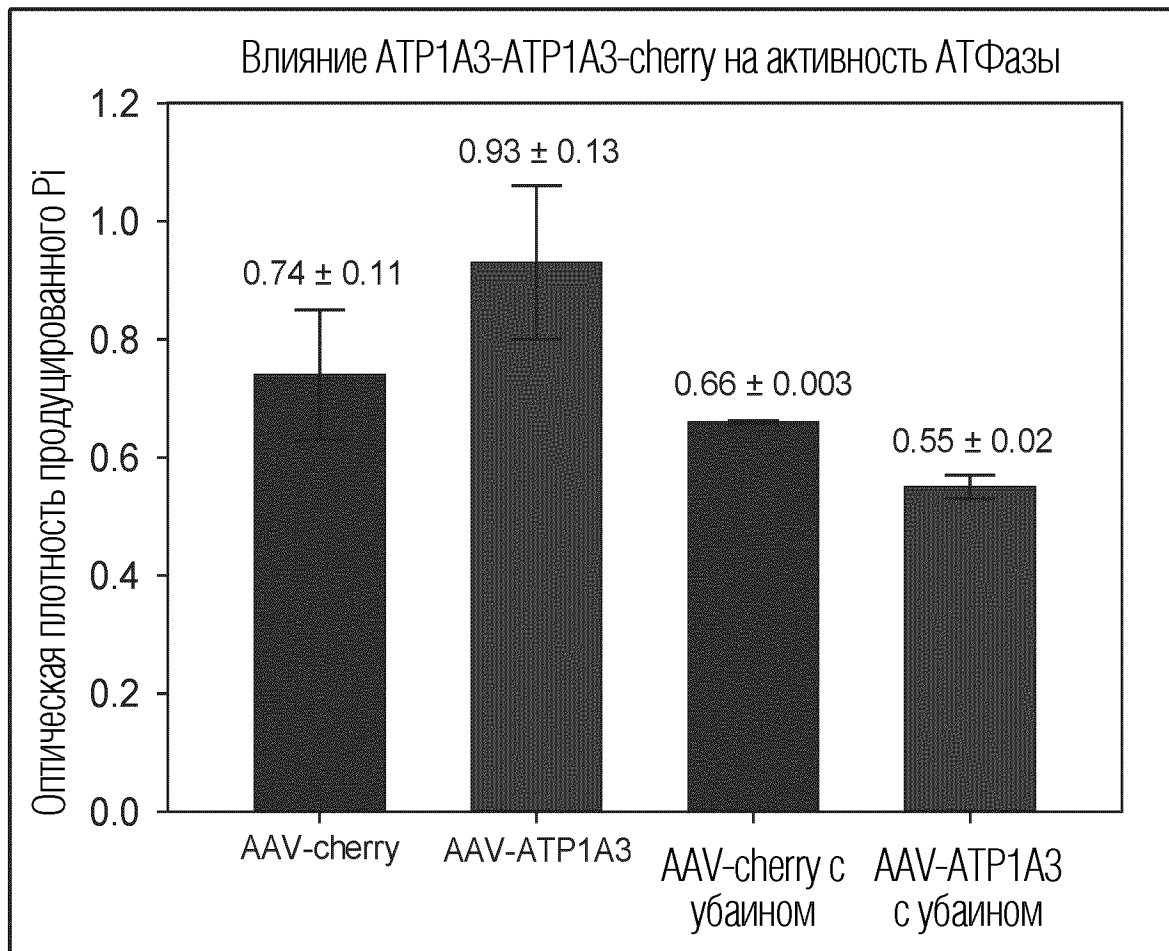
ФИГ. 1



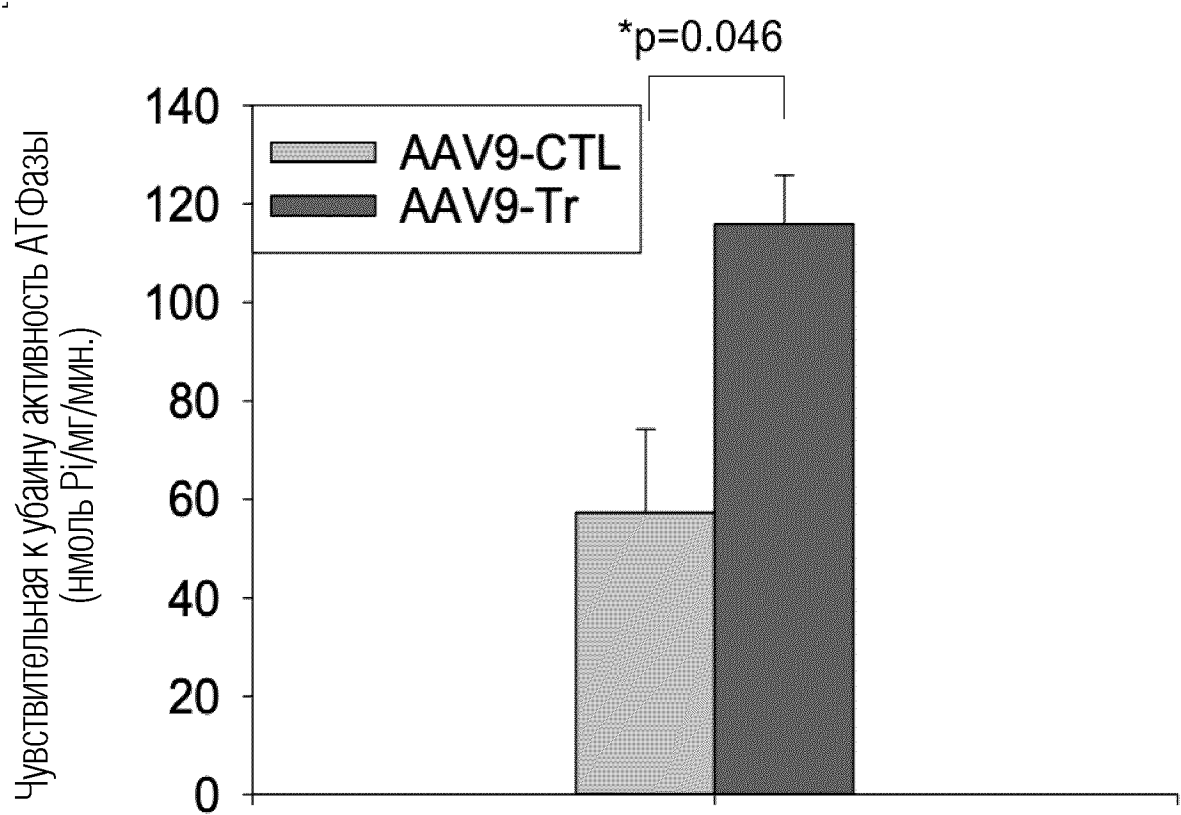
ФИГ. 2



ФИГ. 3

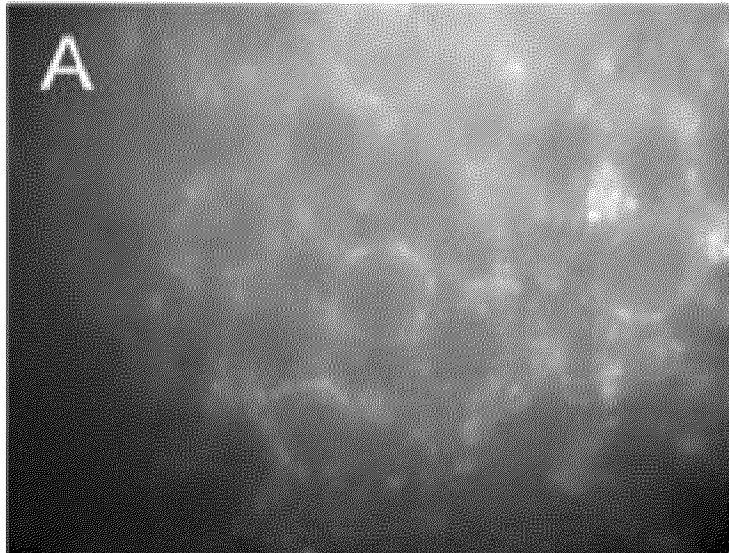


ФИГ. 4

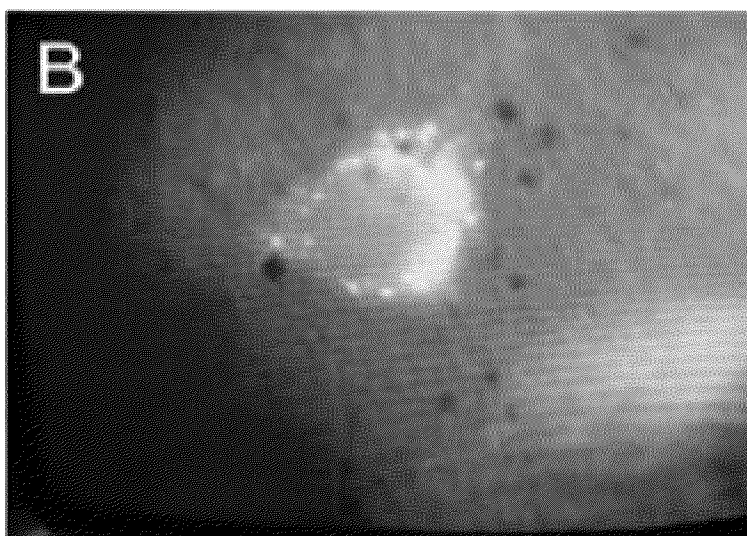


ФИГ. 5

6/22

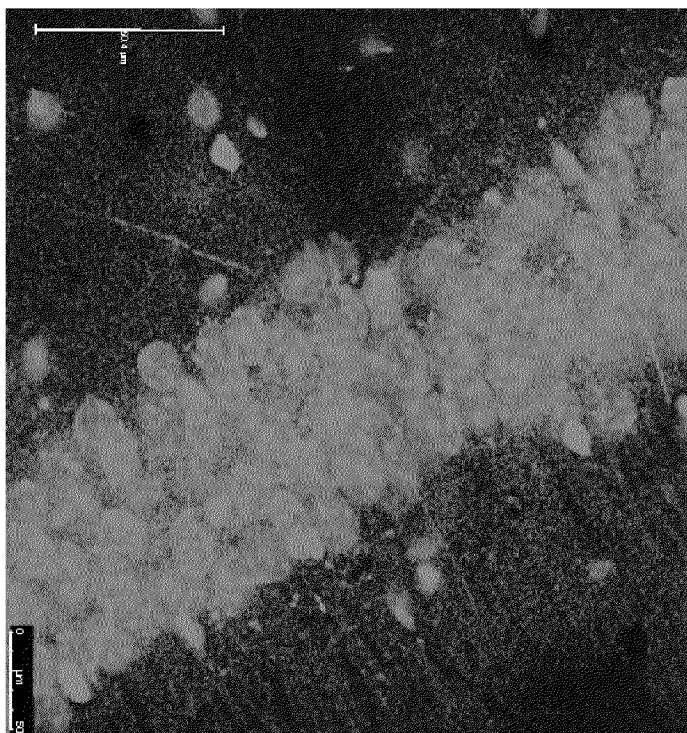


ФИГ. 6А

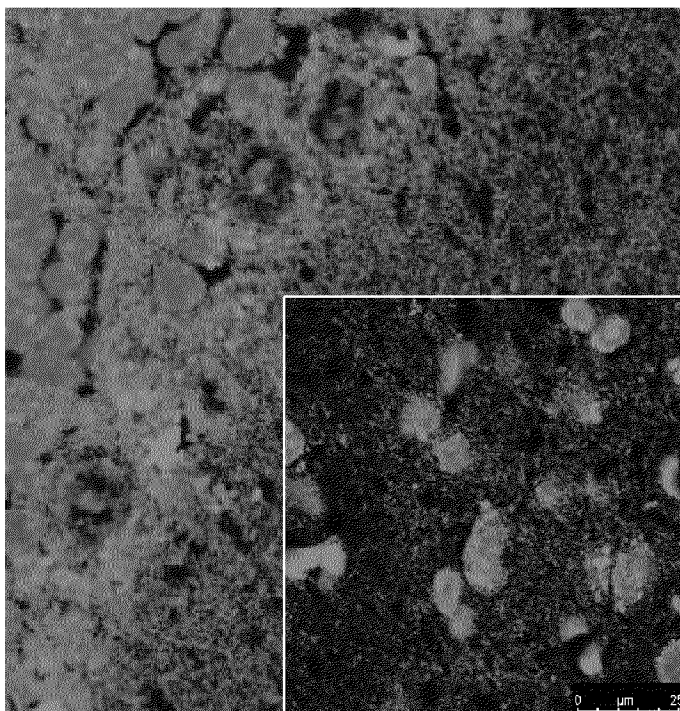


ФИГ. 6В

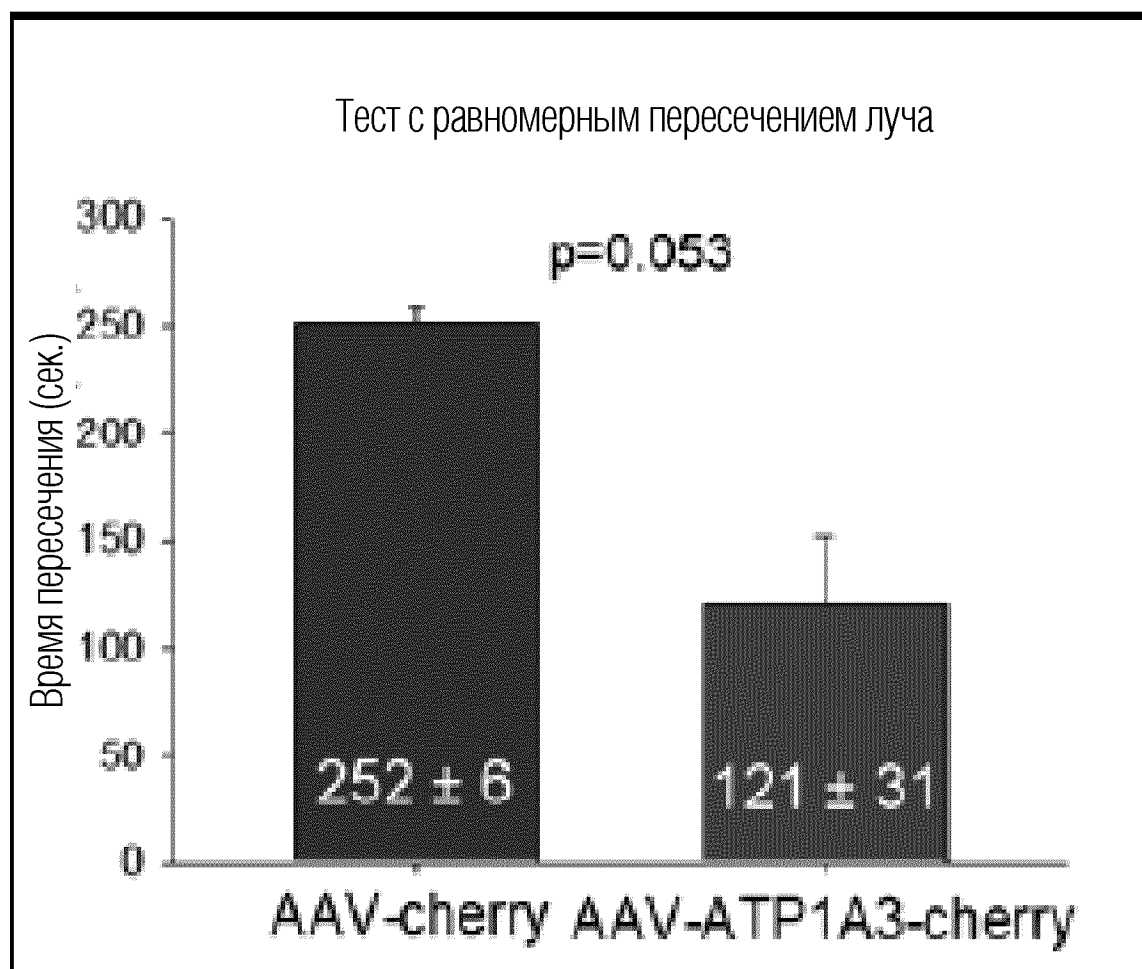
7/22



ФИГ. 7А

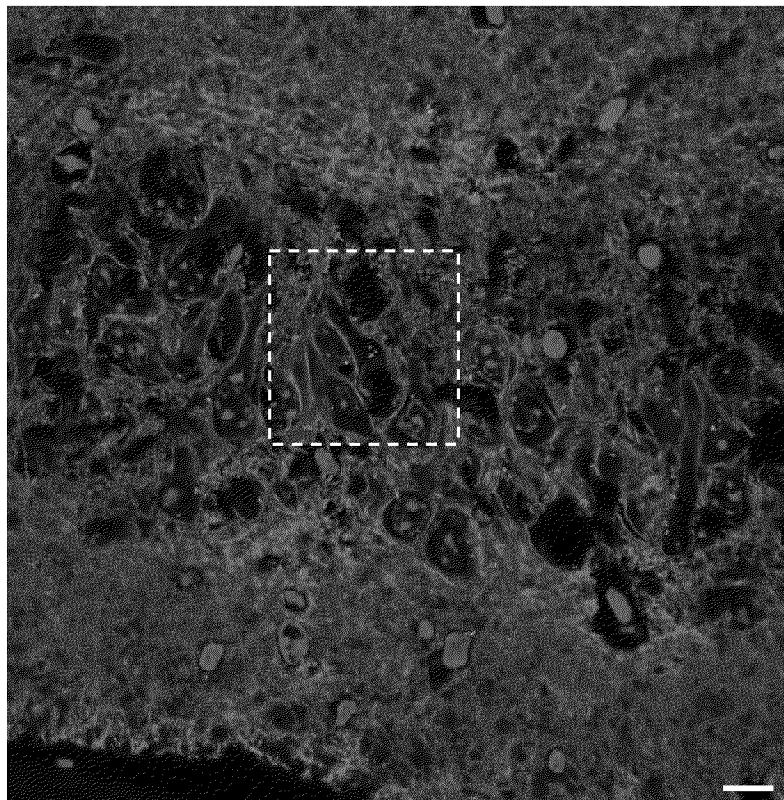


ФИГ. 7В

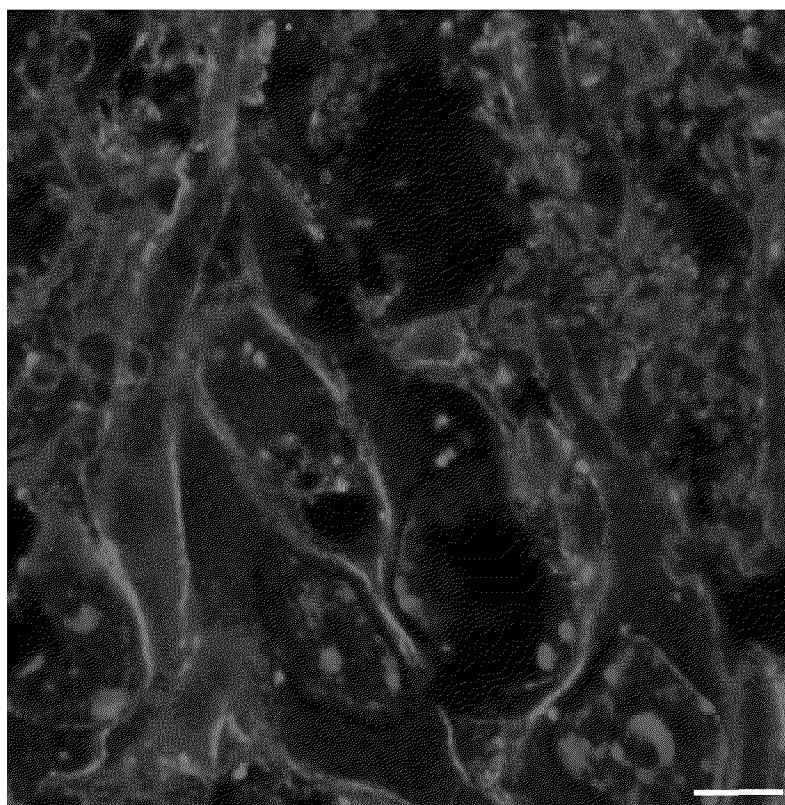


ФИГ. 8

9/22

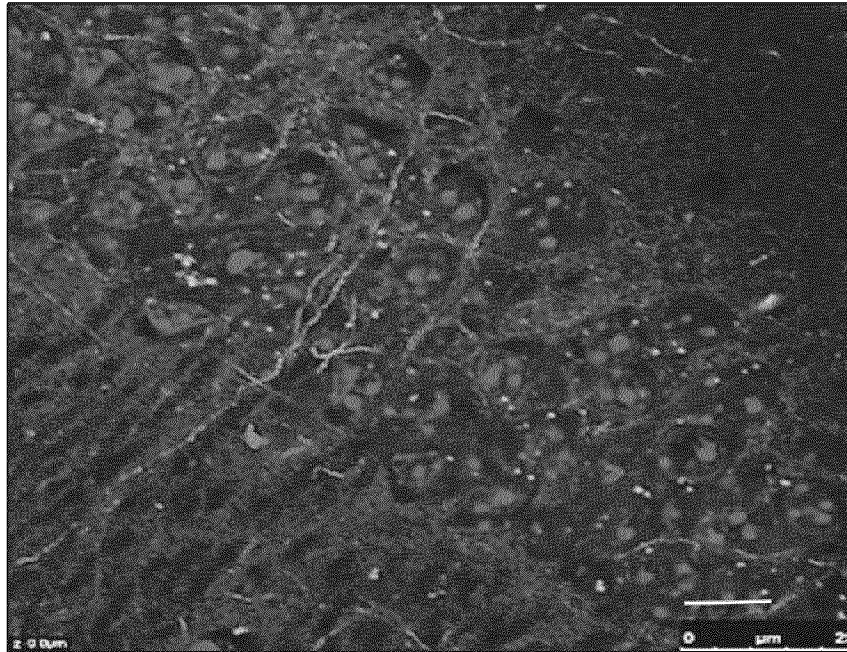


ФИГ. 9А

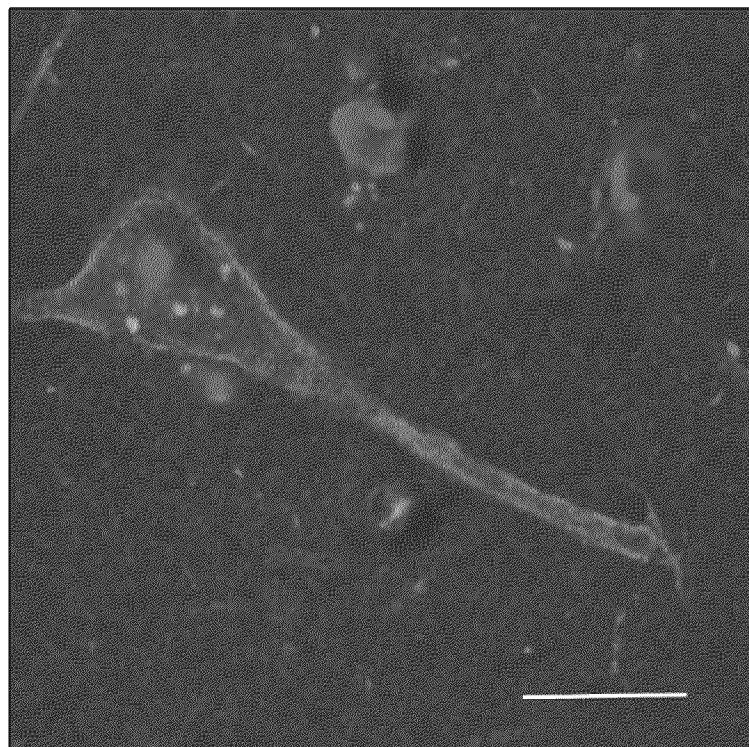


ФИГ. 9В

10/22

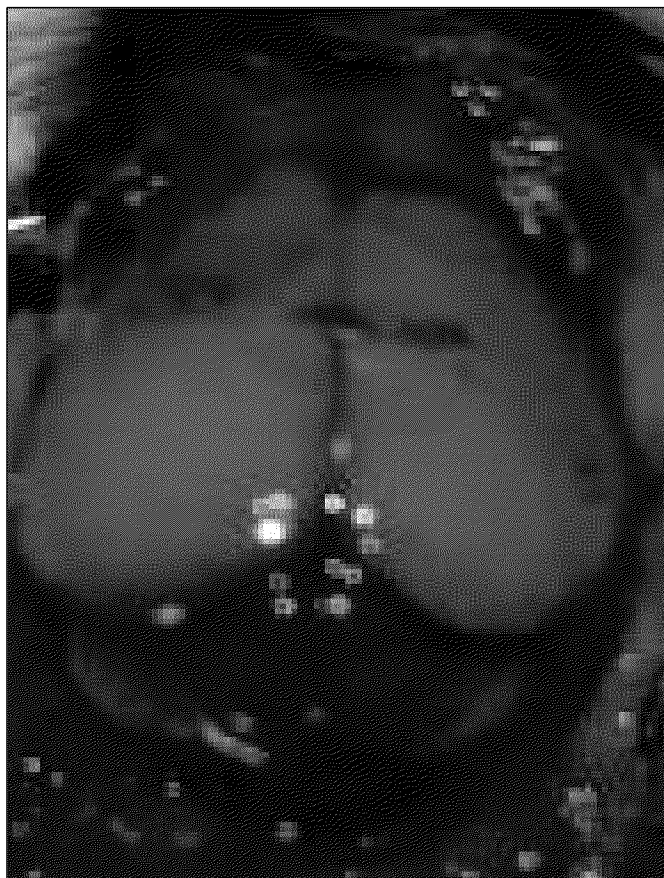


ФИГ. 9С

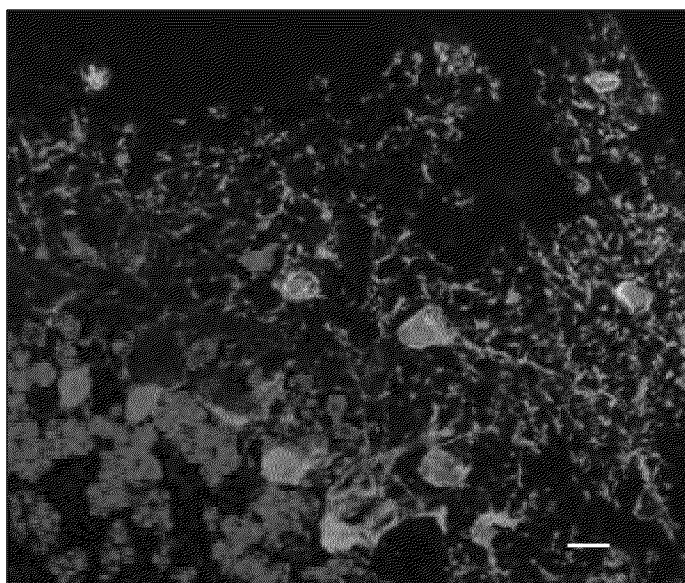


ФИГ. 9D

11/22

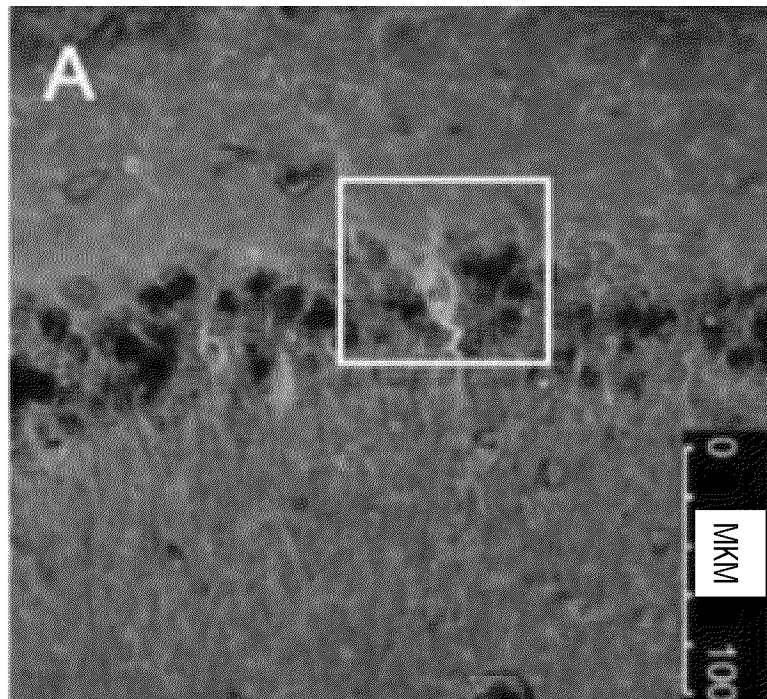


ФИГ. 9Е

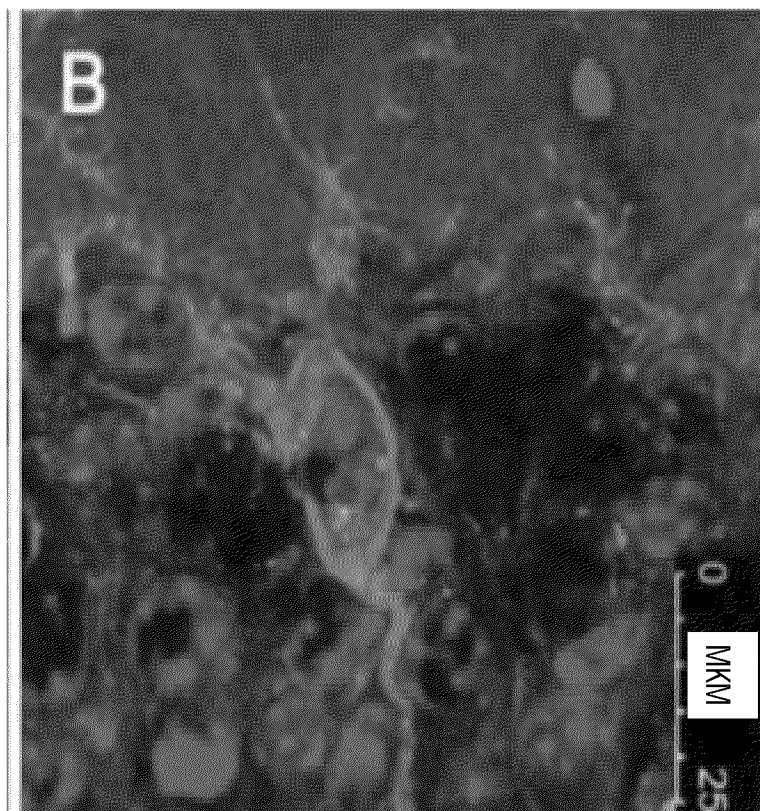


ФИГ. 9F

12/22

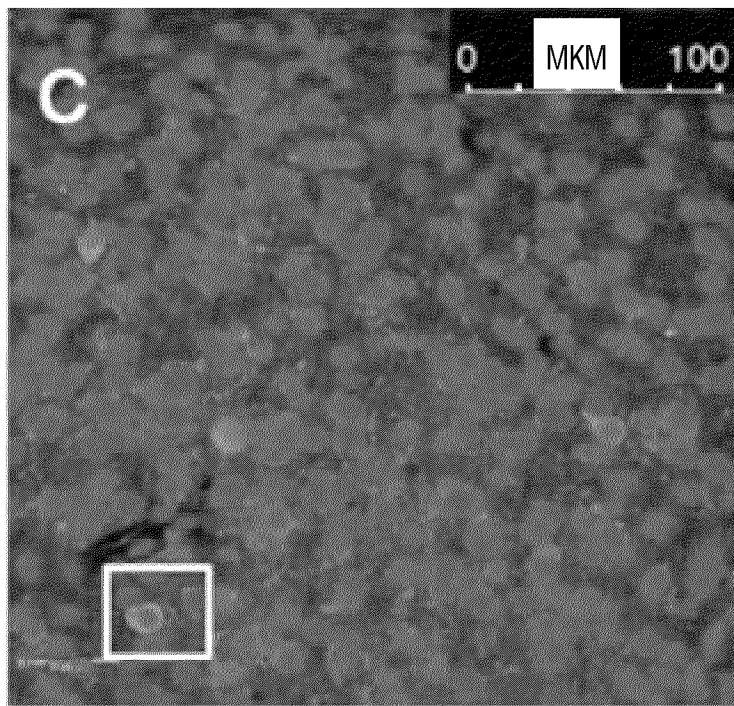


ФИГ. 10А

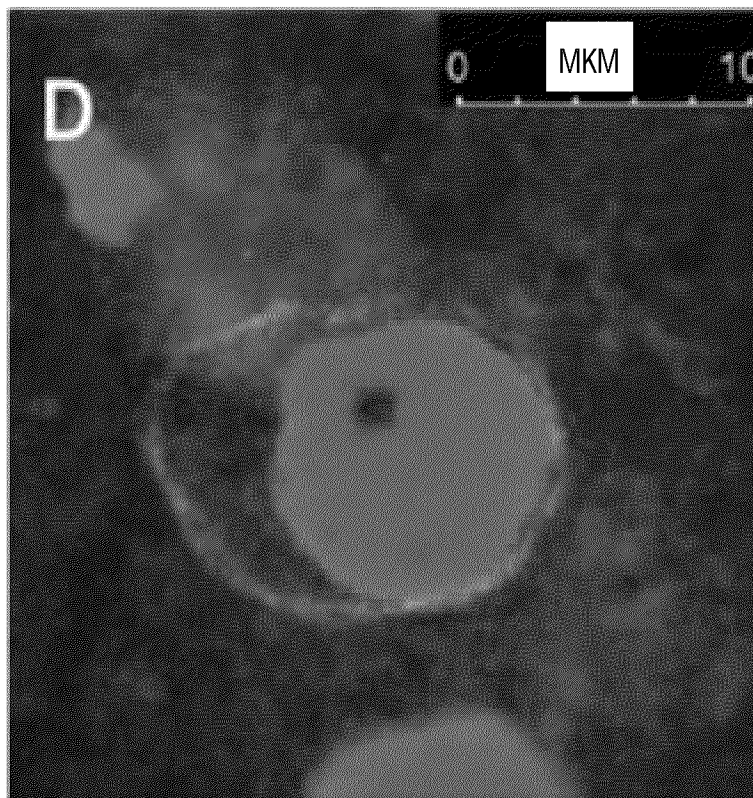


ФИГ. 10В

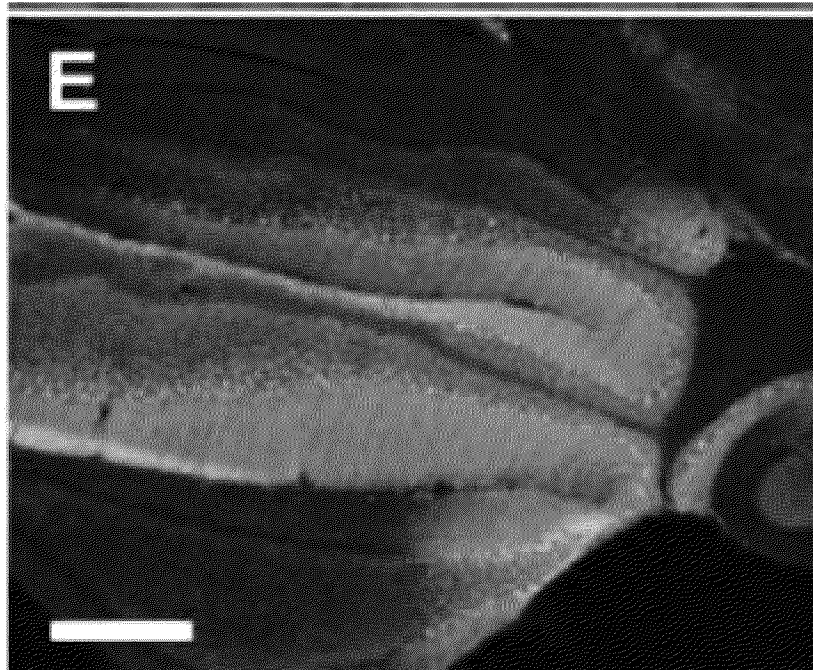
13/22



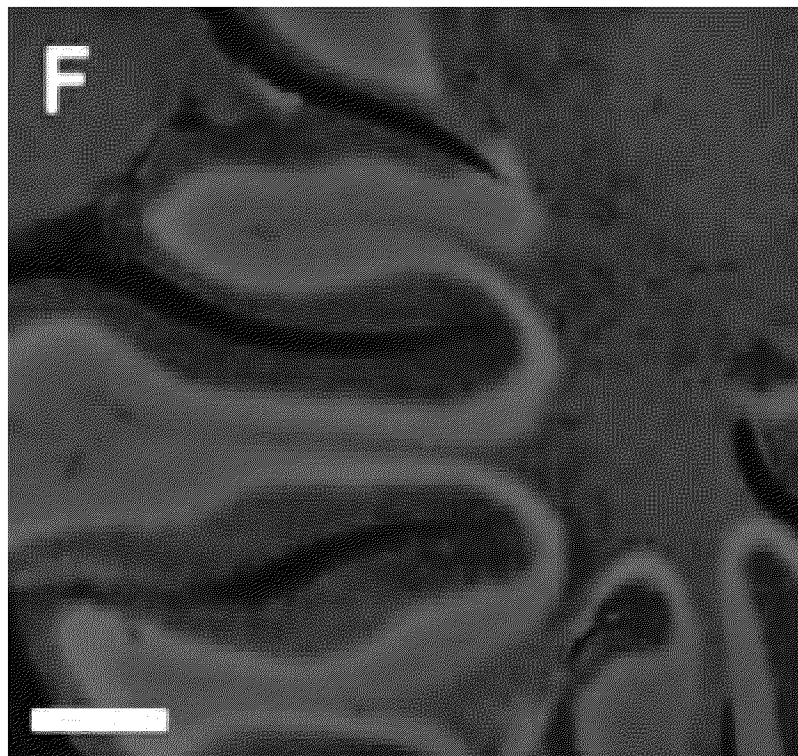
ФИГ. 10С



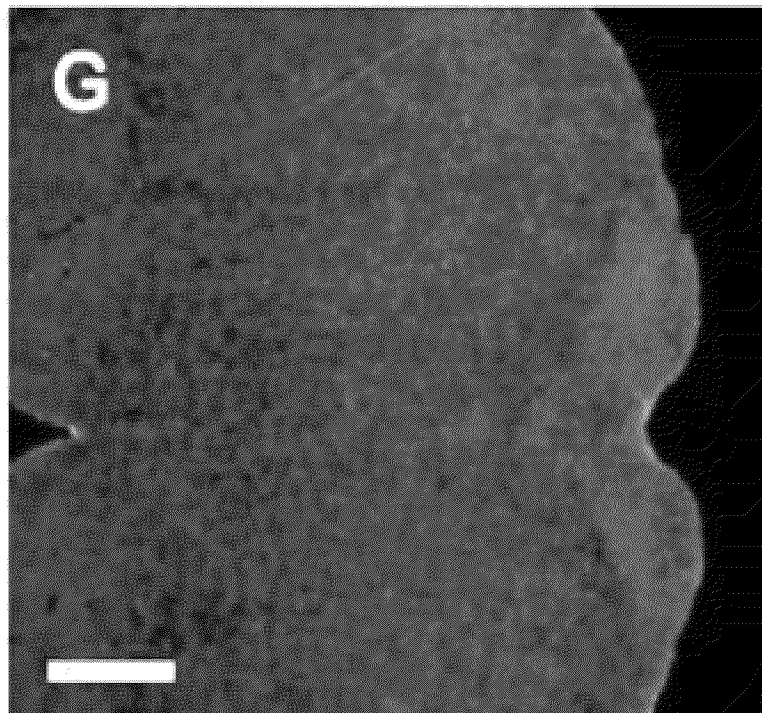
ФИГ. 10D



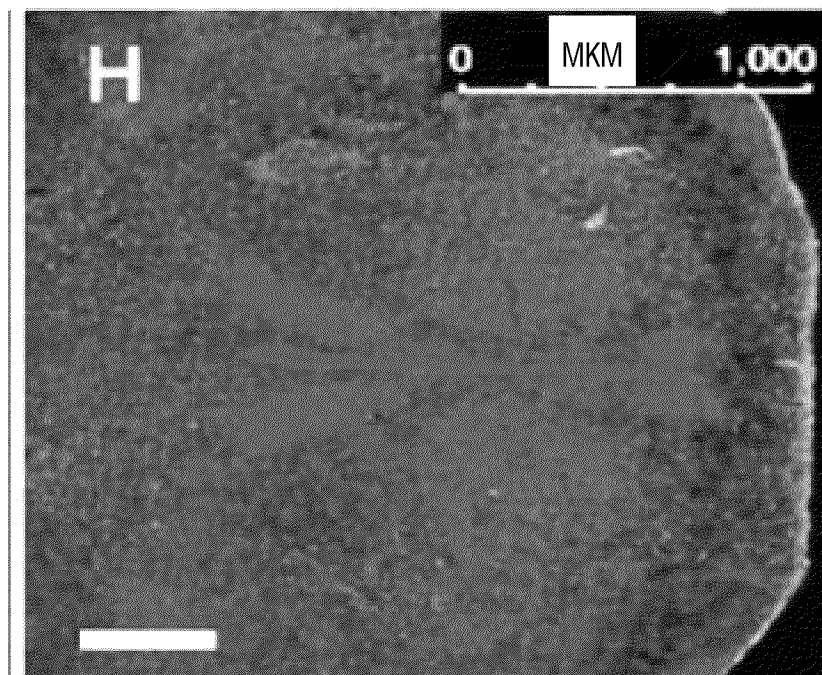
ФИГ. 10Е



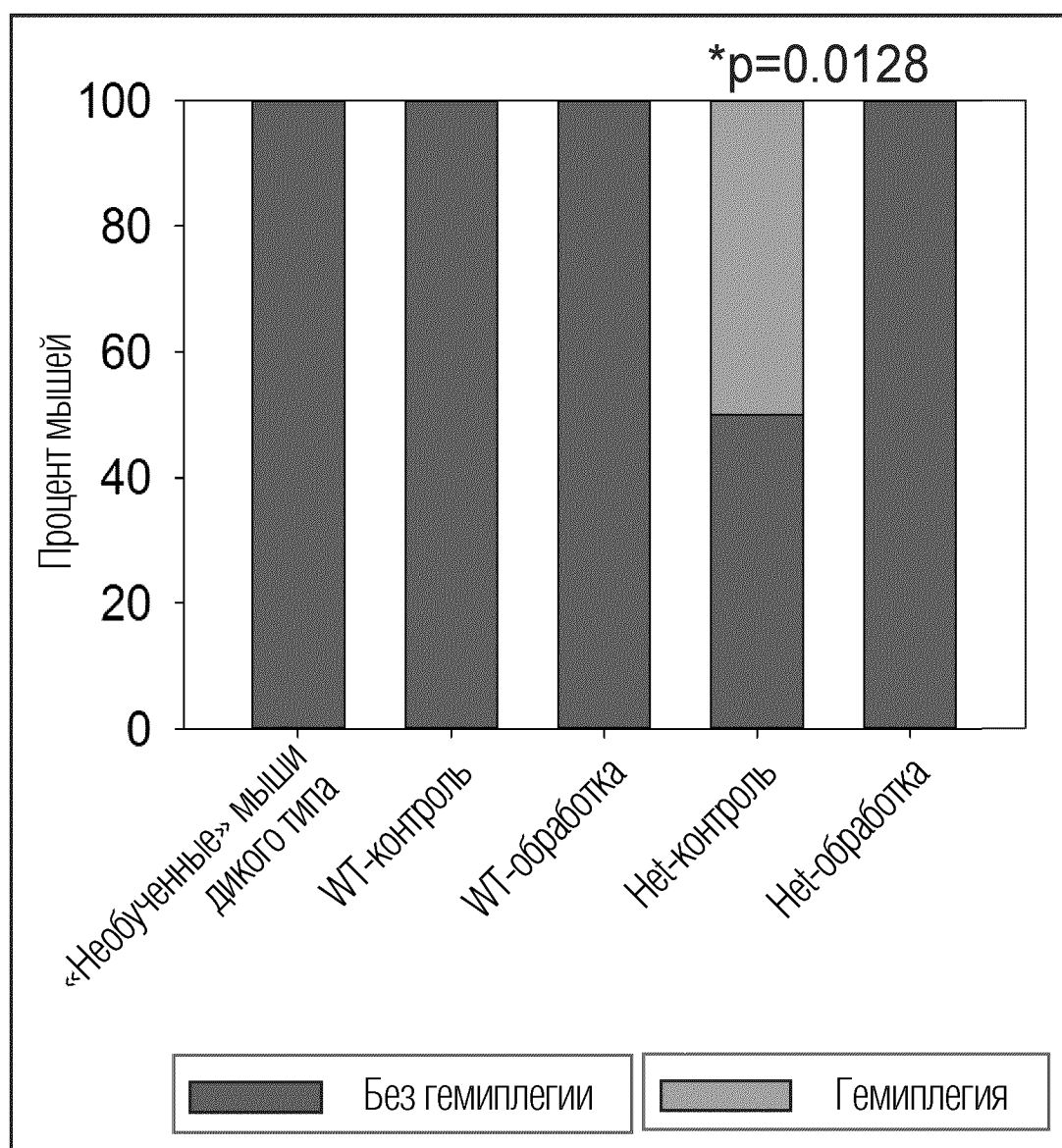
ФИГ. 10F



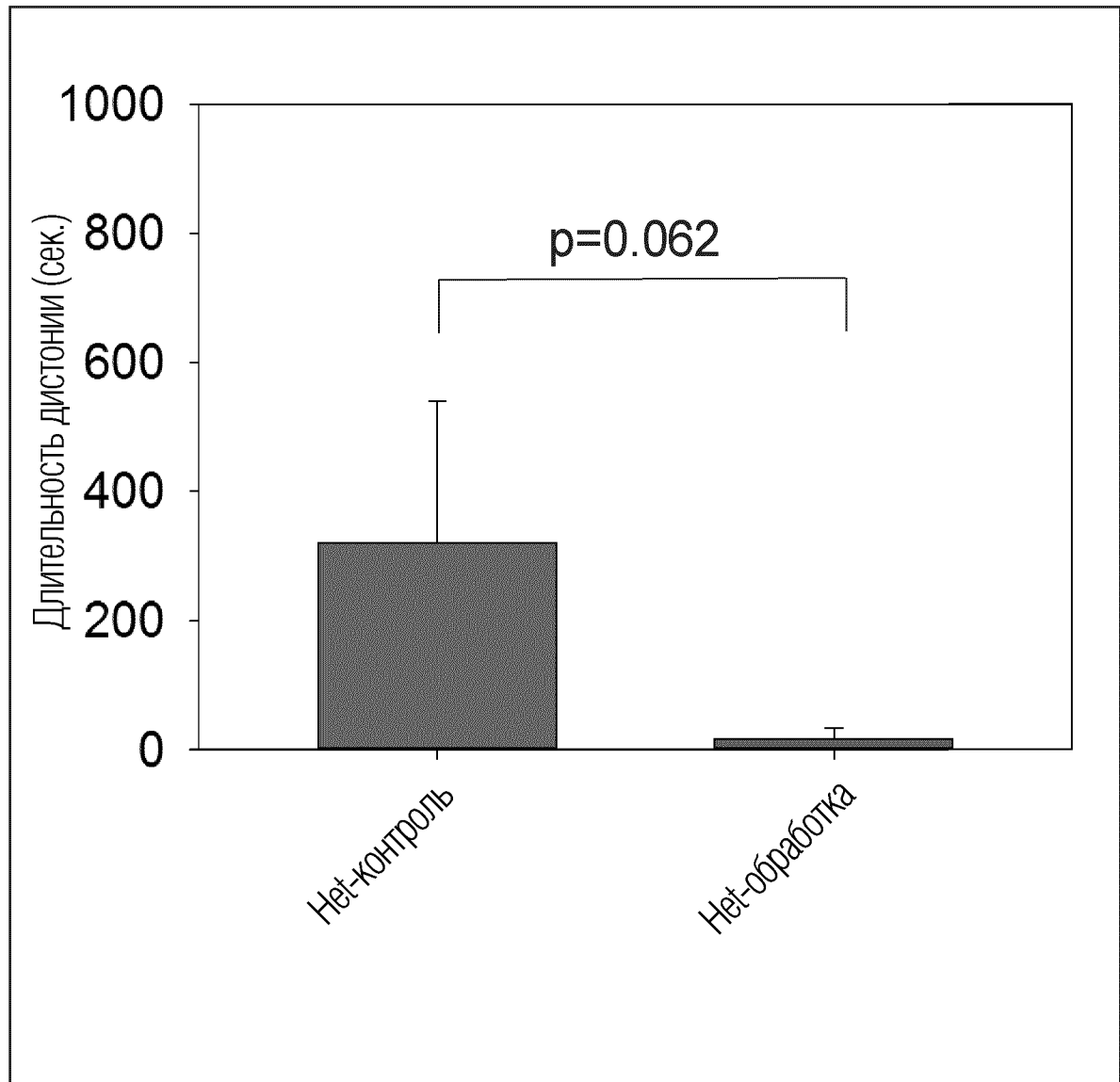
ФИГ. 10Г



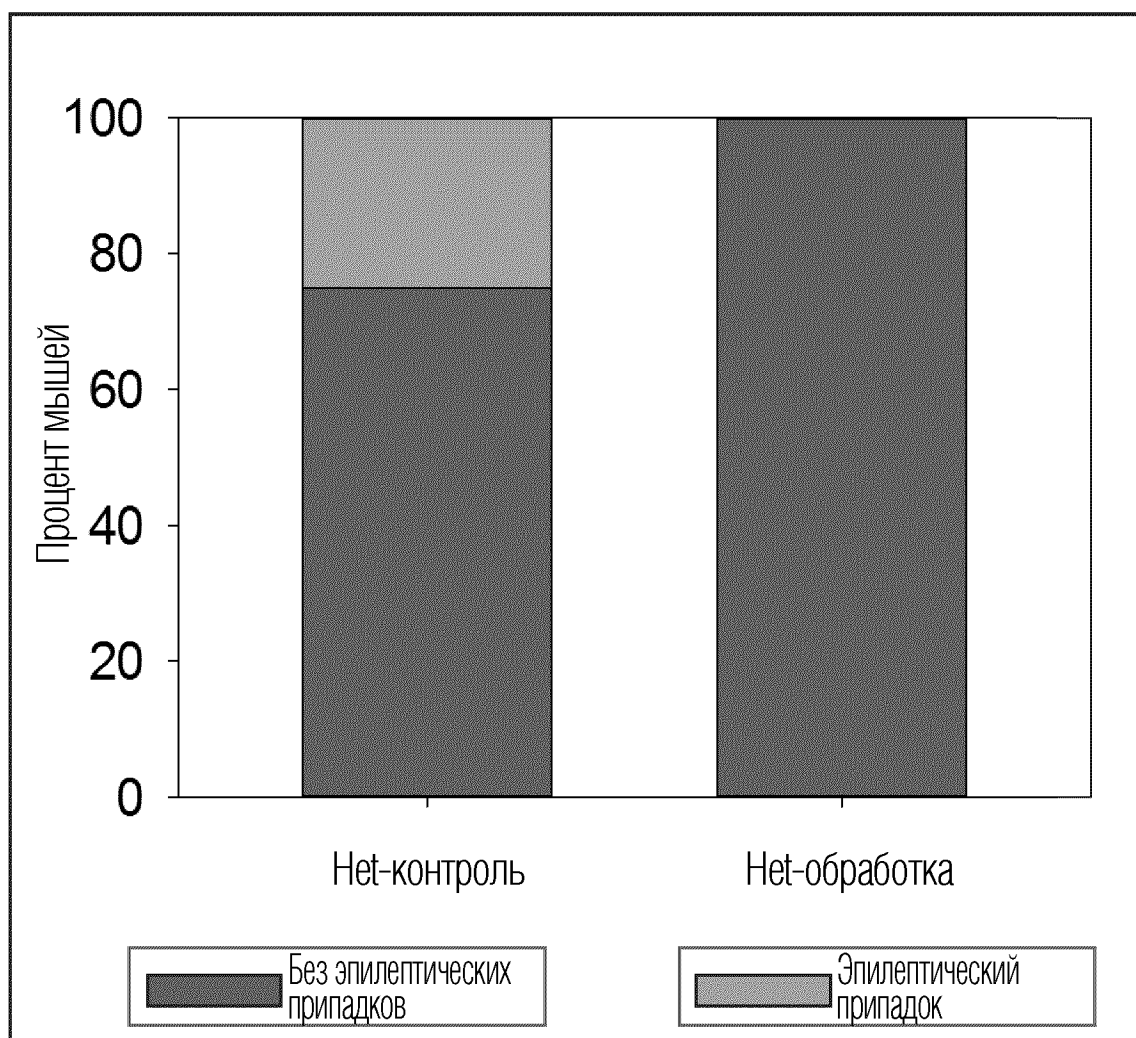
ФИГ. 10Н



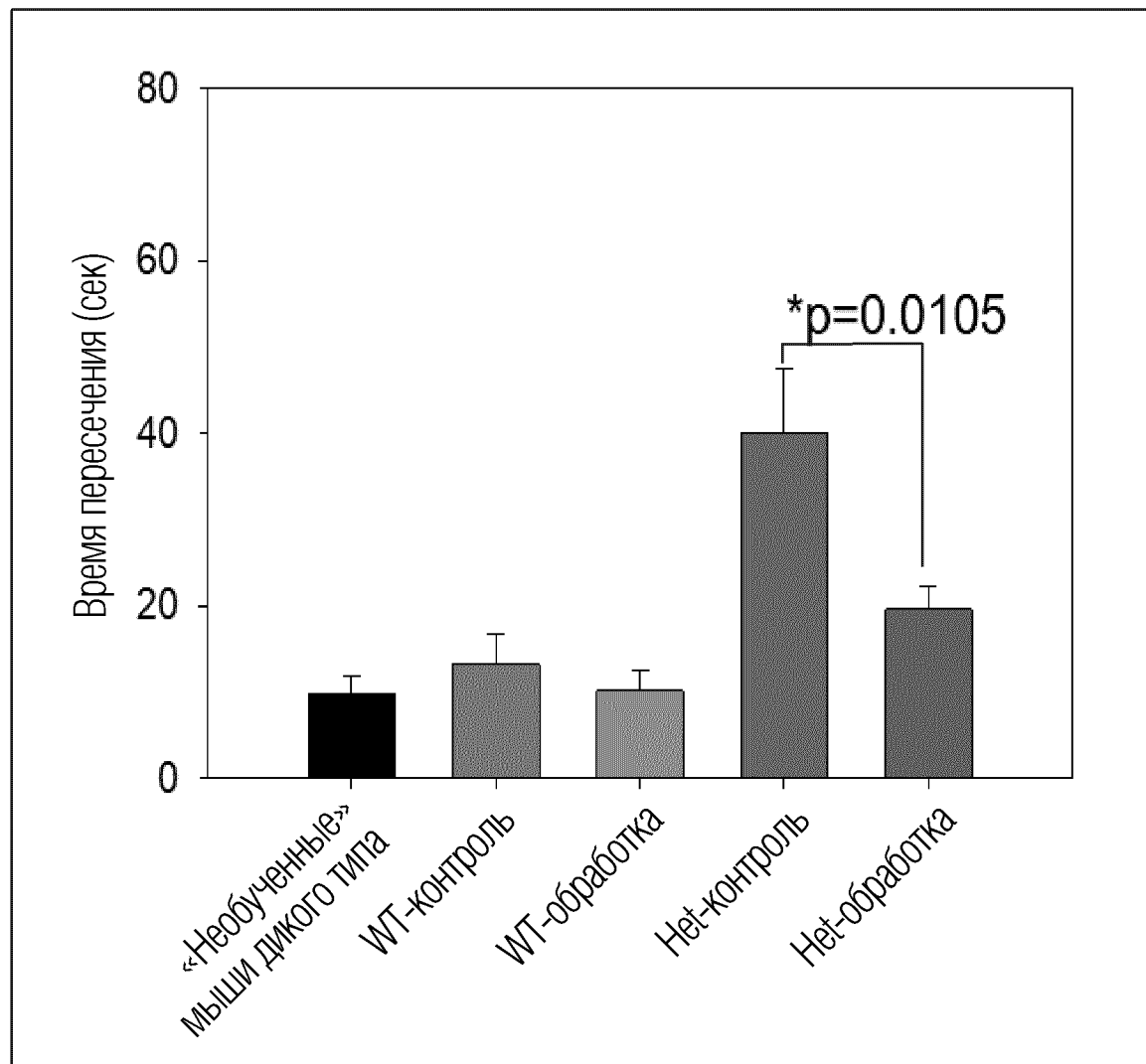
ФИГ. 11



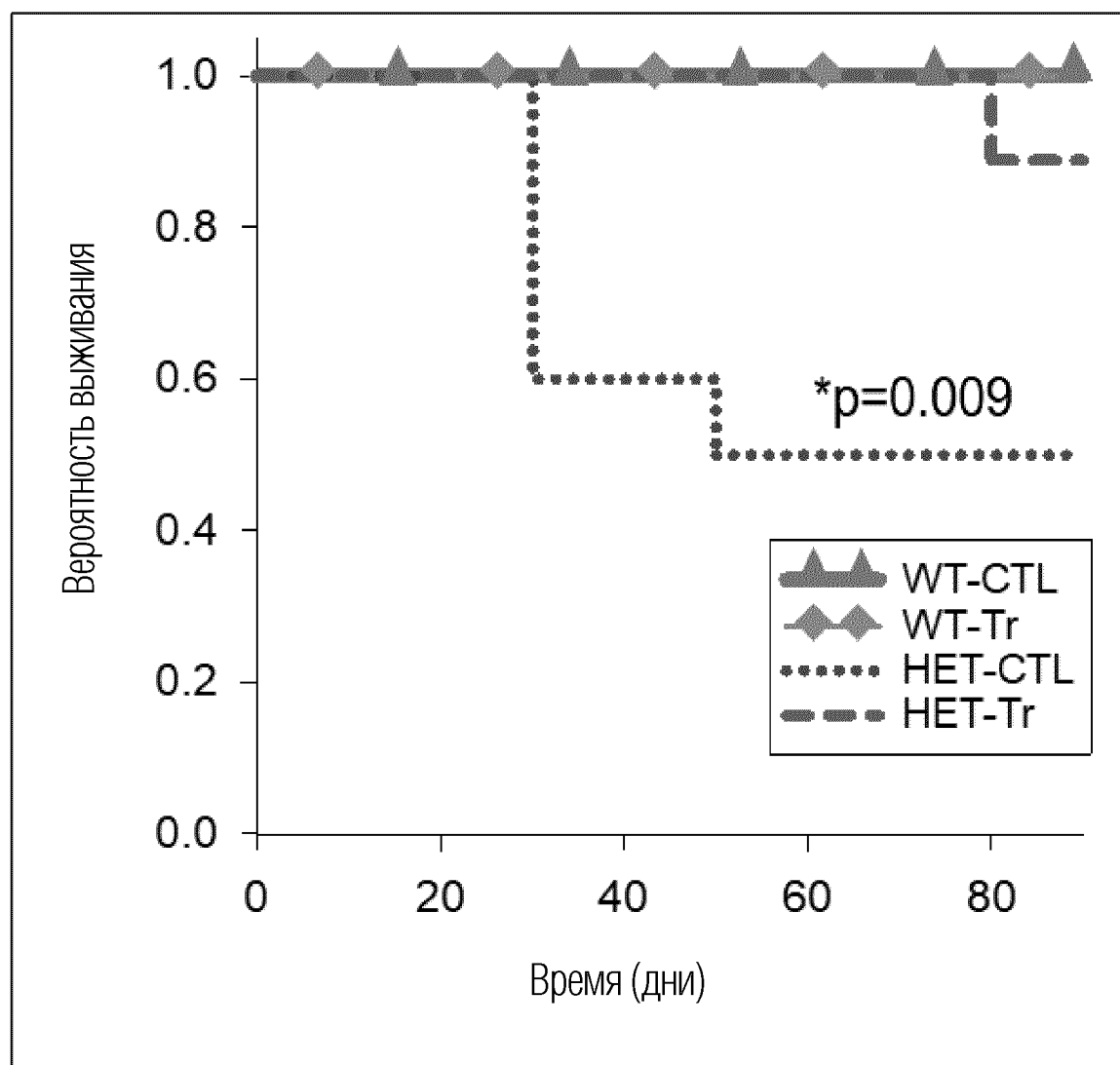
ФИГ. 12



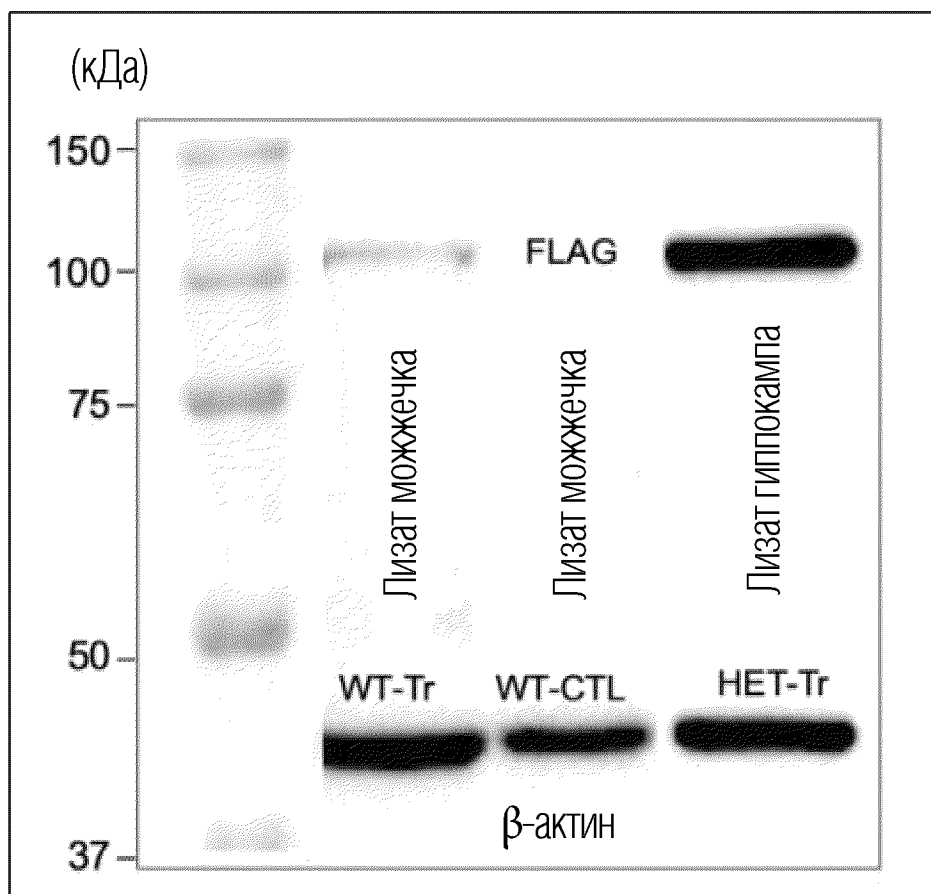
ФИГ. 13



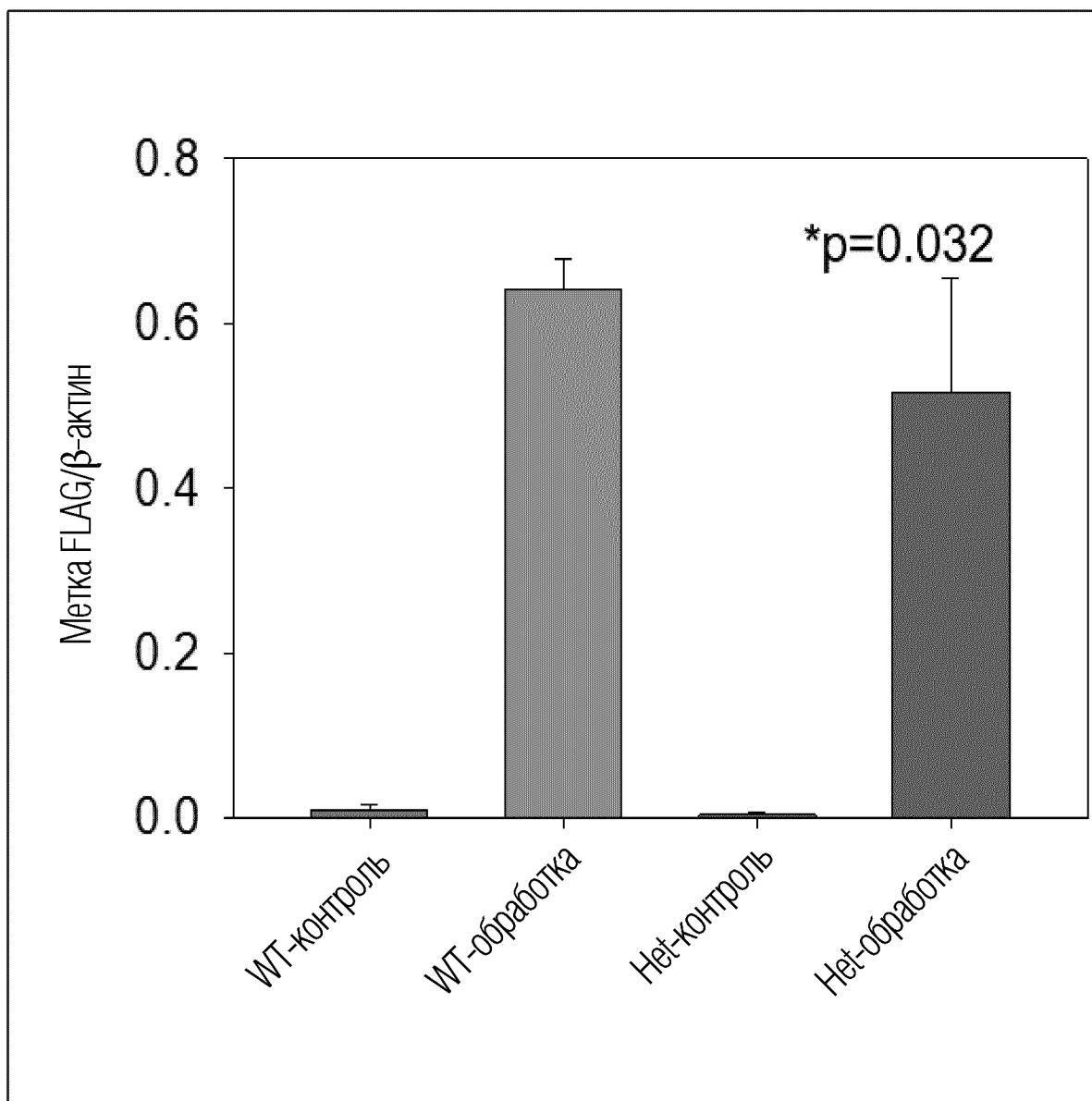
ФИГ. 14



ФИГ. 15



ФИГ. 16



ФИГ. 17