

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202193162** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.04.27

(22) Дата подачи заявки
2020.05.29

(51) Int. Cl. *C12N 15/79* (2006.01)
A61P 25/08 (2006.01)
A61P 25/16 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

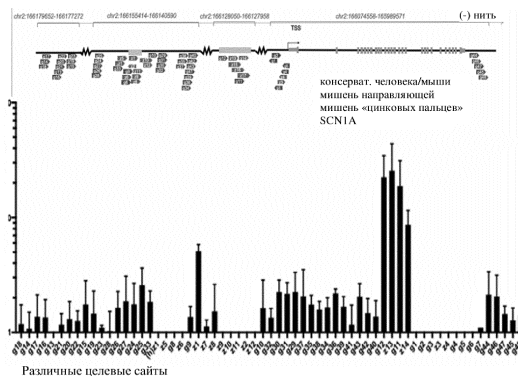
(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ СЕЛЕКТИВНОЙ РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ

(31) 62/854,238; 62/857,727; 63/008,569
(32) 2019.05.29; 2019.06.05; 2020.04.10
(33) US
(86) PCT/US2020/035431
(87) WO 2020/243651 2020.12.03
(71) Заявитель:
ИНКОУДИД ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.
(US)

(72) Изобретатель:
Тальятеля Стефани, Таненхаус Энн,
Рамамуртхи Картик, Янг Эндрю,
Оберкофлер Дэвид (US)

(74) Представитель:
Строкова О.В., Гизатуллин Ш.Ф.,
Гизатуллина Е.М., Прищепный С.В.,
Парамонова К.В., Джермакян Р.В.,
Христофоров А.А., Угрюмов В.М.,
Костюшенкова М.Ю. (RU)

(57) В настоящем документе представлены сконструированные факторы транскрипции для селективной активации SCN1a и их применение для лечения заболеваний и нарушений, таких как синдром Драве. Также представлены сайты связывания микроРНК и их применение для селективной экспрессии в парвальбумин-содержащих нейронах.



A1

202193162

202193162

A1

КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ СЕЛЕКТИВНОЙ РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ

ГЕНОВ

Описание

Ссылка

[1] По настоящей заявке испрашивается приоритет в соответствии с предварительной заявкой на патент США № 62/854238, поданной 29 мая 2019 г.; предварительной заявкой на патент США № 62/857727, поданной 5 июня 2019 г.; и предварительной заявкой на патент США № 63/008569, поданной 10 апреля 2020 г., каждая из которых полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

Перечень последовательностей

[2] Настоящая заявка содержит Перечень последовательностей, который был представлен в электронном виде в формате ASCII и полностью включен в настоящий документ посредством ссылки. Указанная копия ASCII, созданная 28 мая 2020 г., называется 46482-724_601_SL.txt и имеет размер 418483 байта.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

[3] Широкий спектр заболеваний человека связан с аномальной экспрессией генов. В некоторых случаях генетическая мутация в гене вызывает нарушение его регуляции, подавление или отсутствие экспрессии вообще, что приводит к гаплонедостаточности. В некоторых случаях генетическая мутация в гене вызывает его активацию, что приводит к сверхэкспрессии гена. При лечении генетических нарушений или заболеваний существует множество проблем. Один из подходов - генная терапия, которая включает в себя терапевтическую доставку нуклеиновой кислоты в клетки пациента. Тем не менее, различные проблемы, связанные с генной терапией, остаются нерешенными, такие как нежелательный иммунный ответ, вызванный генной терапией, нецелевые эффекты, ограничения клонирующей способности носителей генной терапии (например, вирусов), поддержание терапевтического эффекта в течение более длительного периода времени и т.д. Центральная нервная система (ЦНС) ставит множество уникальных задач для разработки терапии, направленной на устранение основного нарушения экспрессии гена и/или белка. Хотя существуют лекарственные средства, которые помогают управлять симптомами заболеваний/нарушений ЦНС, многие заболевания/нарушения ЦНС, например, синдром Драве, не имеют специальных способов лечения или устранения. Таким образом, существует потребность в новых композициях и способах, способных

модулировать экспрессию любого эндогенного гена, чтобы помочь обратить вспять эффекты заболевания или нарушения, в частности, в терапии со сниженной иммуногенностью, уменьшенными нецелевыми эффектами, повышенной специфичностью для целевого гена и/или повышенной терапевтической эффективностью.

Сущность настоящего изобретения

[4] Согласно одному аспекту в настоящей заявке представлена кассета экспрессии, содержащая последовательность, кодирующую не встречающийся в природе фактор транскрипции, который увеличивает экспрессию гена SCN1A в клетке, причем не встречающийся в природе фактор транскрипции содержит ДНК-связывающий домен (DBD), функционально связанный по меньшей мере с двумя активирующими транскрипцию доменами (TAD) следующим образом: TAD1-TAD2-DBD, DBD-TAD3-TAD4 или TAD1-TAD2-DBD-TAD3-TAD4. Согласно определенным вариантам осуществления TAD1, TAD2, TAD3 и TAD4 независимо выбраны из следующего: VP16, VP64, Viper, CITED2, CITED4, CREB3 или их функциональных фрагментов. Согласно определенным вариантам осуществления TAD1 и TAD2 представляют собой один и тот же TAD. Согласно определенным вариантам осуществления TAD1 и TAD2 представляют собой CITED2 или его функциональный фрагмент. Согласно определенным вариантам осуществления TAD1 и TAD2 представляют собой CITED4 или его функциональный фрагмент. Согласно определенным вариантам осуществления TAD3 и TAD4 представляют собой один и тот же TAD. Согласно определенным вариантам осуществления TAD3 и TAD4 представляют собой CITED2 или его функциональный фрагмент. Согласно определенным вариантам осуществления TAD3 и TAD4 представляют собой CITED4 или его функциональный фрагмент. Согласно определенным вариантам осуществления TAD1, TAD2, TAD3 и TAD4 представляют собой один и тот же TAD. Согласно определенным вариантам осуществления TAD1, TAD2, TAD3 и TAD4 представляют собой CITED2 или его функциональный фрагмент. Согласно определенным вариантам осуществления TAD1, TAD2, TAD3 и TAD4 представляют собой CITED4 или его функциональный фрагмент.

[5] Согласно определенным вариантам осуществления линкер отсутствует по меньшей мере между двумя доменами TAD.

[6] Согласно определенным вариантам осуществления существует линкер по меньшей мере между двумя доменами TAD. Согласно определенным вариантам осуществления линкер содержит или состоит из GGSGGGSG (SEQ ID NO: 177) или GGSGGGSGGGSGGGSG (SEQ ID NO: 178).

[7] Согласно определенным вариантам осуществления DBD связывается с областью генома, содержащей 18-27 нуклеотидов.

[8] Согласно определенным вариантам осуществления DBD характеризуется идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 80%, по отношению к его ближайшему человеческому аналогу. Согласно определенным вариантам осуществления DBD характеризуется идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 90%, по отношению к его ближайшему человеческому аналогу. Согласно определенным вариантам осуществления каждый из DBD и по меньшей мере двух TAD характеризуется идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 80%, по отношению к их ближайшим человеческим аналогам. Согласно определенным вариантам осуществления каждый из DBD и по меньшей мере двух TAD характеризуется идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 90%, по отношению к их ближайшим человеческим аналогам.

[9] Согласно определенным вариантам осуществления DBD содержит направляющую РНК и инактивированный нуклеазами белок Cas. Согласно определенным вариантам осуществления инактивированный нуклеазой белок Cas представляет собой инактивированный нуклеазой белок Cas9.

[10] Согласно определенным вариантам осуществления DBD содержит домен типа «цинковые пальцы». Согласно определенным вариантам осуществления DBD содержит от шести до девяти доменов типа «цинковые пальцы». Согласно определенным вариантам осуществления DBD содержит шесть «цинковых пальцев». Согласно определенным вариантам осуществления DBD связывается с областью генома, содержащей 18 нуклеотидов. Согласно определенным вариантам осуществления DBD содержит девять «цинковых пальцев». Согласно определенным вариантам осуществления DBD связывается с областью генома, содержащей 27 нуклеотидов.

[11] Согласно определенным вариантам осуществления DBD содержит последовательность, характеризующуюся идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 95%, по отношению к любой из SEQ ID NO: 148-151. Согласно определенным вариантам осуществления DBD содержит последовательность, содержащую любую из SEQ ID NO: 148-151.

[12] Согласно определенным вариантам осуществления DBD получен из EGR1 человека или EGR3 человека.

[13] Согласно определенным вариантам осуществления DBD содержит последовательность, характеризующуюся идентичностью, составляющей по меньшей мере

90%, по отношению к любой из SEQ ID NO: 77-98. Согласно определенным вариантам осуществления DBD содержит SEQ ID NO: 77-98.

[14] Согласно определенным вариантам осуществления DBD содержит последовательность, характеризующуюся идентичностью, составляющей по меньшей мере 90%, по отношению к SEQ ID NO: 92. Согласно определенным вариантам осуществления DBD содержит SEQ ID NO: 92.

[15] Согласно определенным вариантам осуществления не встречающийся в природе фактор транскрипции содержит последовательность, характеризующуюся идентичностью, составляющей по меньшей мере 90%, по отношению к SEQ ID NO: 130 или 131. Согласно определенным вариантам осуществления не встречающийся в природе фактор транскрипции содержит SEQ ID NO: 130 или 131.

[16] Согласно определенным вариантам осуществления кассета экспрессии содержит нуклеотидную последовательность, характеризующуюся идентичностью, составляющей по меньшей мере 90%, по отношению к любой из SEQ ID NO: 72 или 73. Согласно определенным вариантам осуществления кассета экспрессии содержит нуклеотидную последовательность любой из SEQ ID NO: 72 или 73.

[17] Согласно определенным вариантам осуществления кассета экспрессии дополнительно содержит регуляторный элемент, который управляет экспрессией фактора транскрипции на более высоком уровне в PV-содержащих нейронах, чем в других типах клеток. Согласно определенным вариантам осуществления регуляторный элемент содержит любую из SEQ ID NO: 1-4. Согласно определенным вариантам осуществления регуляторный элемент содержит SEQ ID NO: 2 или 3.

[18] Согласно определенным вариантам осуществления кассета экспрессии дополнительно содержит селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК. Согласно определенным вариантам осуществления селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК характеризуется идентичностью, составляющей по меньшей мере 90%, по отношению к любой из SEQ ID NO: 7, 14 или 15. Согласно определенным вариантам осуществления селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК содержит любую из SEQ ID NO: 7, 14 или 15.

[19] Согласно определенным вариантам осуществления кассета экспрессии представляет собой часть вирусного вектора. Согласно определенным вариантам осуществления вирусный вектор представляет собой вирус AAV. Согласно определенным вариантам осуществления вирус AAV представляет собой вирус AAV9 или вирус scAAV9. Согласно определенным вариантам осуществления вирусный вектор представляет собой лентивирус.

[20] Согласно другому аспекту в заявке представлена кассета экспрессии, содержащая последовательность, кодирующую не встречающийся в природе фактор транскрипции, который увеличивает экспрессию гена SCN1A в клетке, причем не встречающийся в природе фактор транскрипции содержит ДНК-связывающий домен, функционально связанный с активирующим транскрипцию доменом, причем ДНК-связывающий домен представляет собой белок типа «цинковые пальцы», содержащий последовательность LEPGEKP – [YKCPECGKSFS X HQRTH TGEKP]_n - YKCPECGKSFS X HQRTH – TGKKTS (SEQ ID NO: 147), и причем тег HA отсутствует (SEQ ID NO: 303) между ДНК-связывающим доменом и активирующим транскрипцию доменом. Согласно определенным вариантам осуществления активирующий транскрипцию домен содержит последовательность VP16, VPR или VP64 или их функциональный фрагмент. Согласно определенным вариантам осуществления активирующий транскрипцию домен содержит VP64.

[21] Согласно определенным вариантам осуществления ДНК-связывающий домен связывается с геномной областью, содержащей 18-27 нуклеотидов. Согласно определенным вариантам осуществления ДНК-связывающий домен представляет собой домен типа «цинковые пальцы», содержащий SEQ ID NO: 147, где $n = 6-9$. Согласно определенным вариантам осуществления ДНК-связывающий домен представляет собой домен типа «цинковые пальцы», содержащий SEQ ID NO: 147, где $n = 6$. Согласно определенным вариантам осуществления ДНК-связывающий домен связывается с областью генома, содержащей 18 нуклеотидов. Согласно определенным вариантам осуществления ДНК-связывающий домен представляет собой домен типа «цинковые пальцы», содержащий SEQ ID NO: 147, где $n = 9$. Согласно определенным вариантам осуществления ДНК-связывающий домен связывается с геномной областью, содержащей 27 нуклеотидов.

[22] Согласно определенным вариантам осуществления ДНК-связывающий домен содержит последовательность, характеризующуюся идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 95%, по отношению к любой из SEQ ID NO: 148-151. Согласно определенным вариантам осуществления ДНК-связывающий домен содержит последовательность, содержащую любую из SEQ ID NO: 148-151.

[23] Согласно определенным вариантам осуществления ДНК-связывающий домен содержит последовательность, характеризующуюся идентичностью, составляющей по меньшей мере 90%, по отношению к любой из SEQ ID NO: 77-91. Согласно определенным вариантам осуществления ДНК-связывающий домен содержит любую из SEQ ID NO: 77-91.

[24] Согласно определенным вариантам осуществления кассета экспрессии дополнительно содержит регуляторный элемент, который управляет экспрессией фактора транскрипции на более высоком уровне в PV-содержащих нейронах, чем в других типах клеток. Согласно определенным вариантам осуществления регуляторный элемент содержит любую из SEQ ID NO: 1-4. Согласно определенным вариантам осуществления регуляторный элемент содержит SEQ ID NO: 2 или 3.

[25] Согласно определенным вариантам осуществления не встречающийся в природе фактор транскрипции содержит последовательность, характеризующуюся идентичностью, составляющей по меньшей мере 90%, по отношению к SEQ ID NO: 127. Согласно определенным вариантам осуществления не встречающийся в природе фактор транскрипции содержит SEQ ID NO: 127.

[26] Согласно определенным вариантам осуществления кассета экспрессии содержит нуклеотидную последовательность, характеризующуюся идентичностью, составляющей по меньшей мере 90%, по отношению к любой из SEQ ID NO: 93 или 71. Согласно определенным вариантам осуществления кассета экспрессии содержит нуклеотидную последовательность любой из SEQ ID NO: : 93 или 71.

[27] Согласно определенным вариантам осуществления кассета экспрессии дополнительно содержит селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК. Согласно определенным вариантам осуществления селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК характеризуется идентичностью, составляющей по меньшей мере 90%, по отношению к любой из SEQ ID NO: 7, 14 или 15. Согласно определенным вариантам осуществления селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК содержит любую из SEQ ID NO: 7, 14 или 15.

[28] Согласно определенным вариантам осуществления кассета экспрессии представляет собой часть вирусного вектора. Согласно определенным вариантам осуществления вирусный вектор представляет собой вирус AAV. Согласно определенным вариантам осуществления вирус AAV представляет собой вирус AAV9 или вирус scAAV9. Согласно определенным вариантам осуществления вирусный вектор представляет собой лентивирус. Согласно другому аспекту в заявке представлен полинуклеотид, содержащий селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК, содержащий последовательность, характеризуется идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 80%, по отношению к SEQ ID NO: 14 или 15, причем сайт связывания микроРНК снижает экспрессию трансгена в возбуждающих нейронах. Согласно определенным вариантам осуществления селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК содержит SEQ ID NO: 14. Согласно определенным вариантам осуществления

селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК содержит SEQ ID NO: 15. Согласно другому аспекту в заявке представлена кассета экспрессии, содержащая селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК и промотор и/или энхансер. Согласно определенным вариантам осуществления промотор и/или энхансер представляет собой селективный в отношении PV регуляторный элемент, который управляет экспрессией трансгена на более высоком уровне в парвальбумин-содержащих нейронах (PV), чем в других типах клеток. Согласно определенным вариантам осуществления селективный в отношении PV регуляторный элемент функционально связан с трансгеном.

[29] Согласно другому аспекту в настоящей заявке представлена кассета экспрессии, содержащая регуляторный элемент, функционально связанный с трансгеном, и по меньшей мере один сайт связывания микроРНК, причем регуляторный элемент управляет экспрессией трансгена на более высоком уровне в парвальбумин-содержащих (PV) нейронах, чем в других типах клеток, и причем сайт связывания микроРНК снижает экспрессию трансгена в возбуждающих нейронах. Согласно определенным вариантам осуществления кассета экспрессии не содержит SEQ ID NO: 67. Согласно определенным вариантам осуществления сайт связывания микроРНК содержит по меньшей мере один сайт связывания для MIR128 (SEQ ID NO: 9). Согласно определенным вариантам осуществления сайт связывания микроРНК содержит по меньшей мере один сайт связывания для MIR221 (SEQ ID NO: 11). Согласно определенным вариантам осуществления сайт связывания микроРНК содержит по меньшей мере один сайт связывания для MIR222 (SEQ ID NO: 13). Согласно определенным вариантам осуществления сайт связывания микроРНК содержит по меньшей мере один сайт связывания для MIR128 (SEQ ID NO: 9) и по меньшей мере один сайт связывания для MIR221 (SEQ ID NO: 11). Согласно определенным вариантам осуществления сайт связывания микроРНК содержит по меньшей мере один сайт связывания для MIR128 (SEQ ID NO: 9), по меньшей мере один сайт связывания для MIR221 (SEQ ID NO: 11) и по меньшей мере один сайт связывания для MIR222 (SEQ ID NO: 13). Согласно определенным вариантам осуществления сайт связывания микроРНК содержит последовательность, характеризующуюся идентичностью, составляющей по меньшей мере 90%, по отношению к любой из SEQ ID NO: 7, 14 или 15. Согласно определенным вариантам осуществления сайт связывания микроРНК содержит SEQ ID NO: 7, 14 или 15.

[30] Согласно определенным вариантам осуществления трансген кодирует полипептид, содержащий не встречающийся в природе фактор транскрипции, который увеличивает экспрессию гена SCN1A в клетке. Согласно определенным вариантам осуществления фактор транскрипции связывается с областью генома, содержащей 18-27 нуклеотидов.

Согласно определенным вариантам осуществления фактор транскрипции содержит ДНК-связывающий домен. Согласно определенным вариантам осуществления фактор транскрипции содержит ДНК-связывающий домен и активирующий транскрипцию домен.

[31] Согласно определенным вариантам осуществления ДНК-связывающий домен характеризуется идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 80%, по отношению к его ближайшему человеческому аналогу. Согласно определенным вариантам осуществления ДНК-связывающий домен характеризуется идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 90%, по отношению к его ближайшему человеческому аналогу. Согласно определенным вариантам осуществления как ДНК-связывающий домен, так и активирующий транскрипцию домен характеризуются идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 80%, по отношению к их ближайшим человеческим аналогам. Согласно определенным вариантам осуществления как ДНК-связывающий домен, так и активирующий транскрипцию домен характеризуется идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 90%, по отношению к их ближайшим человеческим аналогам.

[32] Согласно определенным вариантам осуществления ДНК-связывающий домен содержит направляющую РНК и инактивированный нуклеазой белок Cas. Согласно определенным вариантам осуществления инактивированный нуклеазой белок Cas представляет собой инактивированный нуклеазой белок Cas9.

[33] Согласно определенным вариантам осуществления ДНК-связывающий домен содержит домен типа «цинковые пальцы». Согласно определенным вариантам осуществления ДНК-связывающий домен содержит от шести до девяти доменов типа «цинковые пальцы». Согласно определенным вариантам осуществления ДНК-связывающий домен содержит шесть «цинковых пальцев». Согласно определенным вариантам осуществления ДНК-связывающий домен связывается с областью генома, содержащей 18 нуклеотидов. Согласно определенным вариантам осуществления ДНК-связывающий домен содержит девять «цинковых пальцев». Согласно определенным вариантам осуществления ДНК-связывающий домен связывается с геномной областью, содержащей 27 нуклеотидов.

[34] Согласно определенным вариантам осуществления ДНК-связывающий домен содержит последовательность, характеризующуюся идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 95%, по отношению к любой из SEQ ID NO: 148-151. Согласно определенным вариантам осуществления ДНК-связывающий домен содержит последовательность, содержащую любую из SEQ ID NO: 148-151. Согласно определенным вариантам осуществления ДНК-связывающий домен содержит последовательность,

характеризующуюся идентичностью, составляющей по меньшей мере 90%, по отношению к любой из SEQ ID NO: 92-98. Согласно определенным вариантам осуществления ДНК-связывающий домен содержит любую из SEQ ID NO: 92-98.

[35] Согласно определенным вариантам осуществления ДНК-связывающий домен представляет собой белок типа «цинковые пальцы», содержащий последовательность LEPGEKP – [YKCPECGKSFS X HQRTH TGEKP]_n - YKCPECGKSFS X HQRTH – TGKKTS (SEQ ID NO: 147).

[36] Согласно определенным вариантам осуществления ДНК-связывающий домен содержит последовательность, характеризующуюся идентичностью, составляющей по меньшей мере 90%, по отношению к любой из SEQ ID NO: 77-91. Согласно определенным вариантам осуществления ДНК-связывающий домен содержит любую из SEQ ID NO: 77-91.

[37] Согласно определенным вариантам осуществления ДНК-связывающий домен происходит от EGR1 человека или EGR3 человека.

[38] Согласно определенным вариантам осуществления активирующий транскрипцию домен содержит последовательность VP16, VPR, VP64, CITED2, CITED4 или CREB3 или их функциональный фрагмент. Согласно определенным вариантам осуществления активирующий транскрипцию домен содержит последовательность CITED2, CITED4 или CREB3 человека или их функциональный фрагмент.

[39] Согласно определенным вариантам осуществления регуляторный элемент содержит последовательность, содержащую любую из SEQ ID NO: 1-4. Согласно определенным вариантам осуществления регуляторный элемент содержит последовательность, содержащую SEQ ID NO: 2 или 3.

[40] Согласно определенным вариантам осуществления не встречающийся в природе фактор транскрипции содержит последовательность, характеризующуюся идентичностью, составляющей по меньшей мере 90%, по отношению к любой из SEQ ID NO: 105, 106 и 127-129. Согласно определенным вариантам осуществления не встречающийся в природе фактор транскрипции содержит любую из SEQ ID NO: 105, 106 и 127-129.

[41] Согласно определенным вариантам осуществления трансген содержит нуклеотидную последовательность, характеризующуюся идентичностью, составляющей по меньшей мере 90%, по отношению к любой из SEQ ID NO: 71, 74, 75, 76 или 184. Согласно определенным вариантам осуществления трансген содержит любую из SEQ ID NO: 71, 74, 75, 76 или 184.

[42] Согласно определенным вариантам осуществления кассета экспрессии представляет собой часть вирусного вектора. Согласно определенным вариантам

осуществления вирусный вектор представляет собой вирус AAV. Согласно определенным вариантам осуществления вирус AAV представляет собой вирус AAV9 или вирус scAAV9. Согласно определенным вариантам осуществления вирусный вектор представляет собой лентивирус.

[43] Согласно другому аспекту в настоящей заявке представлен способ селективной экспрессии трансгена в парвальбумин-содержащих нейронах (PV) приматов, предусматривающий введение примату вирусного вектора, содержащего трансген и по меньшей мере один сайт связывания микроРНК, причем сайт связывания микроРНК снижает экспрессию трансгена в возбуждающих нейронах.

[44] Согласно определенным вариантам осуществления вирусный вектор дополнительно содержит регуляторный элемент, функционально связанный с трансгеном, причем регуляторный элемент управляет экспрессией трансгена на более высоком уровне в парвальбумин-содержащих нейронах (PV), чем в других типах клеток.

[45] Согласно определенным вариантам осуществления сайт связывания микроРНК содержит по меньшей мере один сайт связывания для MIR128 (SEQ ID NO: 9). Согласно определенным вариантам осуществления сайт связывания микроРНК содержит по меньшей мере один сайт связывания для MIR221 (SEQ ID NO: 11). Согласно определенным вариантам осуществления сайт связывания микроРНК содержит по меньшей мере один сайт связывания для MIR222 (SEQ ID NO: 13). Согласно определенным вариантам осуществления сайт связывания микроРНК содержит по меньшей мере один сайт связывания для MIR128 (SEQ ID NO: 9) и по меньшей мере один сайт связывания для MIR221 (SEQ ID NO: 11). Согласно определенным вариантам осуществления сайт связывания микроРНК содержит по меньшей мере один сайт связывания для MIR128 (SEQ ID NO: 9), по меньшей мере один сайт связывания для MIR221 (SEQ ID NO: 11) и по меньшей мере один сайт связывания для MIR222 (SEQ ID NO: 13). Согласно определенным вариантам осуществления сайт связывания микроРНК содержит последовательность, характеризующуюся идентичностью, составляющей по меньшей мере 90%, по отношению к любой из SEQ ID NO: 7, 14 или 15. Согласно определенным вариантам осуществления сайт связывания микроРНК содержит SEQ ID NO: 7, 14 или 15.

[46] Согласно определенным вариантам осуществления трансген содержит последовательность, кодирующую не встречающийся в природе фактор транскрипции, который увеличивает экспрессию гена SCN1A в клетке.

[47] Согласно определенным вариантам осуществления фактор транскрипции связывается с областью генома, содержащей 18-27 нуклеотидов.

[48] Согласно определенным вариантам осуществления фактор транскрипции содержит ДНК-связывающий домен.

[49] Согласно определенным вариантам осуществления фактор транскрипции содержит ДНК-связывающий домен и активирующий транскрипцию домен.

[50] Согласно определенным вариантам осуществления ДНК-связывающий домен характеризуется идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 80%, по отношению к его ближайшему человеческому аналогу. Согласно определенным вариантам осуществления ДНК-связывающий домен характеризуется идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 90%, по отношению к его ближайшему человеческому аналогу. Согласно определенным вариантам осуществления как ДНК-связывающий домен, так и активирующий транскрипцию домен характеризуются идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 80%, по отношению к их ближайшим человеческим аналогам. Согласно определенным вариантам осуществления как ДНК-связывающий домен, так и активирующий транскрипцию домен характеризуются идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 90%, по отношению к их ближайшим человеческим аналогам.

[51] Согласно определенным вариантам осуществления ДНК-связывающий домен содержит направляющую РНК и инактивированный нуклеазой белок Cas. Согласно определенным вариантам осуществления инактивированный нуклеазой белок Cas представляет собой инактивированный нуклеазой белок Cas9.

[52] Согласно определенным вариантам осуществления ДНК-связывающий домен содержит домен типа «цинковые пальцы». Согласно определенным вариантам осуществления ДНК-связывающий домен содержит от шести до девяти доменов типа «цинковые пальцы». Согласно определенным вариантам осуществления ДНК-связывающий домен содержит шесть «цинковых пальцев». Согласно определенным вариантам осуществления ДНК-связывающий домен связывается с областью генома, содержащей 18 нуклеотидов. Согласно определенным вариантам осуществления ДНК-связывающий домен содержит девять «цинковых пальцев». Согласно определенным вариантам осуществления ДНК-связывающий домен связывается с геномной областью, содержащей 27 нуклеотидов.

[53] Согласно определенным вариантам осуществления ДНК-связывающий домен содержит последовательность, характеризующуюся идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 95%, по отношению к любой из SEQ ID NO: 148-151. Согласно определенным вариантам осуществления ДНК-связывающий домен содержит последовательность, имеющую любую из SEQ ID NO: 148-151.

[54] Согласно определенным вариантам осуществления ДНК-связывающий домен происходит из EGR1 человека или EGR3 человека.

[55] Согласно определенным вариантам осуществления ДНК-связывающий домен содержит последовательность, характеризующуюся идентичностью, составляющей по меньшей мере 90%, по отношению к любой из SEQ ID NO: 92-98. Согласно определенным вариантам осуществления ДНК-связывающий домен содержит любую из SEQ ID NO: 92-98.

[56] Согласно определенным вариантам осуществления ДНК-связывающий домен представляет собой белок типа «цинковые пальцы», содержащий последовательность LEPGEKP – [YKCPECGKSFS X HQRTH TGEKP]_n - YKCPECGKSFS X HQRTH – TGKKTS (SEQ ID NO: 147).

[57] Согласно определенным вариантам осуществления ДНК-связывающий домен содержит последовательность, характеризующуюся идентичностью, составляющей по меньшей мере 90%, по отношению к любой из SEQ ID NO: 77-91. Согласно определенным вариантам осуществления ДНК-связывающий домен содержит любую из SEQ ID NO: 77-91.

[58] Согласно определенным вариантам осуществления активирующий транскрипцию домен содержит последовательность VP16, VPR, VP64, CITED2, CITED4 или CREB3 или их функциональный фрагмент. Согласно определенным вариантам осуществления активирующий транскрипцию домен содержит последовательность CITED2, CITED4 или CREB3 человека или их функциональный фрагмент.

[59] Согласно определенным вариантам осуществления регуляторный элемент содержит последовательность, содержащую любую из SEQ ID NO: 1-4. Согласно определенным вариантам осуществления регуляторный элемент содержит последовательность, содержащую SEQ ID NO: 2 или 3.

[60] Согласно определенным вариантам осуществления не встречающийся в природе фактор транскрипции содержит последовательность, характеризующуюся идентичностью, составляющей по меньшей мере 90%, по отношению к любой из SEQ ID NO: 105, 106 и 127-129. Согласно определенным вариантам осуществления не встречающийся в природе фактор транскрипции содержит любую из SEQ ID NO: 105, 106 и 127-129.

[61] Согласно определенным вариантам осуществления трансген содержит нуклеотидную последовательность, характеризующуюся идентичностью, составляющей по меньшей мере 90%, по отношению к любой из SEQ ID NO: 71, 74, 75, 76 или 184. Согласно определенным вариантам осуществления трансген содержит любую из SEQ ID NO: 71, 74, 75, 76 или 184.

[62] Согласно определенным вариантам осуществления вирусный вектор представляет собой вирус AAV. Согласно определенным вариантам осуществления вирус AAV представляет собой вирус AAV9 или вирус scAAV9. Согласно определенным вариантам осуществления вирусный вектор представляет собой лентивирус.

[63] Согласно определенным вариантам осуществления примат представляет собой человека. Согласно определенным вариантам осуществления примат представляет собой отличного от человека примата. Согласно определенным вариантам осуществления отличный от человека примат представляет собой обезьяну старого мира, орангутана, гориллу, шимпанзе, мартышку, яванского макака, макака-резус или свинохвостого макака.

[64] Согласно другому аспекту в настоящей заявке представлена кассета экспрессии, содержащая последовательность, кодирующую не встречающийся в природе фактор транскрипции, который увеличивает экспрессию гена SCN1A в клетке, причем не встречающийся в природе фактор транскрипции содержит последовательность, характеризующуюся идентичностью, составляющей по меньшей мере 90%, по отношению к SEQ ID NO: 128 или 129. Согласно определенным вариантам осуществления не встречающийся в природе фактор транскрипции содержит SEQ ID NO: 128 или 129.

[65] Согласно другому аспекту в настоящей заявке представлен способ увеличения экспрессии SCN1A в клетке путем введения любой из кассет экспрессии, представленных в настоящем документе. Согласно определенным вариантам осуществления клетка представляет собой нервную клетку. Согласно определенным вариантам осуществления нервная клетка выбрана из группы, состоящей из униполярных, биполярных, мультиполярных или псевдоуниполярных нейронов. Согласно определенным вариантам осуществления клетка представляет собой ГАМКергический нейрон. Согласно определенным вариантам осуществления клетка представляет собой PV-содержащий нейрон. Согласно определенным вариантам осуществления клетка не представляет собой нервную клетку. Согласно определенным вариантам осуществления клетка представляет собой глиальную клетку. Согласно определенным вариантам осуществления глиальная клетка выбрана из группы, состоящей из астроцитов, олигодендроцитов, эпендимных клеток, шванновских клеток и сателлитных клеток. Согласно определенным вариантам осуществления клетка находится внутри субъекта. Согласно определенным вариантам осуществления субъект представляет собой млекопитающее. Согласно определенным вариантам осуществления субъект представляет собой человека. Согласно определенным вариантам осуществления увеличение экспрессии SCN1A лечит заболевание, нарушение или симптом. Согласно определенным вариантам осуществления нарушение представляет собой нарушение центральной нервной системы. Согласно определенным вариантам

осуществления нарушение представляет собой эпилепсию, связанную с гаплонедостаточностью SCN1A. Согласно определенным вариантам осуществления гаплонедостаточность является результатом того, что субъект является гетерозиготным по мутации потери функции гена SCN1A. Согласно определенным вариантам осуществления нарушение представляет собой эпилепсию, связанную со вставкой, делецией или заменой в гене SCN1A. Согласно определенным вариантам осуществления нарушение представляет собой эпилепсию, связанную с точечной мутацией в гене SCN1A. Согласно определенным вариантам осуществления нарушение представляет собой синдром Драве. Согласно определенным вариантам осуществления симптом нарушения центральной нервной системы представляет собой гиперактивность нейронов. Согласно определенным вариантам осуществления лечение нарушения центральной нервной системы предусматривает снижение гиперактивности нейронов. Согласно определенным вариантам осуществления симптомом нарушения центральной нервной системы являются припадки. Согласно определенным вариантам осуществления лечение нарушения центральной нервной системы предусматривает снижение частоты припадков. Согласно определенным вариантам осуществления лечение нарушения центральной нервной системы предусматривает уменьшение тяжести припадков.

[66] Согласно другому аспекту в настоящей заявке представлен способ увеличения экспрессии SCN1A в ЦНС путем введения любой из кассет экспрессии, представленных в настоящем документе. Согласно определенным вариантам осуществления кассету экспрессии вводят посредством одностороннего интрацеребровентрикулярного (ICV) введения. Согласно определенным вариантам осуществления кассету экспрессии вводят посредством двустороннего интрацеребровентрикулярного (ICV) введения. Согласно определенным вариантам осуществления повышенная экспрессия SCN1A происходит в головном мозге. Согласно определенным вариантам осуществления повышенная экспрессия SCN1A происходит во фронтальной коре, теменной коре, височной коре, гиппокампе, продолговатом мозге и/или затылочной коре. Согласно определенным вариантам осуществления повышенная экспрессия SCN1A происходит в позвоночнике. Согласно определенным вариантам осуществления повышенная экспрессия SCN1A происходит в спинном мозге и/или межпозвоновом узле.

Включение по ссылке

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

Краткое описание графических материалов

[68] Новые особенности настоящего изобретения подробно изложены в прилагаемой формуле изобретения. Лучшее понимание особенностей и преимуществ настоящего изобретения будет получено при обращении к нижеследующему подробному описанию, в котором излагаются иллюстративные случаи, в которых используются принципы настоящего изобретения, и прилагаемым графическим материалам, на которых:

[69] На **фиг. 1** показана активация эндогенного SCN1A с использованием сконструированных факторов транскрипции, которые связываются с различными областями на хромосоме 2 (со ссылкой на GRCh38.p12). Данные представлены в виде кратного изменения экспрессии SCN1A по сравнению с контрольным (EGFP-KASH) состоянием.

[70] На **фиг. 2A, фиг. 2B и фиг. 2C** показана относительная экспрессия эндогенного SCN1A в клетках HEK293 с использованием SCN1A-специфических активаторов транскрипции (смотрите **таблицу 1**). Данные представлены в виде кратного изменения относительно контрольных условий и показаны на шкале Log_{10} .

[71] На **фиг. 3A** показана относительная экспрессия эндогенного SCN1A в нейронах ГАМК с использованием SCN1A-специфического активатора транскрипции (конструкция 30). Данные представлены в виде кратного изменения относительно контрольных условий (CBA-EGFP).

[72] На **фиг. 3B** показана относительная экспрессия эндогенного SCN1A в нейронах ГАМК с использованием SCN1A-специфических активаторов транскрипции (конструкции 25 и 16). Данные представлены в виде кратного изменения относительно контрольных условий (CBA-EGFP) в Log_{10} .

[73] На **фиг. 4** показана относительная экспрессия эндогенного SCN1A и 40 ближайших соседних генов, управляемых специфическим фактором транскрипции SCN1A (конструкция 30). Данные представлены в виде кратного изменения относительно контрольных условий (CBA-EGFP-KASH) в Log_{10} .

[74] На **фиг. 5A и фиг. 5B** показана экспрессия SCN1A-специфического активатора транскрипции *in vivo* по сравнению с контрольной кассетой экспрессии, которая экспрессировала eGFP. На **фиг. 5A** показана относительная экспрессию гена SCN1A у мышей, которым инъектировали либо контрольный eGFP, либо конструкцию 4, содержащую активатор транскрипции SCN1A. На **фиг. 5B** показано изменение экспрессии SCN1A с точки зрения среднего процента eGFP. Эти эксперименты показывают, что

активация транскрипции с помощью конструкции 4 привела к усилению экспрессии SCN1A приблизительно на 20-30%.

[75] На **фиг. 6А, фиг. 6В, фиг. 6С, фиг. 6D, фиг. 6Е, фиг. 6F и фиг. 6G** показано влияние на гипертермические припадки на мышинной модели синдрома Драве с нокаутом *Scn1a^{tm1Kex}* с использованием различных факторов транскрипции, специфических для SCN1A, по сравнению с контролем. Мышам P1 *Scn1a* +/- (гетерозиготные; HET) вводили либо AAV9-EGFP, либо вектор AAV9, экспрессирующий фактор транскрипции, специфический для SCN1A (одна из конструкций 31-34, 42 и 43). Мышей P26-P28, подвергнутых инфузии, подвергали тесту на припадки, вызванные гипертермией, и регистрировали внутреннюю температуру, при которой они испытывали тонико-клонический припадок. На **фиг. 6D** показано прямое сравнение между конструкцией 32, которая содержит тег HA, расположенным между DBD и TAD, и конструкцией 34, которая не содержит тега HA. На **фиг. 6Е** показано прямое сравнение между конструкцией 31, которая содержит сайт связывания микроРНК m1, расположенный между кодирующей областью и хвостом полиА, и конструкцией 32, которая не содержит сайт связывания микроРНК m1. На **фиг. 6H** проиллюстрировано влияние на гипертермические припадки в модели синдрома Драве у мышей с мутантным *Scn1a^{RX}* с использованием конструкции 31 (по сравнению с контролем в виде введенного PBS).

[76] На **фиг. 7А, фиг. 7В, фиг. 7С и фиг. 7D** показана выживаемость в модели синдрома Драве у мышей с нокаутом *Scn1a^{tm1Kex}* в различных условиях. На **фиг. 7А** показано сравнение мышей дикого типа (PBS WT) и *Scn1a* +/- (PBS HET) в анализе выживаемости. Мышам P1 *Scn1a* +/- (N = 53) и *Scn1a* ++ (N = 54) вливали PBS. Мышей наблюдали в их домашней клетке ежедневно, и в случае какой-либо смертности регистрировали дату. Наблюдалась значительная разница в выживаемости между животными *Scn1a* +/- и *Scn1a* ++ (P < 0,0001). На **фиг. 7B-D** показано влияние на выживаемость в мышинной модели синдрома Драве для мышей, обработанных различными факторами транскрипции, специфическими для SCN1A, по сравнению с контролем. Мышам P1 *Scn1a* +/- вливали либо PBS, либо вектор AAV9, экспрессирующий фактор транскрипции, специфический для SCN1A (конструкции 31 или 33). Мышей наблюдали в их домашней клетке ежедневно, и в случае какой-либо смертности регистрировали дату. На **фиг. 7D** показано прямое сравнение между конструкцией 31, которая содержит сайт связывания микроРНК m1, расположенным между кодирующей областью и хвостом полиА, и конструкцией 33, которая не содержит сайт связывания микроРНК m1. На **фиг. 7Е** показана выживаемость в модели синдрома Драве у мышей с мутантным *Scn1a^{RX}* с использованием конструкции 31 (по сравнению с контролем, инъецированным PBS).

[77] На **фиг. 8** показана относительная экспрессия мРНК Scn1A в различных тканях головного мозга после интрапаренхимальной доставки вектора AAV9, кодирующего SCN1A-специфический фактор транскрипции (конструкция 33), введенного двум яванским макакам в дозе $1,2 \times 10^{12}$ копий генома/животное, нормализованных по двум необработанным контрольным животным. Всех животных умерщвляли через 28 дней после инъекции и количественно определяли мРНК Scn1A в образцах тканей с помощью Taqman PCR. Данные представлены как нормализованная экспрессия целевой мРНК в различных срезах ткани головного мозга. Аналогичные результаты были зарегистрированы с другим набором праймеров/зонда, полученных из гена Scn1a.

[78] На **фиг. 9A-F** показан характер экспрессии EGFP в области зубчатой извилины гиппокампа мартышки после обработки векторами AAV9, содержащими трансген EGFP под контролем промотора EF1a, промотора RE 2 (SEQ ID NO: 2) или промотора RE 2 (SEQ ID NO: 2) с сайтом связывания микроРНК m1 (SEQ ID NO: 7), расположенным между кодирующей областью EGFP и сайтом polyA. Типичная область зубчатой извилины гиппокампа показана для каждого вектора обработки. В верхнем ряду показаны ядра клеток, окрашенные DAPI, а в нижнем ряду показаны GFP-положительные области, окрашенные антителом к GFP. На **фиг. 9A** (обработка EF1a) область hylus CA4 гиппокампа обведена желтым, а стрелки указывают на слой тела гранулярных клеток зубчатых клеток (DG). **Фиг. 9B** и **фиг. 9C** сосредоточены в той же области. Область CA4, которая представляет собой смесь возбуждающих и тормозных интернейронов, выделена, поскольку это была единственная область со значительной экспрессией в условии RE 2 + m1. При управляемой EF1a и RE 2 экспрессии трансгена экспрессия GFP была более распространенной и включала в себя другие области гиппокампа. Считается, что слой клеток DG содержит в основном возбуждающие нейроны. Экспрессия GFP, управляемая EF1a и RE 2, видна в слое клеток DG (**фиг. 9D** и **фиг. 9E**), но не присутствует у животных, обработанных RE 2 + m1 (**фиг. 9F**) (белые стрелки).

[79] На **фиг. 10A-L** показано, что характер экспрессии EGFP в области зубчатой извилины гиппокампа мартышки после обработки векторами AAV9, содержащими трансген EGFP под контролем промотора EF1a, промотора RE 2 (SEQ ID NO: 2) или промотора RE 2 (SEQ ID NO: 2) с сайтом связывания микроРНК m1 (SEQ ID NO: 7), расположенным между кодирующей областью EGFP и сайтом polyA, в первую очередь локализован на парвальбумин-положительных (PV) клетках у животных, получавших RE 2 и RE 2 + m1. Типичная область зубчатой извилины гиппокампа показана для каждого вектора обработки. В верхнем ряду показаны GFP-положительные области, а в следующем нижнем ряду показаны те же области, окрашенные ингибирующим маркером

интернейронов для PV. Область в рамке на **фиг. 10А-Е** показана при большем увеличении на **фиг. 10G-L**. Экспрессия GFP, управляемая RE 2 и RE 2 + m1, в основном совмещена с ингибирующим маркером PV-содержащих интернейронов (белые стрелки на **фиг. 10H** и **10K, 10I** и **10L**), тогда как в EG-EF1a экспрессия GFP не так легко локализуется в PV-положительных клетках (белые стрелки на **фиг. 10G** и **10J**). Кроме того, GFP-положительные клетки характеризуются отчетливо выраженной морфологией интернейронов высокоразветвленных клеток с пирамидным клеточным телом у животных, получавших RE 2 и RE 2 + m1 (желтые стрелки на **фиг. 10H** и **10I**), по сравнению с менее отчетливой морфологией клеточного тела у животных, получавших EF1a (желтые стрелки на **фиг. 10G**).

[80] На **фиг. 11** показан VG/диплоидный геном в образцах тканей фронтальной коры (FC), ростральной теменной коры (Rostral PC), височной коры (TC), каудальной теменной коры (Caudal PC), гиппокампа (Hip), продолговатого мозга (Med) и затылочной коры (OC) животных, получавших AAV9-RE^{GABA}-eTF^{SCN1A}, вводимые в дозе 4,8E+13 или 8E+13 мкг/животное посредством одностороннего интрацеребровентрикулярного (ICV) введения (пример 10 и пример 11). Каждая точка данных представляет VG/диплоидный геном для образца ткани, а горизонтальные полосы представляют средний VG/диплоидный геном для всех образцов ткани для каждого животного.

[81] На **фиг. 12** показаны транскрипты/мкг РНК в образцах тканей фронтальной коры (FC), ростральной теменной коры (Rostral PC), височной коры (TC), каудальной теменной коры (Caudal PC), гиппокампа (Hip), продолговатого мозга (Med) и затылочной коры (OC) животных, получавших AAV9-RE^{GABA}-eTF^{SCN1A}, вводимые в дозе 4,8E+13 или 8E+13 геномов вектора/животное посредством одностороннего интрацеребровентрикулярного (ICV) введения (пример 10 и пример 11). Каждая точка данных представляет геномы вектора/диплоидный геном для образца ткани, а горизонтальные полосы представляют собой среднее отношение геномы вектора/диплоидный геном для всех образцов ткани для каждого животного. Средние транскрипты для *ARFGAP2* составляли 1,85E+6/мкг РНК и обозначены пунктирной верхней граничной линией. Предел обнаружения обозначен пунктирной нижней граничной линией.

[82] На **фиг. 13** показано биораспределение вектора (геномы вектора/диплоидный геном) и экспрессия трансгена (транскрипты/мкг РНК) в образцах периферической ткани вне головного мозга. Показанные образцы периферической ткани представляют собой спинной мозг C2/L4 (SC C2/L4), межпозвоночный узел C2/L4 (DRG C2/L4), печень, селезенка, сердце, почки, легкие, поджелудочная железа и семенники/яичники. Среднее

значение VCN (векторное биораспределение) и транскрипта (экспрессия трансгена) в головном мозге приматов показано пунктирной линией.

Подробное описание настоящего изобретения

[83] В настоящем документе представлены сконструированные факторы транскрипции или eTF, которые не встречаются в природе и были разработаны для связывания с целевым сайтом генома и модуляции экспрессии представляющего интерес эндогенного гена. Такие eTF могут быть созданы для усиления или подавления экспрессии (экспрессии РНК и/или белка) представляющего интерес гена. В настоящем документе также представлены сайты связывания микроРНК, которые могут быть включены в вирусный вектор и обеспечивать селективную экспрессию трансгена в парвальбумин-содержащих нейронах (PV).

[84] Согласно одному аспекту в настоящей заявке представлены eTF, которые способны повышать экспрессию гена альфа-субъединицы 1 натриевого потенциалзависимого канала (SCN1A) и повышать экспрессию его соответствующего белкового продукта Nav1.1, а также способы их применения для лечения заболеваний или нарушений, связанных с дефицитом Nav1.1, такие как, например, синдром Драве.

[85] Согласно другому аспекту в настоящей заявке предусмотрены сайты связывания микроРНК, которые снижают экспрессию мРНК, содержащей сайт связывания микроРНК, в возбуждающих нейронах, тем самым приводя к селективной экспрессии гена в ГАМКергических нейронах или парвальбумин-содержащих нейронах (PV), и способы их применения для селективной экспрессии представляющего интерес гена в нейронах PV.

Определения

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

[87] Термин «приблизительно» или «примерно» означает в пределах допустимого диапазона ошибок для конкретного значения, определенного специалистом в настоящей области техники, который будет частично зависеть от того, как значение измеряется или определяется, т.е. ограничения системы измерения. Например, «приблизительно» может означать в пределах одного или более чем одного стандартного отклонения в соответствии с практикой в настоящей области техники. В качестве альтернативы «приблизительно» может означать диапазон до 20%, до 15%, до 10%, до 5% или до 1% от заданного значения.

[88] Термины «определение», «измерение», «оценка», «оценивание», «анализ» и их грамматические эквиваленты могут использоваться в настоящем документе взаимозаменяемо для обозначения любой формы измерения и включают в себя определение того, присутствует элемент или нет (например, обнаружение). Эти термины могут включать в себя как количественные, так и/или качественные определения. Оценка может быть относительной или абсолютной.

[89] Термин «экспрессия» относится к процессу, с помощью которого последовательность нуклеиновой кислоты или полинуклеотид транскрибируется с матрицы ДНК (например, в мРНК или другой транскрипт РНК), и/или процессу, посредством которого транскрибированная мРНК впоследствии транслируется в пептиды, полипептиды или белки. Транскрипты и кодируемые полипептиды можно вместе называть «генным продуктом». Если полинуклеотид происходит из геномной ДНК, экспрессия может включать в себя сплайсинг мРНК в эукариотической клетке.

[90] Используемые в настоящем документе термины «функционально связанный», «функциональная связь» или их грамматические эквиваленты относятся к сопоставлению генетических элементов, например, промотора, энхансера, последовательности полиаденилирования и т.д., причем элементы находятся во взаимосвязи, позволяющей им работать ожидаемым образом. Например, регуляторный элемент, который может включать в себя промоторные и/или энхансерные последовательности, функционально связан с кодирующей областью, если регуляторный элемент помогает инициировать транскрипцию кодирующей последовательности. Между регуляторным элементом и кодирующей областью могут быть промежуточные остатки, пока сохраняется эта функциональная связь.

[91] Используемый в настоящем документе термин «вектор» относится к макромолекуле или ассоциации макромолекул, которая содержит полинуклеотид или ассоциируется с ним и которая может использоваться для опосредования доставки полинуклеотида в клетку. Примеры векторов включают в себя плазмиды, вирусные векторы, липосомы и другие носители для доставки генов. Вектор, как правило, содержит генетические элементы, например, регуляторные элементы, функционально связанные с геном для облегчения экспрессии гена в мишени.

[92] Используемые в настоящем документе термины «кассета экспрессии» и «кассета нуклеиновой кислоты» взаимозаменяемо относятся к комбинации последовательностей нуклеиновых кислот или элементов, которые экспрессируются вместе или функционально связаны для экспрессии. В некоторых случаях кассета экспрессии относится к комбинации регуляторных элементов и гена или генов, с которыми они функционально связаны для экспрессии.

[93] Термин «AAV» представляет собой сокращение от аденоассоциированного вируса и может использоваться для обозначения самого вируса или его производного. Термин охватывает все серотипы, подтипы, а также встречающиеся в природе и рекомбинантные формы, если не требуется иное. Сокращение «гAAV» относится к рекомбинантному аденоассоциированному вирусу, также называемому рекомбинантным вектором AAV (или «вектором гAAV»). Термин «AAV» включает в себя AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, rh10 и их гибриды, AAV птиц, AAV крупного рогатого скота, AAV собак, AAV лошадей, AAV приматов, AAV не приматов и AAV овец. Геномные последовательности различных серотипов AAV, а также последовательности нативных концевых повторов (TR), белков Rep и субъединиц капсида известны в настоящей области техники. Такие последовательности можно найти в литературе или в общедоступных базах данных, таких как GenBank. Используемый в настоящем документе термин «вектор гAAV» относится к вектору AAV, содержащему полинуклеотидную последовательность, не имеющую происхождения AAV (т.е. полинуклеотид, гетерологичный AAV), как правило, последовательность, представляющую интерес для генетической трансформации клетки. В общем, гетерологичный полинуклеотид фланкирован по меньшей мере одной, а обычно двумя последовательностями инвертированных концевых повторов AAV (ITR). Вектор гAAV может быть одноцепочечным (ssAAV) или самокомплементарным (scAAV). «Вирус AAV» или «вирусная частица AAV» относится к вирусной частице, состоящей по меньшей мере из одного капсидного белка AAV и инкапсидированного полинуклеотидного вектора гAAV. Если частица содержит гетерологичный полинуклеотид (т.е. полинуклеотид, отличный от генома AAV дикого типа, такой как трансген, который должен быть доставлен в клетку млекопитающего), ее обычно называют «векторной частицей гAAV» или просто «частицей гAAV». Таким образом, получение частицы гAAV обязательно включает в себя производство вектора гAAV, поскольку такой вектор содержится в частице гAAV.

[94] Используемые в настоящем документе термины «лечить», «лечение», «терапия» и т.п. относятся к облегчению, задержке или замедлению прогрессирования, профилактике, ослаблению, уменьшению эффектов или симптомов, предотвращению возникновения, ингибированию или облегчению начало заболеваний или нарушений. Способы настоящего раскрытия можно использовать с любым млекопитающим. Примеры млекопитающих включают в себя, без ограничения, крыс, кошек, собак, лошадей, коров, овец, свиней и, более предпочтительно, людей. Терапевтический эффект включает в себя искоренение или улучшение основного подлежащего лечению заболевания. Кроме того, терапевтический эффект достигается за счет устранения или облегчения одного или нескольких

физиологических симптомов, связанных с основным заболеванием, так что улучшение наблюдается у субъекта, несмотря на то, что субъект все еще может страдать от основного нарушения. В некоторых случаях с профилактической целью терапевтическое средство можно вводить субъекту с риском развития определенного заболевания или субъекту, сообщаящему об одном или нескольких физиологических симптомах заболевания, даже если диагноз этого заболевания не был поставлен. Способы настоящего раскрытия можно использовать с любым млекопитающим. В некоторых случаях лечение может привести к уменьшению или прекращению симптомов (например, снижению частоты, продолжительности и/или тяжести припадков). Профилактический эффект включает в себя отсрочку или устранение появления заболевания или состояния, отсрочку или устранение появления симптомов заболевания или состояния, замедление, остановку или обращение вспять прогрессирования заболевания или состояния или любую их комбинацию.

[95] Термин «эффективное количество» или «терапевтически эффективное количество» относится к тому количеству описанной в настоящем документе композиции, которого достаточно для воздействия на предполагаемое применение, включая в себя, без ограничения, лечение заболевания, как определено ниже. Терапевтически эффективное количество может варьироваться в зависимости от предполагаемого лечебного применения (*in vivo*) или субъекта и подвергаемого лечению патологического состояния, например, массы и возраста субъекта, тяжести патологического состояния, способа введения и т.п., что может легко определить специалист в настоящей области техники. Этот термин также применяется к дозе, которая вызовет конкретный ответ в целевой клетке. Конкретная доза будет варьироваться в зависимости от конкретной выбранной композиции, схемы дозированного введения, которую необходимо соблюдать, вводится ли она в комбинации с другими соединениями, времени введения, ткани, в которую ее вводят, и физической системы доставки, в которой она вводится.

[96] «Фрагмент» нуклеотидной или пептидной последовательности относится к последовательности, которая короче эталонной или «полноразмерной» последовательности.

[97] «Вариант» молекулы относится к аллельным вариациям таких последовательностей, т.е. к последовательности, по существу сходной по структуре и биологической активности либо со всей молекулой, либо с ее фрагментом.

[98] «Функциональный фрагмент» последовательности ДНК или белка относится к фрагменту, который сохраняет биологическую активность (функциональную или структурную), которая по существу аналогична биологической активности полноразмерной последовательности ДНК или белка. Биологическая активность

последовательности ДНК может заключаться в ее способности влиять на экспрессию способом, который, как известно, приписывается полноразмерной последовательности.

[99] Термины «субъект» и «индивидуум» используются в настоящем документе взаимозаменяемо для обозначения позвоночного животного, предпочтительно, млекопитающего, более предпочтительно, человека. Описанные в настоящем документе способы могут быть применимы в терапевтических целях для человека, в ветеринарии и/или в доклинических исследованиях на животных моделях заболевания или состояния.

[100] Термин «*in vivo*» относится к событию, которое происходит в организме субъекта.

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

[102] В общем, «идентичность последовательностей» или «гомология последовательностей», которые могут использоваться взаимозаменяемо, относятся к точному соответствию нуклеотид-нуклеотид или аминокислота-аминокислота двух полинуклеотидных или полипептидных последовательностей, соответственно. Как правило, способы определения идентичности последовательностей включают в себя сравнение двух нуклеотидных или аминокислотных последовательностей и определение их процентной идентичности. Сравнение последовательностей, например, с целью оценки идентичности, может быть выполнено с помощью любого подходящего алгоритма выравнивания, включая в себя, без ограничения, алгоритм Нидлмана-Вунша (смотрите, например, выравниватель EMBOSS Needle, доступный на www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/, необязательно с настройками по умолчанию), алгоритм BLAST (смотрите, например, инструмент выравнивания BLAST, доступный на blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi, необязательно с настройками по умолчанию) и алгоритм Смита-Уотермана (смотрите, например, выравниватель EMBOSS Water, доступный на www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_water/, необязательно с настройками по умолчанию). Оптимальное выравнивание можно оценить с использованием любых подходящих параметров выбранного алгоритма, включая в себя параметры по умолчанию. «Процент идентичности», также называемый «процент гомологии», между двумя последовательностями может быть рассчитан как количество точных совпадений между двумя оптимально выровненными последовательностями, деленное на длину эталонной последовательности и умноженное на 100. Процент идентичности также может быть определен, например, путем сравнения информации о последовательностях с

использованием усовершенствованной компьютерной программы BLAST, включая в себя версию 2.2.9, доступную в Национальных институтах здравоохранения. Программа BLAST основана на способе совмещения Karlin and Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2264-2268 (1990) и как описано в Altschul, et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990); Karlin and Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5877 (1993) и Altschul et al., *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402 (1997). Вкратце, программа BLAST определяет идентичность как количество идентичных выровненных символов (т.е. нуклеотидов или аминокислот), деленное на общее количество символов в более короткой из двух последовательностей. Программа может использоваться для определения процента идентичности по всей длине сравниваемых последовательностей. Параметры по умолчанию предоставляются для оптимизации поиска с помощью коротких последовательностей запросов, например, с помощью программы blastp. Программа также позволяет использовать фильтр SEG для маскировки сегментов последовательностей запросов, как это определено программой SEG Wootton and Federhen, *Computers and Chemistry* 17: 149-163 (1993). Высокая идентичность последовательностей, как правило, включает в себя диапазоны идентичности последовательностей от приблизительно 80% до 100% и целые числа между ними.

[103] Используемый в настоящем документе термин «сконструированный» применительно к белку относится к не встречающемуся в природе белку, включая в себя, без ограничения, белок, полученный из встречающегося в природе белка, или когда встречающийся в природе белок модифицирован или перепрограммирован, чтобы иметь определенное свойство.

[104] Используемые в настоящем документе термины «синтетический» и «искусственный» используются взаимозаменяемо для обозначения белка или его домена, который характеризуется низкой идентичностью последовательности (например, идентичность последовательности составляет менее чем 50%) по отношению к встречающемуся в природе белку человека. Например, домены VPR и VP64 представляют собой синтетические домены трансактивации.

[105] Используемый в настоящем документе термин «сконструированный фактор транскрипции» или «eTF» относится к не встречающемуся в природе ДНК-связывающему белку или не встречающемуся в природе модулятору транскрипции, который был модифицирован или перепрограммирован для связывания со специфическим целевым сайтом связывания и/или включения модифицированного или замененного эффекторного домена транскрипции.

[106] Используемый в настоящем документе термин «ДНК-связывающий домен» может использоваться для обозначения одного или нескольких ДНК-связывающих

мотивов, таких как «цинковый палец» или основной мотив спираль-петля-спираль (bHLH), индивидуально или вместе как часть ДНК-связывающего белка.

[107] Термины «активирующий транскрипцию домен», «домен активации транскрипции», «домен трансактивации», «транс-активирующий домен» и «TAD» используются в настоящем документе взаимозаменяемо и относятся к домену белка, который вместе с ДНК-связывающим доменом может активировать транскрипцию с промотора, контактируя с транскрипционным аппаратом (например, с общими факторами транскрипции и/или РНК-полимеразой) либо напрямую, либо через другие белки, известные как коактиваторы.

[108] Термины «домен репрессора транскрипции» и «TRD» используются в настоящем документе взаимозаменяемо и относятся к домену белка, который в сочетании с ДНК-связывающим доменом может репрессировать транскрипцию с промотора, контактируя с транскрипционным механизмом (например, общие факторы транскрипции и/или РНК-полимераза) либо напрямую, либо через другие белки, известные как корепрессоры.

[109] Термин «GRCh38.p12» относится к заплаточному релизу 12 Консорциума эталонных геномов Human Build 38 (GRCh38.p12), имеющему регистрационный номер сборки GenBank GCA_000001405.27 и датированному 21 декабря 2017 года.

[110] Если не указано иное, все термины, использованные в настоящем документе, характеризуются тем же значением, что и для специалиста в настоящей области техники, и в практике настоящего изобретения будут использоваться традиционные способы молекулярной биологии, микробиологии и технологии рекомбинантных ДНК, которые находятся в пределах знания специалистов в настоящей области техники.

Сконструированные факторы транскрипции (eTF), которые активируют SCN1A

[111] Согласно одному аспекту в настоящей заявке представлены eTF, которые способны повышать экспрессию гена альфа-субъединицы 1 натриевого канала с регулируемым напряжением (SCN1A) и увеличивать экспрессию его соответствующего белкового продукта Nav1.1. Ген SCN1A принадлежит к семейству генов, кодирующих субъединицы, используемые для сборки натриевых каналов. Эти каналы, которые транспортируют положительно заряженные ионы натрия в клетки, играют ключевую роль в способности клетки генерировать и передавать электрические сигналы. Ген SCN1A кодирует одну часть (альфа-субъединицу) натриевого канала, называемого Nav1.1. Эти каналы в основном находятся в головном мозге, где они контролируют поток ионов натрия в клетки. Каналы Nav1.1 участвуют в передаче сигналов от одной нервной клетки (или нейрона) к другой. Было обнаружено, что несколько мутаций в гене SCN1A вызывают генетическую эпилепсию с фебрильными припадками плюс (GEFS+), которая представляет

собой спектр припадочных расстройств различной степени тяжести. Эти состояния включают в себя простые фебрильные (связанные с лихорадкой) припадки, которые начинаются в младенчестве и обычно прекращаются к 5 годам, и фебрильные припадки плюс (FS+). FS+ включает в себя фебрильные и другие типы припадков, в том числе не связанные с лихорадкой (афебрильные припадки), которые продолжаются во взрослом возрасте. Спектр GEFS+ также включает в себя другие состояния, такие как синдром Драве (также известный как тяжелая миоклоническая эпилепсия младенчества или SMEI), которые вызывают более серьезные припадки, которые длятся дольше и которые трудно контролировать. Эти повторяющиеся припадки (эпилепсия) могут со временем обостряться и часто сопровождаются снижением функции головного мозга. Многие другие мутации были связаны с семейной гемиплегической мигренью, формой мигренозной головной боли, которая передается в семье, и по меньшей мере одна мутация была связана с эффективностью некоторых противосудорожных лекарственных средств. Таким образом, представленный в настоящем документе eTF, который увеличивает экспрессию SCN1A, можно использовать для лечения множества заболеваний или нарушений, связанных с мутациями в канале Nav1.1.

[112] Факторы транскрипции (TF) представляют собой белки, которые связываются с определенными последовательностями в геноме и контролируют экспрессию генов. Сконструированные факторы транскрипции или eTF, представленные в настоящем документе, которые активируют SCN1A, представляют собой не встречающиеся в природе белки, которые содержат ДНК-связывающий домен (DBD) и по меньшей мере один домен, который является модулятором транскрипции, например, либо домен активации транскрипции (TAD), либо транскрипционный репрессорный домен (TRD). Согласно одному варианту осуществления eTF, который активирует SCN1A, может содержать DBD и TAD (например, TAD-DBD или DBD-TAD), причем DBD и TAD могут происходить из одного и того же белка или из разных белков. Согласно другому варианту осуществления eTF, который активирует SCN1A, может содержать DBD и два TAD, причем DBD и TAD происходят из одного и того же белка, DBD происходит из первого белка, и оба TAD происходят из второго белка, DBD и один TAD происходят из первого белка, а второй TAD происходит из второго белка, или DBD происходит из первого белка, один TAD происходит из второго белка, а второй TAD происходит из третьего белка (например, TAD1-DBD-TAD1, TAD1-DBD-TAD2, TAD1-TAD1-DBD, TAD1-TAD2-DBD, DBD-TAD1-TAD1 или DBD-TAD1-TAD2). Согласно другому варианту осуществления eTF, который активирует SCN1A, может содержать DBD и три TAD, причем DBD и TAD происходят из одного и того же белка, DBD происходит из первого белка, а TAD происходят из одного или

нескольких разных белков, или причем DBD и все TAD происходят из разных белков, например, TAD_X-TAD_X-TAD_X-DBD, TAD_X-TAD_X-DBD-TAD_X, TAD_X-DBD-TAD_X-TAD_X или DBD-TAD_X-TAD_X-TAD_X, где каждый X выбран независимо и может быть таким же или отличным от одного или всех других TAD. Примеры включают в себя, например, TAD1-TAD1-DBD-TAD1, TAD1-TAD1-DBD-TAD2, TAD1-TAD2-DBD-TAD1, TAD1-TAD2-DBD-TAD2, TAD1-TAD2-DBD-TAD3, TAD1-DBD-TAD1-TAD1, TAD1-DBD-TAD2-TAD2, TAD1-DBD-TAD1-TAD2, TAD2-DBD-TAD1-TAD2, TAD1-DBD-TAD2-TAD3, TAD1-TAD1-TAD1-DBD, TAD1-TAD2-TAD2-DBD, TAD1-TAD2-TAD2-DBD, TAD1-TAD2-TAD3-DBD, DBD-TAD1-TAD1-TAD1, DBD-TAD1-TAD1-TAD2, DBD-TAD1-TAD2-TAD2 или DBD-TAD1-TAD2-TAD3 и т.д. Согласно другому варианту осуществления eTF, который активирует SCN1A, может содержать DBD и четыре TAD, причем DBD и TAD происходят из одного и того же белка, DBD происходит из первого белка, а TAD происходят из одного или нескольких разных белки, или причем DBD и все TAD происходят из разных белков, например, TAD_X-TAD_X-TAD_X-TAD_X-DBD, TAD_X-TAD_X-TAD_X-DBD-TAD_X, TAD_X-TAD_X-DBD-TAD_X-TAD_X, TAD_X-DBD-TAD_X-TAD_X-TAD_X или DBD-TAD_X-TAD_X-TAD_X-TAD_X, где каждый X выбирается независимо и может быть таким же или отличаться от одного или всех других TAD. Примеры включают в себя, например, TAD1-TAD1-DBD-TAD1-TAD1, TAD1-TAD1-DBD-TAD2-TAD2, TAD1-TAD2-DBD-TAD1-TAD2, TAD1-TAD2-DBD-TAD2-TAD1, TAD1-TAD2-DBD-TAD1-TAD3, TAD1-TAD3-DBD-TAD1-TAD2, TAD1-TAD2-DBD-TAD3-TAD4, TAD1-TAD1-TAD1-DBD-TAD2, TAD1-TAD2-TAD3-DBD-TAD4, TAD1-DBD-TAD1-TAD1-TAD2, TAD1-DBD-TAD2-TAD3-TAD4, TAD1-DBD-TAD1-TAD2-TAD3, TAD2-DBD-TAD1-TAD2-TAD3, TAD1-DBD-TAD2-TAD3-TAD4, TAD1-TAD1-TAD1-TAD1-DBD, TAD1-TAD2-TAD2-TAD3-DBD, TAD1-TAD2-TAD3-TAD4-DBD, DBD-TAD1-TAD1-TAD1-TAD1, DBD-TAD1-TAD1-TAD2-TAD2, DBD-TAD1-TAD2-TAD3-TAD4 или DBD-TAD1-TAD2-TAD3-TAD3 и т.д. Согласно одному варианту осуществления eTF, который активирует SCN1A, содержит DBD и два TAD, которые расположены на одном конце DBD (например, N-конце или C-конце), причем DBD происходит из первого белка, и оба TAD происходят из второго белка, или DBD происходит из первого белка, один TAD происходит из второго белка, а второй TAD происходит из третьего белка (например, TAD1-TAD1-DBD, TAD1-TAD2-DBD, DBD-TAD1-TAD1 или DBD-TAD1-TAD2). Согласно определенным вариантам осуществления DBD может представлять собой синтетическую конструкцию, содержащую домены из нескольких белков.

[113] Согласно определенным вариантам осуществления DBD и TAD и/или два TAD могут быть напрямую конъюгированы, например, без промежуточной аминокислотной

последовательности, DBD и TAD и/или два TAD могут быть конъюгированы с использованием пептидного линкера или их комбинаций. Согласно определенным вариантам осуществления DBD конъюгирован с TAD и/или один TAD конъюгирован со вторым TAD через линкер, содержащий 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 90 или 100 аминокислот или 1-5, 1-10, 1-20, 1-30, 1-40, 1-50, 1-75, 1-100, 5-10, 5-20, 5-30, 5-40, 5-50, 5-75, 5-100, 10-20, 10-30, 10-40, 10-50, 10-75, 10-100, 20-30, 20-40, 20-50, 20-75 или 20-100 аминокислот. В некоторых случаях DBD и TAD и/или два TAD конъюгированы через встречающиеся в природе промежуточные остатки, обнаруженные во встречающихся в природе белках, из которых происходят домены. Согласно другим вариантам осуществления DBD и TAD и/или два TAD конъюгированы через синтетическую или экзогенную линкерную последовательность. Подходящие линкеры могут быть гибкими, расщепляемыми, нерасщепляемыми, гидрофильными и/или гидрофобными. Согласно определенным вариантам осуществления DBD и TAD и/или два TAD могут быть слиты вместе через линкер, содержащий множество остатков глицина и/или серина. Примеры пептидных линкеров глицина/серина включают в себя [GS]*n*, [GGGS]*n* (SEQ ID NO: 179), [GGGGS]*n* (SEQ ID NO: 180), [GGSG]*n* (SEQ ID NO: 181), где *n* представляет собой целое число, равное или больше 1. Согласно определенным вариантам осуществления линкер, используемый для конъюгирования DBD и TAD и/или двух TAD, представляет собой GGS²GGGSG (SEQ ID NO: 177). Согласно определенным вариантам осуществления линкер, используемый для конъюгирования DBD и TAD и/или двух TAD, представляет собой GGS²GGGSGGGSGGGSG (SEQ ID NO: 178). Согласно определенным вариантам осуществления, когда DBD конъюгирован с двумя TAD, первый и второй TAD могут быть конъюгированы с DBD с одинаковыми или разными линкерами, или один TAD может быть конъюгирован с DBD с помощью линкера, а другой TAD может быть конъюгирован напрямую с DBD (например, без промежуточной линкерной последовательности), или оба TAD могут быть непосредственно конъюгированы с DBD (например, без промежуточных линкерных последовательностей). Согласно определенным вариантам осуществления, когда DBD конъюгирован с двумя TAD на одном и том же конце (например, N-конце или C-конце), линкер, соединяющий два TAD, может быть таким же или отличаться от линкера, соединяющего TAD с DBD, или TAD могут быть конъюгированы друг с другом с помощью линкера, но TAD напрямую конъюгированы с DBD (например, без промежуточной линкерной последовательности), или TAD могут быть напрямую конъюгированы друг с другом (например, без промежуточных линкерных последовательностей), но TAD конъюгированы с DBD с помощью линкера. Согласно определенным вариантам осуществления представленные в

настоящем документе eTF, которые активируют SCN1A, не содержат один или несколько тегов HA (например, SEQ ID NO: 171), расположенных между DBD и одним или несколькими TAD.

[114] Представленные в настоящем документе eTF, которые активируют SCN1A, обладают свойствами, отличными от природных факторов транскрипции. Согласно определенным вариантам осуществления eTF, который активирует SCN1A, содержит DBD, полученный из встречающегося в природе белка, который был модифицирован таким образом, что DBD связывается с другим целевым сайтом по сравнению с встречающимся в природе белком, из которого он получен, и eTF, содержащий такой модифицированный DBD модулирует экспрессию другого гена (например, SCN1A) по сравнению с природным белком, из которого получен DBD (например, геном, отличным от SCN1A). Согласно другим вариантам осуществления eTF, представленный в настоящем документе, который активирует SCN1A, содержит TAD, полученный из встречающегося в природе белка, который был модифицирован таким образом, что eTF, содержащий такой модифицированный TAD, модулирует экспрессию другого гена (например, SCN1A) по сравнению с встречающимся в природе белком, из которого получен TAD (например, ген, отличный от SCN1A), и/или eTF, содержащий такой модифицированный TAD, по-разному модулирует экспрессию SCN1A (например, активирует или подавляет) по сравнению с встречающимся в природе белком, из которого получен TAD. Согласно определенным вариантам осуществления представленный в настоящем документе eTF, который активирует SCN1A, содержит DBD, полученный из встречающегося в природе белка, и TAD, полученный из встречающегося в природе белка (одного и того же или разных белков), причем как DBD, так и TAD были модифицированы. Согласно таким вариантам осуществления DBD может связываться с другим целевым сайтом по сравнению с встречающимся в природе белком, из которого он был получен, eTF, содержащий такой модифицированный DBD и TAD, модулирует экспрессию другого гена (например, SCN1A) по сравнению с встречающимся в природе белком, из которых получены домены (например, ген(-ы), отличный от SCN1A), и/или eTF, содержащий такие модифицированные DBD и TAD, по-разному модулирует экспрессию SCN1A (например, активирует или подавляет) по сравнению с встречающимися в природе белками, из которых получены домены DBD и TAD.

ДНК-связывающие домены (DBD)

[115] Приведенные в настоящем документе eTF, которые активируют SCN1A, могут содержать любой подходящий DBD, который связывается с представляющим интерес целевым сайтом (например, целевой сайт, который приводит к положительной регуляции

SCN1A при связывании с помощью eTF, представленного в настоящем документе). Согласно определенным вариантам осуществления DBD может представлять собой синтетически разработанный DBD. Согласно другим вариантам осуществления DBD может быть получен из встречающегося в природе белка. Семейства DBD включают в себя основную спираль-петлю-спираль (bHLH) (например, c-Myc), основную лейциновую молнию (например, C/EBP), спираль-поворот-спираль (например, Oct-1) и «цинковые пальцы» (например, EGR1 или EGR3). Эти семейства демонстрируют широкий спектр специфичностей связывания ДНК и генных мишеней. Как предполагается в настоящем документе, любой из известных белков фактора транскрипции человека может служить в качестве белковой платформы для конструирования и/или перепрограммирования DBD для распознавания конкретного целевого сайта, что приводит к модуляции экспрессии эндогенного гена SCN1A. Согласно иллюстративным вариантам осуществления DBD, представленный в настоящем документе, содержит домен типа «цинковые пальцы», связывающий домен TALEN или комплекс gRNA/Cas.

[116] Представленный в настоящем документе DBD может быть разработан для распознавания любого целевого сайта, который приводит к активации SCN1A. Согласно иллюстративным вариантам осуществления DBD разработан для распознавания местоположения в геноме и повышения экспрессии эндогенного гена SCN1A, связанного с eTF. Сайты связывания, способные модулировать экспрессию эндогенного гена SCN1A при связывании с помощью представленного в настоящем документе eTF, могут быть расположены в любом месте генома, что приводит к модуляции экспрессии гена SCN1A. Согласно различным вариантам осуществления сайт связывания может быть расположен на хромосоме, отличной от SCN1A, на той же хромосоме, что и SCN1A, выше против хода транскрипции от сайта начала транскрипции (TSS) гена SCN1A, ниже по ходу транскрипции от TSS гена SCN1A, проксимальнее от TSS гена SCN1A, дистальнее от TSS гена SCN1A, в кодирующей области гена SCN1A, в интроне гена SCN1A, ниже по ходу транскрипции от полиА-хвоста гена SCN1A, в промоторной последовательности, которая регулирует ген SCN1A, или в последовательности энхансера, которая регулирует ген SCN1A.

[117] DBD может быть разработан для связывания с целевым сайтом связывания любой длины при условии, что он обеспечивает специфическое распознавание последовательности целевого сайта связывания посредством DBD, например, с минимальным или нулевым связыванием вне мишени. Согласно определенным вариантам осуществления целевой сайт связывания может модулировать экспрессию SCN1A при связывании с eTF на уровне, который является по меньшей мере 2-кратным, 5-кратным, 10-

кратным, 20-кратным, 50-кратным, 75-кратным, 100-кратным, 150-кратным, 200-кратным, 250-кратным, 500-кратным или более по сравнению со всеми другими генами. Согласно определенным вариантам осуществления целевой сайт связывания может модулировать экспрессию SCN1A при связывании с eTF на уровне, который является по меньшей мере 2-кратным, 5-кратным, 10-кратным, 20-кратным, 50-кратным, 75-кратным, 100-кратным, 150-кратным, 200-кратным, 250-кратным, 500-кратным или более по сравнению с 40 ближайшими соседними генами (например, 40 генов, расположенных ближе всего к хромосоме, выше против хода транскрипции или ниже по ходу транскрипции от кодирующей последовательности SCN1A). Согласно определенным вариантам осуществления целевой сайт связывания может составлять по меньшей мере 5 п.н., 10 п.н., 15 п.н., 20 п.н., 25 п.н., 30 п.н., 35 п.н., 40 п.н., 45 п.н. или 50 п.н. или более. Конкретная длина сайта связывания определяется типом DBD в eTF. В общем, чем больше длина сайта связывания, тем выше специфичность связывания и модуляции экспрессии гена (например, более длинные сайты связывания характеризуются меньшим количеством нецелевых эффектов). Согласно определенным вариантам осуществления, eTF, содержащий DBD, распознающий более длинный целевой сайт связывания, имеет меньше нецелевых эффектов, связанных с неспецифическим связыванием (таких как, например, модуляция экспрессии нецелевого гена или отличного от SCN1A гена) относительно нецелевых эффектов, наблюдаемых с eTF, имеющим DBD, который связывается с более коротким целевым сайтом. В некоторых случаях снижение нецелевого связывания по меньшей мере в 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 раз ниже по сравнению с сопоставимым eTF, имеющим DBD, который распознает более короткий целевой сайт связывания.

[118] Согласно определенным вариантам осуществления представленный в настоящем документе DBD может быть модифицирован, чтобы иметь повышенную аффинность связывания, так что он связывается с целевым сайтом связывания в течение более длительного периода времени, так что TAD, конъюгированный с DBD, может рекрутировать больше факторов транскрипции и/или рекрутировать такой фактор транскрипции на более длительный период времени, чтобы оказывать большее влияние на уровень экспрессии эндогенного гена SCN1A. Согласно определенным вариантам осуществления DBD может быть модифицирован для увеличения его специфического связывания (или целевого связывания) с желаемым целевым сайтом и/или модифицирован для уменьшения его неспецифического или нецелевого связывания.

[119] Согласно различным вариантам осуществления связывание между DBD или eTF и целевым сайтом связывания может быть определено с использованием различных способов. Согласно определенным вариантам осуществления специфическое связывание

между DBD или eTF и целевым сайтом связывания может быть определено с использованием анализа определения изменения подвижности, анализа защиты от ДНКазы или любого другого способа *in vitro*, известного в настоящей области техники для анализа связывания белок-ДНК. Согласно другим вариантам осуществления специфическое связывание между eTF и целевым сайтом связывания можно определить с помощью функционального анализа, например, путем измерения экспрессии (РНК или белка) гена (например, SCN1A), когда целевой сайт связывания связан с eTF. Например, целевой сайт связывания может быть расположен выше против хода транскрипции от репортерного гена (такого как, например, eGFP) или гена SCN1A в векторе, содержащемся в клетке или интегрированном в геном клетки, причем клетка экспрессирует eTF. Альтернативно, экспрессирующий eTF вектор может быть введен в тип клеток, который в природе содержит ген SCN1A. Более высокие уровни экспрессии репортерного гена (или SCN1A) в присутствии eTF по сравнению с контролем (например, без eTF или eTF, который распознает другой целевой сайт) указывают на то, что DBD eTF связывается с целевым сайтом. Подходящие *in vitro* (например, неклеточные) системы транскрипции и трансляции также могут быть использованы аналогичным образом. Согласно определенным вариантам осуществления eTF, который связывается с целевым сайтом, может характеризоваться по меньшей мере 2-кратной, 3-кратной, 5-кратной, 10-кратной, 15-кратной, 20-кратной, 30-кратной, 50-кратной, 75-кратной, 100-кратной, 150-кратной или большей экспрессией репортерного гена или SCN1A по сравнению с контролем (например, без eTF или с eTF, который распознает другой целевой сайт).

[120] Согласно определенным вариантам осуществления раскрытый в настоящем документе eTF, который активирует SCN1A, распознает целевой сайт связывания, размер которого составляет по меньшей мере 9 п.н., 12 п.н., 15 п.н., 18 п.н., 21 п.н., 24 п.н., 27 п.н., 30 п.н., 33 п.н. или 36 п.н.; более чем 9 п.н., 12 п.н., 15 п.н., 18 п.н., 21 п.н., 24 п.н., 27 п.н. или 30 п.н.; или 9-33 п.н., 9-30 п.н., 9-27 п.н., 9-24 п.н., 9-21 п.н., 9-18 п.н., 9-15 п.н., 9-12 п.н., 12-33 п.н., 12-30 п.н., 12-27 п.н., 12-24 п.н., 12-21 п.н., 12-18 п.н., 12-15 п.н., 15-33 п.н., 15-30 п.н., 15-27 п.н., 15-24 п.н., 15-21 п.н., 15-18 п.н., 18-33 п.н., 18-30 п.н., 18-27 п.н., 18-24 п.н., 18-21 п.н., 21-33 п.н., 21-30 п.н., 21-27 п.н., 21-24 п.н., 24-33 п.н., 24-30 п.н., 24-27 п.н., 27-33 п.н., 27-30 п.н. или 30-33 п.н.. Согласно иллюстративным вариантам осуществления раскрытый в настоящем документе eTF, который активирует SCN1A, распознает целевой сайт связывания, который составляет 18-27 п.н., 18 п.н. или 27 п.н.

[121] Согласно определенным вариантам осуществления раскрытый в настоящем документе eTF, который активирует SCN1A, распознает целевой сайт связывания, расположенный на хромосоме 2. Согласно определенным вариантам осуществления

раскрытый в настоящем документе eTF, который активирует SCN1A, распознает целевой сайт связывания, расположенный на хромосоме 2 в пределах 110 т.п.н., 100 т.п.н., 90 т.п.н., 80 т.п.н., 70 т.п.н., 60 т.п.н., 50 т.п.н., 40 т.п.н., 30 т.п.н., 20 т.п.н., 10 т.п.н., 5 т.п.н., 4 т.п.н., 3 т.п.н., 2 т.п.н. или 1 т.п.н. выше против хода транскрипции или ниже по ходу транскрипции от TSS SCN1A. Согласно определенным вариантам осуществления раскрытый в настоящем документе eTF, который активирует SCN1A, распознает целевой сайт связывания, который расположен на хромосоме 2 в пределах 110 т.п.н. выше против хода транскрипции от TSS SCN1A. Согласно определенным вариантам осуществления раскрытый в настоящем документе eTF, который активирует SCN1A, распознает целевой сайт связывания, который расположен на хромосоме 2 в пределах 110 т.п.н. ниже по ходу транскрипции от TSS SCN1A. Согласно иллюстративным вариантам осуществления такие целевые сайты связывания составляют 18-27 п.н., 18 п.н. или 27 п.н.

[122] Согласно определенным вариантам осуществления раскрытый в настоящем документе eTF, который активирует SCN1A, распознает целевой сайт связывания, который расположен на хромосоме 2 в пределах положений 166179652-165989571, в пределах положений 166128050-166127958, в пределах положений 166155414-166140590, в пределах положений 166179652-1661777272 или в пределах положений 1659990246-165989592 (все со ссылкой на GRCh38.p12). Согласно иллюстративным вариантам осуществления такие целевые сайты связывания составляют 18-27 п.н., 18 п.н. или 27 п.н.

[123] Согласно определенным вариантам осуществления раскрытый в настоящем документе eTF, который активирует SCN1A, распознает целевой сайт связывания, который (i) составляет 18-27 п.н., 18 п.н. или 27 п.н., (ii) перекрывается с положением на хромосоме 2, выбранным из 166178880, 166177369, 166177362, 166177299, 166177299, 166155393, 166155264, 166149373, 166149176, 166149165, 166149118, 166148953, 166148565, 166142396, 166142391, 166142344, 166142239, 166141162, 166140928, 166140590, 165990076, 165989684, 165989571, 166155255, 166155099, 166148843, 166148361, 166142219, 166141090, 165990246, 165990193, 166149168, 166127991, 166128002, 166128037 или 166128025 (все со ссылкой на GRCh38.p12) и (iii) способен вызывать по меньшей мере 1,2-кратное увеличение экспрессии SCN1A при связывании раскрытым в настоящем документе eTF.

[124] Согласно определенным вариантам осуществления раскрытый в настоящем документе eTF, который активирует SCN1A, (i) связывается с целевым сайтом, содержащим любую из SEQ ID NO: 18, 25, 30, 31 или 35-66 или состоящим из нее, и (ii) способен вызывать по меньшей мере 1,2-кратное увеличение экспрессии SCN1A при связывании раскрытым в настоящем документе eTF.

[125] Согласно определенным вариантам осуществления раскрытый в настоящем документе eTF, который активирует SCN1A, распознает целевой сайт связывания, который (i) составляет 18-27 п.н., 18 п.н. или 27 п.н., (ii) перекрывается с положением на хромосоме 2, выбранным из 166155255, 166155099, 166148843, 166148361, 166142219, 166141090, 165990246, 165990193, 166149168, 166127991, 166128002, 166128037 или 166128025 (все со ссылкой на GRCh38.p12), и (iii) способен вызывать как минимум 2-кратное увеличение экспрессии SCN1A при связывании раскрытым в настоящем документе eTF.

[126] Согласно определенным вариантам осуществления раскрытый в настоящем документе eTF, который активирует SCN1A, (i) связывается с целевым сайтом, содержащим любую из SEQ ID NO: 18, 30, 31, 37, 38, 45, 47, 48, 49, 55, 61, 62 или 64 или состоящим из нее, и (ii) способен вызывать по меньшей мере 2-кратное увеличение экспрессии SCN1A при связывании раскрытым в настоящем документе eTF.

[127] Согласно определенным вариантам осуществления раскрытый в настоящем документе eTF, который активирует SCN1A, распознает целевой сайт связывания, который (i) составляет 18-27 п.н., 18 п.н. или 27 п.н., и (ii) перекрывается с положением на хромосоме 2, выбранным из 166149168, 166127991, 166128002, 166128037 или 166128025 (все со ссылкой на GRCh38.p12), и (iii) способен вызывать по меньшей мере 5-кратное увеличение экспрессии SCN1A при связывании раскрытым в настоящем документе eTF.

[128] Согласно определенным вариантам осуществления раскрытый в настоящем документе eTF, который активирует SCN1A, (i) связывается с целевым сайтом, содержащим любую из SEQ ID NO: 18, 30, 31, 37 или 38 или состоящим из нее, и (ii) способен вызывать по меньшей мере 5-кратное увеличение экспрессии SCN1A при связывании раскрытым в настоящем документе eTF.

[129] Согласно определенным вариантам осуществления раскрытый в настоящем документе eTF, который активирует SCN1A, распознает целевой сайт связывания, который (i) составляет 18-27 п.н., 18 п.н. или 27 п.н., (ii) перекрывается с положением на хромосоме 2, выбранным из 166128002, 166128037, или 166128025 (все со ссылкой на GRCh38.p12), и (iii) способен вызывать по меньшей мере 15-кратное увеличение экспрессии SCN1A при связывании раскрытым в настоящем документе eTF.

[130] Согласно определенным вариантам осуществления раскрытый в настоящем документе eTF, который активирует SCN1A, (i) связывается с целевым сайтом, содержащим любую из SEQ ID NO: 30, 37 или 38 или состоящим из нее, и (ii) способен вызывать по меньшей мере 15-кратное увеличение экспрессии SCN1A при связывании раскрытым в настоящем документе eTF.

[131] Согласно определенным вариантам осуществления раскрытый в настоящем документе eTF, который активирует SCN1A, распознает целевой сайт связывания, который (i) составляет 18-27 п.н., 18 п.н. или 27 п.н., (ii) перекрывается с положением на хромосоме 2, выбранным из 166128037 или 166128025 (все со ссылкой на GRCh38.p12), и (iii) способен вызывать по меньшей мере 20-кратное увеличение экспрессии SCN1A при связывании раскрытым в настоящем документе eTF.

[132] Согласно определенным вариантам осуществления раскрытый в настоящем документе eTF, который активирует SCN1A, (i) связывается с целевым сайтом, содержащим любую из SEQ ID NO: 30 или 38 или состоящим из нее, и (ii) способен вызывать по меньшей мере 20-кратное увеличение экспрессии SCN1A при связывании раскрытым в настоящем документе eTF.

[133] Согласно определенным вариантам осуществления раскрытый в настоящем документе eTF, который активирует SCN1A, распознает целевой сайт связывания, который (i) составляет 18-27 п.н., 18 п.н. или 27 п.н., (ii) перекрывается с положением на хромосоме 2 в положении 166128025 и (iii) способен вызывать по меньшей мере 25-кратное увеличение экспрессии SCN1A при связывании раскрытым в настоящем документе eTF.

[134] Согласно определенным вариантам осуществления раскрытый в настоящем документе eTF, который активирует SCN1A, (i) связывается с целевым сайтом, содержащим или состоящим из SEQ ID NO: 30, и (ii) способен вызывать по меньшей мере 25-кратное увеличение экспрессии SCN1A при связывании раскрытым в настоящем документе eTF.

[135] Согласно определенным вариантам осуществления раскрытый в настоящем документе eTF, который активирует SCN1A, распознает целевой сайт связывания, который (i) составляет 18-27 п.н., 18 п.н. или 27 п.н. и (ii) связывается с геномной областью, которая находится в пределах по меньшей мере 1 т.п.н., 750 п.н., 500 п.н., 400 п.н., 300 п.н., 200 п.н., 100 п.н. или 50 п.н. геномного местоположения, имеющего последовательность любой из SEQ ID NO: 18, 25, 30, 31 или 35-66. Согласно определенным вариантам осуществления целевой сайт связывания способен вызывать по меньшей мере 1,2-кратное, 2-кратное, 5-кратное, 15-кратное, 20-кратное или 25-кратное увеличение экспрессии SCN1A при связывании раскрытым в настоящем документе eTF.

[136] Согласно определенным вариантам осуществления раскрытый в настоящем документе eTF, который активирует SCN1A, распознает целевой сайт связывания, который (i) составляет 18-27 п.н., 18 п.н. или 27 п.н. и (ii) связывается с областью генома, которая по меньшей мере частично перекрывается с геномным местоположением, имеющим последовательность любой из SEQ ID NO: 18, 25, 30, 31 или 35-66. Согласно определенным

вариантам осуществления целевой сайт связывания способен вызывать по меньшей мере 1,2-кратное, 2-кратное, 5-кратное, 15-кратное, 20-кратное или 25-кратное увеличение экспрессии SCN1A при связывании раскрытым в настоящем документе eTF.

[137] Согласно определенным вариантам осуществления раскрытый в настоящем документе eTF, который активирует SCN1A, распознает целевой сайт связывания, имеющий любую из следующих последовательностей: SEQ ID NO: 18, 25, 30, 31 или 35-66. Согласно определенным вариантам осуществления целевой сайт связывания способен вызывать по меньшей мере 1,2-кратное, 2-кратное, 5-кратное, 15-кратное, 20-кратное или 25-кратное увеличение экспрессии SCN1A при связывании раскрытым в настоящем документе eTF.

[138] Согласно определенным вариантам осуществления раскрытый в настоящем документе eTF, который активирует SCN1A, приводит по меньшей мере к 1,5-кратному, 2-кратному, 3-кратному, 4-кратному, 5-кратному, 6-кратному, 7-кратному, 8-кратному, 9-кратному, 10-кратному, 15-кратному, 20-кратному, 25-кратному, 50-кратному, 100-кратному или более или по меньшей мере 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 200%, 250%, 300%, 400% или 500% или более активации экспрессии SCN1A (РНК SCN1A и/или белок Nav1.1) в клетке или *in vivo* по сравнению с контролем (например, без eTF или с eTF, который не распознает целевой сайт). Согласно различным вариантам осуществления активация экспрессии SCN1A может быть обнаружена с помощью способов ПЦР, вестерн-блоттинга или иммуноанализов.

[139] Согласно определенным вариантам осуществления раскрытый в настоящем документе eTF, который активирует SCN1A, связывается с целевым сайтом, который способен увеличивать экспрессию SCN1A по меньшей мере в 1,2 раза, 1,3 раза, 1,4 раза, 1,5 раз, 1,6 раз, 1,7 раз, 1,8 раз, 1,9 раз, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 8 раз, 10 раз, 12 раз, 15 раз, 18 раз, 20 раз, 25 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 75 раз, 100 раз или больше или по меньшей мере на 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 200%, 250%, 300%, 400% или 500% или более относительно контроля в анализе активации транскрипции. Иллюстративный анализ активации транскрипции SCN1A представлен в настоящем документе в примере 3. Вкратце, НЕК293 трансфицируют плазмидой, несущей eTF или контрольную репортерную конструкцию eGFP. Через 48 часов после трансфекции клетки собирают, выделяют РНК и подвергают обратной транскрипции, а полученные образцы кДНК анализируют с помощью кПЦР (например, с использованием праймеров, имеющих SEQ ID NO: 185 и 186) для количественного определения содержания эндогенного транскрипта SCN1A. GAPDH можно использовать в качестве эталонного гена для определения относительных уровней экспрессии SCN1A.

[140] Согласно определенным вариантам осуществления раскрытый в настоящем документе eTF, который активирует SCN1A, характеризуется минимальными нецелевыми эффектами, например, нецелевыми эффектами, связанными с неспецифическим связыванием, такими как, например, модуляция экспрессии нецелевого гена или отличного от SCN1A гена. Согласно одному варианту осуществления раскрытый в настоящем документе eTF, который активирует SCN1A, специфически активирует SCN1A по сравнению с контролем, по меньшей мере в 5 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 25 раз, 30 раз, 40 раз или 50 раз больше, чем экспрессия, произведенная eTF для одного или нескольких нецелевых генов по сравнению с контролем. Согласно иллюстративному варианту осуществления раскрытый в настоящем документе eTF, который активирует SCN1A, специфически активирует транскрипцию гена SCN1A по сравнению с контролем, по меньшей мере, в 15 раз больше, чем транскрипция 40 ближайших соседних генов (например, 40 ближайших генов, расположенных к кодирующей последовательности SCN1A на хромосоме 2), производимая eTF относительно контроля, например, PLA2R1, ITGB6, RBMS1, TANK, PSMD14, TBR1, SLC4A10, DPP4, FAP, IFIH1, GCA, FIGN, GRB14, COBLL1, SLC38A11, SCN3A, SCN2A, CSRNP3, GALNT3, TTC21B, SCN9A, SCN7A, B3GALT1, STK39, CERS6, NOSTRIN, SPC25, ABCB11, DHRS9, BBS5, KLHL41, FASTKD1, PPIG, CCDC173, PHOSPHO2, KLHL23, SSB, METTL5, UBR3 и MYO3B (смотрите **таблицу 14**). Согласно различным вариантам осуществления активация транскрипции гена SCN1A может быть обнаружена с помощью способов ПЦР.

[141] Согласно определенным вариантам осуществления раскрытый в настоящем документе eTF, который активирует SCN1A, способен снижать частоту припадков в анализе гипертермических припадков (HTS) в модели синдрома Драве на мышах *Scn1a^{tm1kea}*. Согласно определенным вариантам осуществления раскрытый в настоящем документе eTF способен снижать частоту припадков при температуре 42,6°C в анализе HTS по меньшей мере в 1,2 раза, 1,3 раза, 1,4 раза, 1,5 раз, 1,6 раз, 1,7 раз, 1,8 раз, 1,9 раз, 2,0 раза или более или по меньшей мере на 20%, 30%, 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100% или более по сравнению с контролем (например, обработанный PBS или воздействие вектором AAV, содержащим последовательность, кодирующую eGFP). Согласно определенным вариантам осуществления раскрытый в настоящем документе eTF способен снижать частоту припадков при температуре 42,6°C в анализе HTS, так что по меньшей мере у 60%, 62%, 65%, 70%, 75%, 76%, 80%, 85 %, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% мышей, участвовавших в анализе, не наблюдалось припадков при температуре 42,6°C. Иллюстративный анализ HTS описан в настоящем документе в примере 6. Вкратце, пометам детенышей, полученным от самцов

мышей *Scn1a* +/-, скрещенных с самками мышей C57Bl/6J, может быть введен вектор AAV9, кодирующий eTF, который активирует SCN1A, как предусмотрено в настоящем документе, или контрольный вектор, кодирующий eGFP, посредством двустороннего ICV в P1. Мышам можно вводить дозу ~1,0E10-5,0E12 копий геномов/мышь. Анализ HTS проводят на гетерозиготных мышах P26-P28 SCN1A и SCN1A дикого типа на смешанном фоне 129Stac X C57BL/6 путем повышения температуры тела мышей (в контролируемых условиях и с контролем температуры тела) на ~0,5°C каждые 2 минуты до начала первого тонико-клонического припадка, сопровождающегося потерей положения тела, или до достижения температуры тела 43°C. Считается, что у мыши не было припадка, если не было обнаружено припадка с потерей положения тела в течение всего периода эксперимента.

[142] Согласно определенным вариантам осуществления раскрытый в настоящем документе eTF, который активирует SCN1A, способен увеличивать выживаемость мыши, гетерозиготной по SCN1A, например, линии мышей *Scn1a^{tm1kea}*. Согласно определенным вариантам осуществления раскрытый в настоящем документе eTF способен увеличивать выживаемость гетерозиготных мышей SCN1A при P100 по меньшей мере в 1,2 раза, 1,3 раза, 1,4 раза, 1,5 раз, 1,6 раз, 1,7 раз, 1,8 раз, 1,9 раз, 2,0 раза или более, или по меньшей мере на 20%, 30%, 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100% или более, как по сравнению с контролем (например, обработанным PBS или обработанным вектором AAV, содержащим последовательность, кодирующую eGFP). Согласно определенным вариантам осуществления раскрытый в настоящем документе eTF способен увеличивать выживаемость гетерозиготных мышей SCN1A при P100, так что по меньшей мере 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89 %, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% мышей, задействованных в анализе, все еще живы при P100. Иллюстративный анализ выживаемости описан в настоящем документе в примере 7. Вкратце, пометам детенышей, полученным от самцов мышей *Scn1a* +/-, скрещенных с самками мышей C57Bl/6J, может быть введен вектор AAV9 посредством двустороннего ICV в точке P1. Мышам можно вводить дозу ~1,0E10-5,0E12 копий геномов/мышь. Определяют количество мышей, доживших до P100.

[143] Согласно определенным вариантам осуществления представленный в настоящем документе eTF, который активирует SCN1A, может содержать DBD из белка типа «цинковые пальцы», полученного из белка типа «цинковые пальцы», или нуклеаза представляет собой инактивированный белок типа «цинковые пальцы». «Цинковый палец» представляет собой небольшой структурный мотив белка, который характеризуется координацией одного или нескольких ионов цинка (Zn^{2+}) для стабилизации складки. Домены типа «цинковые пальцы» (Znf) представляют собой относительно небольшие

белковые мотивы, которые содержат несколько пальцевидных выступов, которые создают тандемные контакты с целевым участком ДНК. Модульная природа мотива «цинкового пальца» позволяет связывать большое количество комбинаций последовательностей ДНК с высокой степенью аффинности и специфичности, и поэтому идеально подходит для создания белка, который может быть нацелен на определенные последовательности ДНК и связывать их. Многие сконструированные наборы «цинковых пальцев» основаны на домене типа «цинковые пальцы» мышинного фактора транскрипции Zif268. Zif268 содержит три отдельных мотива «цинковые пальцы», которые вместе связывают последовательность из 9 п.н. с высокой аффинностью. Было идентифицировано большое количество белков типа «цинковые пальцы», и они были охарактеризованы на различные типы на основе структуры, которая дополнительно описана в настоящем документе. Любой такой белок типа «цинковые пальцы» применим в связи с описанными в настоящем документе DBD.

[144] Доступны различные способы конструирования белков типа «цинковые пальцы». Например, описаны способы создания белков типа «цинковые пальцы» для связывания с представляющей интерес целевой последовательностью ДНК, смотрите, например, Liu Q, et al., Design of polydactyl zinc-finger proteins for unique addressing within complex genomes, *Proc Natl Acad Sci USA*. 94 (11): 5525–30 (1997); Wright DA et al., Standardized reagents and protocols for engineering zinc finger nucleases by modular assembly, *Nat Protoc*. *Nat Protoc*. 2006;1(3):1637-52 и CA Gersbach and T Gaj, Synthetic Zinc Finger Proteins: The Advent of Targeted Gene Regulation and Genome Modification Technologies, *Am Chem Soc* 47: 2309–2318 (2014). Кроме того, общедоступны различные веб-инструменты для создания белков типа «цинковые пальцы» для связывания с представляющей интерес целевой последовательностью ДНК, смотрите, например, программные инструменты для разработки нуклеаз типа «цинковые пальцы» и веб-сайт анализа сконструированных данных генома от OmicX, доступный в Интернете по адресу omictools.com/zfns-category; и веб-сайт дизайна Zinc Finger Tools от Scripps, доступный в Интернете по адресу scripps.edu/barbas/zfdesign/zfdesignhome.php. Кроме того, доступны различные коммерчески доступные услуги по разработке белков типа «цинковые пальцы» для связывания с представляющей интерес целевой последовательностью ДНК, смотрите, например, коммерчески доступные услуги или наборы, предлагаемые Creative Biolabs (в Интернете по адресу creative-biolabs.com/Design-and-Synthesis-of-Artificial-Zinc-Finger-Proteins.html), Modular Assembly Kit Zinc Finger Consortium, доступный от Addgene (в Интернете по адресу addgene.org/kits/zfc-modular-assembly/), или the CompoZr Custom ZFN Service от Sigma Aldrich (в Интернете по адресу sigmaaldrich.com/life-science/zinc-finger-nuclease-technology/custom-zfn.html).

[145] Согласно определенным вариантам осуществления представленные в настоящем документе eTF, которые активируют SCN1A, содержат DBD, содержащий один или несколько «цинковых пальцев», или получены из DBD белка типа «цинковые пальцы». В некоторых случаях DBD содержит несколько «цинковых пальцев», причем каждый «цинковый палец» связан с другим «цинковым пальцем» или другим доменом либо на своем N-конце, либо на C-конце, или на обоих через аминокислотный линкер. В некоторых случаях представленный в настоящем документе DBD содержит один или несколько «цинковых пальцев» из одного или нескольких типов «цинковых пальцев», описанных в **таблице 9**. В некоторых случаях представленный в настоящем документе DBD содержит множество структур или мотивов «цинковых пальцев» или множество «цинковых пальцев», имеющих одну или несколько из SEQ ID NO: 152-167 или любую их комбинацию. Согласно определенным вариантам осуществления DBD содержит $X-[ZF-X]_n$ и/или $[X-ZF]_n-X$, причем ZF представляет собой домен типа «цинковые пальцы», содержащий любой из мотивов, перечисленных в **таблице 9** (например, любой из SEQ ID NO: 136-146), X представляет собой аминокислотный линкер, содержащий 1-50 аминокислот, и n представляет собой целое число от 1 до 15, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15, причем каждый ZF может независимо иметь ту же последовательность или последовательность, отличную от других последовательностей ZF в DBD, и причем каждый линкер X может независимо иметь такую же последовательность или последовательность, отличную от других последовательностей X в DBD. Каждый «цинковый палец» может быть связан с другой последовательностью, «цинковым пальцем» или доменом на своем C-конце, N-конце или с обоими. В DBD каждый линкер X может быть идентичным по последовательности, длине и/или свойству (например, гибкости или заряду) или отличаться по последовательности, длине и/или свойству. В некоторых случаях два или более линкера могут быть идентичными, в то время как другие линкеры различны. Согласно иллюстративным вариантам осуществления линкер может быть получен или быть производным от последовательностей, соединяющих «цинковые пальцы», обнаруженных в одном или нескольких встречающихся в природе белках типа «цинковые пальцы», представленных в **таблице 9**. Согласно другим вариантам осуществления подходящие линкерные последовательности включают в себя, например, линкеры из 5 или более аминокислот в длину. Смотрите также патент США № 6479626; 6903185 и 7153949 для иллюстративных линкерных последовательностей из 6 или более аминокислот в длину, каждая из которых полностью включена в настоящий документ. Предлагаемые в настоящем документе белки DBD могут включать в себя любую комбинацию подходящих линкеров между отдельными «цинковыми пальцами» белка. Описанные в настоящем документе

белки DBD могут включать в себя любую комбинацию подходящих линкеров между отдельными «цинковыми пальцами» белка.

[146] Согласно определенным вариантам осуществления представленные в настоящем документе eTF, которые активируют SCN1A, содержат DBD, содержащий один или несколько классических «цинковых пальцев». Классический «цинковый палец» C2H2 содержит два цистеина в одной цепи и два остатка гистидина в другой цепи, координируемых ионом цинка. Классический домен типа «цинковый палец» содержит два β -листа и одну α -спираль, причем α -спираль взаимодействует с молекулой ДНК и формирует основу связывания DBD с целевым сайтом и может называться «спиралью распознавания». Согласно иллюстративным вариантам осуществления спираль распознавания «цинковых пальцев» содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену в положении -1, 2, 3 или 6, тем самым изменяя специфичность связывания домена типа «цинковые пальцы». Согласно другим вариантам осуществления представленный в настоящем документе DBD содержит один или несколько неклассических «цинковых пальцев», например, C2–H2, C2–CH и C2–C2.

[147] Согласно другому варианту осуществления представленный в настоящем документе eTF, который активирует SCN1A, содержит DBD, содержащий мотив типа «цинковые пальцы», имеющий следующую структуру: LEPGEKP – [YKCPECGKSFS X HQRTH TGEKP] $_n$ – YKCPECGKSFS X HQRTH – TGKKTS (SEQ ID NO: 147), где n представляет собой целое число от 1 до 15, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15, и каждый X независимо представляет собой последовательность распознавания (например, спираль распознавания), способную связываться с 3 п.н. целевой последовательности. Согласно иллюстративным вариантам осуществления n равно 3, 6 или 9. Согласно особенно предпочтительному варианту осуществления n равно 6. Согласно различным вариантам осуществления каждый X может независимо иметь одинаковую аминокислотную последовательность или отличную аминокислотную последовательность по сравнению с другими последовательностями X в DBD. Согласно иллюстративному варианту осуществления каждый X представляет собой последовательность, содержащую 7 аминокислот, которая была разработана для взаимодействия с 3 п.н. представляющего интерес целевого сайта связывания с использованием Zinger Finger Design Tool от Scripps, расположенного в Интернете по адресу scripps.edu/barbas/zfdesign/zfdesignhome.php.

[148] Поскольку каждый «цинковый палец» в DBD распознает 3 п.н., количество «цинковых пальцев», включенных в DBD, сообщает длину сайта связывания, распознаваемого DBD, например, DBD с 1 «цинковым пальцем» распознает целевой сайт связывания, имеющий 3 п.н., DBD с 2 «цинковыми пальцами» распознает целевой сайт

связывания, имеющий 6 п.н., DBD с 3 «цинковыми пальцами» распознает целевой сайт связывания, имеющий 9 п.н., DBD с 4 «цинковыми пальцами» распознает целевой сайт связывания, имеющий 12 п.н., DBD с 5 «цинковыми пальцами» распознает целевой сайт связывания, имеющий 15 п.н., DBD с 6 «цинковыми пальцами» распознает целевой сайт связывания, имеющий 18 п.н., DBD с 9 «цинковыми пальцами» распознает целевой сайт связывания, имеющий 27 п.н., и т. д. В общем, DBD, которые распознают более длинные целевые сайты связывания, будут проявлять большую специфичность связывания (например, меньшее нецелевое связывание или неспецифическое связывание).

[149] Согласно другим вариантам осуществления представленный в настоящем документе eTF, который активирует SCN1A, содержит DBD, который происходит из встречающегося в природе белка типа «цинковые пальцы» путем выполнения одной или нескольких аминокислотных замен в одной или нескольких спиральях распознавания доменов типа «цинковые пальцы» для изменения специфичности связывания DBD (например, изменение целевого сайта, распознаваемого DBD). Представленный в настоящем документе DBD может быть получен из любого встречающегося в природе белка типа «цинковые пальцы». Согласно различным вариантам осуществления такой DBD может быть получен из белка типа «цинковые пальцы» любого вида, например, мыши, крысы, человека и т.д. Согласно иллюстративному варианту осуществления представленный в настоящем документе DBD получен из белка типа «цинковые пальцы» человека. Согласно определенным вариантам осуществления представленный в настоящем документе DBD получен из встречающегося в природе белка, перечисленного в **таблице 9**. Согласно иллюстративному варианту осуществления представленный в настоящем документе белок DBD получен из белка типа «цинковые пальцы» EGR человека, например, EGR1, EGR2, EGR3 или EGR4. .

[150] Согласно определенным вариантам осуществления представленный в настоящем документе eTF, который активирует SCN1A, содержит DBD, который происходит из встречающегося в природе белка, путем модификации DBD для увеличения количества доменов типа «цинковые пальцы» в белке DBD путем повторения одного или нескольких «цинковых пальцев» в пределах DBD встречающегося в природе белка. Согласно определенным вариантам осуществления такие модификации включают в себя дубликацию, утроение, учетверение или дальнейшее умножение «цинковых пальцев» в пределах DBD встречающегося в природе белка. В некоторых случаях умножается один «цинковый палец» из DBD человеческого белка, например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или более копий одного и того же мотива «цинкового пальца» повторяется в DBD eTF. В некоторых случаях набор «цинковых пальцев» из DBD встречающегося в природе белка

умножается, например, набор из 3 «цинковых пальцев» из DBD встречающегося в природе белка дублируется, чтобы получить eTF, имеющий DBD с 6 «цинковыми пальцами», троекратно повторяется для получения DBD eTF с 9 «цинковыми пальцами» или повторяется четыре раза для получения DBD eTF с 12 «цинковыми пальцами» и т.д. В некоторых случаях набор «цинковых пальцев» из DBD встречающегося в природе белка частично реплицируется для формирования DBD eTF, имеющего большее количество «цинковых пальцев», например, DBD eTF содержит четыре «цинковых пальца», причем «цинковые пальцы» представляют собой одну копию первого «цинкового пальца», одну копию второго «цинкового пальца» и две копии третьего «цинкового пальца» из встречающегося в природе белка, всего четыре «цинковых пальца» в DBD eTF. Затем такие DBD дополнительно модифицируют, производя одну или несколько аминокислотных замен в одной или нескольких спиральных распознавания доменов типа «цинковые пальцы», чтобы изменить специфичность связывания DBD (например, изменяя целевой сайт, распознаваемый DBD). Согласно иллюстративным вариантам осуществления DBD получают из встречающегося в природе человеческого белка, такого как белок типа «цинковые пальцы» EGR человека, например, EGR1, EGR2, EGR3 или EGR4.

[151] EGR1 и EGR3 человека характеризуются трехпальцевым DBD типа «цинковые пальцы» C2H2. Общие правила связывания для «цинковых пальцев» предусматривают, что все три пальца взаимодействуют со своей родственной последовательностью ДНК с аналогичной геометрией, используя одни и те же аминокислоты в альфа-спирали каждого «цинкового пальца» для определения специфичности или распознавания последовательности целевого сайта связывания. Такие правила связывания позволяют изменять DBD EGR1 или EGR3 для создания DBD, который распознает желаемый целевой сайт связывания. В некоторых случаях спираль распознавания ДНК из 7 аминокислот в мотиве «цинкового пальца» EGR1 или EGR3 модифицируется в соответствии с опубликованными правилами разработки «цинковых пальцев». Согласно определенным вариантам осуществления каждый «цинковый палец» в DBD с тремя пальцами EGR1 или EGR3 модифицируется, например, путем изменения последовательности одной или нескольких спиралей распознавания и/или путем увеличения количества «цинковых пальцев» в DBD. Согласно определенным вариантам осуществления EGR1 или EGR3 перепрограммированы для распознавания целевого сайта связывания по меньшей мере из 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36 или более пар оснований в желаемом целевом сайте. Согласно определенным вариантам осуществления такой DBD, полученный из EGR1 или EGR3, содержит по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или более «цинковых пальцев». Согласно иллюстративному варианту осуществления один или несколько «цинковых

пальцев» в DBD содержат по меньшей мере одну аминокислотную замену в положении -1, 2, 3 или 6 спирали распознавания.

[152] Согласно различным вариантам осуществления eTF, который активирует SCN1A, содержащий DBD, полученный из EGR1 или EGR3, характеризуется специфичностью связывания ДНК, которая отличается от специфичности связывания встречающихся в природе EGR1 или EGR3, например, DBD распознает целевой сайт связывания, имеющий последовательность, отличную от последовательности сайта связывания, распознаваемой немодифицированными EGR1 или EGR3: (GCG(T/G)GGGCG) (SEQ ID NO: 182).

[153] Согласно другим вариантам осуществления представленный в настоящем документе eTF, который активирует SCN1A, содержит DBD, который представляет собой комплекс gRNA/Cas. CRISPR (кластеризованные регулярные промежуточные короткие палиндромные повторы)/Cas9 представляет собой инструмент для редактирования генома, который позволяет направленно воздействовать на сайт-специфический геном. Система CRISPR/Cas типа II представляет собой прокариотическую систему адаптивного иммунного ответа, которая использует некодирующие РНК, чтобы направлять нуклеазу Cas9 для индукции сайт-специфического расщепления ДНК. Система CRISPR/Cas9 была использована для создания простого, программируемого с помощью РНК способа, обеспечивающего редактирование генома в клетках млекопитающих. Одна направляющая РНК (sgRNA) может быть создана для направления нуклеазы Cas9 в конкретное место генома, которое затем связывается комплексом gRNA/Cas9. gRNA может быть сконструирована для связывания с представляющим интерес целевым сайтом с использованием различных способов и инструментов. Например, способы создания gRNA для связывания с представляющей интерес целевой последовательностью ДНК описаны в Aach, et al. Flexible algorithm for identifying specific Cas9 targets in genomes. *BioRxiv*, Cold Spring Harbor Labs. doi: <http://dx.doi.org/10.1101/005074> (2014); Bae, et al. Cas-OFFinder: a fast and versatile algorithm that searches for potential off-target sites of Cas9 RNA-guided endonucleases. *Bioinformatics*. 30(10):1473–1475 (2014); Doench, J. G. et al. Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. *Nat Biotech* 34, 184–191 (2016); Gratz, et al. Highly specific and efficient CRISPR/Cas9-catalyzed homology-directed repair in *Drosophila*. *Genetics*. 196(4):961–971 (2014); Heigwer, et al. E-CRISP: fast CRISPR target site identification. *Nat Methods*. 11(2):122–123 (2014); Ma, et al. A guide RNA sequence design platform for the CRISPR/Cas9 system for model organism genomes. *Biomed Res Int*. doi:<http://doi.org/10.1155/2013/270805> (2013); Montague, et al. CHOPCHOP: a CRISPR/Cas9 and TALEN web tool for genome editing. *Nucleic Acids Res*. 42(W1):W401–W407 (2014); Liu, et al. CRISPR-ERA: a comprehensive design tool for CRISPR-mediated gene

editing, repression and activation. *Bioinformatics*. 31(22):3676–3678 (2015); Ran, et al. *In vivo* genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature*. 520(7546):186–191 (2015); Wu, et al. Target specificity of the CRISPR-Cas9 system. *Quant Biol*. 2(2):59–70 (2015); Xiao, et al. CasOT: a genome-wide Cas9/gRNA off-target searching tool. *Bioinformatics*. 30(8):1180–1182 (2014); Zetsche, et al. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System. *Cell*. 163(3):759–771 (2015). Кроме того, общедоступны различные веб-инструменты для создания gRNA для связывания с представляющей интерес целевой последовательностью ДНК, смотрите, например, инструмент разработки CRISPR gRNA, доступный от AUTM в Интернете по адресу atum.bio/eCommerce/cas9/input?multipleContacts=false; инструмент разработки CRISPRa/i gRNA, доступный от Broad Institute в Интернете по адресу portals.broadinstitute.org/gpp/public/analysis-tools/sgrna-design-crisprai; инструмент разработки E-CRISP, доступный в Немецком онкологическом исследовательском центре DKFZ, доступный в Интернете по адресу e-crisp.org/E-CRISP/; и инструмент Knockout Guide Design, доступный от Synthego в Интернете по адресу design.synthego.com/#/. Кроме того, доступны различные коммерчески доступные сервисы для создания gRNA для связывания с представляющей интерес целевой последовательностью ДНК, смотрите, например, коммерчески доступные услуги, предлагаемые IDT (в Интернете по адресу idtdna.com/site/order/designtool/index/CRISPR_SEQUENCE), ThermoFisher (в Интернете по адресу thermofisher.com/order/custom-oligo/crispr) и GenScript (в Интернете по адресу genscript.com/gRNA-design-tool.html).

[154] Согласно иллюстративным вариантам осуществления DBD, который представляет собой комплекс gRNA/Cas, содержит дезактивированный нуклеазой белок Cas или dCas, такой как, например, dCas9, такой как дезактивированный нуклеазой *Staphylococcus aureus* (dSaCas9) или дезактивированный нуклеазой *Streptococcus pyogenes* Cas9 (dSpCas9). gRNA представлена в виде последовательности, содержащей нацеливающую область, которая нацеливает комплекс gRNA/Cas на желаемый целевой сайт, и каркасную область, которая облегчает взаимодействие с белком Cas. Любой подходящий каркас gRNA может использоваться в связи с представленными в настоящем документе gRNA. Согласно иллюстративному варианту осуществления gRNA представляет собой одиночную gRNA или sgRNA и содержит следующую каркасную последовательность:

5'-

GTTTGTAGTACTCTGGAAACAGAATCTACTAAAACAAGGCAAAATGCCGTGTTTATCTCGTCAACTTGTTGGCGAGA-3' (SEQ ID NO: 183). Нацеливающая область направляющей РНК присоединяется к 5'-концу каркасной последовательности с образованием полной sgRNA. Согласно определенным вариантам осуществления gRNA и белок dCas могут

экспрессироваться из одной и той же кассеты экспрессии. Согласно определенным вариантам осуществления промотор U6 используется для экспрессии gRNA. Согласно другим вариантам осуществления gRNA может быть экспрессирована в клетке, которая была сконструирована для стабильной экспрессии белка dCas-TAD, например, либо путем стабильной интеграции dCas в геном, либо на плазмиде, которая стабильно поддерживается вне хромосом.

[155] Согласно другим вариантам осуществления представленный в настоящем документе eTF, который активирует SCN1A, может содержать DBD из TALEN, полученный из TALEN, или который представляет собой инактивированную нуклеазой TALEN. Подобные активатору транскрипции эффекторным нуклеазы (TALEN) представляют собой рестрикционные ферменты, которые содержат DBD и домен нуклеазы, которые могут быть сконструированы для разрезания определенных последовательностей ДНК. TALEN создаются путем конъюгирования эффекторного ДНК-связывающего домена TAL с доменом расщепления ДНК (например, нуклеазой). Эффекторы, подобные активатору транскрипции (TALE), могут быть сконструированы так, чтобы связываться с желаемой целевой последовательностью ДНК, тем самым направляя домен нуклеазы в определенное место.

[156] Эффекторы TAL представляют собой бактериальные белки из бактерий *Xanthomonas*. ДНК-связывающий домен содержит повторяющуюся высококонсервативную последовательность из 33–34 аминокислот с расходящимися 12-ой и 13-ой аминокислотами. Эти два положения, называемые Repeat Variable Di-residue (RVD), сильно изменчивы и показывают сильную корреляцию со специфическим распознаванием нуклеотидов. Эта прямая взаимосвязь между аминокислотной последовательностью и распознаванием ДНК позволяет конструировать DBD, которые специфически нацелены на желаемую последовательность, путем выбора комбинации повторяющихся сегментов, содержащих соответствующие RVD.

[157] Существуют разные способы разработки TALE. Например, способы разработки TALE для связывания с представляющей интерес целевой последовательностью ДНК описаны в T. Cermak et al., *Nucleic Acids Research*. **39** (12): e82 (2011); F. Zhang F et al., *Nature Biotechnology*. **29** (2): 149–53 (2011); R. Morbitzer et al., *Nucleic Acids Research*. **39** (13): 5790–9 (2011); T. Li et al., *Nucleic Acids Research*. **39** (14): 6315–25 (2011); R. Geissler et al., *PLOS One*. **6**(5): e19509 (2011) и E. Weber et al., *PLOS One*. **6** (5): e19722 (2011). Кроме того, общедоступны различные веб-инструменты для разработки TALE для связывания с представляющей интерес целевой последовательностью ДНК, смотрите, например, E-Talen, доступный в Интернете по адресу e-talen.org/E-TALEN/TAL и инструмент Effector

Nucleotide Targeter 2.0, доступный в Интернете по адресу tall-nt.cac.cornell.edu/node/add/single-tale. Кроме того, доступны различные коммерчески доступные сервисы для создания TALE для связывания с представляющей интерес целевой последовательностью ДНК, смотрите, например, коммерчески доступные услуги, предлагаемые OmicX (в Интернете по адресу omictools.com/), Addgene (в Интернете по адресу addgene.org/talen/guide/ или ThermoFisher (в Интернете: thermofisher.com/us/en/home/life-science/genome-editing/geneart-tals/tal-design-tool.html).

Кроме того, общедоступная программа (DNAWorks) может использоваться для создания олигонуклеотидов, подходящих для сборки TALE, смотрите, например, D. Hoover *D Methods in Molecular Biology*. **852**: 215–23 (2012).

Домены модуляции транскрипции

[158] Приведенные в настоящем документе eTF, которые активируют SCN1A, могут содержать любой подходящий домен, который способен рекрутировать один или несколько белковых факторов, которые могут модулировать транскрипцию (например, РНК-полимеразу II, CBP/p300, CREB или KRAB) или уровень экспрессии гена от представляющего интерес гена, когда eTF связан с целевым сайтом через DBD (например, DBD с «цинковыми пальцами», gRNA/Cas DBD или TALE DBD). Согласно определенным вариантам осуществления такой домен рекрутирует белковые факторы, которые увеличивают уровень транскрипции или экспрессии представляющего интерес гена, и представляет собой домен активации транскрипции (TAD). Согласно другим вариантам осуществления такой домен рекрутирует белковые факторы, которые снижают уровень транскрипции или экспрессии представляющего интерес гена, и представляет собой домен репрессора транскрипции (TRD). Согласно определенным вариантам осуществления домен модуляции транскрипции (TAD или TRD) может представлять собой синтетически сконструированный домен. Согласно другим вариантам осуществления домен модуляции транскрипции (TAD или TRD) может происходить из встречающегося в природе белка, например, фактора транскрипции, коактиватора транскрипции, корепрессора транскрипции или белка-сайленсера. Согласно различным вариантам осуществления домен модуляции транскрипции (TAD или TRD) может происходить из белка любого вида, например, мыши, крысы, обезьяны, вируса или человека.

[159] Согласно одному иллюстративному варианту осуществления TAD, подходящий для применения в представленных в настоящем документе eTF, которые активируют SNC1A, происходит из вирусного белка. Иллюстративные TAD, полученные из вирусных белков, включают в себя, например, TAD-домен VP64 (SEQ ID NO: 133), VPR (SEQ ID NO: 132), VP16, VP128, p65, p300 или любой его функциональный фрагмент или вариант, или

последовательность, характеризующуюся идентичностью, составляющей по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, по отношению к ней.

[160] Согласно другому иллюстративному варианту осуществления TAD, подходящий для применения в представленных в настоящем документе eTF, которые активируют SCN1A, происходит из белка человека. Иллюстративные TAD, полученные из белков человека, включают в себя, например, TAD-домен взаимодействующего с CBP/p300 транскриптора 2 (CITED2) (SEQ ID NO: 134), взаимодействующего с CBP/p300 транскриптора 4 (CITED4) (SEQ ID NO: 135), EGR1 (SEQ ID NO: 176), CREB3 (SEQ ID NO: 224) или EGR3 (SEQ ID NO: 175), или любой их функциональный фрагмент или вариант, или последовательность, характеризующуюся идентичностью, составляющей по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, по отношению к ней.

[161] Согласно определенным вариантам осуществления eTF, который активирует SCN1A, содержит DBD типа «цинковые пальцы», который конъюгирован с доменом активации транскрипции или TAD. Согласно различным вариантам осуществления DBD типа «цинковые пальцы» может быть конъюгирован с TAD из вирусного белка, такого как VP64 или VPR, или с TAD из человеческого белка, такого как CITED2, CITED4 или CREB3. Согласно определенным вариантам осуществления DBD типа «цинковые пальцы», полученный из человеческого белка, например, EGR1 или EGR3, конъюгирован с TAD, полученным из человеческого белка, например, CITED2, CITED4 или CREB3. Согласно определенным вариантам осуществления DBD типа «цинковые пальцы», полученный из человеческого белка, например, EGR1 или EGR3, конъюгирован с VP64 или VPR TAD. Согласно определенным вариантам осуществления синтетический DBD типа «цинковые пальцы» или DBD типа «цинковые пальцы», характеризующийся идентичностью последовательности, составляющей менее чем 75%, по отношению к человеческому белку, например, EGR1 или EGR3, конъюгирован с TAD, полученным из человеческого белка, например, CITED2, CITED4 или CREB3. Согласно определенным вариантам осуществления синтетический DBD типа «цинковые пальцы» или DBD типа «цинковые пальцы», характеризующийся идентичностью последовательности, составляющей менее чем 75%, по отношению к человеческому белку, например, EGR1 или EGR3, конъюгирован с VP64 или VPR TAD.

[162] Согласно определенным вариантам осуществления белок dCas конъюгирован с TAD. Согласно различным вариантам осуществления dCas9 может быть конъюгирован с TAD из вирусного белка, такого как VP64 или VPR, или с TAD из человеческого белка,

такого как CITED2, CITED4 или CREB3. Согласно иллюстративным вариантам осуществления dCas9 конъюгирован с VP64 или VPR TAD.

[163] Согласно определенным вариантам осуществления белок TALE конъюгирован с TAD. Согласно различным вариантам осуществления TALE может быть конъюгирован с TAD из вирусного белка, такого как VP64 или VPR, или с TAD из человеческого белка, такого как CITED2, CITED4 или CREB3. Согласно иллюстративным вариантам осуществления TALE конъюгирован с VP64 или VPR TAD.

eTF, которые активируют SCN1A и высоко гомологичны человеческим белкам

[164] Согласно определенным вариантам осуществления раскрытый в настоящем документе eTF, который активирует SCN1A, характеризуется высоким процентом идентичности по отношению к одному или нескольким белкам человека (как дополнительно описано ниже). Согласно определенным вариантам осуществления такие eTF характеризуются общей идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, по отношению к одному или нескольким белкам человека. Согласно определенным вариантам осуществления такие eTF проявляют пониженную иммуногенность по сравнению с eTF, имеющим более низкий общий процент идентичности последовательностей по отношению к одному или нескольким белкам человека. Согласно различным вариантам осуществления снижение иммуногенности можно измерить с использованием анализа elispot, иммуноанализа или способа *in silico*. Согласно определенным вариантам осуществления такие eTF могут содержать DBD, полученный из EGR1 или EGR3 человека, и TAD, полученный из EGR1, EGR3, CITED2, CITED4 или CREB3 человека. Такие eTF практически не обладают иммуногенностью при введении субъекту или обладают пониженной иммуногенностью по сравнению с eTF, характеризующимися более низким процентом идентичности по отношению к последовательностям белков человека.

[165] Согласно определенным вариантам осуществления представленный в настоящем документе eTF, который активирует SNC1A, характеризуется идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, по отношению к одному или нескольким белкам человека. Когда представленный в настоящем документе eTF, который активирует SCN1A, содержит DBD и TAD, происходящие из одного и того же белка, процент идентичности с человеческим белком может быть определен путем расчета общего количества аминокислотных остатков в eTF, которые соответствуют человеческому белку, из которого он был получен (например, EGR1

или EGR3), разделенного на общее количество аминокислотных остатков в eTF. Когда eTF, обеспечивающий активную регуляцию SCN1A, содержит DBD из одного человеческого белка и TAD, полученный из другого человеческого белка, процент идентичности с человеком может быть определен путем отдельного расчета процента идентичности с человеческим для каждого домена и суммирования этих двух показателей вместе, например, (i) вычисление общего количества аминокислотных остатков в DBD, которые соответствуют человеческому белку, из которого он был получен (например, EGR1 или EGR3), деленного на общее количество аминокислотных остатков в eTF; (ii) вычисление общего количества аминокислотных остатков в TAD, которые соответствуют человеческому белку, из которого он был получен (например, CITED2, CITED4 или CREB3), деленного на общее количество аминокислотных остатков в eTF; и (iii) суммирование суммы (i) и (ii). Согласно такому варианту осуществления домены делятся следующим образом: первый домен проходит от N-конца eTF до начала кодирующей последовательности для второго домена, а второй домен проходит от начала кодирующей последовательности для второго домена через C-конец eTF (например, для eTF, имеющего конфигурацию NLS-DBD-линкер-NLS-TAD, первый домен будет NLS-DBD-линкер, а второй домен будет NLS-TAD). Когда представленный в настоящем документе eTF, который активирует SNC1A, содержит DBD из одного человеческого белка и двух TAD, полученных из одного или нескольких различных человеческих белков, процент идентичности с человеком может быть определен путем отдельного расчета процента идентичности с человеческим для каждого домена и суммирования всех троих вместе, например, (i) вычисление общего количества аминокислотных остатков в DBD, которые соответствуют белку человека, из которого он был получен (например, EGR1 или EGR3), деленного на общее количество аминокислотных остатков в eTF; (ii) вычисление общего количества аминокислотных остатков в первом TAD, которые соответствуют человеческому белку, из которого он был получен (например, CITED2, CITED4 или CREB3), деленного на общее количество аминокислотных остатков в eTF; (iii) вычисление общего количества аминокислотных остатков во втором TAD, которые соответствуют человеческому белку, из которого он был получен (например, CITED2, CITED4 или CREB3), деленного на общее количество аминокислотных остатков в eTF; и (iv) суммирование суммы (i), (ii) и (iii). Согласно такому варианту осуществления домены делятся следующим образом: первый домен проходит от N-конца eTF до начала кодирующей последовательности для второго домена, второй домен проходит от начала кодирующей последовательности для второго домена через начало кодирующей последовательности для третьего домена, а третий домен проходит от начала кодирующей

последовательности для третьего домена через С-конец eTF (например, для eTF, имеющего конфигурацию NLS-TAD1-линкер-NLS-DBD-линкер-NLS-TAD2, первый домен будет NLS-TAD1-линкер, второй домен будет NLS-DBD-линкер, а третий домен будет NLS-TAD2). Процент идентичности по отношению к одному или нескольким человеческим белкам, как описано в этом разделе, может быть определен с использованием выходного процента идентичности, полученного с помощью стандартного инструмента BLAST для белков, доступного в NCBI (например, инструмента выравнивания набора blastp, используя алгоритм blastp (белок -> белок) с параметрами по умолчанию) доступен в Интернете на веб-сайте NCBI по адресу blast.ncbi.nlm.nih.gov/.

[166] Согласно определенным вариантам осуществления представленный в настоящем документе eTF, который активирует SCN1A, имеет преимущество в том, что вызывает слабый, минимальный или нулевой неблагоприятный иммунный ответ у человека из-за высокой степени идентичности последовательностей с природными белками человека. Согласно определенным вариантам осуществления представленный в настоящем документе eTF, который активирует SCN1A, вызывает пониженную иммуногенность, например, снижение иммуногенности по меньшей мере в 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 или более раз по сравнению с иммуногенностью, наблюдаемой с eTF, имеющим более низкий процент идентичности по отношению к одному или нескольким белкам человека, например, eTF, характеризующимся идентичностью последовательности, составляющей менее чем 50%, 55%, 65% или 70%, по отношению к одному или нескольким белкам человека. В некоторых случаях снижение иммуногенности можно измерить с помощью анализа elispot, иммуноанализа или способа *in silico*. Генная терапия, обладающая низкой или минимальной иммуногенностью, имеет несколько преимуществ, включая в себя улучшенную переносимость пациентом, уменьшенную дозу, необходимую для достижения терапевтического эффекта, пролонгированные терапевтические эффекты после одного введения, возможность вводить несколько раз или в нескольких дозах, если необходимо, устойчивую терапевтическую эффективность в течение более длительного периода времени на одно введение, повышенную безопасность и/или повышенную эффективность генной терапии.

[167] Согласно определенным вариантам осуществления представленные в настоящем документе eTF, которые активируют SCN1A и характеризуются высоким процентом идентичности последовательности по отношению к одному или нескольким белкам человека, включают в себя DBD и TAD, полученные из одного или нескольких встречающихся в природе белков человека. Согласно определенным вариантам осуществления такие eTF могут содержать DBD, полученный из любого встречающегося в

природе белка человека, содержащего DBD. Согласно иллюстративным вариантам осуществления, представленный в настоящем документе eTF, который активирует SCN1A и характеризуются высоким процентом идентичности последовательности по отношению к одному или нескольким белкам человека, включает в себя DBD, полученный из встречающегося в природе белка типа «цинковые пальцы», такого как, например, любая из конструкций 5-27, 36-41 или 44-53, перечисленные в **таблице 1**. Согласно определенным вариантам осуществления представленный в настоящем документе eTF, который активирует SCN1A и характеризуются высоким процентом идентичности последовательности по отношению к одному или нескольким белкам человека, включает в себя DBD, полученный из белка EGR человека, такого как EGR1, EGR2, EGR3 или EGR4. Согласно иллюстративным вариантам осуществления представленный в настоящем документе eTF, который активирует SCN1A и характеризуются высоким процентом идентичности последовательности по отношению к одному или нескольким белкам человека, включает в себя DBD, полученный из EGR1 или EGR3 человека. Согласно различным вариантам осуществления представленный в настоящем документе eTF, который активирует SCN1A и характеризуются высоким процентом идентичности последовательности по отношению к одному или нескольким белкам человека, включает в себя DBD, полученный из белка типа «цинковые пальцы» человека, в котором минимальные аминокислотные изменения (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 1-7, 2-3, 2-4, 2-5, 2-6, 2-7, 3-4, 3-5, 36 или 3-7 аминокислотных замен) были сделаны в одном или нескольких доменах типа «цинковые пальцы» DBD, чтобы изменить специфичность связывания DBD для распознавания представляющего интерес целевого сайта связывания. Такие модификации последовательности предпочтительно выполняются в спиральных распознавания доменов типа «цинковые пальцы» DBD, в то время как остальная часть DBD или белка типа «цинковые пальцы» человека (включая в себя TAD) остается немодифицированной, чтобы сохранить как можно больше идентичности последовательности с природным человеческим белком по возможности.

[168] Согласно определенным вариантам осуществления представленные в настоящем документе eTF, которые активируют SCN1A и характеризуются высоким процентом идентичности последовательности по отношению к одному или нескольким белкам человека, содержат один или несколько доменов модуляции транскрипции (например, TAD), полученных из человеческого белка, конъюгированного с DBD, полученным из белка человека. Согласно различным вариантам осуществления домен модуляции транскрипции может происходить из любого встречающегося в природе человеческого белка, имеющего домен, способный рекрутировать один или несколько белковых факторов,

которые могут модулировать транскрипцию (например, РНК-полимераза II, коактиваторный белок или ко-репрессорный белок) или уровень экспрессии гена из представляющего интерес гена, когда eTF связывается с целевым сайтом через DBD. Согласно иллюстративным вариантам осуществления TAD получен из белка EGR человека, такого как, например, EGR1, EGR2, EGR3 или EGR4 человека, или из указанного белка человека, такого как, например, белок CITED2 или CITED4 человека. Согласно иллюстративному варианту осуществления представленный в настоящем документе eTF, который активирует SCN1A и характеризуется высоким процентом идентичности последовательности по отношению к одному или нескольким белкам человека, включает в себя TAD из белка EGR1 или EGR3 человека. Согласно другому иллюстративному варианту осуществления представленный в настоящем документе eTF, который активирует SCN1A и характеризуется высоким процентом идентичности последовательности по отношению к одному или нескольким белкам человека, включает в себя TAD из белка CITED2 или CITED4 человека.

[169] Согласно одному варианту осуществления представленный в настоящем документе eTF, который активирует SCN1A и характеризуется высоким процентом идентичности последовательности по отношению к одному или нескольким белкам человека, может содержать DBD человека (hDBD) и TAD человека (hTAD) (например, hTAD-hDBD или hDBD-hTAD), причем hDBD и hTAD могут происходить из одного и того же человеческого белка или из разных человеческих белков. Согласно другому варианту осуществления представленный в настоящем документе eTF, характеризующийся высоким процентом идентичности последовательности по отношению к одному или нескольким белкам человека, может содержать hDBD и два hTAD, причем hDBD и hTAD происходят из одного и того же человеческого белка, hDBD происходит из первого человеческого белка и оба hTAD происходят из второго человеческого белка, hDBD и один hTAD происходят из первого человеческого белка, а второй hTAD происходит из второго человеческого белка, или hDBD происходит из первого человеческого белка, один hTAD происходит из второго человеческого белка, а второй hTAD происходит из третьего человеческого белка (например, hTAD1-hDBD-hTAD1, hTAD1-hDBD-hTAD2, hTAD1-hTAD1-hDBD, hTAD1-hTAD2-hDBD, hDBD-hTAD1-hTAD1 или hDBD-hTAD1-hTAD2).

[170] Согласно иллюстративным вариантам осуществления представленный в настоящем документе eTF, характеризующийся высоким процентом идентичности последовательности по отношению к одному или нескольким белкам человека, содержит любую из следующих конфигураций: (i) hDBD и hTAD, оба получены из EGR1 человека; (ii) hDBD и hTAD, оба получены из EGR3 человека; (iii) hDBD, полученный из EGR1

человека, и hTAD, полученный из CITED2 (например, hEGR1 DBD-hCITED2 TAD или hCITED2 TAD-hEGR1 DBD); (iv) hDBD, полученный из EGR1 человека, и hTAD, полученный из CITED4 человека (например, hEGR1 DBD-hCITED4 TAD или hCITED4 TAD-hEGR1 DBD); (v) hDBD, полученный из EGR3 человека, и hTAD, полученный из CITED2 (например, hEGR3 DBD-hCITED2 TAD или hCITED2 TAD-hEGR3 DBD); (vi) hDBD, полученный из EGR3 человека, и hTAD, полученный из CITED4 человека (например, hEGR3 DBD-hCITED4 TAD или hCITED4 TAD-hEGR3 DBD); (vii) hDBD, полученный из EGR1 человека, и два hTAD, полученные из CITED2 (например, hCITED2 TAD-hEGR1 DBD-hCITED2 TAD, hCITED2 TAD-hCITED2 TAD-hEGR1 DBD или hEGR1 DBD-hCITED2 TAD-hCITED2 TAD); (viii) hDBD, полученный из EGR1 человека, и два hTAD, полученные из CITED4 человека (например, hCITED4 TAD-hEGR1 DBD-hCITED4 TAD, hCITED4 TAD-hCITED4 TAD-hEGR1 DBD или hEGR1 DBD-hCITED4 TAD-hCITED4 TAD); (ix) hDBD, полученный из EGR3 человека, и два hTAD, полученные из CITED2 человека (например, hCITED2 TAD-hEGR3 DBD-hCITED2 TAD, hCITED2 TAD-hCITED2 TAD-hEGR3 DBD или hEGR3 DBD-hCITED2 TAD-hCITED2 TAD); (x) hDBD, полученный из EGR3 человека, и два hTAD, полученные из CITED4 человека (например, hCITED4 TAD-hEGR3 DBD-hCITED4 TAD, hCITED4 TAD-hCITED4 TAD-hEGR3 DBD или hEGR3 DBD-hCITED4 TAD-hCITED4 TAD); (xi) hDBD, полученный из EGR1 человека, первый hTAD, полученный из CITED2 человека, второй hTAD, полученный из CITED4 человека (например, hCITED2 TAD-hEGR1 DBD-hCITED4 TAD, hCITED4 TAD-hEGR1 DBD-hCITED2 TAD, hCITED2 TAD-hCITED4 TAD-hEGR1 DBD, hCITED4 TAD-hCITED2 TAD-hEGR1 DBD, hEGR1 DBD-hCITED4 TAD-hCITED2 TAD или hEGR1 DBD-hCITED2 TAD-hCITED4 TAD); или (xii) hDBD, полученный из EGR3 человека, первый hTAD, полученный из CITED2 человека, второй hTAD, полученный из CITED4 человека (например, hCITED2 TAD-hEGR3 DBD-hCITED4 TAD, hCITED4 TAD-hEGR3 DBD-hCITED2 TAD, hCITED2 TAD-hCITED4 TAD-hEGR3 DBD, hCITED4 TAD-hCITED2 TAD-hEGR3 DBD, hEGR3 DBD-hCITED4 TAD-hCITED2 TAD или hEGR3 DBD-hCITED2 TAD-hCITED4 TAD).

[171] Согласно определенным вариантам осуществления представленный в настоящем документе eTF, который активирует SCN1A и характеризуется высоким процентом идентичности последовательности по отношению к одному или нескольким белкам человека, содержит любое из следующего: (i) последовательность, содержащая любую из SEQ ID NO: 103-124, 128-131, 205, 207, 209, 213, 217, 219, 221 или 223; (ii) последовательность, содержащая любую из SEQ ID NO: 92-98; (iii) последовательность, характеризующаяся идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%,

по отношению к любой из последовательностей (i) или (ii); или (iv) функциональный фрагмент или вариант любой из последовательностей (i), (ii) или (iii). Согласно иллюстративным вариантам осуществления такие eTF способны повышать экспрессию SCN1A по меньшей мере в 2 раза, 5 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 25 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз или больше по сравнению с контролем, или по меньшей мере на 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 200%, 250%, 300% , 400% или 500% или больше по сравнению с контролем. Согласно иллюстративным вариантам осуществления такие eTF характеризуются общей идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% по отношению к одному или нескольким белкам человека. Согласно определенным вариантам осуществления такие eTF проявляют пониженную иммуногенность по сравнению с eTF, характеризующимся более низким общим процентом идентичности последовательностей по отношению к одному или нескольким белкам человека. Согласно различным вариантам осуществления снижение иммуногенности можно измерить с использованием анализа elispot, иммуноанализа или способа *in silico*.

[172] Согласно определенным вариантам осуществления представленный в настоящем документе eTF, который активирует SCN1A и характеризуется высоким процентом идентичности последовательности по отношению к одному или нескольким белкам человека, может дополнительно содержать одну или несколько аминокислотных последовательностей или доменов в дополнение к доменам DBD и TAD, например, сигнал ядерной локализации или линкер и т.д. Кроме того, полинуклеотид, кодирующий представленный в настоящем документе eTF, характеризующийся высоким процентом идентичности последовательности по отношению к одному или нескольким белкам человека, может дополнительно содержать одну или несколько последовательностей нуклеиновых кислот в дополнение к кодирующей последовательности для eTF, например, промотор, энхансер, полиА-хвост и т.д. Согласно таким вариантам осуществления одна или несколько дополнительных аминокислотных последовательностей и/или последовательностей нуклеиновых кислот предпочтительно представляют собой человеческие последовательности, происходящие из человеческих последовательностей, или характеризуются идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% по отношению к белку человека.

Иллюстративные eTF SCN1A

[173] Согласно определенным вариантам осуществления раскрытый в настоящем документе eTF, который активирует SCN1A, содержит ДНК-связывающий домен,

содержащий один или несколько доменов типа «цинковые пальцы», содержащих спираль распознавания, содержащую любую из SEQ ID NO: 152-167. Согласно определенным вариантам осуществления раскрытый в настоящем документе eTF, который активирует SCN1A, содержит ДНК-связывающий домен, содержащий по меньшей мере один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать или двенадцать доменов типа «цинковые пальцы», причем каждый домен типа «цинковые пальцы» независимо содержит спираль распознавания, содержащую любую из SEQ ID NO: 152-167. Согласно определенным вариантам осуществления раскрытый в настоящем документе eTF, который активирует SCN1A, содержит ДНК-связывающий домен, содержащий шесть доменов типа «цинковые пальцы», причем каждый домен типа «цинковые пальцы» независимо содержит спираль распознавания, содержащую любую из SEQ ID NO: 152-167. Согласно определенным вариантам осуществления раскрытый в настоящем документе eTF, который активирует SCN1A, содержит ДНК-связывающий домен, содержащий девять доменов типа «цинковые пальцы», причем каждый домен типа «цинковые пальцы» независимо содержит спираль распознавания, содержащую любую из SEQ ID NO: 152-167. Согласно иллюстративным вариантам осуществления такие eTF содержат ДНК-связывающий домен, содержащий SEQ ID NO: 147, где каждый X независимо выбран из любой из SEQ ID NO: 152-167, а n равно 6 или 9.

[174] Согласно определенным вариантам осуществления раскрытый в настоящем документе eTF, который активирует SCN1A, содержит ДНК-связывающий домен, содержащий любое из следующего: (i) последовательность, содержащая RSDNLVR x REDNLHT x RSDELVR x QSGNLTE x TSGHLVR x QNSTLTE (SEQ ID NO: 148), где x может представлять собой линкер из 1-50 аминокислот, (ii) последовательность, характеризующаяся идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, по отношению к SEQ ID NO : 148, или (ii) функциональный фрагмент из (i) или (ii). Согласно определенным вариантам осуществления такой eTF дополнительно содержит один или несколько TAD, выбранных из VP64, VPR, CITED2, CITED4 или CREB3. Согласно одному варианту осуществления такой eTF содержит домен TAD VPR, конъюгированный с С-концом DBD. Согласно определенным вариантам осуществления такой eTF содержит CITED2 TAD, конъюгированный с N-концом, С-концом или N-концом и С-концом DBD. Согласно определенным вариантам осуществления такой eTF содержит TAD CITED4, конъюгированный с N-концом, С-концом или N-концом и С-концом DBD. Согласно определенным вариантам осуществления такой eTF содержит два TAD CITED4, конъюгированных с N-концом или С-концом DBD. Согласно определенным вариантам

осуществления такой еTF способен связываться с целевым сайтом, содержащим SEQ ID NO: 18, и повышать экспрессию SCN1A по меньшей мере в 2 раза, 5 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 25 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз или более раз по сравнению с контролем, или по меньшей мере на 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 200%, 250%, 300%, 400% или 500% или более по сравнению с контролем.

[175] Согласно определенным вариантам осуществления раскрытый в настоящем документе еTF, который активирует SCN1A, содержит ДНК-связывающий домен, содержащий любое из следующего: (i) последовательность, содержащая RSDNLVR x HRTTLTN x REDNLHT x TSHSLTE x QSSSLVR x REDNLHT (SEQ ID NO: 149), где x может представлять собой линкер из 1-50 аминокислот, (ii) последовательность, характеризующаяся идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, по отношению к SEQ ID NO: 149, или (ii) функциональный фрагмент из (i) или (ii). Согласно определенным вариантам осуществления такой еTF дополнительно содержит один или несколько TAD, выбранных из VP64, VPR, CITED2, CITED4 или CREB3. Согласно одному варианту осуществления такой еTF содержит домен TAD VPR, конъюгированный с С-концом DBD. Согласно определенным вариантам осуществления такой еTF содержит CITED2 TAD, конъюгированный с N-концом, С-концом или N-концом и С-концом DBD. Согласно определенным вариантам осуществления такой еTF содержит TAD CITED4, конъюгированный с N-концом, С-концом или N-концом и С-концом DBD. Согласно определенным вариантам осуществления такой еTF содержит два TAD CITED4, конъюгированных с N-концом или С-концом DBD. Согласно определенным вариантам осуществления такой еTF способен связываться с целевым сайтом, содержащим SEQ ID NO: 30, и повышать экспрессию SCN1A по меньшей мере в 2 раза, 5 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 25 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз или более раз по сравнению с контролем, или по меньшей мере на 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 200%, 250%, 300%, 400% или 500% или более по сравнению с контролем.

[176] Согласно определенным вариантам осуществления раскрытый в настоящем документе еTF, который активирует SCN1A, содержит ДНК-связывающий домен, содержащий любое из следующего: (i) последовательность, содержащая RRDELNV x RSDHLTN x RSDDLVR x RSDNLVR x HRTTLTN x REDNLHT x TSHSLTE x QSSSLVR x REDNLHT (SEQ ID NO: 151), (ii) последовательность, характеризующаяся идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, по отношению к SEQ ID NO: 151, или (ii) функциональный фрагмент (i) или (ii). Согласно определенным вариантам осуществления такой еTF дополнительно содержит

один или несколько TAD, выбранных из VP64, VPR, CITED2, CITED4 или CREB3. Согласно одному варианту осуществления такой eTF содержит домен TAD VPR, конъюгированный с С-концом DBD. Согласно определенным вариантам осуществления такой eTF содержит CITED2 TAD, конъюгированный с N-концом, С-концом или N-концом и С-концом DBD. Согласно определенным вариантам осуществления такой eTF содержит TAD CITED4, конъюгированный с N-концом, С-концом или N-концом и С-концом DBD. Согласно определенным вариантам осуществления такой eTF содержит два TAD CITED4, конъюгированных с N-концом или С-концом DBD. Согласно определенным вариантам осуществления такой eTF способен связываться с целевым сайтом, содержащим SEQ ID NO: 32, и повышать экспрессию SCN1A по меньшей мере в 2 раза, 5 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 25 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз или более по сравнению с контролем, или по меньшей мере на 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 200%, 250%, 300%, 400% или 500% или более по сравнению с контролем.

[177] Согласно определенным вариантам осуществления раскрытый в настоящем документе eTF, который активирует SCN1A, содержит ДНК-связывающий домен, содержащий любое из следующего: (i) последовательность, содержащая DPGALVR x RSDNLVR x QSGDLRR x THLDLIR x TSGNLVR x RSDNLVR (SEQ ID NO: 150), (ii) последовательность, характеризующаяся идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 89%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, по отношению к SEQ ID NO: 150, или (ii) функциональный фрагмент (i) или (ii). Согласно определенным вариантам осуществления такой eTF дополнительно содержит один или несколько TAD, выбранных из VP64, VPR, CITED2, CITED4 или CREB3. Согласно одному варианту осуществления такой eTF содержит домен TAD VPR, конъюгированный с С-концом DBD. Согласно определенным вариантам осуществления такой eTF содержит CITED2 TAD, конъюгированный с N-концом, С-концом или N-концом и С-концом DBD. Согласно определенным вариантам осуществления такой eTF содержит TAD CITED4, конъюгированный с N-концом, С-концом или N-концом и С-концом DBD. Согласно определенным вариантам осуществления такой eTF содержит два TAD CITED4, конъюгированных с N-концом или С-концом DBD. Согласно определенным вариантам осуществления такой eTF способен связываться с целевым сайтом, содержащим SEQ ID NO: 31, и повышать экспрессию SCN1A по меньшей мере в 2 раза, 5 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 25 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз или более по сравнению с контролем, или по меньшей мере на 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 200%, 250%, 300%, 400% или 500% или более по сравнению с контролем.

[178] Согласно определенным вариантам осуществления раскрытый в настоящем документе eTF, который активирует SCN1A, содержит любое из следующего: (i) последовательность, содержащая любую из SEQ ID NO: 99-131, 205, 207, 209, 213, 217, 219, 221 или 223; (ii) последовательность, содержащая любую из SEQ ID NO: 77-98; (iii) последовательность, характеризующаяся идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, по отношению к любой из последовательностей (i) или (ii); или (iv) функциональный фрагмент или вариант любой из последовательностей (i), (ii) или (iii). Согласно иллюстративным вариантам осуществления такие eTF способны повышать экспрессию SCN1A по меньшей мере в 2 раза, 5 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 25 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз или более по сравнению с контролем или по меньшей мере на 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 200%, 250%, 300%, 400% или 500% или более по сравнению с контролем.

[179] Согласно определенным вариантам осуществления раскрытый в настоящем документе eTF, который активирует SCN1A, содержит любое из следующего: (i) последовательность, содержащая любую из SEQ ID NO: 99-102 или 125-127; (ii) последовательность, содержащая любую из SEQ ID NO: 77-91; (iii) последовательность, характеризующаяся идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, по отношению к любой из последовательностей (i) или (ii); или (iv) функциональный фрагмент или вариант любой из последовательностей (i), (ii) или (iii). Согласно иллюстративным вариантам осуществления такие eTF способны повышать экспрессию SCN1A по меньшей мере в 2 раза, 5 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 25 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз или более по сравнению с контролем, или по меньшей мере на 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 200%, 250%, 300%, 400% или 500% или более по сравнению с контролем.

[180] Согласно определенным вариантам осуществления раскрытый в настоящем документе eTF, который активирует SCN1A, содержит любое из следующего: (i) последовательность, содержащая любую из SEQ ID NO: 103-124, 128-131, 205, 207, 209, 213, 217, 219, 221 или 223; (ii) последовательность, содержащая любую из SEQ ID NO: 92-98; (iii) последовательность, характеризующаяся идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, по отношению к любой из последовательностей (i) или (ii); или (iv) функциональный фрагмент или вариант любой из последовательностей (i), (ii) или (iii). Согласно иллюстративным вариантам осуществления такие eTF способны повышать

экспрессию SCN1A по меньшей мере в 2 раза, 5 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 25 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз или более по сравнению с контролем, или по меньшей мере на 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 200%, 250%, 300%, 400% или 500% или более по сравнению с контролем. Согласно иллюстративным вариантам осуществления такие еTF характеризуются общей идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, по отношению к одному или нескольким белкам человека. Согласно определенным вариантам осуществления такие еTF проявляют пониженную иммуногенность по сравнению с еTF, характеризующимся более низким общим процентом идентичности последовательностей по отношению к одному или нескольким белкам человека. Согласно различным вариантам осуществления снижение иммуногенности можно измерить с использованием анализа elispot, иммуноанализа или способа *in silico*.

[181] Согласно определенным вариантам осуществления раскрытый в настоящем документе еTF, который активирует SCN1A, содержит любое из следующего: (i) последовательность, содержащая SEQ ID NO: 127; (ii) последовательность, характеризующаяся идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, по отношению к SEQ ID NO: 127; или (iii) функциональный фрагмент или вариант любой из последовательностей (i) или (ii). Согласно иллюстративным вариантам осуществления такие еTF содержат SEQ ID NO: 77 и связываются с целевым сайтом, содержащим SEQ ID NO: 18. Согласно иллюстративным вариантам осуществления такие еTF способны повышать экспрессию SCN1A по меньшей мере в 2 раза, 5 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 25 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз или более по сравнению с контролем, или по меньшей мере на 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 200%, 250%, 300%, 400% или 500% или более по сравнению с контролем.

[182] Согласно определенным вариантам осуществления раскрытый в настоящем документе еTF, который активирует SCN1A, содержит любое из следующего: (i) последовательность, содержащая SEQ ID NO: 128; (ii) последовательность, характеризующаяся идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% по отношению к SEQ ID NO: 128; или (iii) функциональный фрагмент или вариант любой из последовательностей (i) или (ii). Согласно иллюстративным вариантам осуществления такие еTF содержат SEQ ID NO: 92 и связываются с целевым сайтом, содержащим SEQ ID NO: 18. Согласно иллюстративным вариантам осуществления такие еTF способны повышать экспрессию SCN1A по меньшей мере в 2 раза, 5 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 25 раз,

30 раз, 40 раз, 50 раз или более по сравнению с контролем, или по меньшей мере на 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 200%, 250%, 300%, 400% или 500% или более по сравнению с контролем. Согласно иллюстративным вариантам осуществления такие eTF характеризуются общей идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, по отношению к одному или нескольким белкам человека. Согласно определенным вариантам осуществления такие eTF проявляют пониженную иммуногенность по сравнению с eTF, характеризующимся более низким общим процентом идентичности последовательностей по отношению к одному или нескольким белкам человека. Согласно различным вариантам осуществления снижение иммуногенности можно измерить с использованием анализа elispot, иммуноанализа или способа *in silico*.

[183] Согласно определенным вариантам осуществления раскрытый в настоящем документе eTF, который активирует SCN1A, содержит любое из следующего: (i) последовательность, содержащая SEQ ID NO: 129; (ii) последовательность, характеризующаяся идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, по отношению к SEQ ID NO: 129; или (iii) функциональный фрагмент или вариант любой из последовательностей (i) или (ii). Согласно иллюстративным вариантам осуществления такие eTF содержат SEQ ID NO: 92 и связываются с целевым сайтом, содержащим SEQ ID NO: 18. Согласно иллюстративным вариантам осуществления такие eTF способны повышать экспрессию SCN1A по меньшей мере в 2 раза, 5 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 25 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз или более по сравнению с контролем, или по меньшей мере на 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 200%, 250%, 300%, 400% или 500% или более по сравнению с контролем. Согласно иллюстративным вариантам осуществления такие eTF характеризуются общей идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, по отношению к одному или нескольким белкам человека. Согласно определенным вариантам осуществления такие eTF проявляют пониженную иммуногенность по сравнению с eTF, характеризующимся более низким общим процентом идентичности последовательностей по отношению к одному или нескольким белкам человека. Согласно различным вариантам осуществления снижение иммуногенности можно измерить с использованием анализа elispot, иммуноанализа или способа *in silico*.

[184] Согласно определенным вариантам осуществления раскрытый в настоящем документе eTF, который активирует SCN1A, содержит любое из следующего: (i) последовательность, содержащая SEQ ID NO: 130; (ii) последовательность, характеризующаяся идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, по отношению к SEQ ID NO: 130; или (iii) функциональный фрагмент или вариант любой из последовательностей (i) или (ii). Согласно иллюстративным вариантам осуществления такие eTF содержат SEQ ID NO: 92 и связываются с целевым сайтом, содержащим SEQ ID NO: 18. Согласно иллюстративным вариантам осуществления такие eTF способны повышать экспрессию SCN1A по меньшей мере в 2 раза, 5 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 25 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз или более по сравнению с контролем, или по меньшей мере на 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 200%, 250%, 300%, 400% или 500% или более по сравнению с контролем. Согласно иллюстративным вариантам осуществления такие eTF характеризуются общей идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, по отношению к одному или нескольким белкам человека. Согласно определенным вариантам осуществления такие eTF проявляют пониженную иммуногенность по сравнению с eTF, характеризующимся более низким общим процентом идентичности последовательностей по отношению к одному или нескольким белкам человека. Согласно различным вариантам осуществления снижение иммуногенности можно измерить с использованием анализа elispot, иммуноанализа или способа *in silico*.

[185] Согласно определенным вариантам осуществления раскрытый в настоящем документе eTF, который активирует SCN1A, содержит любое из следующего: (i) последовательность, содержащая SEQ ID NO: 131; (ii) последовательность, характеризующаяся идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, по отношению к SEQ ID NO: 131; или (iii) функциональный фрагмент или вариант любой из последовательностей (i) или (ii). Согласно иллюстративным вариантам осуществления такие eTF содержат SEQ ID NO: 92 и связываются с целевым сайтом, содержащим SEQ ID NO: 18. Согласно иллюстративным вариантам осуществления такие eTF способны повышать экспрессию SCN1A по меньшей мере в 2 раза, 5 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 25 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз или более по сравнению с контролем, или по меньшей мере на 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 200%, 250%, 300%, 400% или 500% или более по сравнению с контролем. Согласно иллюстративным вариантам

осуществления такие eTF характеризуются общей идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, по отношению к одному или нескольким белкам человека. Согласно определенным вариантам осуществления такие eTF проявляют пониженную иммуногенность по сравнению с eTF, характеризующимся более низким общим процентом идентичности последовательностей по отношению к одному или нескольким белкам человека. Согласно различным вариантам осуществления снижение иммуногенности можно измерить с использованием анализа elispot, иммуноанализа или способа *in silico*.

[186] Согласно определенным вариантам осуществления раскрытый в настоящем документе eTF, который активирует SCN1A, содержит DBD, содержащий комплекс gRNA/Cas, причем gRNA содержит нацеливающую последовательность, содержащую любую из SEQ ID NO: 35-66. Целевая последовательность gRNA прикреплена к 5'-концу последовательности каркаса, содержащей последовательность: 5'-GTTTTAGTACTCTGGAAACAGAATCTACTAAAACAAGGCAAAATGCCGTGTTTATCTCGTCAACTTGTTGGCGAGA-3' (SEQ ID NO: 183). Согласно иллюстративным вариантам осуществления белок Cas представляет собой дезактивированный нуклеазой белок Cas9. Согласно определенным вариантам осуществления такой eTF дополнительно содержит один или несколько TAD, конъюгированных с белком Cas, причем TAD выбран из VP64, VPR, CITED2, CITED4 или CREB3. Согласно одному варианту осуществления такой eTF содержит домен VPR TAD, конъюгированный с С-концом белка Cas. Согласно определенным вариантам осуществления такой eTF содержит CITED2 TAD, конъюгированный с N-концом, С-концом или N-концом и С-концом белка Cas. Согласно определенным вариантам осуществления такой eTF содержит TAD CITED4, конъюгированный с N-концом, С-концом или N-концом и С-концом белка Cas. Согласно иллюстративным вариантам осуществления такие eTF способны повышать экспрессию SCN1A по меньшей мере в 2 раза, 5 раз, 10 раз, 15 раз, 20 раз, 25 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз или больше по сравнению с контролем.

Полинуклеотиды

[187] Согласно другому аспекту в настоящей заявке представлены полинуклеотиды, кодирующие любой из eTF, которые активируют SCN1A, раскрытые в настоящем документе. Согласно другому аспекту в настоящей заявке представлены полинуклеотиды, содержащие селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК. Согласно определенным вариантам осуществления в настоящей заявке представлены полинуклеотиды, содержащие селективный в отношении PV регуляторный элемент,

функционально связанный с трансеном, и селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК. Согласно определенным вариантам осуществления в настоящей заявке представлены полинуклеотиды, содержащие последовательность, кодирующую eTF, которая активирует SCN1A, как раскрыто в настоящем документе, и селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК. Согласно определенным вариантам осуществления в настоящей заявке представлен селективный в отношении PV регуляторный элемент, функционально связанный с трансеном, кодирующим eTF, который активирует SCN1A, и селективный в отношении PV регуляторный элемент.

Полинуклеотиды, кодирующие eTF, которые активируют SCN1A

[188] Согласно определенным вариантам осуществления в настоящей заявке представлен полинуклеотид, содержащий любое из следующего: (i) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая eTF, который активирует SCN1A, содержащий любую из SEQ ID NO: 77-131, 205, 207, 209, 213, 217, 219, 221 или 223, или их вариант или функциональный фрагмент; (ii) нуклеиновая кислота, кодирующая функциональный фрагмент eTF, который активирует SCN1A, содержащий любую из SEQ ID NO: 77-131, 205, 207, 209, 213, 217, 219, 221 или 223; или (iii) нуклеиновая кислота, кодирующая eTF, который активирует SCN1A, характеризующийся идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более, по отношению к eTF, который активирует SCN1A, содержащий любую из SEQ ID NO: 77-131, 205, 207, 209, 213, 217, 219, 221 или 223, или их вариант или функциональный фрагмент.

[189] Согласно определенным вариантам осуществления в настоящей заявке представлен полинуклеотид, содержащий любое из следующего: (i) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая DBD, содержащий любую из SEQ ID NO: 92-98, или ее вариант или функциональный фрагмент; (ii) нуклеиновая кислота, кодирующая функциональный фрагмент DBD, содержащий любую из SEQ ID NO: 92-98; или (iii) нуклеиновая кислота, кодирующая DBD, характеризующийся идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более, по отношению к DBD, содержащему любую из SEQ ID NO: 92-98, или ее вариант или функциональный фрагмент, причем DBD способен связываться с целевым сайтом, связанным любой из SEQ ID NO: 92-98.

[190] Согласно определенным вариантам осуществления в настоящей заявке представлен полинуклеотид, кодирующий eTF, который активирует эндогенный SCN1A, причем полинуклеотид содержит любое из следующего: (i) последовательность

нуклеиновой кислоты, кодирующая eTF, содержащий любую из SEQ ID NO: 103-124, 128-131, 205, 207, 209, 213, 217, 219, 221 или 223; (ii) нуклеиновая кислота, кодирующая функциональный фрагмент eTF, содержащий любую из SEQ ID NO: 103-124, 128-131, 205, 207, 209, 213, 217, 219, 221 или 223; или (iii) нуклеиновая кислота, кодирующая eTF, характеризующаяся идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94 %, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более, по отношению к eTF, содержащему любую из SEQ ID NO: 103-124, 128-131, 205, 207, 209, 213, 217, 219, 221 или 223, причем eTF способен активировать SCN1A.

[191] Согласно определенным вариантам осуществления в настоящей заявке представлен полинуклеотид, кодирующий DBD, который связывается с целевым сайтом генома, способным повышать регуляцию эндогенного SCN1A при связывании с помощью раскрытого в настоящем документе eTF, причем полинуклеотид содержит любой из следующих элементов: (i) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая DBD, содержащий любую из SEQ ID NO: 77-98; (ii) нуклеиновая кислота, кодирующая функциональный фрагмент DBD, содержащий любую из SEQ ID NO: 77-98; или (iii) нуклеиновая кислота, кодирующая eTF, характеризующийся идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более, по отношению к DBD, содержащему любую из SEQ ID NO: 77-98, причем DBD способен связываться с целевым сайтом, связанным любой из SEQ ID NO: 77-98.

[192] Согласно определенным вариантам осуществления в настоящей заявке представлен полинуклеотид, кодирующий DBD, который связывается с целевым сайтом генома, способным активировать эндогенный SCN1A при связывании раскрытым в настоящем документе eTF, причем полинуклеотид содержит любой из следующих элементов: (i) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая DBD, содержащий любую из SEQ ID NO: 148-151; (ii) нуклеиновая кислота, кодирующая функциональный фрагмент DBD, содержащий любую из SEQ ID NO: 148-151; или (iii) нуклеиновая кислота, кодирующая eTF, характеризующийся идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более, по отношению к DBD, содержащему любую из SEQ ID NO: 148-151, причем DBD способен связываться с целевым сайтом, связанным любой из SEQ ID NO: 92-98.

[193] Согласно определенным вариантам осуществления в настоящей заявке представлен полинуклеотид, кодирующий eTF, способный регулировать эндогенный SCN1A, причем полинуклеотид содержит любое из следующего: (i) последовательность

нуклеиновой кислоты, содержащая любую из SEQ ID NO: 70-76 или 184; (ii) нуклеиновая кислота, содержащая функциональный фрагмент любой из последовательностей (i); или (iii) нуклеиновая кислота, характеризующаяся идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более, по отношению к любой из последовательностей (i) или (ii), причем полинуклеотид кодирует eTF, который способен активировать SCN1A.

[194] Согласно определенным вариантам осуществления в настоящей заявке представлен полинуклеотид, кодирующий eTF, способный регулировать эндогенный SCN1A, причем полинуклеотид содержит любое из следующего: (i) последовательность нуклеиновой кислоты, содержащая SEQ ID NO: 70; (ii) нуклеиновая кислота, содержащая функциональный фрагмент SEQ ID NO: 70; или (iii) нуклеиновая кислота, характеризующаяся идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95 %, 96%, 97%, 98%, 99% или более, по отношению к любой из последовательностей (i) или (ii). Согласно иллюстративным вариантам осуществления такие полинуклеотиды кодируют eTF, содержащий SEQ ID NO: 127, или его функциональный фрагмент или вариант, который способен активировать SCN1A.

[195] Согласно определенным вариантам осуществления в настоящей заявке представлен полинуклеотид, кодирующий eTF, способный регулировать эндогенный SCN1A, причем полинуклеотид содержит любое из следующего: (i) последовательность нуклеиновой кислоты, содержащая SEQ ID NO: 71; (ii) нуклеиновая кислота, содержащая функциональный фрагмент SEQ ID NO: 71; или (iii) нуклеиновая кислота, характеризующаяся идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95 %, 96%, 97%, 98%, 99% или более, по отношению к любой из последовательностей (i) или (ii). Согласно иллюстративным вариантам осуществления такие полинуклеотиды кодируют eTF, содержащий SEQ ID NO: 127, или его функциональный фрагмент или вариант, который способен активировать SCN1A.

[196] Согласно определенным вариантам осуществления в настоящей заявке представлен полинуклеотид, кодирующий eTF, способный регулировать эндогенный SCN1A, причем полинуклеотид содержит любое из следующего: (i) последовательность нуклеиновой кислоты, содержащая SEQ ID NO: 72; (ii) нуклеиновая кислота, содержащая функциональный фрагмент SEQ ID NO: 72; или (iii) нуклеиновая кислота, характеризующаяся идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере

70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более, по отношению к любой из последовательностей (i) или (ii). Согласно иллюстративным вариантам осуществления такие полинуклеотиды кодируют eTF, содержащий SEQ ID NO: 130, или его функциональный фрагмент или вариант, который способен активировать SCN1A.

[197] Согласно определенным вариантам осуществления в настоящей заявке представлен полинуклеотид, кодирующий eTF, способный регулировать эндогенный SCN1A, причем полинуклеотид содержит любое из следующего: (i) последовательность нуклеиновой кислоты, содержащая SEQ ID NO: 73; (ii) последовательность нуклеиновой кислоты, содержащая функциональный фрагмент SEQ ID NO: 73; или (iii) нуклеиновая кислота, характеризующаяся идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более, по отношению к любой из последовательностей (i) или (ii). Согласно иллюстративным вариантам осуществления такие полинуклеотиды кодируют eTF, содержащий SEQ ID NO: 131, или его функциональный фрагмент или вариант, который способен активировать SCN1A.

[198] Согласно определенным вариантам осуществления в настоящей заявке представлен полинуклеотид, кодирующий eTF, способный регулировать эндогенный SCN1A, причем полинуклеотид содержит любое из следующего: (i) последовательность нуклеиновой кислоты, содержащая SEQ ID NO: 74; (ii) последовательность нуклеиновой кислоты, содержащая функциональный фрагмент SEQ ID NO: 74; или (iii) нуклеиновая кислота, характеризующаяся идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более, по отношению к любой из последовательностей (i) или (ii). Согласно иллюстративным вариантам осуществления такие полинуклеотиды кодируют eTF, содержащий SEQ ID NO: 127, или его функциональный фрагмент или вариант, который способен активировать SCN1A.

[199] Согласно определенным вариантам осуществления в настоящей заявке представлен полинуклеотид, кодирующий eTF, способный регулировать эндогенный SCN1A, причем полинуклеотид содержит любое из следующего: (i) последовательность нуклеиновой кислоты, содержащая SEQ ID NO: 75; (ii) последовательность нуклеиновой кислоты, содержащая функциональный фрагмент SEQ ID NO: 75; или (iii) нуклеиновая кислота, характеризующаяся идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более, по отношению к любой из последовательностей (i) или (ii).

Согласно иллюстративным вариантам осуществления такие полинуклеотиды кодируют eTF, содержащий SEQ ID NO: 127, или его функциональный фрагмент или вариант, который способен активировать SCN1A.

[200] Согласно определенным вариантам осуществления в настоящей заявке представлен полинуклеотид, кодирующий eTF, способный регулировать эндогенный SCN1A, причем полинуклеотид содержит любое из следующего: (i) последовательность нуклеиновой кислоты, содержащая SEQ ID NO: 76; (ii) последовательность нуклеиновой кислоты, содержащая функциональный фрагмент SEQ ID NO: 76; или (iii) нуклеиновая кислота, характеризующаяся идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более, по отношению к любой из последовательностей (i) или (ii). Согласно иллюстративным вариантам осуществления такие полинуклеотиды кодируют eTF, содержащий SEQ ID NO: 106, или его функциональный фрагмент или вариант, который способен активировать SCN1A.

[201] Согласно определенным вариантам осуществления в настоящей заявке представлен полинуклеотид, кодирующий eTF, способный регулировать эндогенный SCN1A, причем полинуклеотид содержит любое из следующего: (i) последовательность нуклеиновой кислоты, содержащая SEQ ID NO: 184; (ii) последовательность нуклеиновой кислоты, содержащая функциональный фрагмент SEQ ID NO: 184; или (iii) нуклеиновая кислота, характеризующаяся идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более, по отношению к любой из последовательностей (i) или (ii). Согласно иллюстративным вариантам осуществления такие полинуклеотиды кодируют eTF, содержащий SEQ ID NO: 106, или его функциональный фрагмент или вариант, который способен активировать SCN1A.

Полинуклеотиды, содержащие сайты связывания микроРНК для селективной экспрессии в PV-содержащих нейронах.

[202] Согласно другому аспекту в настоящей заявке представлены полинуклеотиды, содержащие сайты связывания микроРНК, которые приводят к селективной экспрессии представляющего интерес гена в парвальбумин-содержащих нейронах (PV). МикроРНК или миРНК представляют собой небольшие не кодирующие РНК (~20 нуклеотидов), которые регулируют экспрессию генов посттранскрипционно путем гибридизации с комплементарными сайтами узнавания в молекуле мРНК и приводят к ингибированию экспрессии генов, способствуя деградации транскрипта мРНК или подавляя трансляцию белка, кодируемого мРНК. Предусмотренные в настоящем документе сайты связывания

микроРНК ингибируют экспрессию представляющего интерес гена в возбуждающих нейронах, тем самым способствуя селективной экспрессии представляющего интерес гена в PV-содержащих нейронах (например, селективные к PV сайты связывания микроРНК). Согласно определенным вариантам осуществления возбуждающие нейроны представляют собой нейроны, которые экспрессируют один или несколько из STAC, Slc17a7, Car12, Syt17, ITPKA, Col6a1, CamKII, Sv2b, INHBA и/или DKK3. Согласно иллюстративному варианту осуществления возбуждающие нейроны представляют собой нейроны, экспрессирующие CamKII.

[203] Согласно определенным вариантам осуществления в настоящей заявке представлены полинуклеотиды, содержащие один или несколько сайтов связывания микроРНК для одной или нескольких микроРНК, которые способствуют селективной экспрессии PV, например, способствуют деградации мРНК, содержащей сайт связывания микроРНК, в возбуждающих нейронах. Примеры микроРНК, которые способствуют селективной экспрессии PV, включают в себя, например, miR-128, miR-221 и miR-222. Согласно определенным вариантам осуществления в настоящей заявке представлены полинуклеотиды, содержащие по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более селективных в отношении PV сайтов связывания микроРНК. Согласно одному варианту осуществления в настоящей заявке представлены полинуклеотиды, содержащие по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более сайтов связывания miR-128 (SEQ ID NO: 9). Согласно одному варианту осуществления в настоящей заявке представлены полинуклеотиды, содержащие по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более сайтов связывания miR-221 (SEQ ID NO: 11). Согласно одному варианту осуществления в настоящей заявке представлены полинуклеотиды, содержащие по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более сайтов связывания miR-222 (SEQ ID NO: 13). Согласно одному варианту осуществления в настоящей заявке представлены полинуклеотиды, содержащие по меньшей мере 1 сайт связывания miR-128, по меньшей мере один сайт связывания miR-221 и по меньшей мере один сайт связывания miR-222. Согласно одному варианту осуществления в настоящей заявке представлены полинуклеотиды, содержащие по меньшей мере один сайт связывания miR-128 и по меньшей мере один сайт связывания miR-222. Согласно одному варианту осуществления в настоящей заявке представлены полинуклеотиды, содержащие по меньшей мере один сайт связывания miR-221 и по меньшей мере один сайт связывания miR-222. Согласно иллюстративному варианту осуществления в настоящей заявке представлены полинуклеотиды, содержащие по меньшей мере один сайт связывания miR-128 (SEQ ID NO: 9) и по меньшей мере один сайт связывания miR-221 (SEQ ID NO: 11). Согласно одному варианту осуществления в

настоящей заявке представлены полинуклеотиды, содержащие по меньшей мере 2 сайта связывания miR-128 (SEQ ID NO: 9) и по меньшей мере 2 сайта связывания miR-221 (SEQ ID NO: 11). Согласно одному варианту осуществления в настоящей заявке представлены полинуклеотиды, содержащие по меньшей мере 3 сайта связывания miR-128 (SEQ ID NO: 9) и по меньшей мере 3 сайта связывания miR-221 (SEQ ID NO: 11). Согласно одному варианту осуществления в настоящей заявке представлены полинуклеотиды, содержащие по меньшей мере 4 сайта связывания miR-128 (SEQ ID NO: 9) и по меньшей мере 4 сайта связывания miR-221 (SEQ ID NO: 11). Согласно одному варианту осуществления в настоящей заявке представлены полинуклеотиды, содержащие по меньшей мере 5 сайтов связывания miR-128 (SEQ ID NO: 9) и по меньшей мере 5 сайтов связывания miR-221 (SEQ ID NO: 11). Согласно таким вариантам осуществления сайты связывания могут быть расположены в любом порядке. Например, для конструкции, содержащей 2 сайта связывания miR-128 и 2 сайта связывания miR-221, сайты связывания могут быть расположены в любой из следующих конфигураций: miR-128 – miR-128 – miR-221 – miR221, miR-128 – miR-221 – miR-128 – miR-221, miR-128 – miR221 – miR221 – miR-128, miR-221 – miR128 – miR221 – miR128, miR-221 – miR128 – miR128 – miR221 или miR221 – miR221- miR128 – miR128. Согласно иллюстративному варианту осуществления представленные в настоящем документе полинуклеотиды содержат последовательность, содержащую 4 сайта связывания miR-128 (SEQ ID NO: 9), за которыми следуют четыре сайта связывания miR-221 (SEQ ID NO: 11), например, miR-128 – miR-128 – miR128 – miR-128 – miR221 – miR221 – miR-221 – miR221. Согласно другому иллюстративному варианту осуществления представленные в настоящем документе полинуклеотиды содержат последовательность, содержащую 1 последовательность miR-221 (SEQ ID NO: 11), 1 последовательность miR-222 (SEQ ID NO: 13) и 1 сайт связывания miR-128 (SEQ ID NO: 9), например, miR-221 – miR222 – miR128. Согласно другому иллюстративному варианту осуществления представленные в настоящем документе полинуклеотиды содержат последовательность, содержащую 2 последовательности miR-221 (SEQ ID NO: 11), 2 последовательности miR-222 (SEQ ID NO: 13) и 2 сайта связывания miR-128 (SEQ ID NO: 9) расположены в следующем порядке: miR-221 – miR222 – miR128 - miR-221 – miR222 – miR128.

[204] В полинуклеотидах, содержащих более одного сайта связывания микроРНК, сайты связывания могут быть непосредственно примыкающими друг к другу в полинуклеотидной последовательности (например, без линкера или промежуточной последовательности между сайтами связывания) или могут быть отделены друг от друга по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более

нуклеотидами или 1-20, 1-15, 1-10, 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3 или 1-2 нуклеотидами. Согласно иллюстративным вариантам осуществления сайты связывания микроРНК разделены приблизительно 5 нуклеотидами или 5 нуклеотидами. Согласно иллюстративным вариантам осуществления последовательности, разделяющие сайты связывания микроРНК (а также соединения, образованные между сайтами связывания микроРНК, или соединения, образованные между сайтами связывания микроРНК и последовательностями, разделяющими сайты связывания микроРНК), не комплементарны никаким другим микроРНК или любым другим нейрональным микроРНК.

[205] Согласно определенным вариантам осуществления представленные в настоящем документе полинуклеотиды содержат сайт связывания микроРНК, характеризующийся идентичностью, составляющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%, по отношению к SEQ ID NO: 7. Согласно иллюстративному варианту осуществления представленные в настоящем документе полинуклеотиды содержат сайт связывания микроРНК, содержащий SEQ ID NO: 7.

[206] Согласно определенным вариантам осуществления представленные в настоящем документе полинуклеотиды содержат сайт связывания микроРНК, характеризующийся идентичностью, составляющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%, по отношению к SEQ ID NO: 14. Согласно иллюстративному варианту осуществления представленные в настоящем документе полинуклеотиды содержат сайт связывания микроРНК, содержащий SEQ ID NO: 14.

[207] Согласно определенным вариантам осуществления представленные в настоящем документе полинуклеотиды содержат сайт связывания микроРНК, характеризующийся идентичностью, составляющей по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%, по отношению к SEQ ID NO: 15. Согласно иллюстративному варианту осуществления представленные в настоящем документе полинуклеотиды содержат сайт связывания микроРНК, содержащий SEQ ID NO: 15.

[208] Согласно определенным вариантам осуществления указанные в настоящем документе сайты связывания микроРНК расположены в 3'-нетранслируемой области транскрипта мРНК, например, после кодона терминации трансляции (т.е. TAA, TGA или TAG) и перед полиА-хвостом. Сайт связывания микроРНК может быть расположен непосредственно рядом с кодоном терминации трансляции или может быть отделен от кодона терминации трансляции по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более нуклеотидами или 1-20, 1-15, 1-10, 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3 или 1-2 нуклеотидами, и/или может быть расположен рядом с полиА-хвостом или может быть отделен от полиА-хвоста по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15,

16, 17, 18, 19, 20 или более нуклеотидами или 1-20, 1-15, 1-10, 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3 или 1-2 нуклеотидами.

[209] Согласно определенным вариантам осуществления представленный в настоящем документе сайт связывания микроРНК приводит к селективной экспрессии гена в PV-содержащей клетке по сравнению с нецелевыми типами клеток. В некоторых случаях нецелевые типы клеток включают в себя, без ограничения, возбуждающие нейроны, не содержащие PV типы клеток ЦНС и ненейрональные типы клеток ЦНС. Согласно определенным вариантам осуществления селективные в отношении PV сайты связывания микроРНК приводят к селективной экспрессии генов в PV-содержащих нейронах по меньшей мере для одного, двух, трех, четырех, пяти или более не-PV типов клеток ЦНС. В некоторых случаях не-PV клетка ЦНС представляет собой возбуждающий нейрон, дофаминергический нейрон, астроцит, микроглию, мотонейрон, сосудистую клетку или не-ГАМКергический нейрон (например, клетку, которая не экспрессирует один или более GAD2, GAD1, NKX2.1, DLX1, DLX5, SST и VIP), не-PV нейрон (например, ГАМКергический нейрон, который не экспрессирует парвальбумин) или другие клетки ЦНС (например, типы клеток ЦНС, которые никогда не экспрессируют любой из PV, GAD2, GAD1, NKX2.1, DLX1, DLX5, SST и VIP). Согласно иллюстративному варианту осуществления представленный в настоящем документе селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК приводит к повышенной селективности экспрессии генов в PV-содержащих нейронах по сравнению с возбуждающими нейронами (например, нейронами, которые экспрессируют один или несколько из STAC, Slc17a7, Car12, Syt17, ITPKA, Col6a1, CamKII, Sv2b, INHBA и/или DKK3) за счет уменьшения экспрессии в возбуждающих нейронах. В некоторых случаях типы клеток различают по разным клеточным маркерам, морфологии, фенотипу, генотипу, функции и/или любым другим средствам классификации типов клеток.

[210] Селективность экспрессии, управляемая селективным в отношении PV сайтом связывания микроРНК, может быть измерена несколькими способами. Согласно одному варианту осуществления селективность экспрессии гена в PV-клетке по сравнению с не содержащими PV клетками может быть измерена путем сравнения количества PV-клеток, которые экспрессируют обнаруживаемый уровень транскрипта из гена, который содержит селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК, с общим количеством клеток, которые экспрессируют ген (например, отношение PV-содержащих к общему количеству клеток (PV + не-PV клеток), экспрессирующих ген). Например, селективность в отношении PV-содержащих нейронов может быть определена с использованием анализа колокализации на основе иммуногистохимии с использованием кассеты экспрессии,

содержащей ген, кодирующий флуоресцентный белок (например, eGFP), и селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК для измерения экспрессии гена и антитела, которое идентифицирует PV-содержащие клетки (например, антитело к PV, которое специфически взаимодействует с PV-содержащими нейронами), связанное со второй флуоресцентной меткой (например, красным флуоресцентным белком). Селективность экспрессии в PV-содержащих клетках можно рассчитать путем деления количества клеток, которые экспрессируют как PV, так и eGFP (например, PV-содержащие клетки), на общее количество клеток, экспрессирующих eGFP (например, PV-содержащие клетки и не содержащие PV клетки), и умножения на 100, чтобы преобразовать в проценты. В другом примере селективность в отношении PV-содержащих нейронов может быть определена с использованием анализа колокализации на основе иммуногистохимии с использованием кассеты экспрессии, содержащей ген, кодирующий флуоресцентный белок (например, eGFP), и селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК для измерения экспрессии гена, и первое антитело, которое идентифицирует PV-содержащие клетки (например, антитело к PV, которое специфически взаимодействует с PV-содержащими нейронами), связанное со второй флуоресцентной меткой (например, красным флуоресцентным белком) и вторым антителом, которое идентифицирует возбуждающие клетки (например, антитело к CamKII, которое специфически взаимодействует с возбуждающими нейронами). Селективность экспрессии в PV-содержащих клетках можно рассчитать путем деления количества клеток, экспрессирующих как PV, так и eGFP (например, PV-клетки), на количество клеток, экспрессирующих eGFP + PV и eGFP + CamKII (например, PV-содержащие клетки и возбуждающие клетки), и умножения на 100 для преобразования в процент. Чем выше процент PV-содержащих клеток, экспрессирующих трансген, тем более селективным является сайт связывания микроРНК в отношении PV-содержащих клеток. Согласно определенным вариантам осуществления представленный в настоящем документе селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК может быть высокоселективным для экспрессии в PV-содержащих клетках. Например, представленный в настоящем документе селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК может характеризоваться селективностью, составляющей приблизительно 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более чем приблизительно 99%, для PV-содержащих нейронов (например, PV-содержащие нейроны/все клетки $\times$ 100 или PV-содержащие нейроны/PV + возбуждающие нейроны $\times$ 100).

[211] В некоторых случаях представленный в настоящем документе селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК является коротким. В некоторых случаях размер

селективного в отношении PV сайта связывания микроРНК совместим с клонирующей способностью вектора, например, вирусного вектора или gAAV, так что комбинированный размер трансгена, промотора (и необязательного энхансера) и сайта связывания микроРНК не превышает клонирующую способность вектора. В некоторых случаях селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК составляет в длину до приблизительно 500 п.н., 400 п.н., 300 п.н., 250 п.н., 225 п.н., 215 п.н., 210 п.н., 200 п.н., 150 п.н., 140 п.н., 135 п.н., 130 п.н., 125 п.н., 120 п.н., 115 п.н., 110 п.н., 100 п.н., 90 п.н., 80 п.н., 75 п.н., 70 п.н., 65 п.н., 60 п.н. или 50 п.н.. В некоторых случаях селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК составляет приблизительно 50-500 п.н., 50-400 п.н., 50-300 п.н., 50-250 п.н., 50-200 п.н., 50-100 п.н., 50-75 п.н., 50-70 п.н., 100-500 п.н., 100-400 п.н., 100-300 п.н., 100-250 п.н., 100-200 п.н., 100-150 п.н., 100-140 п.н., 100-135 п.н., 200-500 п.н., 200-400 п.н., 200-300 п.н. или 200-250 п.н..

[212] Согласно иллюстративным вариантам осуществления представленный в настоящем документе полинуклеотид, который содержит один или несколько селективных в отношении PV сайтов связывания микроРНК не содержит SEQ ID NO: 67.

Кассеты экспрессии

[213] Согласно другому аспекту в настоящей заявке представлены кассеты экспрессии, содержащие представленный в настоящем документе полинуклеотид (например, полинуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую eTF, которая активирует SCN1A и/или содержит селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК) и один или несколько регуляторных элементов. Согласно определенным вариантам осуществления в настоящей заявке представлены кассеты экспрессии, содержащие представленный в настоящем документе полинуклеотид (например, полинуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую eTF, которая активирует SCN1A и/или содержит селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК) и селективный в отношении PV промотор.

[214] Согласно определенным вариантам осуществления представленный в настоящем документе полинуклеотид (например, полинуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую eTF, который активирует SCN1A и/или содержит селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК) представляет собой часть кассеты экспрессии, содержащей один или несколько регуляторных элементов в добавок к последовательности, кодирующей eTF. Согласно иллюстративным вариантам осуществления представленный в настоящем документе полинуклеотид (например, полинуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую eTF, который активирует SCN1A и/или содержит селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК), представляет собой часть кассеты экспрессии,

содержащей промотор, расположенный выше против хода транскрипции от трансгенной последовательности, чтобы быть способным управлять экспрессией трансгена (например, eTF, который избирательно активирует SCN1A) в клетке.

[215] Согласно определенным вариантам осуществления раскрытая в настоящем документе кассета экспрессии содержит представленный в настоящем документе полинуклеотид (например, полинуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую eTF, которая активирует регуляцию SCN1A и/или содержит селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК) и конститутивный промотор, расположенный выше против хода транскрипции от последовательности, кодирующей трансген, чтобы быть способным управлять экспрессией трансгена (например, eTF, который избирательно активирует SCN1A) в клетке. Примеры конститутивных промоторов включают в себя промотор GAD2, промотор синапсина человека, промотор CBA, промотор CMV, промотор minCMV, TATA-бокс, супер основной промотор или промотор EF1 α , или их комбинацию.

[216] Согласно определенным вариантам осуществления раскрытая в настоящем документе кассета экспрессии содержит представленный в настоящем документе полинуклеотид (например, полинуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую eTF, которая активирует SCN1A и/или содержит селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК) и короткий промотор, способный управлять экспрессией трансгена (например, eTF, который избирательно активирует SCN1A) в клетке. Согласно определенным вариантам осуществления короткий промотор, подходящий для применения в соответствии с описанными в настоящем документе молекулами нуклеиновой кислоты, содержит менее чем 500 п.н., 450 п.н., 400 п.н., 350 п.н., 300 п.н., 250 п.н., 225 п.н., 200 п.н., 175 п.н., 150 п.н., 145 п.н., 140 п.н., 135 п.н., 130 п.н., 125 п.н., 120 п.н., 115 п.н., 110 п.н., 105 п.н., 100 п.н., 95 п.н., 90 п.н., 85 п.н., 80 п.н. или 75 п.н. или приблизительно 80-300 п.н., 80-275 п.н., 80-250 п.н., 80-200 п.н., 80-150 п.н., 80-125 п.н., 80-120 п.н., 80-115 п.н., 80-110 п.н., 80-105 п.н., 80-100 п.н., 85-300 п.н., 85-275 п.н., 85-250 п.н., 85-200 п.н., 85-150 п.н., 85-125 п.н., 85-120 п.н., 85-115 п.н., 85-110 п.н., 85-105 п.н., 85-100 п.н., 90-300 п.н., 90-275 п.н., 90-250 п.н., 90-200 п.н., 90-150 п.н., 90-125 п.н., 90-120 п.н., 90-115 п.н., 90-110 п.н., 90-105 п.н., 90-100 п.н., 95-300 п.н., 95-275 п.н., 95-250 п.н., 95-200 п.н., 95-150 п.н., 95-125 п.н., 95-120 п.н., 95-115 п.н., 95-110 п.н., 95-105 п.н., 95-100 п.н., 100-300 п.н., 100-275 п.н., 100-250 п.н., 100-200 п.н., 100-150 п.н., 100-125 п.н., 100-120 п.н., 100-115 п.н., 100-110 п.н. или 100-105 п.н. Согласно иллюстративным вариантам осуществления короткий промотор, подходящий для применения в соответствии с описанными в настоящем документе кассетами экспрессии, содержит приблизительно 100-120 п.н., приблизительно 117 п.н. или приблизительно 100 п.н.

[217] Согласно определенным вариантам осуществления раскрытая в настоящем документе кассета экспрессии содержит короткий промотор, содержащий или состоящий из следующего: (i) SEQ ID NO: 1; (ii) его вариант или функциональный фрагмент или (iii) последовательность нуклеиновой кислоты, характеризующаяся идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, по отношению к любому из (i) или (ii), функционально связанная с полинуклеотидом, кодирующим любой из eTF, который избирательно активирует раскрытый в настоящем документе SCN1A и необязательно содержащая раскрытый в настоящем документе сайт связывания микроРНК. Другие примеры короткой промоторной последовательности можно найти в публикации РСТ № WO 2018/213786.

[218] Согласно определенным вариантам осуществления раскрытая в настоящем документе кассета экспрессии содержит представленный в настоящем документе полинуклеотид (например, полинуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую eTF, которая активирует SCN1A и/или содержит селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК) и селективный промотор клеточного типа, расположенный выше против хода транскрипции от последовательности, кодирующей трансген (например, eTF, который избирательно активирует SCN1A), чтобы иметь возможность избирательно управлять экспрессией трансгена в представляющей интерес клетке. Согласно определенным вариантам осуществления селективный промотор клеточного типа может быть селективным (например, избирательно управлять экспрессией) в отношении любого представляющего интерес типа клеток, такого как, например, клетка сердца, клетка печени, мышечная клетка, костная клетка, нейрон или их субпопуляции. Согласно иллюстративному варианту осуществления раскрытая в настоящем документе кассета экспрессии содержит полинуклеотид, кодирующий eTF, который избирательно активирует SCN1A, и селективный в отношении PV регуляторный элемент (например, промотор, энхансер и/или промотор и энхансер), расположенный выше против хода транскрипции от последовательности, кодирующей eTF, так чтобы быть способным избирательно управлять экспрессией eTF в PV-клетке, и, необязательно, селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК. Селективный в отношении PV регуляторный элемент относится к регуляторному элементу, который специфически модулирует экспрессию гена в PV-содержащем нейроне. Согласно определенным вариантам осуществления селективные в отношении PV регуляторные элементы усиливают экспрессию в PV-содержащем нейроне по сравнению с одним или несколькими другими типами клеток ЦНС. Согласно

определенным вариантам осуществления селективный в отношении PV регуляторный элемент подавляет процессы транскрипции и/или трансляции в нецелевых типах клеток.

[219] Согласно определенным вариантам осуществления представленный в настоящем документе селективный в отношении PV регуляторный элемент приводит к селективной экспрессии гена в PV-клетке по сравнению с нецелевыми типами клеток. В некоторых случаях нецелевые типы клеток включают в себя, без ограничения, возбуждающие нейроны, не-PV типы клеток ЦНС и ненейрональные типы клеток ЦНС. Согласно определенным вариантам осуществления селективные в отношении PV регуляторные элементы приводят к селективной экспрессии генов в PV-содержащих нейронах по меньшей мере одного, двух, трех, четырех, пяти или более не содержащих PV типов клеток ЦНС. В некоторых случаях не содержащая PV клетка ЦНС представляет собой возбуждающий нейрон, дофаминергический нейрон, астроцит, микроглию, мотонейрон, сосудистую клетку или не-ГАМКергический нейрон, (например, клетка, которая не экспрессирует один или несколько из GAD2, GAD1, NKX2.1, DLX1, DLX5, SST и VIP), не содержащий PV нейрон (например, ГАМКергический нейрон, который не экспрессирует парвальбумин) или другие клетки ЦНС (например, типы клеток ЦНС, которые никогда не экспрессируют любой из PV, GAD2, GAD1, NKX2.1, DLX1, DLX5, SST и VIP). В некоторых случаях представленный в настоящем документе селективный в отношении PV регуляторный элемент приводит к повышенной селективности экспрессии генов в PV-содержащих нейронах по сравнению с не содержащими PV ГАМКергическими клетками. В некоторых случаях типы клеток различают по разным клеточным маркерам, морфологии, фенотипу, генотипу, функции и/или любым другим средствам классификации типов клеток.

[220] Селективность экспрессии, управляемую селективным в отношении PV регуляторным элементом, можно измерить несколькими способами. Согласно одному варианту осуществления селективность экспрессии гена в PV-содержащей клетке по сравнению с не содержащими PV клетками может быть измерена путем сравнения количества PV-содержащих клеток, которые экспрессируют обнаруживаемый уровень транскрипта от гена, который функционально связан с селективным в отношении PV регуляторным элементом, с общим количеством клеток, которые экспрессируют ген (например, отношение PV к общему количеству клеток (PV + не-PV клеток), экспрессирующих ген). Например, селективность в отношении PV-содержащих нейронов может быть определена с использованием анализа колокализации на основе иммуногистохимии с использованием гена, кодирующего флуоресцентный белок (например, eGFP), функционально связанный с селективным в отношении PV

регуляторным элементом для измерения экспрессии гена и антитела, которое идентифицирует PV-содержащие клетки (например, антитело к PV, которое специфически взаимодействует с PV-содержащими нейронами), связанное со второй флуоресцентной меткой (например, красным флуоресцентным белком). Селективность экспрессии в PV-содержащих клетках можно рассчитать путем деления количества клеток, которые экспрессируют как PV, так и eGFP (например, PV-содержащие клетки), на общее количество клеток, экспрессирующих eGFP (например, PV-содержащие клетки и не содержащие PV клетки), и умножения на 100, чтобы преобразовать в проценты. Чем выше процент PV-содержащих клеток, экспрессирующих трансген, тем более селективным является регуляторный элемент для PV-содержащих клеток. Согласно определенным вариантам осуществления представленный в настоящем документе селективный в отношении PV регуляторный элемент может быть высокоселективным в отношении экспрессии в PV-содержащих клетках. Например, представленный в настоящем документе селективный в отношении PV регуляторный элемент может характеризоваться селективностью, составляющей приблизительно 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94 %, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более чем приблизительно 99%, в отношении PV-содержащих нейронов (например, PV-содержащие нейроны/все клетки $\times$ 100).

[221] В некоторых случаях представленный в настоящем документе селективный в отношении PV регуляторный элемент является коротким. В некоторых случаях размер селективного в отношении PV регуляторного элемента совместим с клонирующей способностью вектора, например, вирусного вектора или gAAV, так что комбинированный размер трансгена и одного или нескольких селективных в отношении PV регуляторных элементов не превышает клонирующую способность вектора. В некоторых случаях селективный в отношении PV регуляторный элемент составляет в длину приблизительно до 2050 п.н., 2000 п.н., 1900 п.н., 1800 п.н., 1700 п.н., 1600 п.н., 1500 п.н., 1400 п.н., 1300 п.н., 1200 п.н., 1100 п.н., 1000 п.н., 900 п.н., 800 п.н., 700 п.н., 600 п.н., 500 п.н., 400 п.н., 300 п.н., 200 п.н. или 100 п.н. В некоторых случаях селективный в отношении PV регуляторный элемент составляет приблизительно 500-600 п.н., 500-700 п.н., 500-800 п.н., 500-900 п.н., 500-1000 п.н., 500-1500 п.н., 500-2000 п.н. или 500-2050 п.н.

[222] Согласно определенным вариантам осуществления представленный в настоящем документе селективный в отношении PV регуляторный элемент содержит или состоит из любого из следующего: (i) SEQ ID NO: 2-4; (ii) вариант, функциональный фрагмент или их комбинация или (iii) последовательность нуклеиновой кислоты, характеризующаяся идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%,

84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% по отношению к любому из (i) или (ii). В некоторых случаях регуляторный элемент включает в себя любую из SEQ ID NO: 2-4. Другие примеры селективных в отношении PV регуляторных элементов можно найти в публикации PCT № WO 2018/187363.

[223] Согласно иллюстративным вариантам осуществления в настоящей заявке представлены кассеты экспрессии, содержащие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую eTF, который избирательно активирует SCN1A под контролем селективного в отношении PV регуляторного элемента. Согласно определенным вариантам осуществления в настоящей заявке представлены кассеты экспрессии, содержащие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую eTF, который избирательно активирует SCN1A, содержащий DBD, содержащий любую из следующих последовательностей: SEQ ID NO: 77-98 под контролем селективного в отношении PV регуляторного элемента, содержащего любую одна из SEQ ID NO: 2-4. Согласно определенным вариантам осуществления в настоящей заявке представлены кассеты экспрессии, содержащие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую eTF, который избирательно активирует SCN1A, содержащий любую из следующих последовательностей: SEQ ID NO: 99-131, 205, 207, 209, 213, 217, 219, 221 или 223 под контролем селективного в отношении PV регуляторного элемента, содержащего любую из SEQ ID NO: 2-4. Согласно определенным вариантам осуществления в настоящей заявке представлены кассеты экспрессии, содержащие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую eTF, который избирательно активирует SCN1A, содержащий любую из следующих последовательностей: SEQ ID NO: 67-73 под контролем селективного в отношении PV регуляторного элемента, содержащего любую из SEQ ID NO: 2-4. Согласно определенным вариантам осуществления в настоящей заявке представлены кассеты экспрессии, содержащие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую eTF, который избирательно активирует SCN1A, содержащий DBD, содержащий любую из следующих последовательностей: SEQ ID NO: 148-151 под контролем селективного в отношении PV регуляторного элемента, содержащего любую из SEQ ID NO: 2. Согласно определенным вариантам осуществления в настоящей заявке представлены кассеты экспрессии, содержащие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую eTF, который избирательно активирует SCN1A, содержащий любую из следующих последовательностей: SEQ ID NO: 99-131, 205, 207, 209, 213, 217, 219, 221 или 223 под контролем селективного в отношении PV регуляторного элемента, содержащего любую из SEQ ID NO: 2. Согласно определенным вариантам осуществления в настоящей заявке представлены кассеты экспрессии, содержащие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую eTF, который избирательно активирует SCN1A, содержащий любую из следующих последовательностей: SEQ ID NO: 67-76 или 316 под

контролем селективного в отношении PV регуляторного элемента, содержащего любую из SEQ ID NO: 2.

[224] Согласно определенным вариантам осуществления в настоящей заявке представлены кассеты экспрессии, содержащие селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК и последовательность промотора и/или энхансера. Любой из описанных в настоящем документе промоторов может быть включен в кассету экспрессии. Согласно иллюстративному варианту осуществления представленная в настоящем документе кассета экспрессии содержит селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК и селективный в отношении PV регуляторный элемент. Согласно определенным вариантам осуществления представленная в настоящем документе кассета экспрессии содержит селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК и селективный в отношении PV регуляторный элемент, содержащий (i) любую из SEQ ID NO: 2-4; (ii) вариант, функциональный фрагмент или их комбинацию или (iii) последовательность нуклеиновой кислоты, характеризующуюся идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, по отношению к любому из (i) или (ii). Согласно определенным вариантам осуществления представленная в настоящем документе кассета экспрессии содержит (1) селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК, содержащий (i) любую из SEQ ID NO: 7, 14 или 15; (ii) вариант, функциональный фрагмент или комбинацию (i) или (iii) последовательность нуклеиновой кислоты, характеризующуюся идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, по отношению к любому из (i) или (ii), и (2) селективный в отношении PV регуляторный элемент, содержащий (i) любую из SEQ ID NO: 2-4; (ii) вариант, функциональный фрагмент или их комбинацию (i) или (iii) последовательность нуклеиновой кислоты, характеризующуюся идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, по отношению к любому из (i) или (ii). Согласно определенным вариантам осуществления представленная в настоящем документе кассета экспрессии содержит (1) селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК, содержащий (i) SEQ ID NO: 7; (ii) вариант, функциональный фрагмент или комбинацию (i) или (iii) последовательность нуклеиновой кислоты, характеризующуюся идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, по отношению к любому из (i) или (ii), и (2) селективный в отношении PV регуляторный элемент,

содержащий (i) SEQ ID NO: 2; (ii) вариант, функциональный фрагмент или комбинацию (i) или (iii) последовательность нуклеиновой кислоты, характеризующуюся идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, по отношению к любому из (i) или (ii). Согласно одному варианту осуществления представленная в настоящем документе кассета экспрессии содержит сайт связывания микроРНК, содержащий SEQ ID NO: 7, и селективный в отношении PV регуляторный элемент, содержащий SEQ ID NO: 2. Согласно определенным вариантам осуществления представленный в настоящем документе полинуклеотид, содержит (1) селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК, содержащий (i) SEQ ID NO: 14; (ii) вариант, функциональный фрагмент или комбинацию (i) или (iii) последовательность нуклеиновой кислоты, характеризующуюся идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, по отношению к любым из (i) или (ii), и (2) селективный в отношении PV регуляторный элемент, содержащий (i) SEQ ID NO: 2; (ii) вариант, функциональный фрагмент или комбинацию (i) или (iii) последовательность нуклеиновой кислоты, характеризующуюся идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, по отношению к любому из (i) или (ii). Согласно одному варианту осуществления представленная в настоящем документе кассета экспрессии содержит сайт связывания микроРНК, содержащий SEQ ID NO: 15, и селективный в отношении PV регуляторный элемент, содержащий SEQ ID NO: 2. Согласно определенным вариантам осуществления представленная в настоящем документе кассета экспрессии содержит (1) селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК, содержащий (i) SEQ ID NO: 15; (ii) вариант, функциональный фрагмент или комбинацию (i) или (iii) последовательность нуклеиновой кислоты, характеризующуюся идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, по отношению к любым из (i) или (ii), и (2) селективный в отношении PV регуляторный элемент, содержащий (i) SEQ ID NO: 2; (ii) вариант, функциональный фрагмент или комбинацию (i) или (iii) последовательность нуклеиновой кислоты, характеризующуюся идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, по отношению к любому из (i) или (ii). Согласно одному варианту осуществления представленная в настоящем документе кассета экспрессии содержит сайт связывания микроРНК,

содержащий SEQ ID NO: 15, и селективный в отношении PV регуляторный элемент, содержащий SEQ ID NO: 2.

[225] Согласно определенным вариантам осуществления представленная в настоящем документе кассета экспрессии содержит селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК и последовательность, кодирующую eTF, который стимулирует экспрессию SCN1A, как предусмотрено в настоящем документе. Согласно иллюстративному варианту осуществления в настоящей заявке представлена кассета экспрессии, содержащая селективный в отношении PV регуляторный элемент, eTF, который активирует экспрессию SCN1A, как предусмотрено в настоящем документе, и селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК. Согласно иллюстративному варианту осуществления в настоящей заявке представлена кассета экспрессии, содержащая (1) селективный в отношении PV регуляторный элемент, содержащий (i) любую из SEQ ID NO: 2-4; (ii) вариант, функциональный фрагмент или комбинацию (i) или (iii) последовательность нуклеиновой кислоты, характеризующуюся идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, по отношению к любому из (i) или (ii), (2) последовательность, кодирующую eTF, который активирует SCN1A, содержащий (i) любую из SEQ ID NO: 77-131, 205, 207, 209, 213, 217, 219, 221 или 223; (ii) вариант, функциональный фрагмент или комбинацию (i) или (iii) последовательность нуклеиновой кислоты, характеризующуюся идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, по отношению к любому из (i) или (ii), и (3) селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК, содержащий (i) любую из SEQ ID NO: 7, 14 или 15; (ii) вариант, функциональный фрагмент или комбинацию (i) или (iii) последовательность нуклеиновой кислоты, характеризующуюся идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, по отношению к любому из (i) или (ii). Согласно другому иллюстративному варианту осуществления в настоящей заявке представлена кассета экспрессии, содержащая (1) селективный в отношении PV регуляторный элемент, содержащий (i) SEQ ID NO: 2; (ii) вариант, функциональный фрагмент или комбинацию (i) или (iii) последовательность нуклеиновой кислоты, характеризующуюся идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, по отношению к любому из (i) или (ii), (2) последовательность, кодирующую eTF, который активирует SCN1A, содержащий (i)

любую из SEQ ID NO: 77 или 127; (ii) вариант, функциональный фрагмент или комбинацию (i) или (iii) последовательность нуклеиновой кислоты, характеризующуюся идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, по отношению к любым из (i) или (ii), и (3) селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК, содержащий (i) SEQ ID NO: 7; (ii) вариант, функциональный фрагмент или комбинацию (i) или (iii) последовательность нуклеиновой кислоты, характеризующуюся идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, по отношению к любому из (i) или (ii). Согласно другому иллюстративному варианту осуществления в настоящей заявке представлена кассета экспрессии, содержащая (1) селективный в отношении PV регуляторный элемент, содержащий (i) SEQ ID NO: 2; (ii) вариант, функциональный фрагмент или комбинацию (i) или (iii) последовательность нуклеиновой кислоты, характеризующуюся идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, по отношению к любому из (i) или (ii), (2) последовательность, кодирующую eTF, который активирует SCN1A, содержащий (i) любую из SEQ ID NO: 77 или 127; (ii) вариант, функциональный фрагмент или комбинацию (i) или (iii) последовательность нуклеиновой кислоты, характеризующуюся идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, по отношению к любым из (i) или (ii), и (3) селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК, содержащий (i) SEQ ID NO: 14; (ii) вариант, функциональный фрагмент или комбинацию (i) или (iii) последовательность нуклеиновой кислоты, характеризующуюся идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, по отношению к любому из (i) или (ii). Согласно другому иллюстративному варианту осуществления в настоящей заявке представлена кассета экспрессии, содержащая (1) селективный в отношении PV регуляторный элемент, содержащий (i) SEQ ID NO: 2; (ii) вариант, функциональный фрагмент или комбинацию (i) или (iii) последовательность нуклеиновой кислоты, характеризующуюся идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, по отношению к любому из (i) или (ii), (2) последовательность, кодирующую eTF, который активирует SCN1A, содержащий (i) любую из SEQ ID NO: 77 или 127; (ii) вариант, функциональный фрагмент или комбинацию

(i) или (iii) последовательность нуклеиновой кислоты, характеризующуюся идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, по отношению к любым из (i) или (ii), и (3) селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК, содержащий (i) SEQ ID NO: 15; (ii) вариант, функциональный фрагмент или комбинацию (i) или (iii) последовательность нуклеиновой кислоты, характеризующуюся идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, по отношению к любому из (i) или (ii). Согласно другому иллюстративному варианту осуществления в настоящей заявке представлена кассета экспрессии, содержащая (1) селективный в отношении PV регуляторный элемент, содержащий (i) SEQ ID NO: 2; (ii) вариант, функциональный фрагмент или комбинацию (i) или (iii) последовательность нуклеиновой кислоты, характеризующуюся идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, по отношению к любому из (i) или (ii), (2) последовательность, кодирующую eTF, который активирует SCN1A, содержащий (i) любую из SEQ ID NO: 92 или 106; (ii) вариант, функциональный фрагмент или комбинацию (i) или (iii) последовательность нуклеиновой кислоты, характеризующуюся идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, по отношению к любым из (i) или (ii), и (3) селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК, содержащий (i) SEQ ID NO: 7; (ii) вариант, функциональный фрагмент или комбинацию (i) или (iii) последовательность нуклеиновой кислоты, характеризующуюся идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, по отношению к любому из (i) или (ii). Согласно другому иллюстративному варианту осуществления в настоящей заявке представлена кассета экспрессии, содержащая (1) селективный в отношении PV регуляторный элемент, содержащий (i) SEQ ID NO: 2; (ii) вариант, функциональный фрагмент или комбинацию (i) или (iii) последовательность нуклеиновой кислоты, характеризующуюся идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, по отношению к любому из (i) или (ii), (2) последовательность, кодирующую eTF, который активирует SCN1A, содержащий (i) любую из SEQ ID NO: 92 или 106; (ii) вариант, функциональный фрагмент или комбинацию (i) или (iii) последовательность нуклеиновой кислоты, характеризующуюся идентичностью

последовательности, составляющей по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, по отношению к любым из (i) или (ii), и (3) селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК, содержащий (i) SEQ ID NO: 14; (ii) вариант, функциональный фрагмент или комбинацию (i) или (iii) последовательность нуклеиновой кислоты, характеризующуюся идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, по отношению к любому из (i) или (ii). Согласно другому иллюстративному варианту осуществления в настоящей заявке представлена кассета экспрессии, содержащая (1) селективный в отношении PV регуляторный элемент, содержащий (i) SEQ ID NO: 2; (ii) вариант, функциональный фрагмент или комбинацию (i) или (iii) последовательность нуклеиновой кислоты, характеризующуюся идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, по отношению к любой из (i) или (ii), (2) последовательность, кодирующую eTF, который активирует SCN1A, содержащий (i) любую из SEQ ID NO: 92 или 106; (ii) вариант, функциональный фрагмент или комбинацию (i) или (iii) последовательность нуклеиновой кислоты, характеризующуюся идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, по отношению к любым из (i) или (ii), и (3) селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК, содержащий (i) SEQ ID NO: 15; (ii) вариант, функциональный фрагмент или комбинацию (i) или (iii) последовательность нуклеиновой кислоты, характеризующуюся идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, по отношению к любому из (i) или (ii).

[226] Согласно определенным вариантам осуществления представленная в настоящем документе кассета экспрессии, содержащая селективный в отношении PV регуляторный элемент и селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК, характеризующийся размером менее чем 5 т.п.н., 4,9 т.п.н., 4,8 т.п.н., 4,7 т.п.н., 4,6 т.п.н., 4,5 т.п.н., 4,4 т.п.н., 4,3 т.п.н., 4,2 т.п.н., 4,1 т.п.н., 4,0 т.п.н., 3,9 т.п.н., 3,8 т.п.н., 3,7 т.п.н., 3,6 т.п.н., 3,5 т.п.н., 3,4 т.п.н., 3,3 т.п.н., 3,2 т.п.н., 3,1 т.п.н., 3,0 т.п.н., 2,9 т.п.н., 2,8 т.п.н., 2,7 т.п.н., 2,6 т.п.н., 2,5 т.п.н., 2,4 т.п.н., 2,3 т.п.н., 2,2 т.п.н., 2,1 т.п.н., 2,0 т.п.н., 1,9 т.п.н., 1,8 т.п.н., 1,7 т.п.н., 1,6 т.п.н. или 1,5 т.п.н. или менее, или приблизительно 1,5-5 т.п.н., 1,5-4,7 т.п.н., 1,5-4,5 т.п.н., 1,5-4,0 т.п.н., 1,5-3,5 т.п.н., 1,5-3,0 т.п.н., 1,5-2,5 т.п.н., 1,5-2,0 т.п.н..

[227] Согласно определенным вариантам осуществления представленная в настоящем документе кассета экспрессии может содержать еще один дополнительный регуляторный элемент в дополнение к промотору, такой как, например, последовательности, связанные с инициацией или окончанием транскрипции, энхансерные последовательности и эффективные сигналы процессинга РНК. Иллюстративные регуляторные элементы включают в себя, например, интрон, энхансер, UTR, элемент стабильности, последовательность WPRE, консенсусную последовательность Kozak, посттрансляционный элемент ответа, сайт связывания микроРНК или последовательность полиаденилирования (полиА) или их комбинацию. Регуляторные элементы могут функционировать, чтобы модулировать экспрессию генов на фазе транскрипции, посттранскрипционной фазе или на фазе трансляции экспрессии генов. На уровне РНК регуляция может происходить на уровне трансляции (например, элементы стабильности, которые стабилизируют мРНК для трансляции), расщепления РНК, сплайсинга РНК и/или терминации транскрипции. Согласно различным вариантам осуществления регуляторные элементы могут рекрутировать факторы транскрипции в кодирующую область, которые повышают избирательность экспрессии генов в представляющем интерес типе клеток, увеличивают скорость, с которой производятся транскрипты РНК, повышают стабильность производимой РНК и/или увеличивают скорость образования синтеза белка из транскриптов РНК. Согласно иллюстративному варианту осуществления представленная в настоящем документе кассета экспрессии содержит по меньшей мере один селективный в отношении РV сайт связывания микроРНК, как предусмотрено в настоящем документе.

[228] Согласно определенным вариантам осуществления описанные в настоящем документе кассеты экспрессии дополнительно содержат последовательность полиА. Подходящие последовательности полиА включают в себя, например, искусственный полиА длиной приблизительно 75 п.н. (РА75) (смотрите, например, WO 2018/126116), полиА бычьего гормона роста, ранний сигнал полиА SV40, поздний сигнал полиА SV40, полиА бета-глобина кролика, полиА тимидинкиназы HSV, полиА гена протамина, полиА аденовируса 5 E1b, полиА гормона роста или полиА PBGD. Согласно иллюстративным вариантам осуществления последовательность полиА, подходящая для применения в представленных в настоящем документе кассетах экспрессии, представляет собой полиА hGH (SEQ ID NO: 17) или синтетический полиА (SEQ ID NO: 16). Как правило, последовательность полиА расположена ниже по ходу транскрипции от полинуклеотида, кодирующего eTF, в описанных в настоящем документе кассетах экспрессии.

[229] Согласно определенным вариантам осуществления представленные в настоящем документе кассеты экспрессии дополнительно содержат одну или несколько

последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих один или несколько сигналов ядерной локализации (NLS). Может быть использован любой пептид NLS, который облегчает импорт белка, к которому прикреплен, в ядро клетки. Примеры NLS включают в себя, например, NLS большого Т-антигена SV40, NLS нуклеоплазмина, NLS EGL-13, NLS с-Мус и NLS TUS-белка. Смотрите, например, C. Dingwall et al., *J. Cell Biol.* 107: 841-9 (1988); J.P. Makkerh et al., *Curr Biol.* 6: 1025-7 (1996) и M. Ray et al., *Bioconj. Chem.* 26: 1004-7 (2015). NLS может быть расположен в любом месте последовательности белка eTF, но согласно предпочтительным вариантам осуществления он конъюгирован с N-концом eTF или доменом eTF. Согласно иллюстративным вариантам осуществления представленные в настоящем документе кассеты нуклеиновых кислот кодируют eTF с NLS, слитым с N-концом eTF. Согласно другим вариантам осуществления представленные в настоящем документе кассеты нуклеиновых кислот кодируют eTF с первым NLS, слитым с N-концом eTF, и вторым NLS, расположенным между DBD и доменом TAD eTF.

Векторы экспрессии

[230] Согласно определенным вариантам осуществления описанные в настоящем документе кассеты экспрессии могут быть включены в вектор экспрессии. Векторы экспрессии можно использовать для доставки кассеты экспрессии в целевую клетку посредством трансфекции или трансдукции. Вектор может представлять собой интегрирующий или неинтегрирующий вектор, что относится к способности вектора интегрировать кассету экспрессии или трансген в геном клетки-хозяина. Примеры векторов экспрессии включают в себя, без ограничения, (а) невирусные векторы, такие как векторы нуклеиновых кислот, включая в себя линейные олигонуклеотиды и кольцевые плазмиды; искусственные хромосомы, такие как искусственные хромосомы человека (HAC), искусственные хромосомы дрожжей (YAC) и бактериальные искусственные хромосомы (BAC или PAC)); эписомальные векторы; транспозоны (например, PiggyBac); и (b) вирусные векторы, такие как ретровирусные векторы, лентивирусные векторы, аденовирусные векторы и аденоассоциированные вирусные векторы.

[231] Векторы экспрессии могут представлять собой линейные олигонуклеотиды или кольцевые плазмиды и могут быть доставлены в клетку с помощью различных способов трансфекции, включая в себя физические и химические способы. Физические способы, как правило, относятся к способам доставки, использующим физическую силу для противодействия барьеру клеточной мембраны для облегчения внутриклеточной доставки генетического материала. Примеры физических способов включают в себя использование иглы, баллистической ДНК, электропорацию, сонопорацию, фотопорацию, магнитофекцию и гидропорацию. Химические способы, как правило, относятся к способам,

при которых химические носители доставляют молекулу нуклеиновой кислоты в клетку, и могут включать в себя неорганические частицы, векторы на основе липидов, векторы на основе полимеров и векторы на основе пептидов.

[232] Согласно определенным вариантам осуществления вектор экспрессии вводят в целевую клетку с использованием катионного липида (например, катионной липосомы). Для доставки генов были исследованы различные типы липидов, такие как, например, липидная наноэмульсия (например, которая представляет собой дисперсию одной несмешивающейся жидкости в другой, стабилизированной эмульгирующим средством) или твердые липидные наночастицы.

[233] Согласно определенным вариантам осуществления вектор экспрессии вводят в целевую клетку с использованием носителя для доставки на основе пептидов. Носители на основе пептидов могут иметь преимущества, заключающиеся в защите доставляемого генетического материала, нацеливании на специфические клеточные рецепторы, разрушении эндосомных мембран и доставке генетического материала в ядро. Согласно определенным вариантам осуществления вектор экспрессии вводят в целевую клетку с использованием носителя для доставки на основе полимера. Носители на основе полимеров могут содержать природные белки, пептиды и/или полисахариды или синтетические полимеры. Согласно одному варианту осуществления средство доставки на основе полимера содержит полиэтиленимин (PEI). PEI может конденсировать ДНК в положительно заряженные частицы, которые связываются с остатками анионной поверхности клетки и попадают в клетку посредством эндоцитоза. Согласно другим вариантам осуществления носитель для доставки на основе полимера может содержать поли-L-лизин (PLL), поли(DL-молочную кислоту) (PLA), поли(DL-лактид-ко-гликозид) (PLGA), полиорнитин, полиаргинин, гистоны, протамины, дендримеры, хитозаны, синтетические аминокислотные производные декстрана и/или катионные акриловые полимеры. Согласно определенным вариантам осуществления носители для доставки на основе полимеров могут включать в себя смесь полимеров, такую как, например, PEG и PLL.

[234] Согласно определенным вариантам осуществления вектор экспрессии может представлять собой вирусный вектор, подходящий для генной терапии. Предпочтительные характеристики векторов вирусной генной терапии или векторов доставки генов могут включать в себя способность воспроизводимо и стабильно размножаться и очищаться до высоких титров; для опосредования направленной доставки (например, для доставки трансгена конкретно в представляющую интерес ткань или орган без широкого распространения вектора в другом месте); и опосредовать доставку гена и экспрессию трансгена, не вызывая вредных побочных эффектов.

[235] Несколько типов вирусов, например, непатогенный парвовирус, называемый аденоассоциированным вирусом, были сконструированы для целей генной терапии, используя путь вирусной инфекции, но избегая последующей экспрессии вирусных генов, которая может привести к репликации и токсичности. Такие вирусные векторы можно получить путем удаления всех или некоторых кодирующих областей из вирусного генома, но оставив нетронутыми те последовательности (например, концевые повторяющиеся последовательности), которые могут быть необходимы для таких функций, как упаковка векторного генома в вирусный капсид или интеграция векторной нуклеиновой кислоты (например, ДНК) в хроматин хозяина.

[236] Согласно различным вариантам осуществления подходящие вирусные векторы включают в себя ретровирусы (например, вирусы А-типа, В-типа, С-типа и D-типа), аденовирус, парвовирус (например, аденоассоциированные вирусы или AAV), коронавирусы, вирусы с отрицательно-полярной нитью РНК, такие как ортомиксовирус (например, вирус гриппа), рабдовирус (например, вирус бешенства и везикулярного стоматита), парамиксовирус (например, корь и Сендай), вирусы с положительно-полярной нитью РНК, такие как пикорнавирус и альфавирус, и двухцепочечные ДНК-вирусы, включая в себя аденовирус, вирус герпеса (например, вирус простого герпеса типов 1 и 2, вирус Эпштейна-Барра, цитомегаловирус) и поксвирус (например, коровьей оспы, оспы птиц и оспы канареек). Примеры ретровирусов включают в себя вирус лейкемии-саркомы птиц, человеческий Т-лимфотрофный вирус типа 1 (HTLV-1), вирус лейкемии крупного рогатого скота (BLV), лентивирус и спумавирус. Другие вирусы включают в себя, например, вирус Норуолк, тогавирус, флавивирус, реовирусы, паповавирус, гепаднавирус и вирус гепатита. Вирусные векторы можно разделить на две группы в зависимости от их способности интегрироваться в геном хозяина - интегрирующиеся и неинтегрирующиеся. Онкоретровирусы и лентивирусы могут интегрироваться в хроматин клетки-хозяина, в то время как аденовирусы, аденоассоциированные вирусы и вирусы герпеса преимущественно сохраняются в ядре клетки в виде внехромосомных эписом.

[237] Согласно определенным вариантам осуществления подходящий вирусный вектор представляет собой ретровирусный вектор. Ретровирусы относятся к вирусам семейства Retroviridae. Примеры ретровирусов включают в себя онкоретровирусы, такие как вирус лейкемии мышей (MLV), и лентивирусы, такие как вирус иммунодефицита человека 1 (HIV-1). Ретровирусные геномы представляют собой одноцепочечные (оц) РНК и содержат различные гены, которые могут быть в цис- или транс-форме. Например, ретровирусный геном может содержать цис-действующие последовательности, такие как два длинных концевых повтора (LTR), с элементами для экспрессии генов, обратной транскрипции и

интеграции в хромосомы хозяина. Другие компоненты включают в себя сигнал упаковки (ψ или ψ) для специфической упаковки РНК во вновь образованные вирионы и полипуриновый тракт (PPT), место инициации синтеза положительно-полярной нити ДНК во время обратной транскрипции. Кроме того, ретровирусный геном может содержать гены *gag*, *pol* и *env*. Ген *gag* кодирует структурные белки, ген *pol* кодирует ферменты, которые сопровождают оцРНК и осуществляют обратную транскрипцию вирусной РНК в ДНК, а ген *env* кодирует вирусную оболочку. Как правило, *gag*, *pol* и *env* предоставляются в транс для вирусной репликации и упаковки.

[238] Согласно определенным вариантам осуществления представленный в настоящем документе ретровирусный вектор может представлять собой лентивирусный вектор. Распознаются по меньшей мере пять серогрупп или серотипов лентивирусов. Вирусы разных серотипов могут по-разному инфицировать определенные типы клеток и/или хозяев. Лентивирусы, например, включают в себя ретровирусы приматов и ретровирусы неprimатов. Ретровирусы приматов включают в себя HIV и вирус иммунодефицита обезьян (SIV). Ретровирусы неprimатов включают в себя вирус иммунодефицита кошек (FIV), вирус иммунодефицита крупного рогатого скота (BIV), вирус артрита-энцефалита коз (CAEV), вирус инфекционной анемии лошадей (EIAV) и виснавирус. Лентивирусы или лентивекторы могут быть способны трансдуцировать покоящиеся клетки. Как и в случае онкоретровирусных векторов, конструкция лентивекторов может быть основана на разделении цис- и транс-действующих последовательностей.

[239] Согласно определенным вариантам осуществления в настоящей заявке представлены векторы экспрессии, которые были разработаны для доставки с помощью оптимизированного терапевтического ретровирусного вектора. Ретровирусный вектор может представлять собой лентивирус, содержащий левый (5') LTR; последовательности, которые способствуют упаковке и/или ядерному импорту вируса; промотор; необязательно, один или несколько дополнительных регуляторных элементов (таких как, например, энхансер или последовательность полиА); необязательно лентивирусный элемент обратного ответа (RRE); конструкция, содержащая селективный регуляторный элемент PV, функционально связанный с последовательностью, кодирующей eTF; необязательно инсультатор и правый (3') ретровирусный LTR.

[240] Согласно иллюстративным вариантам осуществления представленный в настоящем документе вирусный вектор представляет собой аденоассоциированный вирус (AAV). AAV представляет собой небольшой вирус животных без оболочки, дефектной репликации, который поражает людей и некоторые другие виды приматов. Известно, что AAV вызывает заболевание человека и вызывает умеренный иммунный ответ. Векторы

AAV могут также инфицировать как делящиеся, так и покоящиеся клетки, не встраиваясь в геном клетки-хозяина.

[241] Геном AAV состоит из линейной одноцепочечной ДНК длиной ~4,7 т.п.н. Геном состоит из двух открытых рамок считывания (ORF), фланкированных последовательностью инвертированного концевой повтора (ITR) длиной приблизительно 145 п.н. ITR состоит из нуклеотидной последовательности на 5'-конце (5' ITR) и нуклеотидной последовательности, расположенной на 3'-конце (3' ITR), которые содержат палиндромные последовательности. ITR функционируют в цис-системе путем сворачивания с образованием Т-образных шпильчатых структур за счет комплементарного спаривания оснований, которые действуют как праймеры во время инициации репликации ДНК для синтеза второй цепи. Две открытые рамки считывания кодируют гены гер и сар, которые участвуют в репликации и упаковке вириона. Согласно иллюстративному варианту осуществления представленный в настоящем документе вектор AAV не содержит генов гер или сар. Такие гены могут быть представлены в транс для производства вирионов, как описано ниже.

[242] Согласно определенным вариантам осуществления вектор AAV может включать в себя «лишнюю» нуклеиновую кислоту. Согласно определенным вариантам осуществления «лишняя» нуклеиновая кислота может кодировать зеленый флуоресцентный белок или ген устойчивости к антибиотикам, таким как канамицин или ампициллин. Согласно определенным вариантам осуществления «лишняя» нуклеиновая кислота может быть расположена вне последовательностей ITR (например, по сравнению с последовательностью трансгена eTF и регуляторными последовательностями, которые расположены между 5' и 3' ITR-последовательностями).

[243] Существуют различные серотипы AAV, включая в себя AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12 и AAV13. Эти серотипы различаются по своему тропизму или по типам клеток, которые они заражают. AAV могут содержать геном и капсиды из множества серотипов (например, псевдотипов). Например, AAV может содержать геном серотипа 2 (например, ITR), упакованный в капсид серотипа 5 или серотипа 9. Псевдотипы могут повышать эффективность трансдукции, а также изменять тропизм.

[244] В некоторых случаях предпочтителен серотип AAV, который может пересекать гематоэнцефалический барьер или инфицировать клетки ЦНС. В некоторых случаях AAV9 или его вариант используется для доставки кассеты экспрессии согласно настоящему раскрытию, содержащей селективный регуляторный элемент PV, функционально связанный с трансгеном, кодирующим eTF, который избирательно активирует SCN1A. В

некоторых случаях AAV9 или его вариант используется для доставки кассеты экспрессии согласно настоящему раскрытию, содержащей селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК. В некоторых случаях AAV9 или его вариант используется для доставки кассеты экспрессии согласно настоящему раскрытию, содержащей селективный в отношении PV регуляторный элемент, функционально связанный с трансгеном, кодирующим eTF, который селективно активирует SCN1A, и селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК.

[245] Согласно иллюстративным вариантам осуществления в настоящей заявке представлены векторы экспрессии, которые были разработаны для доставки с помощью AAV. AAV может быть любого серотипа, например, AAV1, AAV2, AAV3, AAV3b, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV-DJ, или химерным, гибридным или вариантом AAV. AAV также может представлять собой самокомплементарный AAV (scAAV). Согласно определенным вариантам осуществления вектор экспрессии, разработанный для доставки с помощью AAV, содержит 5' ITR и 3' ITR. Согласно определенным вариантам осуществления вектор экспрессии, разработанный для доставки с помощью AAV, содержит 5' ITR, промотор, трансген, кодирующий eTF, и 3' ITR. Согласно определенным вариантам осуществления вектор экспрессии, разработанный для доставки с помощью AAV, содержит 5' ITR, энхансер, промотор, трансген, кодирующий eTF, последовательность полиА и 3' ITR.

Клетки-хозяева

[246] Согласно другому аспекту настоящее изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей кассету экспрессии или вектор экспрессии, как раскрыто в настоящем документе. Клетки-хозяева могут представлять собой бактериальную клетку, дрожжевую клетку, клетку насекомого или клетку млекопитающего. Согласно иллюстративному варианту осуществления под клеткой-хозяином понимается любая линия клеток, которая восприимчива к заражению представляющим интерес вирусом и поддается культивированию *in vitro*.

[247] Согласно определенным вариантам осуществления предложенная в настоящем документе клетка-хозяин может использоваться для целей генной терапии *ex vivo*. Согласно таким вариантам осуществления клетки трансфицируют молекулой нуклеиновой кислоты или вектором экспрессии, содержащим селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК и/или последовательность, кодирующую eTF, которая избирательно активирует SCN1A, как описано в настоящем документе, и затем трансплантируют пациенту или субъекту. Трансплантированные клетки могут иметь аутологичное, аллогенное или гетерологичное происхождение. Для клинического применения выделение клеток, как

правило, проводят в условиях надлежащей производственной практики (GMP). Перед трансплантацией, как правило, проверяется качество клеток и отсутствие микробов или других загрязнителей, и может проводиться предварительное кондиционирование, такое как облучение и/или иммуносупрессивное лечение. Кроме того, клетки-хозяева можно трансплантировать вместе с факторами роста для стимуляции пролиферации и/или дифференцировки клеток.

[248] Согласно определенным вариантам осуществления клетка-хозяин может использоваться для генной терапии *ex vivo*. Предпочтительно указанные клетки представляют собой эукариотические клетки, такие как клетки млекопитающих, они включают в себя, без ограничения, людей, отличных от людей приматов, таких как обезьяны; шимпанзе; мартышки и орангутаны, домашних животных, включая в себя собак и кошек, а также домашний скот, такой как лошади, крупный рогатый скот, свиньи, овцы и козы, или другие виды млекопитающих, включая в себя, без ограничения, мышей, крыс, морских свинок, кроликов, хомяков и т.п. Специалист в настоящей области техники выберет более подходящие клетки в соответствии с пациентом или объектом трансплантации.

[249] Согласно определенным вариантам осуществления представленная в настоящем документе клетка-хозяин может представлять собой клетку со свойствами самообновления и плюрипотентности, например, стволовые клетки или индуцированные плюрипотентные стволовые клетки. Стволовые клетки предпочтительно представляют собой мезенхимальные стволовые клетки. Мезенхимальные стволовые клетки (MSC) способны дифференцироваться по меньшей мере в один из остеобластов, хондроцитов, адипоцитов или миоцитов и могут быть выделены из любого типа ткани. Как правило, MSC выделяют из костного мозга, жировой ткани, пуповины или периферической крови. Способы их получения хорошо известны специалисту в настоящей области техники. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (также известные как iPS-клетки или iPSC) представляют собой тип плюрипотентных стволовых клеток, которые могут быть получены непосредственно из взрослых клеток. Yamanaka с соавт. индуцировали iPS-клетки путем переноса генов Oct3/4, Sox2, Klf4 и c-Myc в фибробласты мыши и человека и вынуждая клетки экспрессировать гены (WO 2007/069666). Thomson с соавт. впоследствии производили iPS-клетки человека с использованием Nanog и Lin28 вместо Klf4 и c-Myc (WO 2008/118820).

[250] Согласно иллюстративному варианту осуществления представленная в настоящем документе клетка-хозяин представляет собой упаковывающую клетку. Указанные клетки могут представлять собой прикрепленные или суспензионные клетки.

Упаковывающая клетка и вспомогательный вектор или вирус, или конструкция(и) ДНК обеспечивают вместе в транс все недостающие функции, которые требуются для полной репликации и упаковки вирусного вектора.

[251] Предпочтительно указанные упаковывающие клетки представляют собой эукариотические клетки, такие как клетки млекопитающих, включая в себя клетки обезьян, человека, собак и грызунов. Примерами клеток человека являются клетки PER.C6 (WO01/38362), MRC-5 (ATCC CCL-171), WI-38 (ATCC CCL-75), клетки HEK-293 (ATCC CRL-1573), клетки HeLa (ATCC CCL2) и фетальные клетки легких резус (ATCC CL-160). Примерами клеток отличных от людей приматов являются клетки Vero (ATCC CCL81), клетки COS-1 (ATCC CRL-1650) или клетки COS-7 (ATCC CRL-1651). Примерами клеток собаки являются клетки MDCK (ATCC CCL-34). Примерами клеток грызунов являются клетки хомяка, такие как BHK21-F, клетки HKCS или клетки CHO.

[252] В качестве альтернативы источникам млекопитающих клеточные линии для применения в настоящем изобретении могут быть получены из источников птиц, таких как курица, утка, гусь, перепел или фазан. Примеры птичьих клеточных линий включают в себя птичьи эмбриональные стволовые клетки (WO01/85938 и WO03/076601), иммортализованные клетки сетчатки утки (WO2005/042728) и клетки, полученные из птичьих эмбриональных стволовых клеток, включая в себя клетки курицы (WO2006/108846) или клетки утки, такие как клеточная линия EB66 (WO2008/129058 и WO2008/142124).

[253] Согласно другому варианту осуществления указанные клетки-хозяева представляют собой клетки насекомых, такие как клетки SF9 (ATCC CRL-1711), клетки Sf21 (IPLB-Sf21), клетки MG1 (BTI-TN-MG1) или клетки High FiveTM (BTI-TN-5B1-4).

[254] Согласно определенным вариантам осуществления представленные в настоящем документе клетки-хозяева, содержащие рекомбинантный вектор/геном AAV по настоящему изобретению (например, содержащие селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК и/или последовательность, кодирующую eTF, который избирательно активирует SCN1A), могут дополнительно содержать одну или несколько конструкций нуклеиновых кислот, такие как, например, (i) конструкция нуклеиновой кислоты (например, плаزمиды-помощника AAV), которая кодирует гены гер и сар, но не несет последовательностей ITR; и/или (ii) конструкция нуклеиновой кислоты (например, плазмиды), обеспечивающая аденовирусные функции, необходимые для репликации AAV. Согласно иллюстративному варианту осуществления представленная в настоящем документе клетка-хозяин содержит: i) вектор экспрессии, содержащий селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК и/или последовательность, кодирующую eTF,

который избирательно активирует SCN1A, как предусмотрено в настоящем документе (т.е. рекомбинантный геном AAV); ii) конструкцию нуклеиновой кислоты, кодирующую гены гер и сар AAV, которая не несет последовательности ITR; и iii) конструкцию нуклеиновой кислоты, содержащую аденовирусные гены-помощники (как описано ниже).

[255] Согласно определенным вариантам осуществления гены-помощники гер, сар и аденовируса могут быть объединены в одной плазмиде (Blouin V et al. *J Gene Med.* 2004; 6(suppl): S223-S228; Grimm D. et al. *Hum. Gene Ther.* 2003; 7: 839-850). Таким образом, согласно другому иллюстративному варианту осуществления представленная в настоящем документе клетка-хозяин содержит: i) вектор экспрессии, содержащий селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК и/или последовательность, кодирующую eTF, которая избирательно активирует SCN1A, как раскрыто в настоящем документе (т.е. рекомбинантный геном AAV); и ii) плазмиду, кодирующую гены гер и сар AAV, которая не несет последовательности ITR и дополнительно содержит гены-помощники аденовирусов.

[256] Согласно другому варианту осуществления представленная в настоящем документе клетка-хозяин содержит: а) вектор экспрессии, содержащий селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК и/или последовательность, кодирующую eTF, которая избирательно активирует SCN1A, как описано в настоящем документе (т.е. геном рекомбинантного AAV); b) плазмиду, кодирующую гены гер и сар AAV, которая не несет последовательности ITR; и c) плазмиду, содержащую аденовирусные РНК генов-помощников E2a, E4 и VA; причем котрансфекция выполняется в клетках, предпочтительно в клетках млекопитающих, которые конститутивно экспрессируют и характеризуются транскомплементацией к аденовирусному гену E1, как клетки HEK-293 (ATCC CRL-1573).

[257] Согласно определенным вариантам осуществления клетка-хозяин, подходящая для крупномасштабного производства векторов AAV, представляет собой клетки насекомых, которые можно инфицировать комбинацией рекомбинантных бакуловирусов (Urabe et al. *Hum. Gene Ther.* 2002; 13: 1935-1943). Например, клетки SF9 могут быть совместно инфицированы тремя бакуловирусными векторами, соответственно экспрессирующими гер AAV, сар AAV и упаковываемый вектор AAV. Рекомбинантные бакуловирусные векторы будут обеспечивать функции вирусного гена-помощника, необходимые для репликации и/или упаковки вируса.

[258] Дополнительное руководство по конструированию и производству вирионов для генной терапии согласно настоящему изобретению можно найти в: *Viral Vectors for Gene Therapy, Methods and Protocols. Series: Methods in Molecular Biology, Vol. 737.* Merten and Al-Rubeai (Eds.); 2011 Humana Press (Springer); *Gene Therapy.* M. Giacca. 2010 Springer-Verlag; Heilbronn R. and Weger S. *Viral Vectors for Gene Transfer: Current Status of Gene*

Therapeutics. In: Drug Delivery, Handbook of Experimental Pharmacology 197; M. Schafer-Korting (Ed.). 2010 Springer-Verlag; pp. 143-170; Adeno-Associated Virus: Methods and Protocols. R. O. Snyder and P. Moullier (Eds). 2011 Humana Press (Springer); Bunning H. et al. Recent developments in adeno-associated virus technology. J. Gene Med. 2008; 10:717-733 и Adenovirus: Methods and Protocols. M. Chillon and A. Bosch (Eds.); Third. Edition. 2014 Humana Press (Springer).

Вирионы и способы получения вирионов

[259] Согласно определенным вариантам осуществления в настоящей заявке представлены вирусные частицы, содержащие вирусный вектор, содержащий селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК и/или последовательность, кодирующую eTF, который избирательно активирует SCN1A, как раскрыто в настоящем документе. Термины «вирусная частица» и «вирион» используются в настоящем документе взаимозаменяемо и относятся к инфекционной и, как правило, дефектной по репликации вирусной частице, содержащей вирусный геном (например, вектор вирусной экспрессии), упакованный внутри капсида, и, в зависимости от случая, например, для ретровирусов - липидную оболочку, окружающую капсид. «Капсид» относится к структуре, в которую упакован вирусный геном. Капсид состоит из нескольких олигомерных структурных субъединиц, состоящих из белков. Например, у AAV есть икосаэдрический капсид, образованный взаимодействием трех капсидных белков: VP1, VP2 и VP3. Согласно одному варианту осуществления представленный в настоящем документе вирион представляет собой рекомбинантный вирион AAV или вирион gAAV, полученный путем упаковки вектора AAV, содержащего селективный в отношении PV регуляторный элемент и селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК. Согласно другому варианту осуществления представленный в настоящем документе вирион представляет собой рекомбинантный вирион AAV или вирион gAAV, полученный путем упаковки вектора AAV, содержащего селективный в отношении PV регуляторный элемент, функционально связанный с последовательностью, кодирующей eTF, которая избирательно активирует SCN1A, как описано в настоящем документе, в белковой оболочке. Согласно другому варианту осуществления представленный в настоящем документе вирион представляет собой рекомбинантный вирион AAV или вирион gAAV, полученный путем упаковки вектора AAV, содержащего селективный в отношении PV регуляторный элемент, функционально связанный с последовательностью, кодирующей eTF, которая избирательно активирует SCN1A, как описано в настоящем документе, и селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК в белковой оболочке.

[260] Согласно определенным вариантам осуществления представленный в настоящем документе рекомбинантный вирион AAV может быть получен путем инкапсидации генома AAV, полученного из определенного серотипа AAV, в вирусную частицу, образованную природными белками Cap, соответствующими AAV того же конкретного серотипа. Согласно другим вариантам осуществления представленная в настоящем документе вирусная частица AAV содержит вирусный вектор, содержащий ITR данного серотипа AAV, упакованный в белки из другого серотипа. Смотрите, например, Bunning H et al. *J Gene Med* 2008; 10: 717-733. Например, вирусный вектор, имеющий ITR из данного серотипа AAV, может быть упакован в: а) вирусную частицу, состоящую из капсидных белков, полученных из того же или другого серотипа AAV (например, ITR AAV2 и капсидных белков AAV9; ITR AAV2 и капсидных белков AAV8 и т.п.); б) мозаичную вирусную частицу, состоящую из смеси капсидных белков из различных серотипов или мутантов AAV (например, ITR AAV2 с капсидными белками AAV1 и AAV9); в) химерную вирусную частицу, состоящую из капсидных белков, которые были усечены перестановкой доменов между различными серотипами или вариантами AAV (например, ITR AAV2 с белками капсида AAV8 с доменами AAV9); или d) нацеленную вирусную частицу, сконструированную для отображения селективных связывающих доменов, обеспечивающих строгое взаимодействие со специфическими рецепторами целевой клетки (например, ITR AAV5 с капсидными белками AAV9, генетически усеченными путем вставки пептидного лиганда; или капсидные белки AAV9, не модифицированные генетически путем связывания пептидного лиганда на поверхности капсида).

[261] Квалифицированному специалисту будет понятно, что представленный в настоящем документе вирион AAV может содержать капсидные белки любого серотипа AAV. Согласно одному варианту осуществления вирусная частица содержит капсидные белки из серотипа AAV, выбранного из группы, состоящей из AAV1, AAV2, AAV5, AAV8 и AAV9, которые более подходят для доставки в ЦНС (M. Hocquemiller et al., *Hum Gene Ther* 27(7): 478-496 (2016)). Согласно конкретному варианту осуществления вирусная частица содержит кассету экспрессии по настоящему изобретению, в которой последовательности 5' ITR и 3' ITR кассеты экспрессии относятся к серотипу AAV2, а белки капсида относятся к серотипу AAV9.

[262] В настоящей области техники известны многочисленные способы получения вирионов гAAV, включая в себя трансфекцию, получение стабильных клеточных линий и системы производства инфекционных гибридных вирусов, которые включают в себя гибриды аденовирус-AAV, гибриды герпесвирус-AAV (Conway, J E et al., (1997) *J. Virology* 71(11):8780-8789) и гибриды бакуловирис-AAV. Все культуры производства гAAV для

производства вирусных частиц гAAV требуют: 1) подходящие клетки-хозяева, включая в себя, например, клеточные линии человеческого происхождения, такие как клетки HeLa, A549 или 293, или клеточные линии, полученные из насекомых, такие как SF-9, в случае систем производства бакуловирусов; 2) подходящей функции вируса-помощника, обеспечиваемой аденовирусом дикого типа или мутантным аденовирусом (таким как чувствительный к температуре аденовирус), вирусом герпеса, бакуловирусом или плазмидной конструкцией, обеспечивающей вспомогательные функции; 3) гены гер и сар AAV и генные продукты; 4) трансген (например, содержащий один или несколько из: селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК, последовательность, кодирующую eTF, которая избирательно активирует SCN1A, как описано в настоящем документе, и/или селективный в отношении PV промотор), фланкированный последовательностями ITR AAV; и 5) подходящие носители и компоненты среды для поддержки производства гAAV.

[263] Согласно различным вариантам осуществления описанные в настоящем документе клетки-хозяева содержат следующие три компонента: (1) ген гер и ген сар, (2) гены, обеспечивающие вспомогательные функции, и (3) трансген (например, содержащий один или несколько из: селективного в отношении PV сайта связывания микроРНК, последовательности, кодирующей eTF, который избирательно активирует SCN1A, как описано в настоящем документе, и/или селективного в отношении PV промотора), фланкированных ITR. Ген гер AAV, ген сар AAV и гены, обеспечивающие вспомогательные функции, могут быть введены в клетку путем включения указанных генов в вектор, такой как, например, плазида, и введения указанного вектора в клетку-хозяина. Гены гер, сар и гены, обеспечивающие вспомогательные функции, могут быть включены в одну и ту же плазмиду или в разные плазмиды. Согласно предпочтительному варианту осуществления гены гер и сар AAV включены в одну плазмиду, а гены, обеспечивающие вспомогательные функции, включены в другую плазмиду. Различные плазмиды для создания клетки-хозяина для производства вирионов (например, содержащие гены гер и сар AAV, вспомогательных функций или трансген) могут быть введены в клетку с использованием любого подходящего способа, хорошо известного в настоящей области техники. Примеры способов трансфекции включают в себя, без ограничения, соосаждение с фосфатом кальция, DEAE-декстраном, полибренном, электропорацию, микроинъекцию, опосредованное липосомами слияние, липофекцию, ретровирусную инфекцию и биолистическую трансфекцию. Согласно определенным вариантам осуществления плазмиды, обеспечивающие гены гер и сар, вспомогательные функции и трансген, фланкированный ITR, могут быть введены в клетку одновременно. Согласно другому

варианту осуществления плазмиды, обеспечивающие гены гер и сар и вспомогательные функции, могут быть введены в клетку до или после введения плазмиды, содержащей трансген. Согласно иллюстративному варианту осуществления клетки трансфицируют одновременно тремя плазмидами (например, способом тройной трансфекции): (1) плазмидой, содержащей трансген (например, содержащей один или несколько из: селективного в отношении PV сайта связывания микроРНК, последовательности, кодирующей eTF, который избирательно активирует SCN1A, как описано в настоящем документе, и/или селективного в отношении PV промотора), фланкированного ITR, (2) плазмидой, содержащей гены гер и сар AAV, и (3) плазмидой, содержащей гены, обеспечивающие вспомогательные функции. Иллюстративные клетки-хозяева могут представлять собой клетки 293, A549 или HeLa.

[264] Согласно другим вариантам осуществления один или несколько из (1) генов гер и сар AAV, (2) генов, обеспечивающих вспомогательные функции, и (3) трансгена (например, содержащего один или несколько из: селективного в отношении PV сайта связывания микроРНК, последовательности, кодирующей eTF, который избирательно активирует SCN1A, как описано в настоящем документе, и/или селективного в отношении PV промотора), фланкированного ITR, может переноситься упаковывающей клеткой либо эписомально, либо интегрироваться в геном упаковывающей клетки. Согласно одному варианту осуществления клетки-хозяева могут представлять собой упаковывающие клетки, в которых гены гер и сар AAV и гены, обеспечивающие вспомогательные функции, стабильно поддерживаются в клетке-хозяине, и клетка-хозяин временно трансфицируется плазмидой, содержащей трансген (например, содержащей один или несколько из: селективного в отношении PV сайта связывания микроРНК, последовательности, кодирующей eTF, который избирательно активирует SCN1A, как описано в настоящем документе, и/или селективного в отношении PV промотора), фланкированный ITR. Согласно другому варианту осуществления клетки-хозяева представляют собой упаковывающие клетки, в которых гены гер и сар AAV стабильно поддерживаются в клетке-хозяине, и клетка-хозяин временно трансфицируется плазмидой, содержащей трансген (например, содержащей один или несколько из следующего: селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК, последовательность, кодирующая eTF, который избирательно активирует SCN1A, как описано в настоящем документе, и/или селективный в отношении PV промотор), фланкированный ITR и плазмидой, содержащей вспомогательные функции. Согласно другому варианту осуществления клетки-хозяева могут представлять собой упаковывающие клетки, в которых вспомогательные функции стабильно поддерживаются в клетке-хозяине, и клетка-хозяин временно трансфицируется

плазмидой, содержащей трансген (например, содержащий один или несколько из следующего: селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК, последовательность, кодирующая eTF, который избирательно активирует SCN1A, как описано в настоящем документе, и/или селективный в отношении PV промотор), фланкированный ITR, и плазмидой, содержащей гены гер и сар. Согласно другому варианту осуществления клетки-хозяева могут представлять собой клеточные линии-продуценты, которые стабильно трансфицируются генами гер и сар, генами, обеспечивающими вспомогательные функции, и последовательностью трансгена (например, содержащего одно или несколько из следующего: селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК, последовательность, кодирующая eTF, который избирательно активирует SCN1A, как описано в настоящем документе, и/или селективный в отношении PV промотор), фланкированного ITR. Иллюстративные упаковывающие клетки и клетки-продуценты могут происходить из клеток 293, A549 или HeLa.

[265] Согласно другому варианту осуществления линия клеток-продуцентов представляет собой линию клеток насекомых (как правило, клетки Sf9), которые инфицированы векторами экспрессии бакуловируса, которые обеспечивают белки Rep и Cap. Для этой системы не требуются гены-помощники аденовируса (Ayuso E, et al., *Curr. Gene Ther.* 2010, 10:423-436).

[266] Используемый в настоящем документе термин «белок сар» относится к полипептиду, обладающему по меньшей мере одной функциональной активностью нативного белка сар AAV (например, VP1, VP2, VP3). Примеры функциональной активности белков сар включают в себя способность индуцировать образование капсида, способствовать накоплению одноцепочечной ДНК, облегчать упаковку ДНК AAV в капсиды (т.е. инкапсидацию), связываться с клеточными рецепторами и облегчать проникновение вириона в клетки-хозяева. В принципе, в контексте настоящего изобретения можно использовать любой белок Cap.

[267] Сообщалось, что белки сар влияют на тропизм хозяина, специфичность клеток, тканей или органов, использование рецепторов, эффективность заражения и иммуногенность вирусов AAV. Соответственно, сар AAV для применения в гAAV может быть выбран с учетом, например, вида субъекта (например, человека или не человека), иммунологического состояния субъекта, его пригодности для длительного или краткосрочного лечения или конкретного терапевтического применения (например, лечение конкретного заболевания или нарушения или доставка в определенные клетки, ткани или органы). Согласно определенным вариантам осуществления белок сар

происходит из группы AAV, состоящей из серотипов AAV1, AAV2, AAV5, AAV8 и AAV9. Согласно иллюстративному варианту осуществления белок сар происходит из AAV9.

[268] Согласно некоторым вариантам осуществления сар AAV для применения в способе по настоящему изобретению может быть получен путем мутагенеза (т.е. путем вставок, делеций или замен) одного из вышеупомянутых сар AAV или кодирующей его нуклеиновой кислоты. Согласно определенным вариантам осуществления сар AAV по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% или более аналогичен одному или нескольким из вышеупомянутых сар AAV.

[269] Согласно некоторым вариантам осуществления сар AAV является химерным и содержит домены из двух, трех, четырех или более из вышеупомянутых сар AAV. Согласно определенным вариантам осуществления сар AAV представляет собой мозаику мономеров VP1, VP2 и VP3, происходящих из двух или трех различных AAV или рекомбинантного AAV. Согласно определенным вариантам осуществления композиция гAAV содержит более одного из вышеупомянутых сар.

[270] Согласно некоторым вариантам осуществления сар AAV для применения в вируоне гAAV сконструирован таким образом, чтобы он содержал гетерологичную последовательность или другую модификацию. Например, последовательность пептида или белка, обеспечивающая избирательное нацеливание или уклонение от иммунитета, может быть преобразована в белок сар. В качестве альтернативы или в дополнение, сар может быть химически модифицирован так, чтобы поверхность гAAV была полиэтиленгликолированной (т.е. пегилированной), что может способствовать уклонению от иммунитета. Белок сар также может быть мутагенизирован (например, для удаления его естественного связывания с рецептором или для маскировки иммуногенного эпитопа).

[271] Используемый в настоящем документе термин «белок гер» относится к полипептиду, обладающему по меньшей мере одной функциональной активностью нативного белка гер AAV (например, гер 40, 52, 68, 78). Примеры функциональной активности белка гер включают в себя любую активность, связанную с физиологической функцией белка, включая в себя облегчение репликации ДНК посредством распознавания, связывания и отсечения ориджина AAV репликации ДНК, а также активности ДНК-геликазы. Дополнительные функции включают в себя модуляцию транскрипции с промоторов AAV (или других гетерологичных) и сайт-специфическую интеграцию ДНК AAV в хромосому хозяина. Согласно конкретному варианту осуществления гены гер AAV могут происходить из серотипов AAV1, AAV2, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10 или AAVrh10; более предпочтительно из серотипа AAV, выбранного из группы, состоящей из AAV1, AAV2, AAV5, AAV8 и AAV9.

[272] Согласно определенным вариантам осуществления белок гер AAV для применения в способе по настоящему изобретению может быть получен путем мутагенеза (т.е. путем вставок, делеций или замен) одного из вышеупомянутых гер AAV или его кодирующей нуклеиновой кислоты. Согласно определенным вариантам осуществления гер AAV по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% или более аналогичен одному или нескольким из вышеупомянутых гер AAV.

[273] Используемые в настоящем документе выражения «вспомогательные функции» или «гены-помощники» относятся к вирусным белкам, репликация которых зависит от AAV. Вспомогательные функции включают в себя те белки, которые необходимы для репликации AAV, включая в себя, без ограничения, те белки, которые участвуют в активации транскрипции гена AAV, стадийспецифическом сплайсинге мРНК AAV, репликации ДНК AAV, синтезе продуктов экспрессии сар и сборке капсида AAV. Вспомогательные функции на основе вирусов могут быть получены из любого из известных вспомогательных вирусов, таких как аденовирус, вирус герпеса (кроме вируса простого герпеса типа 1) и вирус осповакцины. Вспомогательные функции включают в себя, без ограничения, аденовирус E1, E2a, VA и E4 или герпесвирус UL5, ULB, UL52 и UL29 и герпесвирусную полимеразу. Согласно предпочтительному варианту осуществления белки, от которых зависит репликация AAV, происходят от аденовируса.

[274] Согласно определенным вариантам осуществления вирусный белок, репликация которого зависит от AAV, для применения в способе по настоящему изобретению может быть получен путем мутагенеза (т.е. путем вставок, делеций или замен) одного из вышеупомянутых вирусных белков или кодирующей его нуклеиновой кислоты. Согласно определенным вариантам осуществления вирусный белок по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% или более аналогичен одному или нескольким из вышеупомянутых вирусных белков.

[275] Способы анализа функций белков сар, белков гер и вирусных белков, от которых зависит репликация AAV, хорошо известны в настоящей области техники.

[276] Клетки-хозяева для экспрессии представляющего интерес трансгена (например, содержащие одно или несколько из следующего: селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК, последовательность, кодирующая eTF, который избирательно активирует SCN1A, как описано в настоящем документе, и/или селективный в отношении PV промотор) могут быть выращены в условиях, подходящих для сборки вирионов AAV. Согласно определенным вариантам осуществления клетки-хозяева выращивают в течение подходящего периода времени, чтобы способствовать сборке вирионов AAV и высвобождению вирионов в среду. Как правило, клетки можно выращивать в течение

приблизительно 24 часов, приблизительно 36 часов, приблизительно 48 часов, приблизительно 72 часов, приблизительно 4 дней, приблизительно 5 дней, приблизительно 6 дней, приблизительно 7 дней, приблизительно 8 дней, приблизительно 9 дней или до приблизительно 10 дней. Приблизительно через 10 дней (или раньше, в зависимости от условий культивирования и конкретной используемой клетки-хозяина) уровень продукции, как правило, значительно снижается. Как правило, время культивирования измеряется с момента образования вируса. Например, в случае AAV производство вируса, как правило, начинается после обеспечения функции вируса-помощника в соответствующей клетке-хозяине, как описано в настоящем документе. Как правило, клетки собирают от приблизительно 48 до приблизительно 100, предпочтительно от приблизительно 48 до приблизительно 96, предпочтительно от приблизительно 72 до приблизительно 96, предпочтительно от приблизительно 68 до приблизительно 72 часов после заражения вирусом-помощником (или после начала производства вируса).

[277] Культуры-продуценты гAAV можно выращивать в различных условиях (в широком диапазоне температур, в течение различных периодов времени и т.п.), подходящих для конкретной используемой клетки-хозяина. Культуры производства гAAV включают в себя культуры, зависящие от прикрепления, которые можно культивировать в подходящих емкостях, зависящих от прикрепления, таких как, например, вращающиеся флаконы, фильтры из полого волокна, микроносители и биореакторы с уплотненным слоем или с псевдооживленным слоем. Культуры производства вектора гAAV могут также включать в себя адаптированные к суспензии клетки-хозяева, такие как клетки HeLa, 293 и SF-9, которые можно культивировать различными способами, включая в себя, например, вращающиеся колбы, биореакторы с мешалкой и одноразовые системы, такие как система одноразовых реакторов фирмы Wave.

[278] Подходящие среды, известные в настоящей области техники, могут использоваться для производства вирионов гAAV. Эти среды включают в себя, без ограничения, среды, производимые Nyclone Laboratories и JRH, включая в себя модифицированную среду Игла (MEM), модифицированную Дульбекко среду Игла (DMEM), каждая из которых полностью включена в настоящий документ посредством ссылки. Согласно определенным вариантам осуществления культуральная среда для производства гAAV может быть дополнена сывороткой или полученными из сыворотки рекомбинантными белками на уровне 0,5-20% (в объемном отношении или массово-объемном отношении). Альтернативно, векторы гAAV могут быть получены в бессывороточных условиях, которые также могут называться средами без продуктов животного происхождения.

[279] После культивирования клеток-хозяев, чтобы обеспечить производство вирионов AAV, полученные вирионы могут быть собраны и очищены. Согласно определенным вариантам осуществления вирионы AAV могут быть получены из (1) клеток-хозяев производственной культуры путем лизиса клеток-хозяев и/или (2) культуральной среды указанных клеток через период времени после трансфекции, предпочтительно 72 часа. Вирионы gAAV могут быть собраны из отработанной среды из производственной культуры при условии, что клетки культивируются в условиях, которые вызывают высвобождение вирионов gAAV в среду из интактных клеток (смотрите, например, патент США № 6566118). Подходящие способы лизирования клеток также известны в настоящей области техники и включают в себя, например, несколько циклов замораживания/оттаивания, обработку ультразвуком, микрофлюидизацию и обработку химическими веществами, такими как детергенты и/или протеазы.

[280] После сбора вирионы gAAV могут быть очищены. Используемый в настоящем документе термин «очищенный» включает в себя препарат вирионов gAAV, лишенный по меньшей мере некоторых других компонентов, которые также могут присутствовать там, где вирионы gAAV встречаются в природе или из которых изначально получены. Таким образом, например, очищенные вирионы gAAV могут быть получены с использованием способа выделения для обогащения их из исходной смеси, такой как лизат культуры или супернатант производственной культуры. Обогащение можно измерить множеством способов, например, по доле устойчивых к ДНКазам частиц (DRP) или копий генома (gc), присутствующих в растворе, или по инфекционности, или его можно измерить по отношению к второму, потенциально мешающему веществу, присутствующему в исходной смеси, такому как загрязняющие вещества, включая в себя загрязняющие вещества производственной культуры или технологические загрязняющие вещества, включая в себя вирус-помощник, компоненты среды и т.п.

[281] Согласно определенным вариантам осуществления выход культуры производства gAAV можно осветлить для удаления остатков клеток-хозяев. Согласно некоторым вариантам осуществления выход культуры производства можно осветлить с использованием множества стандартных технологий, таких как центрифугирование или фильтрация через фильтр с размером пор 0,2 мкм или более (например, фильтр из ацетата целлюлозы или серия глубинных фильтров).

[282] Согласно определенным вариантам осуществления выход культуры для производства gAAV дополнительно обрабатывают бензоназойTM для расщепления любой высокомолекулярной ДНК, присутствующей в производственной культуре. Согласно некоторым вариантам осуществления расщепление бензоназойTM проводят в стандартных

условиях, например, при конечной концентрации 1-2,5 единиц/мл бензоназы™ при температуре от температуры окружающей среды до 37°C в течение периода от 30 минут до нескольких часов.

[283] Согласно определенным вариантам осуществления вирионы гAAV могут быть выделены или очищены с использованием одной или нескольких из следующих стадий очистки: равновесное центрифугирование; проточная анионообменная фильтрация; тангенциальная проточная фильтрация (TFF) для концентрирования частиц гAAV; захват гAAV с помощью апатитовой хроматографии; тепловая инактивация вируса-помощника; захват гAAV с помощью хроматографии гидрофобного взаимодействия; замена буфера с помощью эксклюзионной хроматографии (SEC); нанофильтрация и захват гAAV с помощью анионообменной хроматографии, катионообменной хроматографии или аффинной хроматографии. Эти стадии можно использовать по отдельности, в различных комбинациях или в разном порядке. Способы очистки частиц гAAV можно найти, например, в Xiao et al., (1998) *Journal of Virology* 72:2224-2232; патентах США № 6989264 и 8137948 и WO 2010/148143.

[284] Согласно определенным вариантам осуществления очищенные вирионы AAV можно подвергнуть диализу против PBS, отфильтровать и хранить при температуре –80°C. Титры вирусных геномов можно определить с помощью количественной ПЦР с использованием линеаризованной плазмидной ДНК в качестве стандартной кривой (смотрите, например, Lock M, et al., *Hum. Gene Ther.* 2010; 21:1273-1285).

Фармацевтические композиции

[285] Согласно определенным вариантам осуществления в настоящей заявке представлены композиции, содержащие селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК и/или последовательность, кодирующую eTF, который избирательно активирует SCN1A, и фармацевтически приемлемый носитель. Согласно другим вариантам осуществления в настоящей заявке представлены вирионы, содержащие селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК и/или последовательность, кодирующую eTF, который избирательно активирует SCN1A, и фармацевтически приемлемый носитель. Согласно иллюстративным вариантам осуществления такие композиции подходят для применения в генной терапии. Фармацевтические композиции предпочтительно стерильны и стабильны в условиях производства и хранения. Стерильные растворы могут быть получены, например, путем фильтрации через стерильные фильтрующие мембраны.

[286] Приемлемые носители и вспомогательные вещества в фармацевтических композициях предпочтительно нетоксичны для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях. Приемлемые носители и вспомогательные вещества могут включать в себя

такие буферы, как фосфатный, цитратный, HEPES и TAE, такие антиоксиданты, как аскорбиновая кислота и метионин, такие консерванты, как гексаметоний хлорид, октадецилдиметилбензиламмонийхлорид, резорцин и хлорид бензалкония, такие белки, как сывороточный альбумин человека, желатин, декстран и иммуноглобулины, такие гидрофильные полимеры, как поливинилпирролидон, такие аминокислоты, как глицин, глутамин, гистидин и лизин, и такие углеводы, как глюкоза, манноза, сахароза и сорбитол. Фармацевтические композиции по настоящему раскрытию можно вводить парентерально в форме инъекционной композиции. Фармацевтические композиции для инъекций могут быть составлены с использованием стерильного раствора или любой фармацевтически приемлемой жидкости в качестве носителя. Фармацевтически приемлемые носители включают в себя, без ограничения, стерильную воду и физиологический раствор.

[287] Фармацевтические композиции по настоящему раскрытию могут быть приготовлены в микрокапсулах, таких как гидроксиметилцеллюлозные или желатиновые микрокапсулы и микрокапсулы из полиметилметакрилата. Фармацевтические композиции по настоящему раскрытию также могут быть приготовлены в других системах доставки лекарственных средств, таких как липосомы, микросферы альбумина, микроэмульсии, наночастицы и нанокапсулы. Фармацевтическая композиция для генной терапии может быть в приемлемом разбавителе или может содержать матрицу с медленным высвобождением, в которую встроен носитель для доставки гена.

[288] Представленные в настоящем документе фармацевтические композиции могут быть составлены для парентерального введения, подкожного введения, внутривенного введения, внутримышечного введения, внутриартериального введения, интрапаренхимального введения, интратекального введения, введения в мостомозжечковую цистерну, интрацеребровентрикулярного введения или внутрибрюшинного введения. Фармацевтическая композиция также может быть приготовлена или вводиться путем назального введения, посредством спрея, перорального, аэрозольного, ректального или вагинального введения. Согласно одному варианту осуществления представленная в настоящем документе фармацевтическая композиция вводится в ЦНС или спинномозговую жидкость (CSF), т.е. путем интрапаренхимальной инъекции, интратекальной инъекции, инъекции в мостомозжечковую цистерну или интрацеребровентрикулярной инъекции. Тканевая мишень может быть специфической, например, ЦНС, или может представлять собой комбинацию нескольких тканей, например, мышечных тканей и тканей ЦНС. Иллюстративная ткань или другие мишени могут включать в себя печень, скелетные мышцы, сердечную мышцу, жировые отложения, почки, легкие, эндотелий сосудов, эпителиальные клетки, кроветворные клетки, ЦНС и/или CSF.

Согласно предпочтительному варианту осуществления представленная в настоящем документе фармацевтическая композиция, содержащая селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК и/или eTF, который избирательно активирует SCN1A, вводится инъекцией в ЦНС или спинномозговую жидкость, т.е. путем интрапаренхимальной инъекции, интратекальной инъекции, инъекции в мостомозжечковую цистерну или интрацеребровентрикулярной инъекции. Один или несколько из этих способов можно использовать для введения фармацевтической композиции по настоящему раскрытию.

[289] Согласно определенным вариантам осуществления представленная в настоящем документе фармацевтическая композиция содержит «эффективное количество» или «терапевтически эффективное количество». В контексте настоящего описания такие количества относятся к количеству, эффективному в дозировках и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого терапевтического результата, такого как повышение уровня экспрессии SCN1A и/или уменьшение частоты и/или продолжительности припадков.

[290] Дозировка фармацевтических композиций по настоящему раскрытию зависит от факторов, включающих в себя путь введения, заболевание, которое необходимо лечить, и физические характеристики (например, возраст, массу, общее состояние здоровья) субъекта. Дозировка может быть скорректирована для обеспечения оптимального терапевтического ответа. Как правило, дозировка может представлять собой количество, которое эффективно лечит заболевание, не вызывая значительной токсичности. Согласно одному варианту осуществления представленный в настоящем документе вектор AAV можно вводить пациенту для лечения дефицита SCN1A (включая в себя, например, синдром Драве) в количестве или дозе в диапазоне от 5×10^{11} до 1×10^{14} гк/кг (количество геномных копий на килограмм массы тела пациента (гк/кг)). Согласно более конкретному варианту осуществления вектор AAV вводят в количестве, которое находится в диапазоне от приблизительно 5×10^{11} гк/кг до приблизительно 3×10^{13} гк/кг или от приблизительно 1×10^{12} до приблизительно 1×10^{14} гк/кг, или от приблизительно 1×10^{12} до приблизительно 1×10^{13} гк/кг, или приблизительно 5×10^{11} гк/кг, 1×10^{12} гк/кг, $1,5 \times 10^{12}$ гк/кг, $2,0 \times 10^{12}$ гк/кг, $2,5 \times 10^{12}$ гк/кг, 3×10^{12} гк/кг, $3,5 \times 10^{12}$ гк/кг, 4×10^{12} гк/кг, $4,5 \times 10^{12}$ гк/кг, 5×10^{12} гк/кг, $5,5 \times 10^{12}$ гк/кг, 6×10^{12} гк/кг, $6,5 \times 10^{12}$ гк/кг, 7×10^{12} гк/кг, $7,5 \times 10^{12}$ гк/кг, 8×10^{12} гк/кг, $8,5 \times 10^{12}$ гк/кг, 9×10^{12} гк/кг или $9,5 \times 10^{12}$ гк/кг. гк/кг можно определить, например, с помощью кПЦР или цифровой капельной ПЦР (ddPCR) (смотрите, например, M. Lock et al, Hum Gene Ther Methods. 2014 Apr;25(2): 115-25). Согласно другому варианту осуществления представленный в настоящем документе вектор AAV можно вводить пациенту для лечения дефицита SCN1A (включая в себя, например, синдром Драве) в количестве или дозе в диапазоне от 1×10^9 до

1×10^{11} iu/kg (инфекционные единицы вектора (iu)/масса тела субъекта или пациента (кг)). Согласно определенным вариантам осуществления фармацевтическая композиция может быть приготовлена в виде стандартной дозы по мере необходимости. Такие единичные дозированные единицы могут содержать от приблизительно 1×10^9 gc до приблизительно 1×10^{15} gc.

[291] Фармацевтические композиции по настоящему раскрытию можно вводить нуждающемуся в этом субъекту, например, один или несколько раз (например, 1-10 раз или более) ежедневно, еженедельно, ежемесячно, два раза в год, ежегодно или по медицинским показаниям. Согласно иллюстративному варианту осуществления достаточно однократного введения. Согласно одному варианту осуществления фармацевтическая композиция, содержащая кассету экспрессии, кодирующую селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК и/или eTF, который избирательно активирует SCN1A, подходит для применения у людей и вводится путем интрапаренхимальной инъекции, интратекальной инъекции, инъекции в мостомозжечковую цистерну или интрацеребровентрикулярной инъекции. Согласно одному варианту осуществления фармацевтическая композиция доставляется через периферическую вену путем болюсной инъекции. Согласно другим вариантам осуществления фармацевтическая композиция доставляется через периферическую вену путем инфузии в течение приблизительно 10 минут (± 5 минут), в течение приблизительно 20 минут (± 5 минут), в течение приблизительно 30 минут (± 5 минут), в течение приблизительно 60 минут (± 5 минут) или в течение более чем 90 минут (± 10 минут).

[292] Согласно другому аспекту в настоящей заявке дополнительно представлен набор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, вектор, клетку-хозяина, вирион или фармацевтическую композицию, как описано в настоящем документе, в одном или нескольких контейнерах. Набор может содержать инструкции или упаковочные материалы, которые описывают, как вводить пациенту молекулу нуклеиновой кислоты, вектор, клетку-хозяина или вирион, содержащиеся в наборе. Контейнеры набора могут быть из любого подходящего материала, например, стекла, пластика, металла и т.д., и быть любого подходящего размера, формы или конфигурации. Согласно определенным вариантам осуществления наборы могут содержать одну или несколько ампул или шприцев, которые содержат молекулу нуклеиновой кислоты, вектор, клетку-хозяина, вирион или фармацевтическую композицию в подходящей жидкости или форме раствора.

Способы лечения

[293] Согласно одному аспекту в настоящей заявке представлены способы применения eTF, которые избирательно активируют SCN1A, как раскрыто в настоящем документе.

Согласно определенным вариантам осуществления в настоящей заявке представлены способы введения кассеты экспрессии, вектора экспрессии или вирусной частицы, содержащей полинуклеотид, кодирующий eTF, который избирательно активирует SCN1A, как раскрыто в настоящем документе, для усиления экспрессии SCN1A в клетке. Согласно различным вариантам осуществления eTF, который избирательно активирует SCN1A, как раскрыто в настоящем документе, можно использовать для модуляции экспрессии SCN1A в клетке *in vitro*, *in vivo* или *ex vivo*.

[294] Согласно определенным вариантам осуществления в настоящей заявке представлены способы лечения заболевания или нарушения, связанного с SCN1A, путем введения субъекту кассеты экспрессии, вектора экспрессии или вирусной частицы, содержащей полинуклеотид, кодирующий eTF, который избирательно активирует SCN1A, как раскрыто в настоящем документе, при необходимости. Согласно определенным вариантам осуществления нарушение представляет собой нарушение центральной нервной системы. Согласно иллюстративным вариантам осуществления заболевание или нарушение связано с гаплонедостаточностью SCN1A. Согласно определенным вариантам осуществления нарушение представляет собой эпилепсию, связанную с гаплонедостаточностью SCN1A. Согласно определенным вариантам осуществления гаплонедостаточность является результатом того, что субъект является гетерозиготным по мутации потери функции гена SCN1A. Согласно определенным вариантам осуществления нарушение представляет собой эпилепсию, связанную со вставкой, делецией или заменой в гене SCN1A. Согласно определенным вариантам осуществления нарушение представляет собой эпилепсию, связанную с точечной мутацией в гене SCN1A. Согласно определенным вариантам осуществления способ лечения заболевания или нарушения предусматривает введение кассеты экспрессии, вектора экспрессии или вирусной частицы, содержащей полинуклеотид, кодирующий eTF, который избирательно активирует SCN1A, как раскрыто в настоящем документе, так что недостаточная экспрессия SCN1A корректируется, доводится до пределов уровня здорового человека или доводится до нормального диапазона, определенного стандартом медицинской помощи. Согласно определенным вариантам осуществления раскрытые в настоящем документе способы применяются для лечения заболевания или нарушения, связанного с эндогенным SCN1A, содержащим одну или несколько мутаций, которые приводят к аномальной экспрессии SCN1A.

[295] Согласно определенным вариантам осуществления в настоящей заявке представлены способы облегчения симптома, связанного с заболеванием или нарушением, путем введения кассеты экспрессии, вектора экспрессии или вирусной частицы,

содержащей полинуклеотид, кодирующий eTF, который избирательно активирует SCN1A, как раскрыто в настоящем документе, нуждающемуся в этом субъекту.

[296] Согласно иллюстративному варианту осуществления в настоящей заявке представлены способы лечения заболевания, нарушения или симптома, связанного с мутацией в SCN1A (например, точечной мутацией, заменой, делецией, инверсией и т.д.), дефицитом в Nav1.1 и/или снижением активности Nav1.1 путем введения нуждающемуся в этом субъекту кассеты экспрессии, вектора экспрессии или вирусной частицы, содержащей полинуклеотид, кодирующий eTF, который избирательно усиливает экспрессию гена SCN1A или его белкового продукта Nav1.1. Управляемые напряжением ионные натриевые каналы важны для генерации и распространения потенциалов действия в поперечно-полосатых мышцах и нервных тканях. Управляемые напряжением ионные натриевые каналы представляют собой гетеромерные комплексы, состоящие из большой центральной порообразующей гликозилированной альфа-субъединицы и двух меньших вспомогательных бета-субъединиц. Большая альфа-субъединица субъединица Nav1.1, кодируемая геном SCN1A, актуальна для различных заболеваний или нарушений, таких как синдром Драве. Nav1.1 экспрессируется в нейронах и может быть собрана с различными бета-субъединицами, включая в себя Nav β 1, экспрессируемую геном SCN1B.

[297] Согласно определенным вариантам осуществления в настоящей заявке представлены способы лечения заболеваний, связанных с мутацией в SCN1A (например, делецией, вставкой, инверсией, точечной мутацией (например, нонсенс-мутацией, миссенс-мутацией) и т.д.) или сниженной активностью Nav1.1 с использованием eTF, который избирательно повышает экспрессию эндогенного гена SCN1A. Заболевания и нарушения, связанные с мутациями SCN1A, включают в себя, без ограничения: синдром Драве, синдром Охтаха, эпилепсию, раннюю детскую эпилептическую энцефалопатию 6 (EIEE6), семейные фебрильные припадки 3A (FEB3A), трудноизлечимую детскую эпилепсию с генерализованными тонико-клоническими припадками (ICEGTC), мигрень, семейную гемиплегию 3 (FHM3), синдром Панайотопулоса, семейную фибрилляцию предсердий 13 (ATFB13), генерализованную эпилепсию с фебрильными судорогами плюс типа 1 (gefs + тип 1), синдром Бругада, неспецифический дефект сердечной проводимости, генерализованную эпилепсию плюс, доброкачественный ранний младенческий эпилептический синдром, раннюю детскую эпилептическую энцефалопатию (EIEE11), доброкачественную семейную детскую эпилепсию, нейродегенерацию, таупатии и болезнь Альцгеймера. В некоторых случаях неврологическим заболеванием является синдром Драве. Мутации или аномалии в SCN1A также были связаны с судорожными расстройствами, эпилепсией, аутизмом, семейной гемиплегической мигренью 3 типа

(FHM3), генетической эпилепсией с фебрильными припадками плюс (GEFS+) и эффективностью некоторых противосудорожных лекарственных средств. Например, мутация ICS5N+5G>A в SCN1A связана с максимально безопасным количеством (дозой) противосудорожных лекарственных средств фенитоина и карбамазепина.

[298] Согласно определенным вариантам осуществления в настоящей заявке представлен способ лечения субъекта с синдромом Драве или с риском его развития путем введения кассеты экспрессии, вектора экспрессии или вирусной частицы, содержащей полинуклеотид, кодирующий eTF, который избирательно активирует SCN1A. Синдром Драве характеризуется продолжительными фебрильными и нефебрильными припадками в течение первого года жизни ребенка. Это заболевание прогрессирует до других типов припадков, таких как миоклонические и парциальные припадки, задержка психомоторного развития и атаксия. Оно характеризуется когнитивными нарушениями, поведенческими нарушениями и двигательными нарушениями. Поведенческие нарушения часто включают в себя гиперактивность и импульсивность, а в более редких случаях - аутистическое поведение. Синдром Драве также связан с нарушениями сна, включая в себя сонливость и бессонницу. У многих пациентов синдром Драве вызван генетическими мутациями, которые приводят к выработке нефункциональных белков. При лечении заболеваний, связанных с генетическими причинами, существует множество проблем. Таким образом, большинство существующих способов лечения было направлено на профилактическое лечение припадков и других симптомов.

[299] У 70-90% пациентов синдром Драве вызывается нонсенс-мутациями в гене SCN1A, что приводит к преждевременному стоп-кодону и, следовательно, к нефункциональному белку. Как правило, миссенс-мутация в сегменте S5 или S6 поры натриевого канала приводит к потере функции канала и развитию синдрома Драве. Гетерозиготное наследование мутации SCN1A, например, нонсенс-мутация, миссенс-мутация, делеция, вставка, инверсия и т.д. - это все, что необходимо для развития дефектного натриевого канала; у пациентов с синдромом Драве останется одна нормальная копия гена. Таким образом, заболевание характеризуется как гаплонедостаточность, и, таким образом, увеличение экспрессии функционирующей копии SCN1A может восстанавливать нормальные уровни продукции Nav1.1.

[300] Симптомы, связанные с синдромом Драве, включают в себя судороги, дефекты памяти, задержку развития, низкий мышечный тонус и/или когнитивные проблемы. Лечение кассетой экспрессии, вектором экспрессии или вириальной частицей, описанными в настоящем документе, может привести к улучшению одного или нескольких симптомов, таких как уменьшение количества, продолжительности и/или интенсивности припадков.

Введение генной терапии, как описано в настоящем документе, субъекту с риском развития синдрома Драве может предотвратить развитие или замедлить прогрессирование одного или нескольких симптомов Драве.

[301] Согласно определенным вариантам осуществления лечение кассетой экспрессии, вектором экспрессии или вириальной частицей, содержащей полинуклеотид, кодирующий eTF, который избирательно активирует SCN1A, как описано в настоящем документе, снижает продолжительность и/или частоту припадков, например, припадков, связанных с синдромом Драве, по меньшей мере на 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 95% или более по сравнению с не подвергнутым лечению контролем или по сравнению с уровнем до лечения.

[302] У некоторых пациентов с болезнью Альцгеймера выработка амилоида β (A β) с участием многих пептидов и протеаз может влиять на возбудимость нейронов, вызывая припадки и подавляя регуляцию натриевого канала Nav1.1 в нейронах PV. Согласно другому варианту осуществления в настоящей заявке представлены способы лечения субъекта, страдающего болезнью Альцгеймера, путем введения описанной в настоящем документе кассеты экспрессии, вектора экспрессии или вирусной частицы, которая содержит полинуклеотид, кодирующий eTF, который избирательно активирует SCN1A. Симптомы, связанные с болезнью Альцгеймера, включают в себя кратковременную потерю памяти, когнитивные трудности, припадки и трудности с речью, исполнительными функциями, восприятием (агнозия) и выполнением движений (апраксия). Лечение кассетой экспрессии, вектором экспрессии или вирусной частицей, содержащей полинуклеотид, кодирующий eTF, который избирательно активирует SCN1A, может привести к улучшению одного или нескольких симптомов болезни Альцгеймера, таких как снижение прогрессирования потери памяти или предотвращение одного или нескольких симптомов. В некоторых случаях лечение может привести к коррекции активности головного мозга с высокой мощностью гамма-излучения. Лечение может привести к снижению частоты припадков и/или тяжести припадков или снижению активности высокой мощности гамма-излучения по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% или более, как по сравнению с отсутствием лечения. В некоторых случаях лечение может привести к улучшению когнитивных функций. Обучение и/или память могут быть улучшены по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% или более чем на 100% по сравнению с отсутствием лечения или перед лечением полинуклеотидом,

кодирующим eTF, который избирательно активирует SCN1A, как раскрыто в настоящем документе.

[303] В некоторых случаях лечение кассетой экспрессии, вектором экспрессии или вирусной частицей, содержащей полинуклеотид, кодирующий eTF, который избирательно активирует SCN1A, снижает активность высокой мощности гамма-излучения (например, активность высокой мощности гамма-излучения, связанную с болезнью Альцгеймера) по меньшей мере на 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95% по сравнению с не подвергнутым лечению контролем или по сравнению с уровнем до лечения.

[304] Паркинсонизм относится к совокупности признаков и симптомов, обнаруживаемых при болезни Паркинсона (PD), включая в себя медлительность (брадикинезию), тугоподвижность (ригидность), тремор и дисбаланс (постуральную нестабильность). В некоторых случаях введение кассеты экспрессии, вектора экспрессии или вирусной частицы, содержащей полинуклеотид, кодирующий eTF, который избирательно активирует SCN1A, как описано в настоящем документе, субъекту с риском развития или страдающим болезнью Паркинсона может предотвратить развитие одного или нескольких симптомов или замедлить прогрессирование болезни Паркинсона по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80% или по меньшей мере на 90% по сравнению с отсутствием лечения.

[305] Согласно определенным вариантам осуществления в настоящей заявке представлены способы, которые можно применять для лечения субъекта, который находится в группе риска развития заболевания. Может быть известно, что субъект предрасположен к заболеванию, например, неврологическому заболеванию или заболеванию, связанному с эпилепсией, припадками и/или энцефалопатией. Субъект может быть предрасположен к заболеванию из-за генетического события или из-за известных факторов риска. Например, субъект может нести мутацию в SCN1A, которая связана с эпилепсией (такой как, например, синдром Драве). Любая мутация в гене SCN1A, которая снижает его активность (за счет снижения уровней экспрессии, нарушения функции белка или комбинации обоих), может предрасполагать субъекта к заболеванию, включая в себя любое одно или несколько из вставок, делеций, инверсий, транслокаций или замен (например, точечные мутации, включая в себя нонсенс-мутации и/или миссенс-мутации) в гене SCN1A. В некоторых случаях субъект может быть предрасположен к такому

заболеванию, как болезнь Альцгеймера, из-за возраста субъекта. В некоторых случаях у субъекта может быть недостаточное количество белка SCN1A, и лечение заболевания, связанного с SCN1A, предусматривает введение кассеты экспрессии, вектора экспрессии или вирусной частицы, содержащей полинуклеотид, кодирующий eTF, который избирательно активирует эндогенный SCN1A, как описано в настоящем документе.

[306] Согласно определенным вариантам осуществления лечение с использованием кассеты экспрессии, вектора экспрессии или вирусной частицы, содержащей полинуклеотид, кодирующий eTF, который избирательно активирует эндогенный SCN1A, представленный в настоящем документе, может привести к уменьшению или прекращению симптомов, связанных с синдромом Драве или другим заболеванием, связанным с SCN1A, или нарушением, например, эпилепсией, связанной с гаплонедостаточностью SCN1A. Например, лечение может улучшить обучение, память, когнитивные и/или двигательные функции; уменьшить частоту и/или продолжительность припадков; и/или снизить температурную чувствительность (или увеличить температурный порог для запуска припадков).

[307] Согласно другому аспекту в настоящей заявке представлены способы селективной экспрессии трансгена в PV-содержащих нейронах путем введения кассеты экспрессии, вектора экспрессии или вирусной частицы, содержащей по меньшей мере один селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК. Согласно определенным вариантам осуществления в настоящей заявке представлены способы селективной экспрессии трансгена в PV-содержащих нейронах приматов путем введения кассеты экспрессии, вектора экспрессии или вирусной частицы, содержащей трансген и по меньшей мере один селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК. Согласно определенным вариантам осуществления в настоящей заявке представлены способы селективной экспрессии трансгена в PV-содержащих нейронах путем введения кассеты экспрессии, вектора экспрессии или вирусной частицы, содержащей селективный в отношении PV регуляторный элемент, функционально связанный с трансгеном, и по меньшей мере один селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК. Согласно иллюстративным вариантам осуществления трансген содержит последовательность, кодирующую любой из eTF, который избирательно активирует SCN1A, как описано в настоящем документе.

[308] Согласно определенным вариантам осуществления в настоящей заявке представлен способ генной терапии, предусматривающий введение субъекту кассеты экспрессии, вектора экспрессии или вирусной частицы, содержащей трансген и по меньшей мере один селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК. Согласно

определенным вариантам осуществления в заявке представлены способы генной терапии, предусматривающие введение субъекту кассеты экспрессии, вектора экспрессии или вирусной частицы, содержащей селективный в отношении PV регуляторный элемент, функционально связанный с трансгеном, и по меньшей мере один селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК. Согласно иллюстративным вариантам осуществления трансген содержит последовательность, кодирующую любой из eTF, который избирательно активирует SCN1A, как описано в настоящем документе.

[309] Согласно определенным вариантам осуществления в настоящей заявке представлен способ лечения заболевания или нарушения, предусматривающий введение кассеты экспрессии, вектора экспрессии или вирусной частицы, содержащей трансген и по меньшей мере один селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК. Согласно определенным вариантам осуществления в заявке представлены способы лечения заболевания или нарушения, предусматривающие введение субъекту кассеты экспрессии, вектора экспрессии или вирусной частицы, содержащей селективный в отношении PV регуляторный элемент, функционально связанный с трансгеном, и по меньшей мере один селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК. Согласно иллюстративным вариантам осуществления трансген содержит последовательность, кодирующую любой из eTF, который избирательно активирует SCN1A, как описано в настоящем документе. Согласно определенным вариантам осуществления кассета экспрессии, вектор экспрессии или вирусная частица, содержащая трансген и селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК, и, необязательно, селективный в отношении PV регуляторный элемент, могут быть использованы для лечения заболевания или нарушения, в которое вовлечены PV-содержащие нейроны. Согласно определенным вариантам осуществления кассета экспрессии, вектор экспрессии или вирусная частица, содержащая трансген и селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК и, возможно, селективный в отношении PV регуляторный элемент, используются для лечения состояния нейронов. Нейрональные заболевания или нарушения, подходящие для лечения, включают в себя, без ограничения, синдром Драве, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, болезнь Хантингтона, боковой амиотрофический склероз (ALS), спинальную мышечную атрофию (SMA), эпилепсию, нейродегенеративные нарушения, двигательные нарушения, нарушения настроения, болезни двигательных нейронов, прогрессирующую мышечную атрофию (PMA), прогрессирующий бульбарный паралич, псевдобульбарный паралич, первичный боковой склероз, неврологические последствия СПИДа, нарушения развития, рассеянный склероз, нейрогенетические нарушения, инсульт, травму спинного мозга, черепно-мозговую травму, таупатию, гиповозбудимость нейронов и/или припадки.

Согласно некоторым вариантам осуществления вирусный вектор, вирусная частица или фармацевтическая композиция, содержащая трансген и селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК и необязательно селективный в отношении PV регуляторный элемент, используются для лечения психического расстройства (например, шизофрении, обсессивно-компульсивного расстройства, наркомании, депрессии, тревоги, психоза); расстройства аутистического спектра (например, синдрома ломкой X-хромосомы, синдрома Ретта); эпилепсии (например, синдрома Драве, хронической травматической энцефалопатии, генерализованной эпилепсии с фебрильными припадками плюс (GEFS+), эпилептической энцефалопатии, височной эпилепсии, фокальной эпилепсии, туберозного склероза, эпилепсии, связанной с гаплонедостаточностью SCN1A); и/или нейродегенерации (например, болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона). Заболевания, связанные с дисфункциональными нейронами PV, например, вызванные мутациями потери функции в SCN1A или Nav1.1, включают в себя: синдром Драве, синдром Охтаха, эпилепсию, раннюю детскую эпилептическую энцефалопатию 6 (EIEE6), семейные фебрильные припадки 3A (FEB3A), трудноизлечимую детскую эпилепсию с генерализованными тонико-клоническими припадками (ICEGTC), мигрень, семейную гемиплегию 3 (FHM3), синдром Панайотопулоса, семейную фибрилляцию предсердий 13 (ATFB13), генерализованную эпилепсию с фебрильными припадками плюс типа 1 (gefs + тип 1), неспецифический кардиальный синдром, неспецифический синдром Бругада дефект проводимости, генерализованную эпилепсию с фебрильными припадками плюс, доброкачественный ранний младенческий эпилептический синдром, раннюю детскую эпилептическую энцефалопатию 11 (EIEE11), доброкачественную семейную детскую эпилепсию, нейродегенерацию, таупатии и болезнь Альцгеймера.

[310] Согласно определенным вариантам осуществления лечение с использованием кассеты экспрессии, вектора экспрессии или вирусной частицы, содержащей трансген и селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК, и, возможно, селективный в отношении PV регуляторный элемент, описанный в настоящем документе, приводит к улучшению симптомов, связанных с заболеванием или нарушением нейронов. Например, за пациентом с болезнью Паркинсона можно наблюдать симптоматически на предмет улучшения двигательных функций, что указывает на положительный ответ на лечение. Введение терапии с использованием описанного в настоящем документе способа субъекту с риском развития нейронального нарушения может предотвратить развитие или замедлить прогрессирование одного или нескольких симптомов.

[311] Согласно определенным вариантам осуществления кассета экспрессии, вектор экспрессии или вирусная частица, содержащая трансген и селективный в отношении PV

сайт связывания микроРНК, и, необязательно, селективный в отношении PV регуляторный элемент, представленные в настоящем документе, могут быть использованы для лечения субъекта, у которого было диагностировано заболевание нейронов, например, эпилепсия, связанная с гаплонедостаточностью SCN1A, такая как, например, синдром Драве. Согласно различным вариантам осуществления любое из нейрональных заболеваний или нарушений, описанных в настоящем документе, вызвано известным генетическим событием (например, любой из мутаций SCN1A, известных в настоящей области техники) или имеет неизвестную причину.

[312] Согласно определенным вариантам осуществления кассета экспрессии, вектор экспрессии или вирусная частица, содержащая трансген и селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК, и, возможно, селективный в отношении PV регуляторный элемент, представленные в настоящем документе, могут быть использованы для лечения субъекта, который находится в группе риска развития заболевания или нарушения. Согласно определенным вариантам осуществления может быть известно, что субъект предрасположен к заболеванию, например, нейрональному заболеванию (например, эпилепсии, связанной с гаплонедостаточностью SCN1A, такой как, например, синдром Драве). Согласно определенным вариантам осуществления субъект может быть предрасположен к заболеванию из-за генетического события или из-за известных факторов риска. Например, субъект может нести мутацию в SCN1A, которая связана с эпилепсией или синдромом Драве, например, вставку, делецию, инверсию, транслокацию или замену (например, точечную мутацию, включая в себя нонсенс-мутацию и/или миссенс-мутацию).

[313] Согласно определенным вариантам осуществления кассета экспрессии, вектор экспрессии или вирусная частица, содержащая трансген и селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК, и, возможно, селективный регуляторный элемент PV, представленные в настоящем документе, могут быть использованы для уменьшения одного или нескольких симптомов, связанных с заболеванием или нарушением. Например, симптомы, связанные с синдромом Драве, включают в себя судороги, дефекты памяти, задержку развития, плохой мышечный тонус и/или когнитивные проблемы. Лечение вирусным вектором, вирусной частицей или фармацевтической композицией, содержащей трансген и селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК и, необязательно, селективный в отношении PV регуляторный элемент, представленные в настоящем документе, может привести к улучшению одного или нескольких симптомов, таких как уменьшение количества, продолжительности и/или интенсивности припадков.

[314] Согласно определенным вариантам осуществления описанные в настоящем документе способы используются для увеличения экспрессии трансгена в нейроне PV,

генной терапии или лечения заболевания или нарушения у приматов. Согласно определенным вариантам осуществления примат представляет собой человека. Согласно определенным вариантам осуществления примат представляет собой отличного от человека примата. Согласно определенным вариантам осуществления отличный от человека примат представляет собой обезьяну старого мира, орангутана, гориллу, шимпанзе, яванского макака, макака-резус или свинохвостого макака.

[315] Термины «субъект» и «индивидуум» используются в настоящем документе взаимозаменяемо для обозначения позвоночного животного, предпочтительно млекопитающего, более предпочтительно человека. Описанные в настоящем документе способы могут быть применимы в терапевтических целях для человека, в ветеринарии и/или в доклинических исследованиях на животных моделях заболевания или состояния. Согласно различным вариантам осуществления субъект, которого можно лечить в соответствии с описанными в настоящем документе способами, представляет собой млекопитающее, такое как, например, мышь, крыса, хомяк, морская свинка, песчанка, корова, овца, свинья, коза, осел, лошадь, собака, кошка, лама, обезьяна (например, обезьяна старого мира, мартышка или макак, такой как макак-резус, свинохвостый макак или яванский макак (например, макак-крабод)), обезьяна (например, орангутан, горилла или шимпанзе) или человек. Согласно иллюстративному варианту осуществления субъект представляет собой человека.

[316] В следующих таблицах представлены раскрытые в настоящем документе последовательности.

Таблица 1. Раскрытые в настоящем документе иллюстративные сконструированные факторы транскрипции. Последовательности регуляторных элементов (RE) раскрыты ниже в **таблицах 2 и 8**. Для RE, когда указан m1, это означает, что сайт связывания микроРНК m1 (SEQ ID NO: 7, **таблица 8**) включен между кодирующей областью и полиА-хвостом. Последовательности ДНК-связывающих доменов (DBD) раскрыты ниже в **таблице 3**. Для DBD сконструированный «цинковый палец» (eZF) указывает на то, что конструкция имеет формулу, изложенную в SEQ ID NO: 147 (**таблица 10**); EGR1 указывает на то, что DBD происходит от человеческого EGR1 дикого типа (SEQ ID NO: 176; **таблица 12**); и EGR3 указывает на то, что DBD происходит от человеческого EGR3 дикого типа (SEQ ID NO: 175, **таблица 12**). Последовательности для целевых сайтов (например, последовательности, связанные с DBD) представлены в **таблице 4** ниже. Последовательности для доменов активации транскрипции (TAD) раскрыты ниже в **таблице 5**. Для TAD (с) указывает на то, что TAD расположен на с-конце DBD, (n) указывает на то, что TAD расположен на n-конце

DBD, (n/c) означает, что существует TAD, расположенный как на n-конце, так и на c-конце DBD, а 2x CITED4 (n) указывает на то, что есть 2 копии TAD CITED4, расположенные на n-конце DBD. Последовательности сконструированных факторов транскрипции полной длины (DBD + TAD) представлены в **таблице 6** ниже.

Конструкция	RE	DBD	Целевой сайт	TAD (положение)	SEQ ID NO (DBD)	SEQ ID NO (DBD + TAD)
1	RE 1	eZF	Z13	VPR (c)	89	99
2	RE 1	eZF	Z1	VPR (c)	77	100
3	RE 1	eZF	Z13	VP64 (c)	89	101
4	RE 1	eZF	Z1	VP64 (c)	77	102
5	RE 1	EGR1	Z13	CITED4 (n/c)	93	103
6	RE 1	EGR1	Z13	CITED4 (n)	93	104
7	RE 1	EGR1	Z1	CITED4 (n/c)	92	105
8	RE 1	EGR1	Z1	CITED4 (n)	92	106
9	RE 1	EGR1	Z1	CITED4 (c)	92	107
10	RE 1	EGR1	Z1	CITED2 (c)	92	108
11	RE 1	EGR1	Z1	CITED2 (n)	92	109
12	RE 1	EGR3	Z1	CITED4 (n/c)	96	110
13	RE 1	EGR3	Z1	CITED4 (c)	96	111
14	RE 1	EGR3	Z1	CITED2 (c)	96	112
15	RE 1	EGR3	Z1	CITED2 (n)	96	113
16	CBA	EGR3	Z15	N/A	98	114
17	RE 1	EGR1	Z13	N/A	93	115
18	RE 1	EGR1	Z15	N/A	94	116
19	RE 1	EGR1	Z13	N/A	93	117
20	RE 1	EGR1	Z13	N/A	93	115
21	RE 1	EGR1	Z1	N/A	92	118
22	CBA	EGR3	Z13	N/A	97	119
23	RE 1	EGR1	Z17	N/A	95	120
24	RE 1	EGR1	Z13	N/A	93	121
25	CBA	EGR3	Z1	N/A	96	122
26	RE 1	EGR1	Z1	N/A	92	123
27	RE 1	EGR1	Z1	N/A	92	124
28	RE 1	eZF	Z8	VP64 (c)	84	125
29	RE 1	eZF	Z14	VP64 (c)	90	126
30	CBA	eZF	Z13	VPR (c)	89	99
31	RE 2 (m1)	eZF	Z1	VP64 (c)	77	102
32	RE 2	eZF	Z1	VP64 (c)	77	102
33	RE 2	eZF	Z1	VPR (c)	77	100
34	RE 2	eZF	Z1	VP64 (c)	77	127
35	RE 2 (m1)	eZF	Z1	VP64 (c)	77	127
36	RE 2	EGR1	Z1	CITED4 (n)	92	128
37	RE 2 (m1)	EGR1	Z1	CITED4 (n)	92	106
38	RE 2 (m1)	EGR1	Z1	CITED4 (n)	92	129
39	RE 2 (m1)	EGR1	Z1	CITED4 (n/c)	92	105
40	RE 2 (m1)	EGR1	Z1	2x CITED4 (n)	92	130

Конструкция	RE	DBD	Целевой сайт	TAD (положение)	SEQ ID NO (DBD)	SEQ ID NO (DBD + TAD)
41	RE 2 (m1)	EGR1	Z1	2x CITED4 (n)	92	131
42	RE 2 (m2)	eZF	Z1	VP64 (c)	77	102
43	RE 2 (m3)	eZF	Z1	VP64 (c)	77	102
44	RE 2 (m2)	EGR1	Z1	CITED4 (n)	92	106
45	RE 2 (m3)	EGR1	Z1	CITED4 (n)	92	106
46	RE 1	EGR1	Z1	CITED4 (n)	92	205
47	RE 1	EGR1	Z1	2x CITED4 (n)	92	207
48	RE 1	EGR1	Z1	2x CITED4 (n)	92	209
49	CBA	eZF	Z1	CREB3 (n)	77	213
50	CBA	EGR1	Z1	CREB3 (n)	92 (без C-конц. Lys)	217
51	CBA	EGR1	Z13	CREB3 (n)	93 (без C-конц. Lys)	219
52	CBA	eZF	Z1	CREB3 (n); без домена TM на (c)	77	221
53	CBA	EGR1	Z1	CREB3 (n); без домена TM на (c)	92 (без C-конц. Lys)	223

Таблица 2. Последовательности нуклеиновых кислот для различных регуляторных элементов (RE), раскрытых в настоящем документе.

RE	Последовательность	SEQ ID NO
RE 1	GTGATGCGGTTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAG CGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCAT GACGTCAATGGGAGTTTGTGTTTGGCACCAAAATCAACGG GACTTTCCAATAATGTCGTAACAACCTCCGCCCCATTGACG CAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATA AGCAGAGCTGGTACCGTGTGTATGCTCAGGGGCTGGGAA AGGAGGGGAGGGAGCTCCGGCTCAG	1
RE 2	ggaggaagccatcaactaaactacaatgactgtaagatacaaaattgggaatggtaacatat gaagtctgttgacataaagaatcatgatattaatgccatggaaatgaaagggcgatcaacac tatggttgaaaaggggaaattgtagagcacagatgtgttcgtgtggcagtgctgtctctag caatactcagagaagagagagaacaatgaaattctgattggccccagtgtagccagatga ggttcagctgccaactttctcttcacatcttatgaaagtcatttaagcacaactaacttttttt tttttttgagacagagtctgtctgtgtgccaggacagagtgcagtagtgactcaatctcggt cactgcagcctccactcctaggctcaaacggctcctcgcacagcctcccaagtagctgga attacaggagtggccaccatgccagctaattttgtattttaatagatacgggggttcaccat atcaccaggctggtctcgaactcctggcctcaagtgatccactgcctcgccctcccaagt gctgggattataggcgtcagccactatgcccaaccgaccaaccttttttaaaataaatatttaa aaattggtatttcacatatatactagtagttatccacacaaaacggacgggctccgctg aaccagtgaagggcagcgtgcgcataaataaccctgcgtgctgcaccactggggaga gggggaggaccaggtaaatggagcgagcgcatagcaaaagggacgcggggtcctttctc tgccggtggcactgggtagctgtggccaggtgtggtactttgatggggccagggtggagc	2

RE	Последовательность	SEQ ID NO
	tcaaggaagcgtcgcaggggtcacagatctgggggaaccccggggaaaagcactgaggcaa aaccgccgctcgtctcctacaatatatgggagggggaggttgagtacgttctggattactcata agaccttttttttctcctccgggcgcaaaaccgtgagctggattataatcgccctataaagctcc agaggcgggtcaggcacctgcagaggagccccgccgctccgccgactagctgccccgcga gcaacggcctcgtgatttccccgccgatccgggtccccgcctccccactctgccccgcctacc ccggagccgtgcagccgcctctccgaatctctcttctcttggcgctcgcgtgcgagaggga actagcgagaacgaggaagcagctggaggtgacgccgggcagattacgcctgtcagggcc gagccgagcggatcgtgggcgctgtgcagaggaaaggcgggagtgcccggtcgtgtc gcagagccgaggtgggtaagctagcgaccacctggacttcccagcgcccaaccgtggtttt cagccaggtcctctcctcccgcggttctcaaccaacccatcccagcgccggccaccaac ctcccgaaatgagtgttctgccccagcagccgaaggcgctactaggaacggtaacctgtta ctttccaggggcccgtagtcgacccgctgcccagttgctgtgctgactgcgcgcgcgggggt agagtgaagtgactgtggttctctctggccaagtccgagggagaacgtaaagatatgggc cttttccccctctcacttgtctcaccaaagtccttagtccccggagcagttagccttttttcc agggaattagccagacacaacaacgggaaccagacaccgaaccagacatgcccgcccggt gcgcctccccgctcgtgcctttctcctcttctgtctctccagagccggatcttaaggggag cctcgtgccccgggtgctcagtcctccggtgtgcaggaccccggaagtctccccgcac agctctcgttctctttgcagcctgtttctgcgccggaccagtcgaggactctggacagtagag gccccgggacgaccgagctg	
RE 3	TCAACAGGGGGACACTTGGGAAAGAAGGATGGGGACAG AGCCGAGAGGACTGTTACACATTAGAGAAACATCAGTG ACTGTGCCAGCTTTGGGGTAGACTGCACAAAAGCCCTGA GGCAGCACAGGCAGGATCCAGTCTGCTGGTCCCAGGAA GCTAACCGTCTCAGACAGAGCACAAAGCACCGAGACAT GTGCCACAAGGCTTGTGTAGAGAGGTCAGAGGACAGCG TACAGGTCCCAGAGATCAAACCTCAACCTCACCAGGCTTG GCAGCAAGCCTTTACCAACCCACCCCCACCCACCCACC CTGCACGCGCCCCCTCTCCCCTCCCCATGGTCTCCCATGGC TATCTCACTTGGCCCTAAAATGTTTAAGGATGACACTGG CTGCTGAGTGGAATGAGACAGCAGAAGTCAACAGTAG ATTTTAGGAAAGCCAGAGAAAAAGGCTTGTGCTGTTTTT AGAAAGCCAAGGGACAAGCTAAGATAGGGCCCAAGTAA TGCTAGTATTTACATTTATCCACACAAAACGGACGGGCC TCCGCTGAACCAGTGAGGCCCCAGACGTGCGCATAAATA ACCCCTGCGTGCTGCACCACCTGGGGAGAGGGGGAGGA CCACGGTAAATGGAGCGAGCGCATAGCAAAAGGGACGC GGGGTCCTTTTCTCTGCCGGTGGCACTGGGTAGCTGTGG CCAGGTGTGGTACTTTGATGGGGCCCAGGGCTGGAGCTC AAGGAAGCGTCGCAGGGTCACAGATCTGGGGGAACCCC GGGGAAAAGCACTGAGGCAAAACCGCCGCTCGTCTCCT ACAATATATGGGAGGGGGAGGTTGAGTACGTTCTGGATT ACTCATAAGACCTTTTTTTTTTCTTCCGGGCGCAAAACC GTGAGCTGGATTTATAATCGCCCTATAAAGCTCCAGAGG CGGTCAGGCACCTGCAGAGGAGCCCCGCCGCTCCGCCGA CTAGCTGCCCCCGCGAGCAACGGCCTCGTGATTTCCCCG CCGATCCGGTCCCCGCCTCCCCACTCTGCCCCCGCCTACC CCGGAGCCGTGCAGCCGCCTCTCCGAATCTCTCTTCTC CTGGCGCTCGCGTGCGAGAGGGAAGTAGCGAGAACGAG GAAGCAGCTGGAGGTGACGCCGGGCAGATTACGCCTGT	3

RE	Последовательность	SEQ ID NO
	CAGGGCCGAGCCGAGCGGATCGCTGGGCGCTGTGCAGA GGAAGGCGGGAGTGCCCGGCTCGCTGTCGCAGAGCCG AGGTGGGTAAGCTAGCGACCACCTGGACTTCCCAGCGCC CAACCGTGGCTTTTCAGCCAGGTCTCTCCTCCCGCGGCT TCTCAACCAACCCCATCCCAGCGCCGGCCACCCAACCTC CCGAAATGAGTGCTTCCTGCCCCAGCAGCCGAAGGCGCT ACTAGGAACGGTAACCTGTTACTTTTCCAGGGGCGCGTAG TCGACCCGCTGCCCGAGTTGCTGTGCGACTGCGCGCGCG GGGCTAGAGTGCAAGGTGACTGTGGTTCTTCTCTGGCCA AGTCCGAGGGAGAACGTAAAGATATGGGCCTTTTCCCC CTCTCACCTTGTCTCACCAAAGTCCCTAGTCCCCGGAGC AGTTAGCCTCTTTCTTTCCAGGGAATTAGCCAGACACAA CAACGGGAACCAGACACCGAACCAGACATGCCCCGCCCC GTGCGCCCTCCCCGCTCGCTGCCTTTCCTCCCTCTTGTCT CTCCAGAGCCGGATCTTCAAGGGGAGCCTCCGTGCCCCC GGCTGCTCAGTCCCTCCGGTGTGCAGGACCCCGGAAGTC CTCCCCGCACAGCTCTCGCTTCTCTTTGCAGCCTGTTTCT GCGCCGGACCAGTCGAGGACTCTGGACAGTAGAGGCC CGGGACGACCGAGCTG	
RE 4	GCCCTCTAGGCCACCTGACCAGGTCCCCTCAGTCCCCC CTTCCCACACTCCCACACTCAGCCCCCTCCCCCCCCC GACCCCTGCAGGATTATCCTGTCTGTGTTCTGACTCAGC CTGGGAGCCACCTGGGCAGCAGGGGCCAAGGGTGTCTT AGAAGGGACCTGGAGTCCACGCTGGGCCAAGCCTGCCCT TTCTCCCTCTGTCTTCCGTCCCTGCTTGCGGTTCTGCTGA ATGTGGTTATTTCTCTGGCTCCTTTTACAGAGAATGCTGC TGCTAATTTTATGTGGAGCTCTGAGGCAGTGTAATTGGA AGCCAGACACCCTGTCAGCAGTGGGCTCCCGTCTTGAGC TGCCATGCTTCTGTCTCTCCTCCCGTCCCGGCTCCTCATT TCATGCAGCCACCTGTCCCAGGGAGAGAGGAGTCACCCA GGCCCCCTCAGTCCGCCCTTAAATAAGAAAGCCTCCGTT GCTCGGCACACATAACCAAGCAGCCGCTGGTGCAATCT	4
СВА (энхансер CMV + промотор бета- актина кур)	CGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACC GCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTA TGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACG TCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGC AGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTAT TGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGC CCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTA CATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGggtcgaggtgagc cccacgttctgcttactctccccatctccccccctccccaccccaatttgtattattattttt aattattttgtgcagcgatgggggcgggggggggggggcgcgcgccaggcggggcggg gcggggcgaggggcggggcggggagggcgagaggtgcggcgagccaatcagag cgggcgctccgaaagtctctttatggcgagggcgggcgggcgggcgccataaaaagc gaagcgcgcgggcggggagtcgctgcgttgcttcgcccgtgcccgtccgcgcg cctcgcccggcgcccggtctgactgaccgcttactcccacaggtgagcgggcgggga cgccctctctcgggctgaattagcgcttggttaatgacggctcgttctttctgtggtg cgtgaaagcctaaagggctccgggagggcccttgtgcgggggggagcggtcgggggg tgcgtgcgtgtgtgtgcgtggggagcgccgctgcggcccgctgcccggcggtgtg agcgctgcgggcgggcggggcttgtgcgtccgctgtgcgcgaggggagcgcg	5

RE	Последовательность	SEQ ID NO
	ccgggggcggtgccccgcggtgcgggggggctgcgaggggaacaaaggctgcgtgcgg ggtgtgtgcgtggggggggtgagcaggggggtgtgggcgcggcggtcgggctgtaaccccc cctgcacccccctccccgagttgctgagcacggcccggcttcgggtgcggggctccgtgcg gggcgtggcgcggggctcgccgtgccggcggggggtggcggcaggtgggggtgccgg gcggggcgggggccgcctcgggcgggggagggctcgggggaggggcgcggcgggccccg gagcgccggcggtgtcgaggcgcggcgagccgcagccattgcctttatggaatcgtgcg agagggcgagggacttcctttgtcccaaatctggcggagccgaaatctgggagggcgccgc cgcaccccccttagcgggcgcgggcgaagcggtgcggcgccggcaggaaggaaatggg cggggagggccttcgtgcgtcgccgcgcggcgtcccttctccatctccagcctcggggct gccgcagggggacggctgccttcgggggggacggggcagggcggggttcggcttctggc gtgtgaccggcggtctagagcctctgtaaccatgttcatgccttcttctttctacagctct gggcaacgtgctgggtgtgtgtgtctcatcatttggcaagaatt	
EF1 альфа	GAGTAATTCATACAAAAGGACTCGCCCTGCCTTGGGGA ATCCAGGGACCGTCGTTAAACTCCCACTAACGTAGAAC CCAGAGATCGCTGCGTTCCCGCCCCCTCACCCGCCCGCT CTCGTCATCACTGAGGTGGAGAAGAGCATGCGTGAGGCT CCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAG TCCCGGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTCGGCAATTGAACC GGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAACTGGGAAAG TGATGTCGTGTACTGGCTCCGCCTTTTTCCCGAGGGTGGG GGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTT CTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGT GCCGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTTACGGGT ATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATTACTTCCACGCCCTGGC TGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTGGAA GTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCCTTAAGGAGCCC CTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCTTGGGCGCT GGGGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCT GTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTT TTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCAAGATAGT CTTGTAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTTCG GTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCGTCC CAGCGCACATGTTCCGCGAGGCGGGGCCTGCGAGCGCG GCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCC GGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCCGCGTGTATCG CCCCGCCCTGGGCGGCAAGGCTGGCCCGGTGGCACCAG TTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTG CAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGGAGAG CGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGGAAAAGGGCCTT TCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCACGGAGTA CCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTT TTGGAGTACGTCGTCTTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTA TGCATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGA AGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGA ATTTGCCCTTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAG CCTCAGACAGTGGTTCAAAGTTTTTTCTTCCATTTCAAG TGTCGTGA	6

Таблица 3. Аминокислотные последовательности для иллюстративных ДНК-связывающих доменов (DBD), представленных в настоящем документе. Для DBD сконструированный «цинковый палец» (eZF) указывает на то, что конструкция имеет формулу, изложенную в SEQ ID NO: 147 (**таблица 10**); EGR1 указывает на то, что DBD происходит от человеческого EGR1 дикого типа (SEQ ID NO: 176; **таблица 12**); и EGR3 указывает на то, что DBD происходит от человеческого EGR3 дикого типа (SEQ ID NO: 175, **таблица 12**). Целевые сайты представляют собой последовательности, связанные с DBD, и представлены в **таблице 4** ниже.

DBD/целевой сайт	Последовательность	SEQ ID NO
eZF/z1	LEPGEKPYKCPECGKSFSRSDNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSREDNLHTHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSDNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSGNLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSTSGHLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQNSTLTEHQRTHTGKKTS	77
eZF/z2	LEPGEKPYKCPECGKSFSSTKNSLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRADNLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQLAHLRAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSTKNSLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQAGHLASHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSTHLDLIRHQRTHTGKKTS	78
eZF/z3	LEPGEKPYKCPECGKSFSQAGHLASHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSREDNLHTHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSTSGNLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSTHLDLIRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQKSSLIAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQAGHLASHQRTHTGKKTS	79
eZF/z4	LEPGEKPYKCPECGKSFSSTGNLTVHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSTSGELVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSREDNLHTHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSTSGNLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSSSLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQRA NLRAHQRTHTGKKTS	80
eZF/z5	LEPGEKPYKCPECGKSFSRRTCRAHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSTGALTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSDNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRNDALTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSGDLRRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSTSHSLTEHQRTHTGKKTS	81
eZF/z6	LEPGEKPYKCPECGKSFSRKDNLKNHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDPGALVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSREDNLHTHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSDPGALVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSTSGELVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRKDNLKNHQRTHTGKKTS	82
eZF/z7	LEPGEKPYKCPECGKSFSKKALTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSPPADLTRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSDNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSREDNLHTHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSDNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQSGNLTEHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSSTSGHLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQNSTLTEHQRTHTGKKTS	83

[illegible]

DBD/целевой сайт	Последовательность	SEQ ID NO
EGR1/z13	RPYACPVESCDRRFSRSDNLVRHIRIHTGQKPFQCRICMRN FSHRTTLTNHIRTHTGEKPFACDICGRKFAREDNLHTHTKI HLRQKDRPYACPVESCDRRFSTSHSLTEHIRIHTGQKPFQC RICMRNFSQSSSLVRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAREDNL HTHTKIHRLRQKDK	93
EGR1/z15	RPYACPVESCDRRFSRRDELNVHIRIHTGQKPFQCRICMRN FSRSDHLTNHIRTHTGEKPFACDICGRKFARSDDLVRHTKI HLRQKDRPYACPVESCDRRFSRSDNLVRHIRIHTGQKPFQC RICMRNFSHRTTLTNHIRTHTGEKPFACDICGRKFAREDNL HTHTKIHRLRQKDRPYACPVESCDRRFSTSHSLTEHIRIHTGQ KPFQCRICMRNFSQSSSLVRHIRTHTGEKPFACDICGRKFA REDNLHTHTKIHRLRQKD	94
EGr1/z17	RPYACPVESCDRRFSDPGALVRHIRIHTGQKPFQCRICMRN FSRSDNLVRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQSGDLRRHTKI HLRQKDRPYACPVESCDRRFSTHLDLIRHIRIHTGQKPFQC RICMRNFSTSGNLVRHIRTHTGEKPFACDICGRKFARSDDL VRHTKIHRLRQKDRPYACPVESCDRRFSQSGHLTEHIRIHTG QKPFQCRICMRNFSERSHLREHIRTHTGEKPFACDICGRKF AQAGHLASHTKIHRLRQKD	95
EGR3/z1	RPHACPAEGCDRRFSRSDNLVRHLRIHTGHKPFQCRICMRS FSREDNLHTHIRTHTGEKPFACEFCGRKFARSDELVRHAKI HLKQKEHACPAEGCDRRFSQSGNLTEHLRIHTGHKPFQCRI CMRSFSTSGHLVRHIRTHTGEKPFACEFCGRKFAQNSTLTE HAKIHLKQKEK	96
EGR3/z13	RPHACPAEGCDRRFSRSDNLVRHLRIHTGHKPFQCRICMRS FSHRTTLTNHIRTHTGEKPFACEFCGRKFAREDNLHTHAKI HLKQKEHACPAEGCDRRFSTSHSLTEHLRIHTGHKPFQCRI CMRSFSQSSSLVRHIRTHTGEKPFACEFCGRKFAREDNLHT HAKIHLKQKEK	97
EGR3/z15	RPHACPAEGCDRRFSRRDELNVHLRIHTGHKPFQCRICMRS FSRSDHLTNHIRTHTGEKPFACEFCGRKFARSDDLVRHAKI HLKQKEHACPAEGCDRRFSRSDNLVRHLRIHTGHKPFQCR ICMRSFSHRTTLTNHIRTHTGEKPFACEFCGRKFAREDNLH THAKIHLKQKEHACPAEGCDRRFSTSHSLTEHLRIHTGHKPF QCRICMRSFSQSSSLVRHIRTHTGEKPFACEFCGRKFARE DNLHTHAKIHLKQKEK	98

Таблица 4. Последовательности целевых сайтов и хромосомная локализация иллюстративных целевых сайтов, связанных с раскрытыми в настоящем документе ДНК-связывающими доменами.

Начальн. положени е хром. 2	Последовательность целевого сайта	Целевой сайт	SEQ ID NO для последовательности целевого сайта
166149168	CTAGGTCAAGTGTAGGAG	z1	18
166149158	ACTTGACCTAGACAGCCT	z2	19
166073978	TGAATAACTCATTAGTGA	z3	20

Начальн. положени е хром. 2	Последовательность целевого сайта	Целевой сайт	SEQ ID NO для последовательнос ти целевого сайта
166073933	AAAGTACATTAGGCTAAT	z4	21
166149199	CCAGCACTGGTGCTTCGT	z5	22
166149176	AAGGCTGTCTAGGTCAAG	z6	23
166149168	CTAGGTCAAGTGTAGGAGACACAC	z7	24
166149165	GGTCAAGTGTAGGAGACA	z8	25
166149162	CAAGTGTAGGAGACACAC	z9	26
166149160	AGTGTAGGAGACACACTGCTGGCC	z10	27
166149160	AGTGTAGGAGACACACTG	z11	28
166149155	AGGAGACACACTGCTGGCCTG	z12	29
166128025	TAGGTACCATAGAGTGAG	z13	30
166127991	GAGGATACTGCAGAGGTC	z14	31
166127999	TAGGTACCATAGAGTGAGGCGAGGA TG	z15	32
166127991	ATAGAGTGAGGCGAGGATGAAGCCG AG	z16	33
166127974	TGAAGCCGAGAGGATACTGCAGAGG TC	z17	34

Таблица 5. Аминокислотные последовательности для раскрытых в настоящем документе иллюстративных доменов активации транскрипции (TAD).

TAD	Последовательность	SEQ ID NO
VPR	DALDDFDLDMLGSDALDDFDLDMLGSDALDDFDLDMLGSDA LDDFDLDMLINRSSSGSPKKRKVGSQYLPDTPDRHRIEEKRK RTYETFKSIMKKSPFSGPTDPRPPPRRIA VPSRSSASVPKPAPQPY PFTSSLSTINYDEFPTMVFPSPGQISQASALAPAPPQVLPQAPAPA PAPAMVSALAQA PAVPV LAPGPPQAV APPAPKPTQAGEGTL S EALLQLQFDDEDLGALLGNSTDP AVFTDLASVDNSEFQQLLNQ GIPVAPHTTEPMLMEYPEAITRLVTGAQRPPDPAPAPLGAPGLP NGLLSGDEDFSSIADMDFSALLGSGSGSRDSREGMFLPKPEAGS AISDVFE GREVCQPKRIRPFHPPGSPWANRPLASLAPTPTGPVH EPVGSLTPAPVPQPLDPAPAVTPEASHLLED PDEETSQAVKALR EMADTVIPQKEEAAICGQMDLSHPPPRGHLDELTTTLESMTEDL NLDSPLTPELNEILD TFLNDECLLHAMHISTGLSIFDTSLF	132
VP64	DALDDFDLDMLGSDALDDFDLDMLGSDALDDFDLDMLGSDA LDDFDLDM L	133
CITED 2	MSGLEMADHMMAMNHGRFPDGTNGLHHHPAHRMGMGQFPS PHHHQQQQPQHAFNALMGEHHY GAGNMNATSGIRHAMGPG TVNGGHPPSALAPAARFNNSQFMGPPVASQGGSLPASMQLQKL NNQYFNHHPYPHNHYMPDLHPAAGHQMN GTNQHFRCNPKH SGGSSTPGSGGSSTPGSGSSSGGGAGSSNSGGGSGSGNMPAS VAHVPAAMLPPNVIDTDFIDEEVLMSLVIEMGLDRIKELPELWL GONEFDFEMTDFVCKOOPSRVSC	134

TAD	Последовательность	SEQ ID NO
CITED 4	ADHMLAEGYRLVQRPPSAAAAHGPHALRTLPPYAGPGLDSG LRPRGAPLGPPPPRQPGALAYGAFGPPSSFQPFPAVPPPAAGIAH LQPVATPYPGRAAAPPNAPGGPPGPQAPSAAPPPPAHALGG MDAELIDEEALTSLELELGLHRVRELPELFLGQSEFDCFSDLGS APPAGSVSC	135
CREB3	MELELDAGDQDLLAFLLEESGDLGTAPDEAVRAPLDWALPLSE VPSDWEVDDLLCSLLSPPASLNILSSSNPCLVHHHTYSLPRET VSMDSLESESCRKEGTQMTQPHMEELAEQEIARLVLTDEEKSL EKEGLILPETLPLTKTEEQILKRVR	224

Таблица 6. Аминокислотные последовательности для раскрытых в настоящем документе иллюстративных сконструированных факторов транскрипции (DBD + TAD).

Конструкция	Последовательность	SEQ ID NO
1	MAPKKKRKVGIIHGVPAALEPGEKPYKCPECGKSFS RSDNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSHRITLTNH QRTHTGEKPYKCPECGKSFSREDNLHTHQRTHTGE KPYKCPECGKSFSSTSHSLTEHQRTHTGEKPYKCPEC GKSFSQSSSLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRED NLHTHQRTHTGKKTSKRPAATKKAGQAKKKKGSY PYDVPDYALEEASGSGRADALDDFDLDMLGSDALD DFDLDMLGSDALDDFDLDMLGSDALDDFDLDMLIN SRSSGSPKKKRKVGSQLPDTDDRHRIEEKRKRTYE TFKSIMKKSPFSGPTDPRPPPRRIAVPSRSSASVPKPA PQYPFTSSLSTINYDEFPTMVFPQISQASALAPAP PQVLPQAPAPAPAPAMVSALAQAAPVPVLAPGPPQ AVAPPAPKPTQAGEGTLSEALLQLQFDDDEDLGALLG NSTDPAVFTDLASVDNSEFQQLLNQGIPVAPHTTEP MLMEYPEAITRLVTGAQRPPDPAPAPLGAPGLPNGL LSGDEDFSSIADMDFSALLGSGSGSRDSREGMFLPK PEAGSAISDVFEGREVCQPKRIRPFHPPGSPWANRPL PASLAPTPTGPVHEPVGSLTPAPVPQPLDPAPAVTPE ASHLLEDPEETSQAVKALREMADEVIPQKEEAIC GQMDLSHPPPRGHLDELTTTLESMTEDLNLDSPPTP ELNEILDFTLNDECLLHAMHISTGLSIFDTSLF	99
2	MAPKKKRKVGIIHGVPAALEPGEKPYKCPECGKSFS RSDNLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSREDNLHT HQRTHTGEKPYKCPECGKSFSRSDNLVRHQRTHTGE KPYKCPECGKSFSQSGNLTEHQRTHTGEKPYKCPEC GKSFSSTSGHLVRHQRTHTGEKPYKCPECGKSFSQNS TLTEHQRTHTGKKTSKRPAATKKAGQAKKKKGSYP YDVPDYALEEASGSGRADALDDFDLDMLGSDALD DFDLDMLGSDALDDFDLDMLGSDALDDFDLDMLIN SRSSGSPKKKRKVGSQLPDTDDRHRIEEKRKRTYE TFKSIMKKSPFSGPTDPRPPPRRIAVPSRSSASVPKPA PQYPFTSSLSTINYDEFPTMVFPQISQASALAPAP PQVLPQAPAPAPAPAMVSALAQAAPVPVLAPGPPQ AVAPPAPKPTQAGEGTLSEALLQLQFDDDEDLGALLG	100

Конструкция	Последовательность	SEQ ID NO
	NSTDPAVFTDLASVDNSEFQQLLNQGIPVAPHTTEP MLMEYPEAITRLVTGAQRPPDPAPAPLGAPGLPGL LSGDEDFSSIADMDFSALLGSGSGSRDSREGMFLPK PEAGSAISDVFEGREVCQPKRIRPFHPPGSPWANRPL PASLAPTPTGPVHEPVGSLTPAPVPQPLDPAPAVTPE ASHLLEDPEETSQAVKALREMADTVIPQKEEAIC GQMDLSHPPPRGHLDELTTTLESMTEDLNLDSP LTP ELNEILDFTLNDECLLHAMHISTGLSIFDTSLF	
3	MAPKKKRKVGIHGVPAALEPGEKPYKCPECCKSFS RSDNLVRHQRTHTGEKPYKCPECCKSFSHRTTLTNH QRTHTGEKPYKCPECCKSFSREDNLHHTHQRTHTGE KPYKCPECCKSFSSTSHSLTEHQRTHTGEKPYKCPEC GKSFSQSSSLVRHQRTHTGEKPYKCPECCKSFSRED NLHHTHQRTHTGKKTSKRPAATKKAGQAKKKKGSY PYDVPDYALEDALDDFDLDMLGSDALDDFDLDMLG GSDALDDFDLDMLGSDALDDFDLDMLG	101
4	MAPKKKRKVGIHGVPAALEPGEKPYKCPECCKSFS RSDNLVRHQRTHTGEKPYKCPECCKSFSREDNLHT HQRTHTGEKPYKCPECCKSFSRDELVRHQRTHTGE KPYKCPECCKSFSQSGNLTEHQRTHTGEKPYKCPEC GKSFSSTSGHLVRHQRTHTGEKPYKCPECCKSFSQNS TLTEHQRTHTGKKTSKRPAATKKAGQAKKKKGSYP YDVPDYALEDALDDFDLDMLGSDALDDFDLDMLG SDALDDFDLDMLGSDALDDFDLDMLG	102
5	MAADHMLAEGYRLVQRPPSAAAAHGPHALRTLPP YAGPGLDSGLRPRGAPLGPPPPRQPGALAYGAFGPP SSFQPFPAVPPPAAGIAHLQPVATPYPGRAAAPPNAP GGPPGPQAPSAAAPPPPAHALGGMDAELIDEEALT SLELELGLHRVRELPELFLGQSEFDCFSDLGSAPPAG SVSCGGSGGGSGQSQLIKPSRMRKYPNRPSKTPPHE RPYACPVESCDRRFSRSDNLVRHIRHTGQKPFQCRI CMRNFSHRTTLTNHIRTHTGEKPFACDICGRKFARE DNLHTHTKIHLRQKDRPYACPVESCDRRFSTSHSLT EHIRHTGQKPFQCRI CMRNFSQSSSLVRHIRHTHTGE KPFACDICGRKFAREDNLHTHTKIHLRQKDKLEMA DHLMLAEGYRLVQRPPSAAAAHGPHALRTLPPYAG PGLDSGLRPRGAPLGPPPPRQPGALAYGAFGPPSSFQ PFPAVPPPAAGIAHLQPVATPYPGRAAAPPNAPGGP PGPQAPSAAAPPPPAHALGGMDAELIDEEALTSL LELGLHRVRELPELFLGQSEFDCFSDLGSAPPAGSVS C	103
6	MAADHMLAEGYRLVQRPPSAAAAHGPHALRTLPP YAGPGLDSGLRPRGAPLGPPPPRQPGALAYGAFGPP SSFQPFPAVPPPAAGIAHLQPVATPYPGRAAAPPNAP GGPPGPQAPSAAAPPPPAHALGGMDAELIDEEALT SLELELGLHRVRELPELFLGQSEFDCFSDLGSAPPAG SVSCGGSGGGSGQSQLIKPSRMRKYPNRPSKTPPHE RPYACPVESCDRRFSRSDNLVRHIRHTGQKPFQCRI CMRNFSHRTTLTNHIRTHTGEKPFACDICGRKFARE DNLHTHTKIHLRQKDRPYACPVESCDRRFSTSHSLT	104

Конструкция	Последовательность	SEQ ID NO
	EHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSQSSSLVRHIRTHTGE KPFACDICGRKFAREDNLHTHTKIHLRQKDK	
7	MAADHMLAEGYRLVQRPPSAAAAHGPHALRTLPP YAGPGLDSGLRPRGAPLGPPPPRQPGALAYGAFGPP SSFQPFPAVPPPAAGIAHLQPVATPYPGRAAAPPNAP GGPPGPQPAPSAAAPPPPAHALGGMDAELIDEEALT SLELELGLHRVRELPELFLGQSEFDCFSDLGSAPPAG SVSCGGSGGGSGQSOLIKPSRMRKYPNRPSKTPPHE RPYACPVESCDRRFSRSDNLVRHIRIHTGQKPFQCRI CMRNFSREDNLHTHIRTHTGEKPFACDICGRKFARS DELVRHTKIHLRQKDRPYACPVESCDRRFSQSGNLT EHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSTSGHLVRHIRTHTGE KPFACDICGRKFAQNSTLTEHTKIHLRQKDKLEMAD HMLAEGYRLVQRPPSAAAAHGPHALRTLPPYAGP GLDSGLRPRGAPLGPPPPRQPGALAYGAFGPPSSFQPF PAVPPPAAGIAHLQPVATPYPGRAAAPPNAPGGPP GPQPAPSAAAPPPPAHALGGMDAELIDEEALTSLEL ELGLHRVRELPELFLGQSEFDCFSDLGSAPPAGSVSC	105
8	MAADHMLAEGYRLVQRPPSAAAAHGPHALRTLPP YAGPGLDSGLRPRGAPLGPPPPRQPGALAYGAFGPP SSFQPFPAVPPPAAGIAHLQPVATPYPGRAAAPPNAP GGPPGPQPAPSAAAPPPPAHALGGMDAELIDEEALT SLELELGLHRVRELPELFLGQSEFDCFSDLGSAPPAG SVSCGGSGGGSGQSOLIKPSRMRKYPNRPSKTPPHE RPYACPVESCDRRFSRSDNLVRHIRIHTGQKPFQCRI CMRNFSREDNLHTHIRTHTGEKPFACDICGRKFARS DELVRHTKIHLRQKDRPYACPVESCDRRFSQSGNLT EHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSTSGHLVRHIRTHTGE KPFACDICGRKFAQNSTLTEHTKIHLRQKDK	106
9	MQSQLIKPSRMRKYPNRPSKTPPHERPYACPVESCD RRFSRSDNLVRHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSREDNL HTHIRTHTGEKPFACDICGRKFARSDELVRHTKIHLR QKDRPYACPVESCDRRFSQSGNLTEHIRIHTGQKPF QCRICMRNFSTSGHLVRHIRTHTGEKPFACDICGRKF AQNSTLTEHTKIHLRQKDKLEMADHMLAEGYRLV QRPPSAAAAHGPHALRTLPPYAGPGLDSGLRPRGAP LGPPPPRQPGALAYGAFGPPSSFQPFPAVPPPAAGIA HLQPVATPYPGRAAAPPNAPGGPPGPQPAPSAAAPP PPAHALGGMDAELIDEEALTSLELELGLHRVRELPE LFLGQSEFDCFSDLGSAPPAGSVSC	107
10	MQSQLIKPSRMRKYPNRPSKTPPHERPYACPVESCD RRFSRSDNLVRHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSREDNL HTHIRTHTGEKPFACDICGRKFARSDELVRHTKIHLR QKDRPYACPVESCDRRFSQSGNLTEHIRIHTGQKPF QCRICMRNFSTSGHLVRHIRTHTGEKPFACDICGRKF AQNSTLTEHTKIHLRQKDKLEMSGLEMADHMMAM NHGRFPDGTNGLHHHPAHRMGMGQFSPHHHQQQ QPQHAFNALMGEHIHYGAGNMNATSGIRHAMGPG TVNGGHPPSALAPAAARFNNSQFMGPPVASQGGSLP ASMQLQKLNNQYFNHHPYPHNHYMPDLHPAAGHQ MNGTNQHFRDCNPKHSGGSSTPGGSGGSSTPGGSG	108

Конструкция	Последовательность	SEQ ID NO
	SSSGGGAGSSNSGGGSGSGNMPASVAHVPAAMLPP NVIDTDFIDEEVLMSLVIEMGLDRIKELPELWLGN EFDFTDFVCKQQPSRVSC	
11	MSGLEMADHMMAMNHGRFPDGTNGLHHHPAHRM GMGQFSPHHHQQQQPQHAFNALMGEHIHYGAGN MNATSGVRHAMGPGTVNGGHPPSALAPAAARFNS QFMGPPVASQGGSLPASMQLQKLNNQYFNHHPYPH NHYPDLHPAAGHQMNNGTNQHFRDCNPKHSGGSS TPGGSGGSSTPGGSGSSSGGGAGSSNSGGGSGSGNM PASVAHVPAAMLPPNVIDTDFIDEEVLMSLVIEMGL DRIKELPELWLGN EFDFTDFVCKQQPSRVSCQSQ LIKPSRMRYPNRPSKTPPHERPYACPVESCDRRFSR SDNLVRHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSREDNLHTHIR THTGEKPFACDICGRKFARSDELVRHTKIHLRQKDR PYACPVESCDRRFSQSGNLTEHIRIHTGQKPFQCRIC MRNFSTSGHLVRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQNS TLTEHTKIHLRQKDK	109
12	MAADHMLAEGYRLVQRPPSAAAAHGPHALRTLPP YAGPGLDSGLRPRGAPLGPPPPRQPGALAYGAFGPP SSFQPFPAVPPPAAGIAHLQPVATPYPGRAAAPPNAP GGPPGPQAPSAAPPPPAHALGGMDAELIDEEALT SLELELGLHRVRELPELFLGQSEFDCFSDLGSAPPAG SVSCGGSGGGSGRPHACPAEGCDRRFSRSDNLVRH LRIHTGHKPFQCRICMRSFSREDNLHTHIRTHTGEK FACEFCGRKFARSDELVRHAKIHLKQKEHACPAEG CDRRFSQSGNLTEHLRIHTGHKPFQCRICMRSFSTSG HLVRHIRTHTGEKPFACEFCGRKFAQNSTLTEHAKI HLKQKEKLEMADHMLAEGYRLVQRPPSAAAAHG PHALRTLPPYAGPGLDSGLRPRGAPLGPPPPRQPGA LAYGAFGPPSSFQPFPAVPPPAAGIAHLQPVATPYPG RAAAPPNAPGGPPGPQAPSAAPPPPAHALGGMD AELIDEEALTSLELELGLHRVRELPELFLGQSEFDC SDLGSAPPAGSVSC	110
13	MRPHACPAEGCDRRFSRSDNLVRHLRIHTGHKPFQ RICMRSFSREDNLHTHIRTHTGEKPFACEFCGRKFAR SDELVRHAKIHLKQKEHACPAEGCDRRFSQSGNLTE HLRIHTGHKPFQCRICMRSFSTSGHLVRHIRTHTGEK PFACEFCGRKFAQNSTLTEHAKIHLKQKEKLEMAD HMLAEGYRLVQRPPSAAAAHGPHALRTLPPYAGP GLDSGLRPRGAPLGPPPPRQPGALAYGAFGPPSSFQ FPAVPPPAAGIAHLQPVATPYPGRAAAPPNAPGGPP GPQAPSAAPPPPAHALGGMDAELIDEEALTSLE ELGLHRVRELPELFLGQSEFDCFSDLGSAPPAGSVSC	111
14	MRPHACPAEGCDRRFSRSDNLVRHLRIHTGHKPFQ RICMRSFSREDNLHTHIRTHTGEKPFACEFCGRKFAR SDELVRHAKIHLKQKEHACPAEGCDRRFSQSGNLTE HLRIHTGHKPFQCRICMRSFSTSGHLVRHIRTHTGEK PFACEFCGRKFAQNSTLTEHAKIHLKQKEKKAEG GAPSASSAPPVSLAPVVTTCALMSGLEMADHMM AMNHGRFPDGTNGLHHHPAHRMGMGQFSPHHHQQ QQPQHAFNALMGEHIHYGAGNMNATSGIRHAMGP	112

Конструкция	Последовательность	SEQ ID NO
	GTVNGGHPPSALAPAARFNNSQFMGPPVASQGGSL PASMQLQKLNNQYFNHHPYPHNHYMPDLHPAAGH QMNGTNQHFRDCNPKHSGGSSTPGGSGGSSTPGGS GSSSGGGAGSSNSGGGSGSGNMPASVAHVPAAML PNVIDTDFIDEEVLMSLVIEMGLDRIKELPELWLGQN EFDFTDFVCKQQPSRVSC	
15	MSGLEMAHMMAMNHNHGRFPDGTNGLHHHPAHRM GMGQFSPHHHQQQQPQHAFNALMGEHHYAGN MNATSGVRHAMGPGTVNNGGHPPSALAPAARFNNS QFMGPPVASQGGSLPASMQLQKLNNQYFNHHPYPH NHYMPDLHPAAGHQMNGTNQHFRDCNPKHSGGS TPGGSGGSSTPGGSGSSSGGGAGSSNSGGGSGSGNM PASVAHVPAAMLPPNVIDTDFIDEEVLMSLVIEMGL DRIKELPELWLGQNEFDFTDFVCKQQPSRVSCRPH ACPAEGCDRRFSRSDNLVRHLRIHTGHKPFQCRICM RSFSREDNLHTHIRTHTGEKPFACEFCGRKFARSD VRHAKIHLKQKEHACPAEGCDRRFSQSGNLTEHLRI HTGHKPFQCRICMRSFSTSGHLVRHIRTHTGEKPF ACEFCGRKFAQNSTLTEHAKIHLKQKEKKAKEGGAP SASSAPPVSLAPVVTTC	113
16	MTGKLAEKLPVTMSSLLNQLPDNLYPEEIPSA NLFSGSSDSVVHYNQMATENVMDIGLTNEKPNPELSYS GSFQAPGNKTVTYLGKFAFDSPSNWCQDNII SLMSAGILGVPPASGALSTQTSTASMVQPPQGD VEAMYPALPPYSNCGDLYSEPVSFHD PQGNPGLAYSPQDYQS AKPALDSNLFPMIPDYNLYHHPNDMGS IPEHKPFQGMPIRVNPPITPLETIKAFKDKQ IHPGFGSLPQPPLTLKPIRPRKY PNRPSKTPLHERPHACPAEGCDRRFSRR DELNVHLRIHTGHKPFQCRICMRSFSRSD HLTNHIRTHTGEKPFACEFCGRKFARSD DLVRHAKIHLKQKEHACPAEGCDRRFSRSD NLVRHLRIHTGHKPFQCRICMRFS SHRTTLTNHIRTHTGEKPFACEFCGRKF FAREDNLHTHAKIHLKQKEHACPAEGCD RRFSTSHSLTEHLRIHTGHKPFQCRIC MRSFSQSSSLVRHIRTHTGEKPFAC EFCGRKFAREDNLHTHAKIHLKQKEK KAEKGGAPASSAPPVSLAPVVTTC	114
17	MAAAKAEMQLMSPLQISDPFGSFP HSPTMDNYPKLEEMMLLSNGAPQFLGA AGAPEGSGSNSSSSSSGGGGGGGG SNSSSSSTFNPQADTGEQPYEHLTA ESFPDISLNNEKVLVETSYPSQTTRL PPITYTGRFSLEPAPNSGNTLWPEPL FSLVSGLVSMTNPPASSSSAPSPA ASSASQSPPLSCAVPSNDSSPIYSA APTFPTPNTDIFPEPQSQAFPGS AGTALQYPPAYPAKGGFQVPMIPD YLFPQQQGDGLGTPDQKPFQGLE SRTQQPSLTPLSTIKAFATQSGS QDLKALNTSYQSQLIKPSRM RKYPNRPSKTPPHERPYACPVES CDRRFSDNLVRHIRIHTGQKPFQ CRICMRNFSHRTTLTNHIRTHTGEK PFACDICGRKFAREDNLHTHTKIHL RQKDRPYACPVESCDRRFSTHSL TEHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSQ SSSSLVRHIRTHTGEKPFACDICGR KFAREDNLHTHTKIHLRQKDKKA DKS VVASSATSSLSYSPVATSYSPVTT SYSPATT	115

Конструкция	Последовательность	SEQ ID NO
	SYSPVPTSFSSPGSSTYSPVHSGFPSPSVATTYSSV PPAFPAQVSSFPSSAVTNSFSASTGLSDMTATFSPRTI EIC	
18	MAAAKAEMQLMSPLQISDPFGSFPHSPTMDNYPKL EEMMLLSNGAPQFLGAAGAPEGSGSNSSSSSSGGGG GGGGGSNSSSSSSSTFNPQADTGEQPYEHLTAESFPDI SLNNEKVLVETSYPSQTTRLPPITYTGRFSLEPAPNS GNTLWPEPLFSLVSGLVSMTNPPASSSSAPSPAASSA SASQSPPLSCAVPSNDSSPIYSAAPTFTPTNTDIFPEPQ SQAFPGSAGTALQYPPPAYPAAKGGFQVPMIPDYLF PQQQGDGLGTPDQKPFQGLESTQQPSLTPLSTIKA FATQSGSQDLKALNTSYQSQLIKPSRMRKYPNRPSK TPPHERPYACPVESCDRRFSRRDELNVHIRIHTGQKP FQCRICMRNFSRSDHLTNHIRTHTGEKPFACDICGRK FARSDDLVRHTKIHLRQKDRPYACPVESCDRRFSRS DNLVRHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSHRTTLTNHIRT HTGEKPFACDICGRKFAREDNLHTHTKIHLRQKDRP YACPVESCDRRFSTSHSLTEHIRIHTGQKPFQCRICM RNFSQSSSLVRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAREDNL HTHTKIHLRQKDKKADKSVVASSATSSLSSYSPVA TSYSPVTTSYSPATTSYSPVPTSFSSPGSSTYSPV HSGFPSPSVATTYSSVPPAFPAQVSSFPSSAVTNSFSA STGLSDMTATFSPRTIEIC	116
19	MAAAKAEMQLMSPLQISDPFGSFPHSPTMDNYPKL EEMMLLSNGAPQFLGAAGAPEGSGSNSSSSSSGGGG GGGGGSNSSSSSSSTFNPQADTGEQPYEHLTAESFPDI SLNNEKVLVETSYPSQTTRLPPITYTGRFSLEPAPNS GNTLWPEPLFSLVSGLVSMTNPPASSSSAPSPAASSA SASQSPPLSCAVPSNDSSPIYSAAPTFTPTNTDIFPEPQ SQAFPGSAGTALQYPPPAYPAAKGGFQVPMIPDYLF PQQQGDGLGTPDQKPFQGLESTQQPSLTPLSTIKA FATQSGSQDLKALNTSYQSQLIKPSRMRKYPNRPSK TPPHERPYACPVESCDRRFSRSDNLVRHIRIHTGQKP FQCRICMRNFSHRTTLTNHIRTHTGEKPFACDICGRK FAREDNLHTHIRTHTGEKPFACDICGRKFSTSHSLTE HIRIHTGQKPFQCRICMRNFSQSSSLVRHIRTHTGEK PFACDICGRKFAREDNLHTHTKIHLRQKDKKADKS VVASSATSSLSSYSPVATSYSPVTTSYSPATTSYSP SPVPTSFSSPGSSTYSPVHSGFPSPSVATTYSSVPPA FPAQVSSFPSSAVTNSFSASTGLSDMTATFSPRTIEIC	117
20	MAAAKAEMQLMSPLQISDPFGSFPHSPTMDNYPKL EEMMLLSNGAPQFLGAAGAPEGSGSNSSSSSSGGGG GGGGGSNSSSSSSSTFNPQADTGEQPYEHLTAESFPDI SLNNEKVLVETSYPSQTTRLPPITYTGRFSLEPAPNS GNTLWPEPLFSLVSGLVSMTNPPASSSSAPSPAASSA SASQSPPLSCAVPSNDSSPIYSAAPTFTPTNTDIFPEPQ SQAFPGSAGTALQYPPPAYPAAKGGFQVPMIPDYLF PQQQGDGLGTPDQKPFQGLESTQQPSLTPLSTIKA FATQSGSQDLKALNTSYQSQLIKPSRMRKYPNRPSK TPPHERPYACPVESCDRRFSRSDNLVRHIRIHTGQKP FQCRICMRNFSHRTTLTNHIRTHTGEKPFACDICGRK	115

Конструкция	Последовательность	SEQ ID NO
	FAREDNLHTHTKIHRLRQKDRPYACPVESCDRRFSTS HSLTEHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSQSSSLVRHIRTH TGEKPFACDICGRKFAREDNLHTHTKIHRLRQKDKKA DKSVVASSATSSLSSYPSPVATSYPSPVTTSYPSPATT SYSPSPVPTSFSSPGSSTYPSPVHSGFPSPSVATTYSSV PPAFPAQVSSFPSSAVTNSFSASTGLSDMTATFSPRTI EIC	
21	MAAAKAEMQLMSPLQISDPFGSFPHSPTMDNYPKL EEMMLLSNGAPQFLGAAGAPEGSGSNSSSSSSGGGG GGGGGSNSSSSSSSTFNPQADTGEQPYEHLTAESFPDI SLNNEKVLVETSYPSQTTRLPPITYTGRFSLEPAPNS GNTLWPEPLFSLVSGLVSMTNPPASSSSAPSPAASSA SASQSPPLSCAVPSNDSSPIYSAAPTFTPTNTDIFPEPQ SQAFPGSAGTALQYPPPAYPAAKGGFQVPMIPDYLF PQQQGDGLGTPDQKPFQGLESTQQPSLTPLSTIKA FATQSGSQDLKALNTSYQSQLIKPSRMRKYPNRPSK TPPHERPYACPVESCDRRFSRSDNLVRHIRIHTGQKP FQCRICMRNFSREDNLHTHIRTHTGEKPFACDICGR KFARSDDELVRHTKIHRLRQKDRPYACPVESCDRRFSQ SGNLTEHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSTSGHLVRHIR THTGEKPFACDICGRKFAQNSTLTEHTKIHRLRQKDK KADKSVVASSATSSLSSYPSPVATSYPSPVTTSYPSP ATTSYPSPVPTSFSSPGSSTYPSPVHSGFPSPSVATTY SSVPPAFPAQVSSFPSSAVTNSFSASTGLSDMTATFS PRTIEIC	118
22	MTGKLAEKLPVTMSSLLNQLPDNLYPEEIPSAALNLF SGSSDSVVHYNQMATENVMDIGLTNEKPNPELSYS GSFQPAPGNKTVTYLGKFAFDSPSNWCQDNIIISLMS AGILGVPPASGALSTQTSTASMVQPPQGDVEAMYP ALPPYSNCGDLYSEPVSFHDPPQGNPGLAYSPQDYQS AKPALDSNLFPMIPDYNLYHHPNDMGSIPEHKPFQ MDPIRVNPPITPLETIKAFKDKQIHPGFGSLPQPPLT LKPIRPRKYPNRPSKTPLHERPHACPAEGCDRRFSRS DNLVRHLRIHTGHKPFQCRICMRFSHRTTLTNHIRT HTGEKPFACEFCGRKFAREDNLHTHAKIHLKQKEH ACPAEGCDRRFSTSHSLTEHLRIHTGHKPFQCRICMR SFSQSSSLVRHIRTHTGEKPFACEFCGRKFAREDNLH THAKIHLKQKEKKAEEKGGAPSASSAPPVSLAPVVT CA	119
23	MAAAKAEMQLMSPLQISDPFGSFPHSPTMDNYPKL EEMMLLSNGAPQFLGAAGAPEGSGSNSSSSSSGGGG GGGGGSNSSSSSSSTFNPQADTGEQPYEHLTAESFPDI SLNNEKVLVETSYPSQTTRLPPITYTGRFSLEPAPNS GNTLWPEPLFSLVSGLVSMTNPPASSSSAPSPAASSA SASQSPPLSCAVPSNDSSPIYSAAPTFTPTNTDIFPEPQ SQAFPGSAGTALQYPPPAYPAAKGGFQVPMIPDYLF PQQQGDGLGTPDQKPFQGLESTQQPSLTPLSTIKA FATQSGSQDLKALNTSYQSQLIKPSRMRKYPNRPSK TPPHERPYACPVESCDRRFSDPGALVRHIRIHTGQKP FQCRICMRNFSRSDNLVRHIRTHTGEKPFACDICGR	120

Конструкция	Последовательность	SEQ ID NO
	KFAQSGDLRRHTKIHRLRQKDRPYACPVESCDRRFST HLDLIRHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSTSGNLVRHIR THTGEKPFACDICGRKFARSDNLVRHTKIHRLRQKDR PYACPVESCDRRFSQSGHLTEHIRIHTGQKPFQCRIC MRNFSERSHLREHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQAG HLASHTKIHRLRQKDKKADKSVVASSATSSLSSYPSP VATSYSPVTTSYSPATTSYSPVPTSFSSPGSSTYP SPVHSGFPSPSVATTYSSVPPAFPAQVSSFPSSAVTNS FSASTGLSDMTATFSPRTIEIC	
24	MAAAKAEMQLMSPLQISDPFGSFPHSPTMDNYPKL EEMMLLSNGAPQFLGAAGAPEGSGSNSSSSSSSGGGG GGGGGSNSSSSSSSTFNPQADTGEQPYEHLTAESFPDI SLNNEKVLVETSYPSQTTRLPPITYTGRFSLEPAPNS GNTLWPEPLFSLVSGLVSMTNPPASSSSAPSPAASSA SASQSPPLSCAVPSNDSSPIYSAAPTFTPTNTDIFPEPQ SQAFFGSAGTALQYPPPAYPAAKGGFQVPMIPDYLF PQQQGDGLGTPDQKPFQGLESTQQPSLTPLSTIKA FATQSGSQDLKALNTSYQSQLIKPSRMRKYPNRPSK TPPHERPYACPVESCDRRFSRSDNLTRHIRIHTGQKP FQCRICMRNFSSHSTLTNHIRTHTGEKPFACDICGRK FARSDNRKTHIRHTHTGEKPFACDICGRKFSTSHSLTE HIRIHTGQKPFQCRICMRNFSQSSSLTRHIRTHTGEKP FACDICGRKFARSDNRKTHTKIHRLRQKDKKADKSV VASSATSSLSSYPSPVATSYSPVTTSYSPATTSYPS PVPTSFSSPGSSTYPSPVHSGFPSPSVATTYSSVPPAF PAQVSSFPSSAVTNSFSASTGLSDMTATFSPRTIEIC	121
25	MTGKLAEKLPVTMSSLLNQLPDNLYPEEIPSA LNLF SGSSDSVVHYNQMATENVMDIGLTNEKPNPELSYS GSFQPAPGNKTVTYLGKFAFDSPSNWCQDNII SLMS AGILGVPPASGALSTQTSTASMVQPPQGDVEAMYP ALPPYSNCGDLYSEPVSFHDPPQGNPGLAYSPQDYQS AKPALDSNLFPMIPDYNLYHHPNDMGSIPEHKPFQG MDPIRVNPPITPLETIKAFKDKQIHPGFGSLPQPPLT LKPIRPRKYPNRPSKTPLHERPHACPAEGCDRRFSRS DNLVRHLRIHTGHKPFQCRICMRSFSREDNLHTHIRT HTGEKPFACEFCGRKFARSDELVRHAKIHLKQKEH ACPAEGCDRRFSQSGNLTEHLRIHTGHKPFQCRICM RSFSTSGHLVRHIRTHTGEKPFACEFCGRKFAQNSTL TEHAKIHLKQKEKKAEEKGAPSASSAPPVSLAPVVT TCA	122
26	MAAAKAEMQLMSPLQISDPFGSFPHSPTMDNYPKL EEMMLLSNGAPQFLGAAGAPEGSGSNSSSSSSSGGGG GGGGGSNSSSSSSSTFNPQADTGEQPYEHLTAESFPDI SLNNEKVLVETSYPSQTTRLPPITYTGRFSLEPAPNS GNTLWPEPLFSLVSGLVSMTNPPASSSSAPSPAASSA SASQSPPLSCAVPSNDSSPIYSAAPTFTPTNTDIFPEPQ SQAFFGSAGTALQYPPPAYPAAKGGFQVPMIPDYLF PQQQGDGLGTPDQKPFQGLESTQQPSLTPLSTIKA FATQSGSQDLKALNTSYQSQLIKPSRMRKYPNRPSK TPPHERPYACPVESCDRRFSRSDNLTRHIRIHTGQKP FQCRICMRNFSRSDNLTHIRHTHTGEKPFACDICGRK	123

Конструкция	Последовательность	SEQ ID NO
	FARSDERKRHIRTHTGEKPFACDICGRKFSQSGNLTE HIRIHTGQKPFQCRICMRNFSTSGHLTRHIRTHTGEK PFACDICGRKFAQSSTRKEHTKIHLRQKDKKADKSV VASSATSSLSSYPSPVATSYPSPVTTSYPSPATTSYPS PVPTSFSSPGSSTYPSPVHSGFPSPSVATTYSSVPPAF PAQVSSFPSSAVTNSFSASTGLSDMTATFSPRTIEIC	
27	MAAAKAEMQLMSPLQISDPFGSFPHSPTMDNYPKL EEMMLLSNGAPQFLGAAGAPEGSGSNSSSSSSSGGGG GGGGGSNSSSSSSTFNPQADTGEQPYEHLTAESFPDI SLNNEKVLVETSYPSTTRLPPITYTGRFSLEPAPNS GNTLWPEPLFSLVSGLVSMTNPPASSSSAPSPAASSA SASQSPPLSCAVPSNDSSPIYSAAPTFTPTNTDIFPEPQ SQAFFGSAGTALQYPPPAYPAAKGGFQVPMIPDYL PQQQGDGLGTPDQKPFQGLESTQQPSLTPLSTIKA FATQSGSQDLKALNTSYQSQLIKPSRMRKYPNRPSK TPPHERPYACPVESCDRRFSRSDNLVRHIRIHTGQKP FQCRICMRNFSREDNLHTHIRTHTGEKPFACDICGR KFARSDDELVRHIRTHTGEKPFACDICGRKFSQSGNL TEHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSTSGHLVRHIRTHTGE KPFACDICGRKFAQNSTLTEHTKIHLRQKDKKADKS VVASSATSSLSSYPSPVATSYPSPVTTSYPSPATTSYPS SPVPTSFSSPGSSTYPSPVHSGFPSPSVATTYSSVPPA FPAQVSSFPSSAVTNSFSASTGLSDMTATFSPRTIEIC	124
28	MAPKKKRKVGIIHGVPAALEPGEKPYKCPECCKSFS PADLTRHQRTHHTGEKPYKCPECCKSFSRSDNLVRH QRTHHTGEKPYKCPECCKSFSREDNLHTHQRTHHTGE KPYKCPECCKSFSRSDNLVRHQRTHHTGEKPYKCPEC CKSFSQSGNLTEHQRTHHTGEKPYKCPECCKSFSSTSG HLVRHQRTHHTGKKTSKRPAATKKAGQAKKKKGSY PYDVDPDYALEDALDDFDLDMLGSDALDDFDLDM LGSDALDDFDLDMLGSDALDDFDLDM	125
29	MAPKKKRKVGIIHGVPAALEPGEKPYKCPECCKSFS DPGALVRHQRTHHTGEKPYKCPECCKSFSRSDNLVR HQRTHHTGEKPYKCPECCKSFSQSGDLRRHQRTHHTG EKPYKCPECCKSFSSTHLDLIRHQRTHHTGEKPYKCPE CKSFSSTSGNLVRHQRTHHTGEKPYKCPECCKSFSRS DNLVRHQRTHHTGKKTSKRPAATKKAGQAKKKKGSY YPYDVDPDYALEDALDDFDLDMLGSDALDDFDLDM LGSDALDDFDLDMLGSDALDDFDLDM	126
30	MAPKKKRKVGIIHGVPAALEPGEKPYKCPECCKSFS RSDNLVRHQRTHHTGEKPYKCPECCKSFSHRITLTNH QRTHHTGEKPYKCPECCKSFSREDNLHTHQRTHHTGE KPYKCPECCKSFSSTSHSLTEHQRTHHTGEKPYKCPEC CKSFSQSSSLVRHQRTHHTGEKPYKCPECCKSFSRED NLHTHQRTHHTGKKTSKRPAATKKAGQAKKKKGSY PYDVDPDYALEEASGSGRADALDDFDLDMLGSDALD DFDLDMLGSDALDDFDLDMLGSDALDDFDLDMLIN SRSSGSPKKKRKVGSGYLPDTDDRHRIEEKRKRTYE TFKSIMKKSPFSGPTDPRPPPRRIA VPSRSSASVPKPA PQYPFTSSLSTINYDEFPTMVFPQSGQISQASALAPAP PQVLPQAPAPAPAPAMVSALAQAAPVPVLPAPGPPQ	99

Конструкция	Последовательность	SEQ ID NO
	AVAPPAPKPTQAGEGTLSEALLQLQFDDDEDLGALLG NSTDPAVFTDLASVDNSEFQQLLNQGIPVAPHTTEP MLMEYPEAITRLVTGAQRPPDPAPAPLGAPGLPNGL LSGDEDFSSIADMDFSALLGSGSGSRDSREGMFLPK PEAGSAISDVFEGREVCQPKRIRPFHPPGSPWANRPL PASLAPTPTGPVHEPVGSLTPAPVPQPLDPAPAVTPE ASHLLEDPEETSQAVKALREMADTVIPQKEEAAIC GQMDLSHPPPRGHLDELTTTLESMTEDLNLDSP LTP ELNEILD TFLNDECLLHAMHISTGLSIFDTSLF	
31	MAPKKKRKVGIIHGVPAALEPGEKPYKCPECCKSFS RSDNLVRHQRTHTGEKPYKCPECCKSFSREDNLHT HQRTHTGEKPYKCPECCKSFSRSDNLVRHQRTHTGE KPYKCPECCKSFSQSGNLTEHQRTHTGEKPYKCPEC CKSFSSTSGHLVRHQRTHTGEKPYKCPECCKSFSQNS TLTEHQRTHTGKKT SKRPAATKKAGQAKKKKGSYP YDVDPYALEDALDDFDLDMLGSDALDDFDLDMLG SDALDDFDLDMLGSDALDDFDLDMLG	102
32	MAPKKKRKVGIIHGVPAALEPGEKPYKCPECCKSFS RSDNLVRHQRTHTGEKPYKCPECCKSFSREDNLHT HQRTHTGEKPYKCPECCKSFSRSDNLVRHQRTHTGE KPYKCPECCKSFSQSGNLTEHQRTHTGEKPYKCPEC CKSFSSTSGHLVRHQRTHTGEKPYKCPECCKSFSQNS TLTEHQRTHTGKKT SKRPAATKKAGQAKKKKGSYP YDVDPYALEDALDDFDLDMLGSDALDDFDLDMLG SDALDDFDLDMLGSDALDDFDLDMLG	102
33	MAPKKKRKVGIIHGVPAALEPGEKPYKCPECCKSFS RSDNLVRHQRTHTGEKPYKCPECCKSFSREDNLHT HQRTHTGEKPYKCPECCKSFSRSDNLVRHQRTHTGE KPYKCPECCKSFSQSGNLTEHQRTHTGEKPYKCPEC CKSFSSTSGHLVRHQRTHTGEKPYKCPECCKSFSQNS TLTEHQRTHTGKKT SKRPAATKKAGQAKKKKGSYP YDVDPYALEEASGSGRADALDDFDLDMLGSDALD DFDLDMLGSDALDDFDLDMLGSDALDDFDLDMLIN SRSSGSPKKKRKVGSIYLPDTDDRHRIEEKRTYE TFKSIMKKSPFSGPTDPRPPPRRIAVPSRSSASVPKPA PQYPFTSSLSTINYDEFPTMVFP SGQISQASALAPAP PQVLPQAPAPAPAPAMVSALAQAPAPVPVLAPGPPQ AVAPPAPKPTQAGEGTLSEALLQLQFDDDEDLGALLG NSTDPAVFTDLASVDNSEFQQLLNQGIPVAPHTTEP MLMEYPEAITRLVTGAQRPPDPAPAPLGAPGLPNGL LSGDEDFSSIADMDFSALLGSGSGSRDSREGMFLPK PEAGSAISDVFEGREVCQPKRIRPFHPPGSPWANRPL PASLAPTPTGPVHEPVGSLTPAPVPQPLDPAPAVTPE ASHLLEDPEETSQAVKALREMADTVIPQKEEAAIC GQMDLSHPPPRGHLDELTTTLESMTEDLNLDSP LTP ELNEILD TFLNDECLLHAMHISTGLSIFDTSLF	100
34	MAPKKKRKVGIIHGVPAALEPGEKPYKCPECCKSFS RSDNLVRHQRTHTGEKPYKCPECCKSFSREDNLHT HQRTHTGEKPYKCPECCKSFSRSDNLVRHQRTHTGE KPYKCPECCKSFSQSGNLTEHQRTHTGEKPYKCPEC CKSFSSTSGHLVRHQRTHTGEKPYKCPECCKSFSQNS	127

Конструкция	Последовательность	SEQ ID NO
	TLTEHQRTHTGKKT SKRPAATKKAGQAKKKKGSD ALDDFDLDM LGSDALDDFDLDM LGSDALDDFDLDM MLGSDALDDFDLDM	
35	MAPKKRKVG I HGVPAALEPG EKPYKCPEC GKSF S RSDNLVRHQ RTHTGEKPYKCPEC GKSF SREDNLHT HQRTHTGEKPYKCPEC GKSF SRSDNLVRHQ RTHTGE KPYKCPEC GKSF SQSGNLTEHQ RTHTGEKPYKCPEC GKSFSTSGHLVRHQ RTHTGEKPYKCPEC GKSF SQNS TLTEHQRTHTGKKT SKRPAATKKAGQAKKKKGSD ALDDFDLDM LGSDALDDFDLDM LGSDALDDFDLDM MLGSDALDDFDLDM	127
36	MAADHLM LAEGYRLVQRPPSAAAAHGPHALRTLPP YAGPGLDSGLRPRGAPLGPPPPRQPGALAYGAFGPP SSFQPFPAVPPPAAGIAHLQPVATPYPGRAAAPPNAP GGPPGPQAPSA AAPP PPAHALGGMDAELIDEEALT SLELELGLHRVRELPELFLGQSEFDCFS DLGSAPPAG SVSCQSQLIKPSRM RKYPNRPSKTPPHERPYACPVES CDRRFSRSDNLVRHRIHTGQKPFQCRICMRNFSRED NLHTHIRTHTGEKPFACDICGRKFARSDELVRHTKIH LRQKDRPYACPVESCDRRFSQSGNLTEHIRIHTGQK PFQCRICMRNFSTSGHLVRHIRTHTGEKPFACDICGR KFAQNSTLTEHTKIHLRQKDK	128
37	MAADHLM LAEGYRLVQRPPSAAAAHGPHALRTLPP YAGPGLDSGLRPRGAPLGPPPPRQPGALAYGAFGPP SSFQPFPAVPPPAAGIAHLQPVATPYPGRAAAPPNAP GGPPGPQAPSA AAPP PPAHALGGMDAELIDEEALT SLELELGLHRVRELPELFLGQSEFDCFS DLGSAPPAG SVSCGGSGGGSGGQSQLIKPSRM RKYPNRPSKTPPHE RPYACPVESCDRRFSRSDNLVRHRIHTGQKPFQCRI CMRNFSREDNLHTHIRTHTGEKPFACDICGRKFARS DELVRHTKIHLRQKDRPYACPVESCDRRFSQSGNL TEHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSTSGHLVRHIRTHTGE KPFACDICGRKFAQNSTLTEHTKIHLRQKDK	106
38	MAADHLM LAEGYRLVQRPPSAAAAHGPHALRTLPP YAGPGLDSGLRPRGAPLGPPPPRQPGALAYGAFGPP SSFQPFPAVPPPAAGIAHLQPVATPYPGRAAAPPNAP GGPPGPQAPSA AAPP PPAHALGGMDAELIDEEALT SLELELGLHRVRELPELFLGQSEFDCFS DLGSAPPAG SVSCGGSGGGSGGGSGGGSGGQSQLIKPSRM RKYPN RPSKTPPHERPYACPVESCDRRFSRSDNLVRHRIHT GQKPFQCRICMRNFSREDNLHTHIRTHTGEKPFACDI CGRKFARSDELVRHTKIHLRQKDRPYACPVESCDRR FSQSGNLTEHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSTSGHLVR HIRTHTGEKPFACDICGRKFAQNSTLTEHTKIHLRQK DK	129
39	MAADHLM LAEGYRLVQRPPSAAAAHGPHALRTLPP YAGPGLDSGLRPRGAPLGPPPPRQPGALAYGAFGPP SSFQPFPAVPPPAAGIAHLQPVATPYPGRAAAPPNAP GGPPGPQAPSA AAPP PPAHALGGMDAELIDEEALT SLELELGLHRVRELPELFLGQSEFDCFS DLGSAPPAG SVSCGGSGGGSGGQSQLIKPSRM RKYPNRPSKTPPHE	105

Конструкция	Последовательность	SEQ ID NO
	RPYACPVESCDRRFSRSDNLVRHIRIHTGQKPFQCRI CMRNFSREDNLHTHIRTHTGEKPFACDICGRKFARS DELVRHTKIHRLQKDRPYACPVESCDRRFSQSGNLT EHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSTSGHLVRHIRTHTGE KPFACDICGRKFAQNSTLTEHTKIHRLQKDKLEMA DHLMLAEGYRLVQRPPSAAAAHGPHALRTLPPYAGP GLDSGLRPRGAPLGPPPPRQPGALAYGAFGPPSSFQ PFAVPPPAAGIAHLQPVATPYPGRAAAPPNAPGGPP GPQPAPSAAAPPPPAHALGGMDAELIDEEALTSLEL ELGLHRVRELPELFLGQSEFDCFSDLGSAPPAGSVSC	
40	MAADHLMLAEGYRLVQRPPSAAAAHGPHALRTLPP YAGPGLDSGLRPRGAPLGPPPPRQPGALAYGAFGPP SSFQPFPAVPPPAAGIAHLQPVATPYPGRAAAPPNAP GGPPGPQPAPSAAAPPPPAHALGGMDAELIDEEALT SLELELGLHRVRELPELFLGQSEFDCFSDLGSAPPAG SVSCADHLMLAEGYRLVQRPPSAAAAHGPHALRTL PPYAGPGLDSGLRPRGAPLGPPPPRQPGALAYGAFG PPSSFQPFPAVPPPAAGIAHLQPVATPYPGRAAAPPN APGGPPGPQPAPSAAAPPPPAHALGGMDAELIDEEA LTSLELELGLHRVRELPELFLGQSEFDCFSDLGSAPP AGSVSCQSQLIKPSRMRKYPNRPSTPPHERPYACP VESCDRRFSRSDNLVRHIRIHTGQKPFQCRICMRNFS REDNLHTHIRTHTGEKPFACDICGRKFARSDELVRH TKIHRLQKDRPYACPVESCDRRFSQSGNLTEHIRIHT GQKPFQCRICMRNFSTSGHLVRHIRTHTGEKPFACDI CGRKFAQNSTLTEHTKIHRLQKDK	130
41	MAADHLMLAEGYRLVQRPPSAAAAHGPHALRTLPP YAGPGLDSGLRPRGAPLGPPPPRQPGALAYGAFGPP SSFQPFPAVPPPAAGIAHLQPVATPYPGRAAAPPNAP GGPPGPQPAPSAAAPPPPAHALGGMDAELIDEEALT SLELELGLHRVRELPELFLGQSEFDCFSDLGSAPPAG SVSCGGSGGGSGADHLMLAEGYRLVQRPPSAAAAH GPHALRTLPPYAGPGLDSGLRPRGAPLGPPPPRQPG ALAYGAFGPPSSFQPFPAVPPPAAGIAHLQPVATPYP GRAAAPPNAPGGPPGPQPAPSAAAPPPPAHALGGM DAELIDEEALTSLELELGLHRVRELPELFLGQSEFDC FSDLGSAPPAGSVSCGGSGGGSGQSQLIKPSRMRKY PNRPSKTPPHERPYACPVESCDRRFSRSDNLVRHIRI HTGQKPFQCRICMRNFSREDNLHTHIRTHTGEKPFAC DICGRKFARSDELVRHTKIHRLQKDRPYACPVESC DRRFSQSGNLTEHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSTSGH LVRHIRTHTGEKPFACDICGRKFAQNSTLTEHTKIH RLQKDK	131
42	MAPKKKRKVGIHGVPAALEPGEKPYKCPECCKSFS RSDNLVRHQRTHTGEKPYKCPECCKSFSREDNLHT HQRTHTGEKPYKCPECCKSFSRSDNLVRHQRTHTGE KPYKCPECCKSFSQSGNLTEHQRTHTGEKPYKCPEC CKSFSTSGHLVRHQRTHTGEKPYKCPECCKSFSQNS TLTEHQRTHTGKKTSKRPAATKKAGQAKKKKGSYP YDVPDYALEDALDDFDLDMLGSDALDDFDLDMLG SDALDDFDLDMLGSDALDDFDLDMLG	102

Конструкция	Последовательность	SEQ ID NO
43	MAPKKRKVGIHGVPAALEPGEKPYKCPECCKSFS RSDNLVRHQRTHTGEKPYKCPECCKSFSREDNLHT HQRTHTGEKPYKCPECCKSFSRSDNLVRHQRTHTGE KPYKCPECCKSFSQSGNLTEHQRTHTGEKPYKCPEC CKSFSSTSGHLVRHQRTHTGEKPYKCPECCKSFSQNS TLTEHQRTHTGKKTSKRPAATKKAGQAKKKKGSYP YDVPDYALEDALDDFDLDMLGSDALDDFDLDMLG SDALDDFDLDMLGSDALDDFDLDMLG	102
44	MAADHMLAEGYRLVQRPPSAAAAHGPHALRTLPP YAGPGLDSGLRPRGAPLGPPPPRQPGALAYGAFGPP SSFQPFPAVPPPAAGIAHLQPVATPYPGRAAAPPNAP GGPPGPQPAPSAAAPPPPAHALGGMDAELIDEEALT SLELELGLHRVRELPELFLGQSEFDCFSDLGSAPPAG SVSCGGSGGGSGGSQLIKPSRMRKYPNRPSKTPPHE RPYACPVESCDRRFSRSDNLVRHIRIHTGQKPFQCRI CMRNFSREDNLHTHIRTHTGEKPFACDICGRKFARS DELVRHTKIHRLQKDRPYACPVESCDRRFSQSGNLT EHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSTSGHLVRHIRTHTGE KPFACDICGRKFAQNSTLTEHTKIHRLQKDK	106
45	MAADHMLAEGYRLVQRPPSAAAAHGPHALRTLPP YAGPGLDSGLRPRGAPLGPPPPRQPGALAYGAFGPP SSFQPFPAVPPPAAGIAHLQPVATPYPGRAAAPPNAP GGPPGPQPAPSAAAPPPPAHALGGMDAELIDEEALT SLELELGLHRVRELPELFLGQSEFDCFSDLGSAPPAG SVSCGGSGGGSGGSQLIKPSRMRKYPNRPSKTPPHE RPYACPVESCDRRFSRSDNLVRHIRIHTGQKPFQCRI CMRNFSREDNLHTHIRTHTGEKPFACDICGRKFARS DELVRHTKIHRLQKDRPYACPVESCDRRFSQSGNLT EHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSTSGHLVRHIRTHTGE KPFACDICGRKFAQNSTLTEHTKIHRLQKDK	106
46	MAADHMLAEGYRLVQRPPSAAAAHGPHALRTLPP YAGPGLDSGLRPRGAPLGPPPPRQPGALAYGAFGPP SSFQPFPAVPPPAAGIAHLQPVATPYPGRAAAPPNAP GGPPGPQPAPSAAAPPPPAHALGGMDAELIDEEALT SLELELGLHRVRELPELFLGQSEFDCFSDLGSAPPAG SVSCGGSGGGSGGGSGGGSGGSQLIKPSRMRKYPN RPSKTPPHERPYACPVESCDRRFSRSDNLVRHIRIHT GQKPFQCRICMRNFREDNLHTHIRTHTGEKPFACDI CGRKFARSDDELVRHTKIHRLQKDRPYACPVESCDRR FSQSGNLTEHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSTSGHLVR HIRTHTGEKPFACDICGRKFAQNSTLTEHTKIHRLQK DK	205
47	MAADHMLAEGYRLVQRPPSAAAAHGPHALRTLPP YAGPGLDSGLRPRGAPLGPPPPRQPGALAYGAFGPP SSFQPFPAVPPPAAGIAHLQPVATPYPGRAAAPPNAP GGPPGPQPAPSAAAPPPPAHALGGMDAELIDEEALT SLELELGLHRVRELPELFLGQSEFDCFSDLGSAPPAG SVSCADHMLAEGYRLVQRPPSAAAAHGPHALRTL PPYAGPGLDSGLRPRGAPLGPPPPRQPGALAYGAFG PPSSFQPFPAVPPPAAGIAHLQPVATPYPGRAAAPPN APGGPPGPQPAPSAAAPPPPAHALGGMDAELIDEEA	207

Конструкция	Последовательность	SEQ ID NO
	LTSLELELGLHRVRELPELFLGQSEFDCFSDLGSAPP AGSVSCQSQLIKPSRMRKYPNRPSKTPPHERPYACP VESCDRRFSRSDNLVRHIRHTGQKPFQCRICMRNFS REDNLHHTHIRTHTGEKPFACDICGRKFARSDELVRH TKIHLRQKDRPYACPVESCDRRFSQSGNLTEHIRIHT GQKPFQCRICMRNFSTSGHLVRHIRHTHTGEKPFACDI CGRKFAQNSTLTEHTKIHLRQKDK	
48	MAADHMLAEGYRLVQRPPSAAAAHGPALRTLPP YAGPGLDSGLRPRGAPLGPPPPRQPGALAYGAFGPP SSFQPFPAVPPPAAGIAHLQPVATPYPGRAAAPPNAP GGPPGPQAPSAAPPAAHALGGMDAELIDEEALT SLELELGLHRVRELPELFLGQSEFDCFSDLGSAPPAG SVSCGGSGGGSGADHMLAEGYRLVQRPPSAAAAH GPHALRTLPPYAGPGLDSGLRPRGAPLGPPPPRQPG ALAYGAFGPPSSFQPFPAVPPPAAGIAHLQPVATPYP GRAAAPPNAPGGPPGPQAPSAAPPAAHALGGM DAELIDEEALTSLELELGLHRVRELPELFLGQSEFDC FSDLGSAPPAGSVSCGGSGGGSGQSQLIKPSRMRKY PNRPSKTPPHERPYACPVESCDRRFSRSDNLVRHIRI HTGQKPFQCRICMRNFSREDNLHHTHIRTHTGEKPFAC DICGRKFARSDELVRHTKIHLRQKDRPYACPVESC DRRFSQSGNLTEHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSTSGH LVRHIRHTHTGEKPFACDICGRKFAQNSTLTEHTKIHL RQKDK	209
49	MELELDAGDQDLLAFLLEESGDLGTAPDEAVRAPL DWALPLSEVPSDWEVDDLLCSLLSPPASLNILSSSNP CLVHHDHTYSLPRETVSMDLESESCRKEGTQMTPQ HMEELAEQEIARLVLTDEEKSLLEKEGLILPETLPLT KTEEQILKRVRLEPGEKPYKCPECCKSFSRSDNLVR HQRTHHTGEKPYKCPECCKSFSREDNLHHTHQRTHHTG EKPYKCPECCKSFSRSDNLVRHQRTHHTGEKPYKCPE CGKSFSQSGNLTEHQRTHHTGEKPYKCPECCKSFSST GHLVRHQRTHHTGEKPYKCPECCKSFSQNSTLTEHQ RTHHTGKKTSVYVGGLESRVLYTAQNMELQNKVQ LLEEQLNLSLLDQLRKLQAMVIEISNKTSSSSTCILVLL VSFCLLLVPAMYSSDTRGSLPAEHGVLSRQLRALPS EDPYQLELPALQSEVPKSTHQLWDGSDCVLQAPG NTSCLLHYMPQAPSAEPPELWPFDFSEPLCRGPIL PLQANLTRKGGWLPTGSPSVILQDRYSG	213
50	MELELDAGDQDLLAFLLEESGDLGTAPDEAVRAPL DWALPLSEVPSDWEVDDLLCSLLSPPASLNILSSSNP CLVHHDHTYSLPRETVSMDLESESCRKEGTQMTPQ HMEELAEQEIARLVLTDEEKSLLEKEGLILPETLPLT KTEEQILKRVRRPYACPVESCDRRFSRSDNLVRHIRI HTGQKPFQCRICMRNFSREDNLHHTHIRTHTGEKPFAC DICGRKFARSDELVRHTKIHLRQKDRPYACPVESC DRRFSQSGNLTEHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSTSGH LVRHIRHTHTGEKPFACDICGRKFAQNSTLTEHTKIHL RQKDVYVGGLESRVLYTAQNMELQNKVQLLEEQLN LSLLDQLRKLQAMVIEISNKTSSSSTCILVLLVSFCL LLPAMYSSDTRGSLPAEHGVLSRQLRALPSEDPYQ	217

Конструкция	Последовательность	SEQ ID NO
	LELPALQSEVPKDSHTQWLDGSDCVLQAPGNTSCL LHYMPQAPSAEPPLWPFDFSEPLCRGPILPLQAN LTRKGGWLPTGSPSVILQDRYSG	
51	MELELDAGDQDLLAFLLEESGDLGTAPDEAVRAPL DWALPLSEVPDWEVDDLLCSLLSPPASLNILSSSNP CLVHHDHTYSLPRETVSMDLESESCRKEGTQMTPQ HMEELAEQEIARLVLTDEEKSLLEKEGLILPETLPLT KTEEQILKRVRPYACPVESCDRRFSRSDNLVRHIRI HTGQKPFQCRICMRNFSHRTTLTNHIRTHTGEKPIFA CDICGRKFAREDNLHTHTKIHLRQKDRPYACPVESC DRRFSTSHSLTEHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSQSSSL VRHIRTHTGEKPIFACDICGRKFAREDNLHTHTKIHL RQKDVYVGGLESRLVLYTAQNMELQNKVQLLEEQ NLSLLDQLRKLQAMVIEISNKTSSSSTCILVLLVSFCL LLVPAMYSSDTRGSLPAEHGVLSRQLRALPSEDPIYQ LELPALQSEVPKDSHTQWLDGSDCVLQAPGNTSCL LHYMPQAPSAEPPLWPFDFSEPLCRGPILPLQAN LTRKGGWLPTGSPSVILQDRYSG	219
52	MELELDAGDQDLLAFLLEESGDLGTAPDEAVRAPL DWALPLSEVPDWEVDDLLCSLLSPPASLNILSSSNP CLVHHDHTYSLPRETVSMDLESESCRKEGTQMTPQ HMEELAEQEIARLVLTDEEKSLLEKEGLILPETLPLT KTEEQILKRVRLEPGKPYKCPECGKSFSRSDNLVR HQRTHHTGEKPYKCPECGKSFSREDNLHTHQRTHHTG EKPYKCPECGKSFSRSDNLVRHQRTHHTGEKPYKCPE CGKSFSQSGNLTEHQRTHHTGEKPYKCPECGKSFSST GHLVRHQRTHHTGEKPYKCPECGKSFSQNSTLTHQ RTHHTGKKTSVYVGGLESRLVLYTAQNMELQNKVQ LLEEQLNLSLLDQLRKLQAMVIEIS	221
53	MELELDAGDQDLLAFLLEESGDLGTAPDEAVRAPL DWALPLSEVPDWEVDDLLCSLLSPPASLNILSSSNP CLVHHDHTYSLPRETVSMDLESESCRKEGTQMTPQ HMEELAEQEIARLVLTDEEKSLLEKEGLILPETLPLT KTEEQILKRVRPYACPVESCDRRFSRSDNLVRHIRI HTGQKPFQCRICMRNFSREDNLHTHIRTHTGEKPIFA CDICGRKFARSDNLVRHTKIHLRQKDRPYACPVESC DRRFQSGNLTEHIRIHTGQKPFQCRICMRNFSTSGH LVRHIRTHTGEKPIFACDICGRKFAQNSTLTHHTKIHL RQKDVYVGGLESRLVLYTAQNMELQNKVQLLEEQ NLSLLDQLRKLQAMVIEIS	223

Таблица 7. Последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие раскрытые в настоящем документе иллюстративные сконструированные факторы транскрипции.

Конструкция	Последовательность	SEQ ID NO
31 (RE + кодирующая)	ggaggaagccatcaactaaactacaatgactgtaagatacaaaattgggaatggt aacatattttgaagttctgttgacataaagaatcatgatattaatgcccatggaaatg aaaggcgcatcaacactatgggttgaaaagggggaattgtagagcacagatgt	67

Конструкция	Последовательность	SEQ ID NO
	gttcgtgtggcagtgctgtctctagcaatactcagagaagagagagaacaatg aaattctgattggccccagtgtagccagatgaggttcagctgccaactttctt tcacatcttatgaaagtcatttaagcacaactaactttttttttttttttttttgagaca gagcttctgtctgttggccaggacagagtgtagtgactcaatctcggctcact gcagcctccacctcctaggtcaaacgggtcctcctgcatcagcctcccaagtagc tggaattacaggagtgcccaccatgccagctaattttgtattttaatagatacg ggggtttcaccatatcaccaggtggtctcgaactcctggcctcaagtatcca cctgcctcggcctcccaagtgtctgggattatagcgctcagccactatgcccac ccgaccaacctttttaaaataaatatttaaaaaattggtatttcacatatatactagta ttacatttatccacacaaaacggacgggctcgcgtgaaccagtgaggcccca gacgtgcgcataaataacccctgcgtgctgcaccacctggggagaggggggag gaccacggtaaatggagcgcgcgcatagcaaaaggacgcgggggtcctttct ctgccgtggcactgggtagctgtggccaggtgtggtactttgatggggcccag ggctggagctcaaggaagcgtcgcaggggtcacagatctgggggaaccccg ggaaaagcactgaggcaaaaccgctcgtctcctacaatatatgggagggg gaggttgagtacgttctggattactcataagacctttttttcctccgggcgcaaa accgtgagctggattataatcgccctataaagctccagaggcggtcaggcacct gcagaggagccccgctcgcgcgactagctgccccgcgcagcaacggcct cgtgatttccccgccgatccggtccccgcctcccactctgccccgcctacccc ggagccgtgcagccgctctccgaatctctcttctcctggcgctcgcgtgcga gaggggaactagcgagaacgaggaagcagctggagggtgacgccgggcagatt acgctgtcagggccgagccgagcggatcgctgggcgctgtgcagaggaaa ggcgggagtgcccggtcgtgtcgcagagccgaggtgggtaagctagcgac cacctggacttccagcgcccaaccgtggcttttcagccaggtcctctctcccg cggttctcaaccaaccccatcccagcgccggccaccaacctcccgaatga gtgcttctgccccagcagccgaaggcgctactaggaacggtaacctgttacttt tccagggccgtagtcgacccgctgcccagttgctgtgcgactgcgcgcgcg gggctagagtgcagggtgactgtggttcttcttgcccaagtccgagggagaa gtaaaagatatgggcctttttccctctcaccttgtctaccaaaagtccttagtccc cggagcagttagcctcttttccaggggaattagccagacacaacaacgggaac cagacaccgaaccagacatgcccggcgtgcgcccctcccgcgtcgtgccttt cctccctctgtctctccagagccggatcttcaaggggagcctccgtgccccgg ctgctcagtcctccggtgtgcaggaccccggaagtctcccgcacagctctc gttctctttgcagcctgtttctgcgcggaccagtcgaggactctggacagtaga ggccccgggacgaccgagctgGAATTCGCCACCATGGCCCC AAAGAAGAAGCGGAAGGTCGGTATCCACGGAGT CCCAGCAGCCCTCGAACCAGGTGAAAAACCTTA CAAATGTCCTGAATGTGGGAAATCATTCAGTCGC AGCGACAACCTGGTGAGACATCAACGCACCCAT ACAGGAGAAAAACCTTATAAATGTCCAGAATGT GGAAAGTCCTTCTCACGAGAGGATAACTTGCAC ACTCATCAACGAACACATACTGGTGAAAAACCA TACAAGTGTCCCGAATGTGGTAAAAGTTTTAGCC GGAGCGATGAACTTGTCCGACACCAACGAACCC ATACAGGCGAGAAGCCTTACAAATGTCCCGAGT GTGGCAAGAGCTTCTCACAATCAGGGAATCTGA CTGAGCATCAACGAACCTCATAACGGGGAAAAAC CTTACAAGTGTCCAGAGTGTGGGAAGAGCTTTTC CACAAGTGGACATCTGGTACGCCACCAGAGGAC ACATACAGGGGAGAAGCCCTACAAATGCCCCGA	

Конструкция	Последовательность	SEQ ID NO
	ATGCGGTAAAAGTTTCTCTCAGAATAGTACCCTG ACCGAACACCAGCGAACACACACTGGGAAAAAA ACGAGTAAAAGGCCGGCGGCCACGAAAAAGGCC GGCCAGGCAAAAAAGAAAAAGGGATCCTACCCA TACGACGTACCAGATTACGCTCTCGAGGACGCGC TGGACGATTTTCGATCTCGACATGCTGGGTTCTGA TGCCCTCGATGACTTTGACCTGGATATGTTGGGA AGCGACGCATTGGATGACTTTGATCTGGACATGC TCGGCTCCGATGCTCTGGACGATTTTCGATCTCGA TATGTTATAAACTAGTaaagagaccggttactgtgacagtaaaa gagaccggttactgtgagaatgaaagagaccggttactgtgatcggaaga gaccggttactgtgagcggccttgaaccagcagacaatgtagctcagtaga aaccagcagacaatgtagctgaatggaaccagcagacaatgtagcttcgg agaaaccagcagacaatgtagctAAGCTTGGGTGGCATCCC TGTGACCCCTCCCCAGTGCCTCTCCTGGCCCTGG AAGTTGCCACTCCAGTGCCCAACCAGCCTTGTCCT AATAAAATTAAGTTGCATCATTTTGTCTGACTAG GTGTCCTTCTATAATATTATGGGGTGGAGGGGGG TGGTATGGAGCAAGGGGCAAGTTGGGAAGACAA CCTGTAGGGCCTGCGGGGTCTATTGGGAACCAA GCTGGAGTGCAGTGGCACAATCTTGGCTCACTGC AATCTCCGCCTCCTGGGTTCAGCGATTCTCCTG CCTCAGCCTCCCGAGTTGTTGGGATTCCAGGCAT GCATGACCAGGCTCAGCTAATTTTTGTTTTTTTGG TAGAGACGGGGTTTCACCATATTGGCCAGGCTGG TCTCCAACCTCCTAATCTCAGGTGATCTACCCACC TTGGCCTCCCAAATTGCTGGGATTACAGGCGTGA ACCACTGCTCCCTTCCCTGTCCTT	
32 (RE + кодирующая)	ggaggaagccatcaactaaactacaatgactgtaagatacaaaattgggaatggt aacatatttgaagttctgttgacataaagaatcatgatattaatgccatggaaatg aaagggcgatcaacactatgggttgaagggggaaattgtagagcacagatgt gttcgtgtggcagtggtgtctctagcaatactcagagaagagagagaacaatg aaattctgattggccccagtgtagccagatgaggttcagctgccaactttctctt tcacatcttatgaaagtcatttaagcacaactaactttttttttttttttttttttgagaca gagtcttctgtctgttgcaggacagagtgcagtagtgactcaatctcggctcact gcagcctccacctcctaggctcaaacggctcctcctcatcagcctcccaagtagc tggaattacaggagtggccaccatgccagctaattttgtattttaatagatacg gggggttcaccatatcaccaggctgggtctcgaactcctggcctcaagtatcca cctgcctcggcctccaaagtgtgggattataggcgtcagccactatgccaac ccgaccaaccttttttaataaataatttaaaaaattggtatttcacatatatactagta ttacatttatccacacaaaacggacgggctcgcgtgaaccagtgaggcccca gacgtgcgcataaataaccctgcgtgctgcaccacctggggagaggggggag gaccacggtaaatggagcgagcgcatagcaaaaggagcgggggtcttttct ctgccgtggcactgggtagctgtggccaggtgtggtactttgatggggcccag ggctggagctcaaggaagcgtcgcagggtcacagatctgggggaaccccg ggaaaagcactgaggcaaacccgctcgtctcctacaatatatgggagggg gaggttagtacgttctggattactcataagaccttttttttctccggcgcaaa accgtgagctggatttataatcgccctataaagctccagaggcggtcaggcacct gcagaggagccccgctcgcgactagctgccccgcgagcaacggcct cgtgatttccccgcatccggtccccgctccccactctgccccgcctacccc	68

Конструкция	Последовательность	SEQ ID NO
	ggagccgtgcagccgcctctccgaatctctctctctcctggcgctcgcggtgcga gagggaaactagcgagaacgaggaagcagctggaggtgacgccgggcagatt acgcctgtcagggccgagccgagcggatcgctgggcgctgtgcagaggaaa ggcgggagtgcccggctcgtgtcgcagagccgaggtgggtaagctagcgac cacctggacttcccagcgcccaaccgtggctttcagccaggtcctctctcccg cggcttctcaaccaaccccatcccagcgccggccaccaacctcccgaatga gtgcttctgccccagcagccgaaggcgctactaggaacggtaacctgttacttt tccaggggcccgtagtcgacccgctgcccagttgtgtgactgcgcgcgcg gggctagagtgaagggtgactgtggttcttcttgccaagtccgagggagaac gtaaagatatgggctttttcccctctcacctgtctcaccaaagtccttagtccc cggagcagttagcctcttttccaggggaattagccagacacaacaacgggaac cagacaccgaaccagacatgcccggcccgctgcgcctcccgcgtcgctgccttt cctcctcttgtctctccagagccggatcttcaaggggagcctccgtgccccgg ctgctcagtcctcgggtgtgcaggaccccgggaagtctccccgcacagctctc gttctcttgcagcctgtttctgcgccggaccagtcgaggactctggacagtaga ggccccgggacgaccgagctgGAATTCGCCACCATGGCCCC AAAGAAGAAGCGGAAGGTCGGTATCCACGGAGT CCCAGCAGCCCTCGAACCAGGTGAAAAACCTTA CAAATGTCCTGAATGTGGGAAATCATTCAGTCGC AGCGACAACCTGGTGAGACATCAACGCACCCAT ACAGGAGAAAAACCTTATAAATGTCCAGAATGT GGAAAGTCCTTCTCACGAGAGGATAACTTGCAC ACTCATCAACGAACACATACTGGTGAAAAACCA TACAAGTGTCCCGAATGTGGTAAAAGTTTtagcc GGAGCGATGAACTTGTCCGACACCAACGAACCC ATACAGGCGAGAAGCCTTACAAATGTCCCGAGT GTGGCAAGAGCTTCTCACAATCAGGGAATCTGA CTGAGCATCAACGAACCTCATACCGGGGAAAAAC CTTACAAGTGTCCAGAGTGTGGGAAGAGCTTTTC CACAAGTGGACATCTGGTACGCCACCAGAGGAC ACATACAGGGGAGAAGCCCTACAAATGCCCCGA ATGCGGTAAAAGTTTCTCTCAGAATAGTACCCTG ACCGAACACCAGCGAACACACACTGGGAAAAAA ACGAGTAAAAGGCCGGCGGCCACGAAAAAGGCC GGCCAGGCAAAAAAGAAAAAGGGATCCTACCCA TACGACGTACCAGATTACGCTCTCGAGGACGCGC TGGACGATTTTCGATCTCGACATGCTGGGTTCTGA TGCCCTCGATGACTTTGACCTGGATATGTTGGGA AGCGACGCATTGGATGACTTTGATCTGGACATGC TCGGCTCCGATGCTCTGGACGATTTTCGATCTCGA TATGTTATAAACTAGTAAGCTTGGGTGGCATCCC TGTGACCCCTCCCCAGTGCCCTCTCCTGGCCCTGG AAGTTGCCACTCCAGTGCCCAACAGCCTTGTCTT AATAAAATTAAGTTGCATCATTTTGTCTGACTAG GTGTCCTTCTATAAATTATGGGGTGGAGGGGGG TGGTATGGAGCAAGGGGCAAGTTGGGAAGACAA CCTGTAGGGCCTGCGGGGTCTATTGGGAACCAA GCTGGAGTGCAGTGGCACAATCTTGGCTCACTGC AATCTCCGCCTCCTGGGTTCAGCGATTCTCCTG CCTCAGCCTCCCGAGTTGTTGGGATTCCAGGCAT	

[illegible]

Конструкция	Последовательность	SEQ ID NO
	TACAAGTGTCCCGAATGTGGTAAAAGTTTTAGCC GGAGCGATGAACTTGTCCGACACCAACGAACCC ATACAGGCGAGAAGCCTTACAAATGTCCCGAGT GTGGCAAGAGCTTCTCACAATCAGGGAATCTGA CTGAGCATCAACGAACTCATACCGGGGAAAAAC CTTACAAGTGTCCAGAGTGTGGGAAGAGCTTTTC CACAAGTGGACATCTGGTACGCCACCAGAGGAC ACATACAGGGGAGAAGCCCTACAAATGCCCCGA ATGCGGTAAAAGTTTCTCTCAGAATAGTACCCTG ACCGAACACCAGCGAACACACACTGGGAAAAAA ACGAGTAAAAGGCCGGCGGCCACGAAAAAGGCC GGCCAGGCAAAAAAGAAAAAGGGATCCTACCCA TACGACGTACCAGATTACGCTCTCGAGGAGGCC AGCGGTTCCGGACGGGCTGACGCATTGGACGAT TTTGATCTGGATATGCTGGGAAGTGACGCCCTCG ATGATTTTGACCTTGACATGCTTGGTTCGGATGC CCTTGATGACTTTGACCTCGACATGCTCGGCAGT GACGCCCTTGATGATTTTCGACCTGGACATGCTGA TTAACTCTAGAAGTTCCGGATCTCCGAAAAAGAA ACGCAAAGTTGGTAGCCAGTACCTGCCCGACAC CGACGACCGGCACCGGATCGAGGAAAAGCGGAA GCGGACCTACGAGACATTCAAGAGCATCATGAA GAAGTCCCCCTTCAGCGGCCCCACCGACCCTAGA CCTCCACCTAGAAGAATCGCCGTGCCCAGCAGAT CCAGCGCCAGCGTGCCAAAACCTGCCCCCAGC CTTACCCCTTCACCAGCAGCCTGAGCACCATCAA CTACGACGAGTTCCCTACCATGGTGTTCACCAGC GGCCAGATCTCTCAGGCCTCTGCTCTGGCTCCAG CCCCTCCTCAGGTGCTGCCTCAGGCTCCTGCTCC TGCACCAGCTCCAGCCATGGTGTCTGCACTGGCT CAGGCACCAGCACCCGTGCCTGTGCTGGCTCCTG GACCTCCACAGGCTGTGGCTCCACCAGCCCCTAA ACCTACACAGGCCGGCGAGGGCACACTGTCTGA AGCTCTGCTGCAGCTGCAGTTCGACGACGAGGAT CTGGGAGCCCTGCTGGGAAACAGCACCGATCCT GCCGTGTTACCGACCTGGCCAGCGTGGACAAC AGCGAGTTCCAGCAGCTGCTGAACCAGGGCATC CCTGTGGCCCCCTCACACCACCGAGCCCATGCTGA TGGAATACCCCGAGGCCATCACCCGGCTCGTGAC AGGCGCTCAGAGGCCTCCTGATCCAGCTCCTGCC CCTCTGGGAGCACCAAGGCCTGCCTAATGGACTGC TGTCTGGCGACGAGGACTTCAGCTCTATCGCCGA TATGGATTTCTCAGCCTTGCTGGGCTCTGGCAGC GGCAGCCGGGATTCCAGGGAAGGGATGTTTTTG CCGAAGCCTGAGGCCGGCTCCGCTATTAGTGACG TGTTTGAGGGCCGCGAGGTGTGCCAGCCAAAAC GAATCCGGCCATTTTCATCCTCCAGGAAGTCCATG GGCCAACCGCCCACTCCCCGCCAGCCTCGCACCA ACACCAACCGGTCCAGTACATGAGCCAGTCGGG TCACTGACCCCGGCACCAGTCCCTCAGCCACTGG	

Конструкция	Последовательность	SEQ ID NO
	ATCCAGCGCCCGCAGTGAAGTCCCGAGGCCAGTC ACCTGTTGGAGGATCCCGATGAAGAGACGAGCC AGGCTGTCAAAGCCCTTCGGGAGATGGCCGATA CTGTGATTCCCCAGAAGGAAGAGGCTGCAATCT GTGGCCAAATGGACCTTTCCCATCCGCCCCCAAG GGGCCATCTGGATGAGCTGACAACCACACTTGA GTCCATGACCGAGGATCTGAACCTGGACTCACCC CTGACCCCGGAATTGAACGAGATTCTGGATACCT TCCTGAACGACGAGTGCCTCTTGCATGCCATGCA TATCAGCACAGGACTGTCCATCTTCGACACATCT CTGTTTTAACTAGTaataaaagatctttatttcattagatctgtgtgt tggtttttgtgtg	
34 (RE + кодирующая)	ggaggaagccatcaactaaactacaatgactgtaagatacaaaattgggaatggt aacatatttgaagttctgttgacataaagaatcatgatattaatgcccatggaaatg aaagggcgatcaacactatggtttgaagggggaaattgtagagcacagatgt gttcgtgtggcagtgtgtgtctctagcaatactcagagaagagagagaacaatg aaattctgattggccccagtgtagccagatgaggtcagctgccaactttctctt tcacatcttatgaaagtcatttaagcacaactaactttttttttttttttttttttgagaca gactctgtctgttgcccaggacagagtgcagtagtgactcaatctcggctcact gcagcctccacctctaggctcaaacggctcctctgcatcagcctcccaagtagc tggaaattacaggagtggcccaccatgccagctaattttgtattttaatagatacg ggggtttcacatatacaccaggctggtctcgaactcctggcctcaagtatcca cctgcctcggcctcccaaagtgtgtggattataggcgtcagccactatgccaac ccgaccaacttttttaaaataaatatttaaaaaattggtatttcacatatatactagta ttacatttatecacacaaaacggacgggctcgcgtgaaccagttagggccca gacgtgcgcataaataacccctgcgtgctgcaccacctggggagagggggag gaccacggtaaatggagcgagcgcatagcaaaaggacgcgggggtcttttct ctgccgtggcactgggtagctgtggccaggtgtggtactttgatggggcccag ggctggagctcaaggaagcgtgcagggtcacagatctgggggaaccccg ggaaaagcactgaggcaaaaccgctcgtctctcaaatatgggagggg gaggttagtacgttctggattactcataagaccttttttttcttccgggcgcaaa accgtgagctggattataatcgccctataaagctccagaggcggtcaggcacct gcagaggagccccgccgctccgcccactagctgccccgcgagcaacggcct cgtgatttccccgccgatccgggtccccgcctccccactctgccccgcctacccc ggagccgtgcagccgctctccgaatctctcttctctctggtcgtcgcgtgcga gagggaaactagcgagaacgaggaagcagctggaggtgacggcgagcagatt acgctgtcagggccgagccgagcggatcgtggcgctgtgcagaggaaa ggcgggagtgccccggctcgtgtcgcagagccgaggtgggtaagctagcgac cacctggacttcccagcgcccaaccgtggcttttcagccaggtcctctctccc cggcttctcaaccaacccatcccagcgcggccaccaacctcccgaatga gtgcttctgccccagcagccgaaggcgctactaggaacggtaacctgttacttt tccaggggcccgtagtcgaccgctgcccagttgtgtgctgactgcgcgcgcg gggctagagtgaagggtgactgtgtgttctctggccaagtccgaggagaaac gtaagatatgggctttttccccctctcacctgtctcaccaaagtccttagtccc cggagcagtttagcctcttttccaggggaattagccagacacacaacgggaac cagacaccgaaccagacatgcccggccgtgcgcctccccgctcgtgccttt cctccctctgtctctccagagccggatctcaaggggagcctccgtgccccgg ctgctcagtcctccggtgtgcaggaccccggaagtctccccgcacagctctc gcttctcttgagcctgtttctgcgcccggaccagtcgaggactctggacagtaga ggccccgggacgaccgagctgGAATTCGCCACCATGGCCCC	70

Конструкция	Последовательность	SEQ NO	ID
	AAAGAAGAAGCGGAAGGTCGGTATCCACGGAGT CCCAGCAGCCCTCGAACCAGGTGAAAAACCTTA CAAATGTCCTGAATGTGGGAAATCATTCAAGTCGC AGCGACAACCTGGTGAGACATCAACGCACCCAT ACAGGAGAAAAACCTTATAAATGTCCAGAATGT GGAAAGTCCCTTCTCACGAGAGGATAACTTGCAC ACTCATCAACGAACACATACTGGTGAAAAACCA TACAAGTGTCCCGAATGTGGTAAAAGTTTTAGCC GGAGCGATGAACTTGTCCGACACCAACGAACCC ATACAGGCGAGAAGCCTTACAAATGTCCCGAGT GTGGCAAGAGCTTCTCACAATCAGGGAATCTGA CTGAGCATCAACGAACCTACACCGGGGAAAAAC CTTACAAGTGTCCAGAGTGTGGGAAGAGCTTTTC CACAAGTGGACATCTGGTACGCCACCAGAGGAC ACATACAGGGGAGAAGCCCTACAAATGCCCCGA ATGCGGTAAAAGTTTCTCTCAGAATAGTACCCTG ACCGAACACCAGCGAACACACACTGGGAAAAAA ACGAGTAAAAGGCCGGCGGCCACGAAAAAGGCC GGCCAGGCCAAAAAAGAAAAAGGGATCCGACGC GCTGGACGATTTTCGATCTCGACATGCTGGGTCT GATGCCCTCGATGACTTTGACCTGGATATGTTGG GAAGCGACGCATTGGATGACTTTGATCTGGACAT GCTCGGCTCCGATGCTCTGGACGATTTTCGATCTC GATATGTTATAAAAGCTTGGGTGGCATCCCTGTG ACCCCTCCCCAGTGCCTCTCCTGGCCCTGGAAGT TGCCACTCCAGTGCCCAACAGCCTTGTCTAATA AAATTAAGTTGCATCATTTTGTCTGACTAGGTGT CCTTCTATAATATTATGGGGTGGAGGGGGGTGGT ATGGAGCAAGGGGCAAGTTGGGAAGACAACCTG TAGGGCCTGCGGGGTCTATTGGGAACCAAGCTG GAGTGCAGTGGCACAATCTTGGCTCACTGCAATC TCCGCCTCCTGGGTTCAAGCGATTCTCCTGCCTC AGCCTCCCGAGTTGTTGGGATTCCAGGCATGCAT GACCAGGCTCAGCTAATTTTTGTTTTTTTGGTAG AGACGGGGTTTCACCATATTGGCCAGGCTGGTCT CCAACCTCCTAATCTCAGGTGATCTACCCACCTTG GCCTCCCAAATTGCTGGGATTACAGGCGTGAACC ACTGCTCCCTTCCCTGTCCTT		
26 (RE + кодирующая)	ggaggaagccatcaactaaactacaatgactgtaagatacaaaattggaatggt aacatattttgaagtctgttgacataaagaatcatgatattaatgcccatggaaatg aaagggcgatcaacactatggttgaaggggggaaattgtagagcacagatgt gttcgtgtggcagtgctgtcttagcaatactcagagaagagagagaacaatg aaattctgattgccccagtgtagccagatgagggtcagctgccaactttctctt tcacatcttatgaaagtcatttaagcacactaactttttttttttttttttttttgagaca gagtcttgctctgttggccaggacagagtgcagtagtgactcaatctcggtcact gcagctccacctccttaggctcaaacggctcctcctgcatcagctcccaagtagc tggaattacaggagtggtggccaccatggccagctaattttgtatttttaatagatagc gggggttcaccatatcaccaggtggtctcgaactcctggcctcaagtgatcca cctgcctcggcctcccaagtgctgggattataggcgctcagccactatgccaac ccgaccaaccttttttaaaataaatattttaaaaaattgggtatttcacatatatactagta	71	

Конструкция	Последовательность	SEQ NO	ID
	ttacatttatccacacaaaacggacgggcctccgctgaaccagtgaggcccca gacgtgcgcataaataaccctctgctgtgcaccacctggggagagggggag gaccacggtaaatggagcgcgcgcatagcaaaaggagcgcggggctctttct ctgccgggtggcactgggtagctgtggccagggtgtggtactttgatggggcccag ggctggagctcaaggaaagcgtcgcagggtcacagatctgggggaaccccg ggaaaagcactgaggcaaaaccgccgctcgtctcctacaatatatgggagggg gaggttgagtacgttctggattactcataagaccttttttttctccgggcgcaaa accgtgagctggattataatgccctataaagctccagaggcggtcaggcacct gcagaggagccccgccgctccgccgactagctgccccgcgagcaacggcct cgtgatttccccgccgactccgggtccccgcctccccactctgccccgcctacccc ggagccgtgcagccgcctctccgaatctctcttctcctggcgctcgcgtgcga gagggaactagcgagaacgaggaagcagctggaggtgacgccgggcagatt acgcctgtcagggccgagccgagcgggatcgtgggcgctgtgcagaggaaa ggcgggagtgcccggtcgtgtcgcagagccgaggtgggtaagctagcgac cacctggacttcccagcgcccaaccgtggctttcagccaggtcctctctcccg cggcttctcaaccaaccccatcccagcgccggccaccaacctcccgaatga gtgcttctgccccagcagccgaaggcgctactaggaacggtaacctgttacttt tccaggggcccgtagtgcacccgctgcccagttgctgtgcgactgcgcgcgcg gggctagagtgaagggtgactgtggttctctctggccaagtccgagggagaac gtaaagatatgggcctttttccccctctcacctgtctcacaaagtccttagtccc cggagcagtagcctcttcttccagggaattagccagacacacaacgggaac cagacaccgaaccagacatgccgccccgtgcgcctccccgctcgtgccttt cctccctctgtctctccagagccggatcttcaaggggagcctccgtgcccccg ctgctcagtcctccgggtgtgcaggaccccggaagtctccccgcacagctctc gttctctttgcagcctgtttctgcgccgaccagtcgaggactctggacagtaga ggccccgggacgaccgagctgGAATTCGCCACCATGGCCCC AAAGAAGAAGCGGAAGGTTCGGTATCCACGGAGT CCCAGCAGCCCTCGAACCAGGTGAAAAACCTTA CAAATGTCCTGAATGTGGGAAATCATTACGTCGC AGCGACAACCTGGTGAGACATCAACGCACCCAT ACAGGAGAAAAACCTTATAAATGTCCAGAATGT GGAAAGTCCTTCTCACGAGAGGATAACTTGCAC ACTCATCAACGAACACATACTGGTGAAAAACCA TACAAGTGTCCGAATGTGGTAAAAGTTTTAGCC GGAGCGATGAACTTGTCCGACACCAACGAACCC ATACAGGCGAGAAGCCTTACAAATGTCCCGAGT GTGGCAAGAGCTTCTCACAATCAGGGAATCTGA CTGAGCATCAACGAACCTCATACCGGGGAAAAAC CTTACAAGTGTCCAGAGTGTGGGAAGAGCTTTTC CACAAGTGGACATCTGGTACGCCACCAGAGGAC ACATACAGGGGAGAAGCCCTACAAATGCCCCGA ATGCGGTAAAAGTTTCTCTCAGAATAGTACCCTG ACCGAACACCAGCGAACACACACTGGGAAAAAAA ACGAGTAAAAGGCCGGCGGCCACGAAAAAGGCC GGCCAGGCAAAAAAGAAAAAGGGATCCGACGC GCTGGACGATTTTCGATCTCGACATGCTGGGTCT GATGCCCTCGATGACTTTGACCTGGATATGTTGG GAAGCGACGCATTGGATGACTTTGATCTGGACAT GCTCGGCTCCGATGCTCTGGACGATTTTCGATCTC GATATGTTATAAaaagagaccggttactgtgacagtaaaagagac		

Конструкция	Последовательность	SEQ ID NO
	cgggttcaactgtgagaatgaaagagaccggttcaactgtgatcggaagagaccg gttcaactgtgagcggccttgaaaccagcagacaatgtagctcagtagaaacc agcagacaatgtagctgaatggaaccagcagacaatgtagcttcggagaaa cccagcagacaatgtagctAAGCTTGGGTGGCATCCCTGTG ACCCCTCCCCAGTGCCTCTCCTGGCCCTGGAAGT TGCCACTCCAGTGGCCACCAGCCTTGTCTAATA AAATTAAGTTGCATCATTTTGTCTGACTAGGTGT CCTTCTATAATATTATGGGGTGGAGGGGGGGTGGT ATGGAGCAAGGGGCAAGTTGGGAAGACAACCTG TAGGGCCTGCGGGGTCTATTGGGAACCAAGCTG GAGTGCAGTGGCACAATCTTGGCTCACTGCAATC TCCGCCTCCTGGGTTCAAGCGATTCTCCTGCCTC AGCCTCCCGAGTTGTTGGGATTCCAGGCATGCAT GACCAGGCTCAGCTAATTTTTGTTTTTTGGTAG AGACGGGGTTTCACCATATTGGCCAGGCTGGTCT CCAACCTCTAATCTCAGGTGATCTACCCACCTTG GCCTCCCAAATTGCTGGGATTACAGGCGTGAACC ACTGCTCCCTTCCCTGTCCTT	
40 (кодирующая)	ATGGCCGCAGATCACCTGATGCTGGCTGAAGGCT ACAGACTGGTGCAGCGGCCTCCATCTGCCGCTGC CGCCACGGCCCCCACGCCCTGAGAACACTGCCC CCCTACGCCGGCCCTGGTCTTGATAGCGGACTCA GACCTAGAGGCGCCCCTCTGGGCCCTCCACCTCC AAGACAGCCTGGAGCCCTGGCCTACGGCGCCTTC GGCCCTCCTTCTAGCTTCCAGCCCTTCCCCGCCGT GCCTCCTCCAGCgGCTGGCATCGCCACCTGCAG CCTGTGGCCACCCCTTACCCCGGAAGAGCCGCCG CCCCTCCAAACGCCCTGGCGGACCTCCTGGCCC CCAGCCTGCTCCAAGCGCCGCTGCCCTCCACCT CCTGCTCATGCCCTGGGCGGCATGGACGCCGAGC TGATCGACGAGGAAGCCCTGACCAGCCTGGAAC TGGAACCTGGGCCTGCACAGAGTGCGGGAACCTGC CTGAGCTGTTCTTGGGACAGAGCGAGTTCGACTG CTTCAGCGACCTGGGCAGCGCCCTCCTGCCGGC TCTGTGTCCTGCGccgaccacctgatgctcgccgagggctaccgct ggtgcagaggccgctcgccgcccgcgcccatggcctcatgctccgg actctgccgctacgcgggcccgccctggacagtgggctgagggcgcg ggggctccgctggggccgcccgcgcccgcgaaccggggccctggcgta ggggccttcggggccgctcctcctccagcccttcggccgtgctccg gcccgggcatcgcgacctgcagcctgtggcgacgcccgtacccggcg gcCggcgcccccaacgctccgggaggccccggggcgagccggc cccaagcgccgagccccgcgcccgcgacgcccggggcgcatgga cgccgaactcatcgagaggaggcgtgacgtcgctggagctggagctggg ctgcaccgctgcgcgagctcccgagctgtcctgggcccagagcgagtcga ctgcttcggacttggggctccgcccgcgcccgcggctccgtgagctgca ccagctcatcaaacccagccgcatgcgaagtacccaaccggcccagcaag acggccccccacgaacgcccctacgcttggccagtggagtcctgtgatcgcc tttccCGCAGCGACAACCTGGTGAGAcacatccgcatccac acaggccagaagcccttcagtgccgcatctgcatgAGAAacttcagcCG AGAGGATAACTTGCACACTcacatccgacccacacaggcg	72

Конструкция	Последовательность	SEQ ID NO
	aaaagcccttcgctgcgacatctgtggaagaaagtttgccCGGAGCGA TGAACCTGTCCGAcataccaagatccacttgcggcagaaggaccgc ccttacgcttgcagtgaggctctgtgatcgccgttctccCAATCAGG GAATCTGACTGAGcacatccgcatccacacaggccagaagcccttc cagtgccgcatctgcatgAGAAacttcagcACAAGTGGACATCT GTACGCcacatccgcacccacacaggcgaaaagcccttcgctgcgac atctgtggaagaaagtttgccCAGAATAGTACCCTGACCGAA cataccaagatccacttgcggcagaaggacaag	
41 (кодирующая)	ATGGCCGCAGATCACCTGATGCTGGCTGAAGGCT ACAGACTGGTGCAGCGGCCTCCATCTGCCGCTGC CGCCACGGCCCCCACGCCCTGAGAACACTGCCC CCCTACGCCGGCCCTGGTCTTGATAGCGGACTCA GACCTAGAGGCGCCCCTCTGGGCCCTCCACCTCC AAGACAGCCTGGAGCCCTGGCCTACGGCGCCTTC GGCCCTCCTTCTAGCTTCCAGCCCTTCCCCGCCGT GCCTCCTCCAGCTGCTGGCATCGCCACCTGCAG CCTGTGGCCACCCCTTACCCCGGAAGAGCCGCCG CCCCTCCAAACGCCCTGGCGGACCTCCTGGCCC CCAGCCTGCTCCAAGCGCCGCTGCCCCTCCACCT CCTGCTCATGCCCTGGGCGGCATGGACGCCGAGC TGATCGACGAGGAAGCCCTGACCAGCCTGGAAC TGGAACCTGGGCTGCACAGAGTGCGGGAACTGC CTGAGCTGTTCTTGGGACAGAGCGAGTTCGACTG CTTACGCGACCTGGGCAGCGCCCTCCTGCCGGC TCTGTGTCCTGCGGCGGCAGCGGCGGCGGAAGC GGCgccgaccacctgatgctcgcgagggctaccgctggtgcagaggcc gccgtccgcccgcgcccgcctatggccctcatgcgtccggactctgcgcgct acgcggggcccgccctggacagtgggctgaggccgccccgggctccgctgg ggccgcccgcgccccgcaaccgcccggcctggcgtaggggcttcgggc cgccgtctctctccagcccttcggcgtgctccgcccgcgcccgcgcccc cgcacctgcagcctgtggcgacgcccgtaccccgccgcccgcgcccgcgcccc ccaacgctccgggagggcccccgccgcccgcagccggccccaaagcgcgca gccccgcgcccgcgcccgcacgcccgtggcgcatggacgcccgaactcatc gacgaggaggcgctgacgtcgtggagctggagctggggctgcaccgctgc gcgagctgcccagctgttctgggcccagagcgagttcgactgcttctcgactt ggggtccgcgcccgcgcccgcgctccgtgagctgcggtggttctggtggtt ctggtcagtcctcagctcatcaaacccagccgcatgcgcaagtaccccaaccgg ccagcaagacgcccccccacgaacgcccttacgcttgcccagtgaggctctgt gategcccgttctccCGCAGCGACAACCTGGTGAGAcacatc cgcattcacacaggccagaagcccttcagtgccgcatctgcatgAGAAact tcagcCGAGAGGATAACTTGCACACTcacatccgcacccac acaggcgaaaagcccttcgctgcgacatctgtggaagaaagtttgccCGG AGCGATGAACTTGTCCGAcataccaagatccacttgcggcaga aggaccgccccttacgcttgcccagtgaggctctgtgatcgccgttctccCAA TCAGGGAATCTGACTGAGcacatccgcatccacacaggccag aagcccttcagtgccgcatctgcatgAGAAacttcagcACAAGTGG ACATCTGGTACGCcacatccgcacccacacaggcgaaaagcccttc gctgcgacatctgtggaagaaagtttgccCAGAATAGTACCCTG ACCGAAcataccaagatccacttgcggcagaaggacaag	73

Конструкция	Последовательность	SEQ NO	ID
42 (RE + кодирующая)	ggaggaagccatcaactaaactacaatgactgtaagatacaaaattgggaatggt aacatattttgaagtctgttgacataaagaatcatgatattaatgcccatggaaatg aaagggcgatcaacactatggttgaaaaggggggaaattgtagagcacagatgt gttcgtgtggcagtgctgtctctagcaatactcagagaagagagagaacaatg aaattctgattggccccagtgtagccagatgagggtcagctgccactttctctt tcacatcttatgaaagtcatttaagcacaaactaacttttttttttttttttgagaca gagtcctgtctgttgcccaggacagagtgtagtgactcaatctcggctcact gcagcctccacctcctaggctcaaacggctcctcctgcatcagcctcccaagtagc tggaattacaggagtggtggccaccatgccagctaattttgtattttaatagatacg gggggttcaccatatcaccaggctgggtctgaactcctggcctcaagtgatcca cctgcctcggcctccaaagtgtgggattataggcgtagccactatgcccac ccgaccaacctttttaaaataaatatttaaaaaattggatttcacatatatactagta ttacatttatccacacaaaacggacgggcctccgctgaaccagttagggcccca gacgtgcgcataaataacccctgcgtgctgcaccacctggggagaggggggag gaccacggtaaatggagcgagcgcatagcaaaagggacgcggggctctttct ctgccggtggcactgggtagctgtggccaggtgtggtactttgatggggcccag ggctggagctcaagggaagcgtcgagggtcacagatctgggggaaccccg ggaaaagcactgaggcaaaaccgcgctcgtcctacaatatatgggagggg gaggttgagtacgttctggattactcataagacctttttttcttccggcgcaaa accgtgagctggattataatcgccctataaagctccagaggcggtcaggcacct gcagaggagccccgcgctccgccgactagctgccccgcgagcaacggcct cgtgatttccccgcgatccggtccccgcctccccactctgccccgcctaccc ggagccgtgcagccgcctctccgaatctctcttctcctggcgctcgctgcga gagggaaactagcgagaacgaggaagcagctggaggtgacgccgggcagatt acgcctgtcagggccgagccgagcggatcgtggcgctgtgcagaggaaa ggcgggagtgcccggtcgtgtcgcagagccgaggtgggtaagctagcgac cacctggacttcccagcgcccaaccgtggcttttcagccaggtcctctcctccg cggcttctcaaccaacccatcccagcgccggccaccaacctccgaaatga gtgttctctccccagcagccgaaggcgctactaggaacggtaacctgttacttt tcaggggccgtagtcgacccgctgcccgagttgctgtgcgactgcgcgcgcg gggctagagtgaaggtgactgtggttcttcttgccaagtccgagggagaac gtaaagatatgggcctttttcccctctcacctgtctaccaaagtccttagtccc cggagcagttagcctcttttccagggaattagccagacacacaacgggaac cagacaccgaaccagacatgcccgccccgtgcgccctccccgcctgcgtgcttt cctccctctgtctctccagagccggatctcaaggggagcctccgtgcccccg ctgtcagtcctccggtgtgcaggaccccggaagtctccccgcacagctctc gttctctttgcagcctgtttctgcgcggaccagtgcaggactctggacagtaga ggccccgggacgaccgagctgGAATTCGCCACCATGGCCCC AAAGAAGAAGCGGAAGGTCGGTATCCACGGAGT CCCAGCAGCCCTCGAACCAGGTGAAAAACCTTA CAATGTCTCTGAATGTGGGAAATCATTAGTCGC AGCGACAACCTGGTGAGACATCAACGCACCCAT ACAGGAGAAAAACCTTATAAATGTCCAGAATGT GGAAAGTCCTTCTCACGAGAGGATAACTTGCAC ACTCATCAACGAACACATACTGGTGAAAAACCA TACAAGTGTCCGAATGTGGTAAAAGTTTTAGCC GGAGCGATGAACTTGTCCGACACCAACGAACCC ATACAGGCGAGAAGCCTTACAAATGTCCCGAGT GTGGCAAGAGCTTCTCACAAATCAGGGAATCTGA CTGAGCATCAACGAACCTCATAACCGGGGAAAAAC	74	

Конструкция	Последовательность	SEQ ID NO
	CTTACAAGTGTCCAGAGTGTGGGAAGAGCTTTTC CACAAGTGGACATCTGGTACGCCACCAGAGGAC ACATACAGGGGAGAAGCCCTACAAATGCCCCGA ATGCGGTAAAAGTTTCTCTCAGAATAGTACCCTG ACCGAACACCAGCGAACACACACTGGGAAAAAA ACGAGTAAAAGGCCGGCGGCCACGAAAAAGGCC GGCCAGGCAAAAAAGAAAAAGGGATCCTACCCA TACGACGTACCAGATTACGCTCTCGAGGACGCGC TGGACGATTTTCGATCTCGACATGCTGGGTTCTGA TGCCCTCGATGACTTTGACCTGGATATGTTGGGA AGCGACGCATTGGATGACTTTGATCTGGACATGC TCGGCTCCGATGCTCTGGACGATTTTCGATCTCGA TATGTTATAAACTAGTGAAACCCAGCAGACAAT GTAGCTAGACCCAGTAGCCAGATGTAGCTAAAG AGACCGGTTCACTGTGAAAGCTTGGGTGGCATCC CTGTGACCCCTCCCCAGTGCCTCTCCTGGCCCTG GAAGTTGCCACTCCAGTGCCACCAGCCTTGTCCT TAATAAAATTAAGTTGCATCATTTTGTCTGACTA GGTGTCCTTCTATAATATTATGGGGTGGAGGGGG GTGGTATGGAGCAAGGGGCAAGTTGGGAAGACA ACCTGTAGGGCCTGCGGGGTCTATTGGGAACCA AGCTGGAGTGCAGTGGCACAATCTTGGCTCACTG CAATCTCCGCCTCCTGGGTTCAAGCGATTCTCCT GCCTCAGCCTCCCGAGTTGTTGGGATTCCAGGCA TGCATGACCAGGCTCAGCTAATTTTTGTTTTTTTG GTAGAGACGGGGTTTACCATATTGGCCAGGCTG GTCTCCAACCTCCTAATCTCAGGTGATCTACCCAC CTTGGCCTCCCAAATTGCTGGGATTACAGGCGTG AACCCTGCTCCCTTCCCTGTCTT	
43 (RE + кодирующая)	ggaggaagccatcaactaaactacaatgactgtaagatacaaaattgggaatggt aacatattttgaagttctgttgacataaagaatcatgatattaatgcccatggaaatg aaagggcgatcaacactatgggttgaaggggggaaattgtagagcacagatgt gtctgtgtggcagtggtgtctctagcaatactcagagaagagagagaacaatg aaattctgattggccccagtgtagccagatgaggttcagctgccaactttctctt tcacatcttatgaaagtcatttaagcacaaactaactttttttttttttttttttttgagaca gagtctgtctgttggccaggacagagtgcagtagtgactcaatctcggtcact gcagcctccacctctaggctcaaacggctcctctcatcagcctcccaagtagc tggaaattacaggagtggcccaccatgccagctaattttgtatttttaatagatacg ggggtttcacatatacaccaggctgggtctcgaactcctggcctcaagtgatcca cctgcctcggcctccaaagtgtgggattataggcgtcagccactatgcccac ccgaccaaccttttttaaaataaatatttaaaaaattggtatttcacatatatactagta ttacatttatccacacaaaacggacgggctccgctgaaccagtgagggccca gacgtgcgcataaataaccctgcgtgctgcaccacctggggagaggggggag gaccacggtaaatggagcgcgcagtagcaaaaggacgcgggggtcttttct ctgccgtggcactgggtagctgtggccaggtgtggtactttgatggggcccag ggctggagctcaaggaagcgtcgcaggggtcacagatctgggggaaccccg ggaaaagcactgaggcaaacgccgctcgtctctacaatatatgggagggg gaggttgagtacgttctggattactcataagaccttttttttccctccggggcgcaaa accgtgagctggattataatcgccctataaagctccagaggcggtcaggcacct gcagaggagccccgccgctccgcccactagctgccccgcgagcaacggcct	75

Конструкция	Последовательность	SEQ ID NO
	cgtgatttccccgccgatccgggtccccgcctccccactctgccccgcctacccc ggagccgtgcagccgcctctccgaatctctctctctctctggcgctcgctgcga gagggaaactagcgagaacgaggaagcagctggaggtgacgccgggcagatt acgcctgtcagggccgagccgagcggatcgctgggcgctgtgcagaggaaa ggcgggagtgccccggctcgctgtcgagagccgaggtgggtaagctagcgac cacctggacttcccagcgcccaaccgtggcttttcagccaggtcctctctcccg cggcttctcaaccaacccccatcccagcgccggccaccaacctcccgaatga gtgcttctgccccagcagccgaaggcgctactaggaacggtaacctgttacttt tccaggggcccgtagtcgacccgctgcccagttgtgtgagctgcgcgcgcg gggtagagtgaagggtgactgtggttcttcttgccaagtccgaggggagaac gtaaagatatgggcctttttccccctctcacctgtctcacaaagtccttagtccc cggagcagttagcctcttttcttccaggaattagccagacacaacaacgggaac cagacaccgaaccagacatgcccgcctcgcgccctccccgctcgctgctttt ctccctcttgtctctccagagccggatcttcaaggggagcctccgtgcccccg ctgctcagtcctcgggtgtgcaggaccccggaagtcctccccgcacagctctc gttctctttgcagcctgtttctgcgcccggaccagtcgaggactctggacagtaga ggccccgggacgaccgagctgGAATTCGCCACCATGGCCCC AAAGAAGAAGCGGAAGGTCGGTATCCACGGAGT CCCAGCAGCCCTCGAACCAGGTGAAAAACCTTA CAAATGTCCTGAATGTGGGAAATCATTCAGTCGC AGCGACAACCTGGTGAGACATCAACGCACCCAT ACAGGAGAAAAACCTTATAAATGTCCAGAATGT GGAAAGTCCTTCTCACGAGAGGATAACTTGCAC ACTCATCAACGAACACATACTGGTGAAAAACCA TACAAGTGTCCCGAATGTGGTAAAAGTTTTAGCC GGAGCGATGAACTTGTCCGACACCAACGAACCC ATACAGGCGAGAAGCCTTACAAATGTCCCGAGT GTGGCAAGAGCTTCTCACAAATCAGGGAATCTGA CTGAGCATCAACGAACCTCATACCGGGGAAAAAC CTTACAAGTGTCCAGAGTGTGGGAAGAGCTTTTC CACAAGTGGACATCTGGTACGCCACCAGAGGAC ACATACAGGGGAGAAGCCCTACAAATGCCCCGA ATGCGGTAAAAGTTTCTCTCAGAATAGTACCCTG ACCGAACACCAGCGAACACACACTGGGAAAAAA ACGAGTAAAAGGCCGGCGGCCACGAAAAAGGCC GGCCAGGCAAAAAAGAAAAAGGGATCCTACCCA TACGACGTACCAGATTACGCTCTCGAGGACGCGC TGGACGATTTTCGATCTCGACATGCTGGGTTCTGA TGCCCTCGATGACTTTGACCTGGATATGTTGGGA AGCGACGCATTGGATGACTTTGATCTGGACATGC TCGGCTCCGATGCTCTGGACGATTTTCGATCTCGA TATGTTATAAACTAGTGAAACCCAGCAGACAAT GTAGCTAGACCCAGTAGCCAGATGTAGCTAAAG AGACCGGTTCACTGTGAGAAACCCAGCAGACAA TGTAAGCTAGACCCAGTAGCCAGATGTAGCTAAA GAGACCGGTTCACTGTGAAAGCTTGGGTGGCATC CCTGTGACCCCTCCCCAGTGCCCTCTCCTGGCCCT GGAAGTTGCCACTCCAGTGCCCAACAGCCTTGTC CTAATAAAATTAAGTTGCATCATTTTGTCTGACT AGGTGTCCTTCTATAATATTATGGGGTGGAGGGG	

Конструкция	Последовательность	SEQ ID NO
	GGTGGTATGGAGCAAGGGGCAAGTTGGGAAGAC AACCTGTAGGGCCTGCGGGGTCTATTGGGAACC AAGCTGGAGTGCAGTGGCACAAATCTTGGCTCACT GCAATCTCCGCCTCCTGGGTTCAAGCGATTCTCC TGCCTCAGCCTCCCGAGTTGTTGGGATTCCAGGC ATGCATGACCAGGCTCAGCTAATTTTTGTTTTTTT GGTAGAGACGGGGTTTCACCATATTGGCCAGGCT GGTCTCCAACCTCCTAATCTCAGGTGATCTACCCA CCTTGGCCTCCCAAATTGCTGGGATTACAGGCGT GAACCACTGCTCCCTTCCCTGTCCTT	
44 (RE + кодирующая)	ggaggaagccatcaactaaactacaatgactgtaagatacaaaattgggaatggt aacatattttgaagttctgttgacataaagaatcatgatattaatgcccatggaaatg aaagggcgatcaactatggttgaaaagggggaaattgtagagcacagatgt gttcgtgtggcagtgtgctgtcttagcaatactcagagaagagagagaacaatg aaattctgattggccccagtgtagccagatgaggttcagctgccaaactttctt tcacatcttatgaaagtcatttaagcacaactaactttttttttttttttttttttgagaca gagtcttgcctgttggccaggacagagtgcagtagtgactcaatctcggctcact gcagcctccacctcctaggctcaaacggctcctcctcatcagcctcccaagtagc tggaaattacaggagtggcccaccatgccagctaattttgtatttttaatagatacg ggggtttcacatatcaccaggtggtctcgaactcctggcctcaagtatcca cctgcctcggcctcccaagtgtggtgattatagcgctcagccactatgcccac ccgaccaaccttttttaaaataaatatttaaaaaattggtatttcacatatatactagta ttacatttatccacacaaaacggacgggcctcgcctgaaccagttagggccca gacgtgcgcataaataacccctgcgtgctgcaccacctggggagaggggggag gaccacggtaaatggagcgcagcgcatagcaaaaggacgcgggggtcctttct ctgccgtggcactgggtagctgtggccaggtgtggtactttgatggggcccag ggctggagctcaaggaagcgtcgcaggggtcacagatctgggggaaccccg ggaaaagcactgaggcaaaaccgctcgtcctcctacaatatatgggagggg gaggttgagtacgttctggattactcataagacctttttttcctccgggcgcaaa accgtgagctggattataatcgccctataaagctccagaggcggtcaggcacct gcagaggagccccgctcgcgactagctgccccgcgagcaacggcct cgtgattccccgccgatccggtccccgctccccactctgccccgcctacccc ggagccgtgcagccgctctccgaatctctcttctcctggcgctcgcgtgcga gaggggaactagcgagaacgaggaagcagctggaggtgacgccgggcagatt acgctgtcagggccgagccgagcggatcgctgggcgctgtgcagaggaaa ggcgggagtggcggtcgtgtgcagagccgaggtgggtaagctagcgac cacctggacttccagcgcccaaccgtggcttttcagccaggtcctctctcccg cggcttctcaaccaacccccatcccagcgccggccaccaacctcccgaatga gtgcttctgccccagcagccgaaggcgtactaggaacggtaacctgttacttt tccaggggctgtagtcgacccgctgcccagttgctgtgcgactgcgcgcgcg gggctagagtgcagggtgactgtggttcttcttgccaaagtccgagggagaa gtaaagatatgggcctttttccccctctcacctgtctcaccaaagtccttagtccc cggagcagttagcctcttttccaggaattagccagacacacaacgggaac cagacaccgaaccagacatgcccggccgctgcgccccctccgctcgtgccttt cctccctctgtctctccagagcggatcttcaaggggagcctccgtgccccgg ctgctcagtcctcgggtgtgcaggaccccggaagtctccccgcacagctctc gcttcttttgagcctgtttctgcgcccggaccagtcgaggactctggacagtaga ggccccgggacgaccgagctgGAATTCGCCACCATGGCCgc cgaccacctgatgctcgccgaggggtaccgctggtgcagaggccgcccgtcc gccggccgcccctatggccctcatgcgtccggactctgccggctacgggg	76

Конструкция	Последовательность	SEQ ID NO
	cccgggcctggacagtgggctgaggccgcggggggctccgctggggccgcgc gcccggccgccaacccggggccctggcgtagggggccttcggggccgcgtc ctccttcagccctttccggccgtgctccgcggccgcgggcacgcgcacct gcagcctgtggcgacgccgtaccccgccgcgcggccgcgcccccaacgc tcggggaggcccccgggccgcagccggcccaagcgccgcagccccgc cgccggccgcgcacgccctggcgccgcatggacgccgaactcatcgacgagg aggcgctgacgtcgctggagctggagctggggctgcaccgcgtgcgcgagct gcccgagctgttctctggccagagcgagttcgactgcttctcgacttggggtc cgcgccgcccgcgggtccgtgagctgcggtgttctggtggtgttctgtgca gtcccagctcatcaaacccagccgcatgcgcaagtacccaaccggcccagca agacgccccccacgaacgcccttacgcttggccagtggagtcctgtgatcgcc gcttctccCGCAGCGACAACCTGGTGAGAcacatccgcatcc acacaggccagaagcccttcagtgccgcatctgcatgAGAaacttcagcC GAGAGGATAACTTGACACTcacatccgacccacacaggc gaaaagcccttcgcctgcgacatctgtggaagaaagtttgccCGGAGCG ATGAACTTGTCCGAcataccaagatccacttgccgcagaaggacc gcccttacgcttggccagtggagtcctgtgatcgccgcttctccCAATCAG GGAATCTGACTGAGAcacatccgcatccacacaggccagaagccct tccagtgccgcatctgcatgAGAaacttcagcACAAGTGGACATC TGGTACGCGcacatccgacccacacaggcgaaaagcccttcgcctgcg acatctgtggaagaaagtttgccCAGAATAGTACCCTGACCG AAcataccaagatccacttgccgcagaaggacaagtaaCTCGAGGA AACCCAGCAGACAATGTAGCTAGACCCAGTAGC CAGATGTAGCTAAAGAGACCGGTTCACTGTGAA AGCTTGGGTGGCATCCCTGTGACCCCTCCCCAGT GCCTCTCCTGGCCCTGGAAGTTGCCACTCCAGTG CCCACCAGCCTTGTCTAATAAAATTAAGTTGCA TCATTTTGTCTGACTAGGTGTCCTTCTATAATATT ATGGGGTGGAGGGGGGTGGTATGGAGCAAGGGG CAAGTTGGGAAGACAACCTGTAGGGCCTGCGGG GTCTATTGGGAACCAAGCTGGAGTGCAGTGGCA CAATCTTGGCTCACTGCAATCTCCGCCTCCTGGG TTCAAGCGATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCGAGTT GTTGGGATTCCAGGCATGCATGACCAGGCTCAGC TAATTTTGTTTTTTTTGGTAGAGACGGGGTTTCAC CATATTGGCCAGGCTGGTCTCCAACCTCCTAATCT CAGGTGATCTACCCACCTTGGCCTCCCAAATTGC TGGGATTACAGGCGTGAACCACTGCTCCCTTCCC TGTCCTT	
45 (RE + кодирующая)	ggaggaagccatcaactaaactacaatgactgtaagatacaaaattgggaatggt aacatattttgaagttctgttgacataaagaatcatgatattaatgccccatggaaatg aaagggcgatcaacactatgggttgaaaagggggaaattgtagagcacagatgt gttcgtgtggcagtgtgctgtcttagcaatactcagagaagagagagaacaatg aaattctgattggccccagtgtgagcccagatgaggttcagctgccaactttctctt tcacatcttatgaaagtcatttaagcacaaactatctttttttttttttttttttttgagaca gagtcctgctctgttgcccaggacagagtgcagtagtgactcaatctcggctcact gcagcctccacctctaggctcaaacggctcctcctgcatcagcctcccaagtagc tggaattacaggagtggcccacatgcccagctaattttgtatttttaatagatacg gggggttcaccatatcaccaggtggtctcgaactcctggcctcaagtgatcca cctgcctcggcctccaaagtgtgtgggattataggcgtcagccactatgcccac	184

[illegible]

Конструкция	Последовательность	SEQ ID NO
	AAcataccaagatccacttgccgcagaaggacaagtaaCTCGAGGA AACCCAGCAGACAATGTAGCTAGACCCAGTAGC CAGATGTAGCTAAAGAGACCGGTTCACTGTGAG AAACCCAGCAGACAATGTAGCTAGACCCAGTAG CCAGATGTAGCTAAAGAGACCGGTTCACTGTGA AAGCTTGGGTGGCATCCCTGTGACCCCTCCCCAG TGCCTCTCCTGGCCCTGGAAGTTGCCACTCCAGT GCCCACCAGCCTTGTCTAATAAAATTAAGTTGC ATCATTCTTGTCTGACTAGGTGTCCTTCTATAATAT TATGGGGTGGAGGGGGGTGGTATGGAGCAAGGG GCAAGTTGGGAAGACAACCTGTAGGGCCTGCGG GGTCTATTGGGAACCAAGCTGGAGTGCAGTGGC ACAATCTTGGCTCACTGCAATCTCCGCCTCCTGG GTTCAAGCGATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCGAGT TGTTGGGATTCCAGGCATGCATGACCAGGCTCAG CTAATTTTTGTTTTTTTGGTAGAGACGGGGTTTCA CCATATTGGCCAGGCTGGTCTCCAACCTCCTAATC TCAGGTGATCTACCCACCTTGGCCTCCCAAATTG CTGGGATTACAGGCGTGAACCACTGCTCCCTTCC CTGTCCTT	
8 (кодирующая)	ATGGCCgccgaccacctgatgctgccgagggctaccgcctggtgcaga ggccgccgtccgccgccgccgccatggccctcatgcgctccggactctgccg ccgtacgcggggccggcctggacagtgggctgagggccgccccgggctccg ctggggccgccgccgccccgccaccggggccctggcgtagggggccttc ggggccgcgtctctctccagcccttccggccgtgctccgccggccgcggg catcgcgacactgcagcctgtggcgacgccgtacccggccgcgcggccgcg cccccaacgctccgggagggccccggggccgcagccggccccaaagcgcc gcagccccgccgccgccgccgcgcacgccctggggggcatggacgccgaactc atcgacgaggaggcgctgacgtcgtggagctggagctggggctgcaccgcg tgcgcgagctgcccagctgttctggggcagagcgagttcgactgcttctcg acttggggctccgcgccgccgccgggctccgtgagctgcggtggttctggtg gttctggtcagtcacagctcatcaaacccagccgcatgcgcaagtacccaacc ggcccagcaagacgccccccacgaacgcccttacgcttgcccagtggagtcc tgtgatcgccgcttctccCGCAGCGACAACCTGGTGAGAcac atccgcatccacacaggccagaagcccttccagtgcgcgcatctgcatgAGAA acttcagcCGAGAGGATAACTTGCACACTcacatccgacc cacacaggcgaaaagcccttcgctgcgacatctgtggaagaaagtgttccCG GAGCGATGAACCTTGTCCGAcataccaagatccacttgccgca gaaggaccgcccttacgcttgcccagtggagtctgtgatcgccgcttctccCA ATCAGGGAATCTGACTGAGcacatccgcatccacacaggcca gaagcccttccagtccgcatctgcatgAGAAacttcagcACAAGTG GACATCTGGTACGCcacatccgcacccacacaggcgaaaagccct tcgctgcgacatctgtggaagaaagtgttccCAGAATAGTACCCT GACCGAAcataccaagatccacttgccgcagaaggacaag	203
46 (кодирующая)	ATGGCCgccgaccacctgatgctgccgagggctaccgcctggtgcaga ggccgccgtccgccgccgccgccatggccctcatgcgctccggactctgccg ccgtacgcggggccggcctggacagtgggctgagggccgccccgggctccg ctggggccgccgccgccccgccaccggggccctggcgtagggggccttc ggggccgcgtctctctccagcccttccggccgtgctccgccggccgcggg catcgcgacactgcagcctgtggcgacgccgtacccggccgcgcggccgcg	204

Конструкция	Последовательность	SEQ ID NO
	ccccccaacgctccgggaggccccccgggcccgcagccggccccaagcgcc gcagccccgccgcccgcgcacgccctgggcggcatggacgccgaactc atcgacgaggaggcgctgacgtcgtggagctggagctggggtgcaccgcg tgcgcgagctccccgagctgttctgggccagagcgagttcgactgcttctcg acttggggtccgcgcccgcggctccgtgagctgcggtggttctggtggtg gttctggtGGTGGCAGCGGGGAGGTTCTGGTcagtcca gtcatcaaacccagccgcatgcgcaagtacccaaccggcccagcaagacg ccccccacgaacgcccttacgcttgcccagtggagtcctgtgatcgccgcttct ccCGCAGCGACAACCTGGTGAGAcacatccgcatccacaca ggccagaagcccttcagtccgcatctgcatgAGAAacttcagcCGAG AGGATAACTTGCACACTcacatccgcacccacacaggcgaaaa gcccttcgcctgcgacatctgtgaagaaagtttggcCGGAGCGATGA ACTTGTCCGAcataccaagatccacttgcggcagaaggaccgccctta cgcttggccagtggagtcctgtgatcgccgcttctccCAATCAGGGAA TCTGACTGAGcacatccgcatccacacaggccagaagcccttcagt ccgcatctgcatgAGAAacttcagcACAAGTGGACATCTGGT ACGCcacatccgcacccacacaggcgaaaagcccttcgcctgcgacatctg tggaagaaagtttggcCAGAATAGTACCCTGACCGAAcatac caagatccacttgcggcagaaggacaag	
47 (кодирующая)	ATGGCCGCAGATCACCTGATGCTGGCTGAAGGCT ACAGACTGGTGCAGCGGCCTCCATCTGCCGCTGC CGCCCACGGCCCCCACGCCCTGAGAACACTGCCC CCCTACGCCGGCCCTGGTCTTGATAGCGGACTCA GACCTAGAGGCGCCCCCTCTGGGCCCTCCACCTCC AAGACAGCCTGGAGCCCTGGCCTACGGCGCCTTC GGCCCTCCTTCTAGCTTCCAGCCCTTCCCCGCCGT GCCTCCTCCAGCcGCTGGCATCGCCCACCTGCAG CCTGTGGCCACCCCTTACCCCGGAAGAGCCGCCG CCCCTCCAAACGCCCTGGCGGACCTCCTGGCCC CCAGCCTGCTCCAAGCGCCGCTGCCCCTCCACCT CCTGCTCATGCCCTGGGCGGCATGGACGCCGAGC TGATCGACGAGGAAGCCCTGACCAGCCTGGAAC TGGAAGTGGGCCTGCACAGAGTGCGGGAAGTGC CTGAGCTGTTCTGGGACAGAGCGAGTTCGACTG CTTCAGCGACCTGGGCAGCGCCCCCTCCTGCCGGC TCTGTGTCTGCGccgaccacctgatgctcgccgagggtaccgcct ggtgcagaggccgcccgtccgcccgcgcccgcctcatgctccg actctgccggtacgcgggcccggcctggacagtgggctgaggccg ggggtccgctggggccgcccgcgcccgaaccggggccctggcgtac ggggccttcgggcccgcgtctcttcagcccttcggccgtgctccg gccgcccgcacatgcgcacctgcagcctgtggcgacgcggtaccccgccgc gcCgccgccccccaacgctccgggaggccccccgggcccgcagccggc cccaagcgccgcagccccgcgcccgcgcacgccctgggcggcatgga cgccgaactcatcgacgaggaggcgctgacgtcgctggagctggagctggg ctgcaccgctgcgcgagctgcccagctgttctgggccagagcgagttcga ctgcttctcgacttggggtccgcgcccgcggtccgtgagctgccagtc ccagctcatcaaacccagccgcatgcgaagtacccaaccggcccagcaag acgccccccacgaacgcccttacgcttgcccagtggagtcctgtgatcgccgc ttctccCGCAGCGACAACCTGGTGAGAcacatccgcatccac acaggccagaagcccttcagtgcgcatctgcatgAGAAacttcagcCG	206

Конструкция	Последовательность	SEQ ID NO
	AGAGGATAACTTGCACACTcacatccgcacccacacaggcg aaaagcccttcgcctgcgacatctgtggaagaaagtttggcCGGAGCGA TGAACCTTGTCCGAcataccaagatccacttgcggcagaaggaccgc ccttacgcttgcacagtgaggctcctgtgatcgccgcttctccCAATCAGG GAATCTGACTGAGcacatccgcatccacacaggccagaagcccttc cagtgcgcgcatctgcatgAGAAacttcagcACAAGTGGACATCT GGTACGCcacatccgcacccacacaggcgaaaagcccttcgcctgcgac atctgtggaagaaagtttggcCAGAATAGTACCCTGACCGAA cataccaagatccacttgcggcagaaggacaag	
48 (кодирующая)	ATGGCCGCAGATCACCTGATGCTGGCTGAAGGCT ACAGACTGGTGCAGCGGCCTCCATCTGCCGCTGC CGCCACGGCCCCCACGCCCTGAGAACACTGCCC CCCTACGCCGGCCCTGGTCTTGATAGCGGACTCA GACCTAGAGGCGCCCCCTCTGGGCCCTCCACCTCC AAGACAGCCTGGAGCCCTGGCCTACGGCGCCTTC GGCCCTCCTTCTAGCTTCCAGCCCTTCCCCGCCGT GCCTCCTCCAGCTGCTGGCATCGCCACCTGCAG CCTGTGGCCACCCCTTACCCCGGAAGAGCCGCCG CCCCTCCAAACGCCCTGGCGGACCTCCTGGCCC CCAGCCTGCTCCAAGCGCCGCTGCCCTCCACCT CCTGCTCATGCCCTGGGCGGCATGGACGCCGAGC TGATCGACGAGGAAGCCCTGACCAGCCTGGAAC TGGAACCTGGGCCTGCACAGAGTGCGGGAACTGC CTGAGCTGTTCTTGGGACAGAGCGAGTTCGACTG CTTCAGCGACCTGGGCAGCGCCCTCCTGCCGGC TCTGTGTCTTGCGGCGGCAGCGGCGGCGGAAGC GGCgcccaccacctgatgctcgcgagggctaccgctggtgcagaggcc gccgtccgcccgcgcgccatggccctcatgcgctccggactctgccgccgt acgcggggcccgccctggacagtgggctgagggcgccggggggtccgctgg ggccgcccgcgccccccaacccggggccctggcgtaggggcttcgggc cgccgtctctctccagccctttccggcggtgcctccgcccggcgccgcatcg cgcacctgcagcctgtggcgacgcccgtaccccgccgcccgcgcccgcgccc ccaacgctccgggagggccccccgggcccgcagccggccccaaagcgcgca gccccgcgcccgcgcccgcacgcccctggcgccatggacgcccgaactcatc gacgaggaggcgctgacgtcgctggagctggagctggggctgcaccgcgtgc gcgagctgcccagctgttctgggcccagagcgagttcgactgcttctcgactt ggggtccgcccgcgcccgcggtccgtgagctcggtgtgtgtgtgtgtgt ctggtcagtcccagctcatcaaacccagccgcatgcgcaagtaccccaaccgg cccagcaagacgccccccacgaacgcccttacgcttgcccagtgaggctcctgt gacgcccgttctccCGCAGCGACAACCTGGTGAGAcacatc cgcatccacacaggccagaagcccttcagtgccgcatctgcatgAGAAact tcagcCGAGAGGATAACTTGCACACTcacatccgcacccac acaggcgaaaagcccttcgctgcgacatctgtggaagaaagtttggcCGG AGCGATGAACTTGTCCGAcataccaagatccacttgcggcaga aggaccgccccttacgcttgcacagtgaggctcctgtgatcgccgcttctccCAA TCAGGGAATCTGACTGAGcacatccgcatccacaggccag aagcccttcagtgccgcatctgcatgAGAAacttcagcACAAGTGG ACATCTGGTACGCcacatccgcacccacacaggcgaaaagcccttc gcctgcgacatctgtggaagaaagtttggcCAGAATAGTACCCTG ACCGAAcataccaagatccacttgcggcagaaggacaag	208

Конструкция	Последовательность	SEQ ID NO
49 (кодирующая)	atggagctggaattggatgctggtgaccaagacctgctggccttctgctagag gaaagtggagatttggggacggcaccgatgaggccgtgagggccccactgg actgggcgctccgcttctgaggtGccgagcgactgggaagtagatgattgc tgtgctccctgctgagtcccccagcgtcgttgaacattctcagctcctccaacccc tgccctgtccaccatgaccacacctactccctccacgggaaactgtctctatgga tctagagagtgagagctgtagaaaagaggggaccagatgactccacagcata tgaggagctggcagagcaggagattgctaggctagtactgacagatgaggag aagagtctattggagaaggaggggcttattctgcctgagacacttctctactaa gacagaggaacaaattctgaaacgtgtgcggCTCGAACCAGGTGA AAAACCTTACAAATGTCCTGAATGTGGGAAATC ATTCAGTCGCAGCGACAACCTGGTGAGACATCA ACGCACCCATACAGGAGAAAAACCTTATAAATG TCCAGAATGTGGAAAGTCCTTCTCACGAGAGGAT AACTTGCACTCATCAACGAACACATACTGGTG AAAAACCATACAAGTGTCCCGAATGTGGTAAAA GTTTTAGCCGGAGCGATGAACTTGTCCGACACCA ACGAACCCATACAGGCGAGAAGCCTTACAAATG TCCCGAGTGTGGCAAGAGCTTCTCACAATCAGGG AATCTGACTGAGCATCAACGAACCTCATAACGGG GAAAAACCTTACAAGTGTCCAGAGTGTGGGAAG AGCTTTTCCACAAGTGGACATCTGGTACGCCACC AGAGGACACATACAGGGGAGAAGCCCTACAAAT GCCCCGAATGCGGTAAAAGTTTCTCTCAGAATAG TACCCTGACCGAACACCAGCGAACACACACTGG GAAAAAAACGAGTgtgtaCgttgggggttagagagcCgggtctt gaaatacacagcccagaatatggagcttcagaacaaagtacagcttctggagga acagaattgtcccttctagatcaactgaggaaactccaggccatggtgattgaga tCtaaacaaaaccagcagcagcagcacctgcatcttggctctGctagtctcctt ctgcctctccttgtacctgctatgtactcctctgacacaagggggagcctgccag ctgagcatggagtgttgtcccgccagcttcgtgccctccccagtgaggaccctta ccagctggagctgcctgccctgcagtcagaagtccgaaagacagcacacacc agtgggtggacggctcagactgtgtactccaggccctggcaacacttctgcct gctgcattacatgcctcaggctccagtgagagcctccctggagtggccCtt ccctgacctctctcagagcctctctgccgaggtccctcctccctcagagca aatctcacaaggaaggaggatggcttctactggttagccctctgtcatttgc ggacagatactcaggc	212
50 (кодирующая)	atggagctggaattggatgctggtgaccaagacctgctggccttctgctagag gaaagtggagatttggggacggcaccgatgaggccgtgagggccccactgg actgggcgctccgcttctgaggtGccgagcgactgggaagtagatgattgc tgtgctccctgctgagtcccccagcgtcgttgaacattctcagctcctccaacccc tgccctgtccaccatgaccacacctactccctccacgggaaactgtctctatgga tctagagagtgagagctgtagaaaagaggggaccagatgactccacagcata tgaggagctggcagagcaggagattgctaggctagtactgacagatgaggag aagagtctattggagaaggaggggcttattctgcctgagacacttctctactaa gacagaggaacaaattctgaaacgtgtgcggcgcccttacgcttggcagtgga gtcctgtgatcgccgcttctccCGCAGCGACAACCTGGTGAG AcacatccgcatccacacaggccagaagcccttcagtgccgcactctgcatGA GAaacttcagcCGAGAGGATAACTTGCACACTcacatccg caccacacaggcgaagagcccttcgcctgcgacatctgtggaagaaagtgtgc cCGGAGCGATGAACTTGTCCGAcataccaagatccacttgcg	216

Конструкция	Последовательность	SEQ ID NO
	gcagaaggaccgcccttacgcttgcccagtgaggctcctgtgatcgccgcttctcc CAATCAGGGAATCTGACTGAGGcacatccgcatccacacagg ccagaagcccttccagtgccgcatctgcatgAGAAacttcagcACAAGT GGACATCTGGTACGCGcacatccgcacccacacaggcgaaaagcc ctctgcctgcgacatctgtggaagaaagttgccCAGAATAGTACCC TGACCGAACAcatcaagatccacttgccgcagaaggacgtgtaCgttg ggggttttagagagcCgggtcttgaaatacacagcccagaatatggagcttcag aacaaaagtagagcttctggaggaacagaattgtcccttctagatcaactgagga aactccaggccatggtgattgagatCtcaaaaaaccagcagcagcagcacc tgcatttggctctGctagtctccttctgcctcctcctgtacctgctatgtactctc tgacacaagggggagcctgccagctgagcatggagtgtgtcccgcagcttc gtgccctcccagtgaggacccttaccagctggagctgctgcccctgcagtcag aagtgccgaaagacagcacacaccagtggttgacggctcagactgtgtactcc agggccctggcaacacttctgctgctgattacatgcctcaggctcccagtcg agagcctcccctggagtggccCttccctgaccttctcagagcctctctgccga ggtcccatctcccctgcaggcaaatctcacaaggaaggaggatggcttct actggtagcccctctgtcattttgcaggacagatactcaggc	
51 (кодирующая)	atggagctggaattggatgctggtgaccaagacctgctggccttctgtagag gaaagtggagatttggggacggcaccgatgaggccgtgagggccccactgg actgggcgctgccgcttctgaggtGccgagcgactgggaagtagatgattgc tgtgctccctgctgagtcccccagcgtcggtgaacattctcagctcctccaacccc tgccttgccaccatgaccacactactcctcccacgggaaactgtctctatgga tctagagagttagagctgtagaaaagaggggacccagatgactccacagcata tggaggagctggcagagcaggagattgctaggctagtactgacagatgaggag aagagtctattggagaaggaggggcttattctgctgagacacttctctactaa gacagaggaaacaaattctgaaacgtgtgcggcgcccttacgcttgcccagtgga gtctgtgatcgccgcttctccCGCTCAGACAACCTCGTTCTGA cacatccgcatccacacaggccagaagcccttcagtgccgcatctgcatgAG AaacttcagcCACCGGACTACACTCACGAACcacatccgca cccacacaggcgaaaagcccttcgctgcgacatctgtggaagaaagtttgc AGAGAAGACAATCTCCATACTcataccaagatccacttgcg gcagaaggaccgcccttacgcttgcccagtgaggctcctgtgatcgccgcttctcc ACCAGCCATTCTCTCACTGAAcacatccgcatccacacagg ccagaagcccttccagtgccgcatctgcatgAGAAacttcagcCAGTCT AGCTCACTGGTGAGGcacatccgcacccacacaggcgaaaagc ccttcgctgcgacatctgtggaagaaagtttgcAGGGAGGATAAC CTGCATACGcataccaagatccacttgccgcagaaggacgtgtaCgtt gggggtttagagagcCgggtcttgaaatacacagcccagaatatggagcttca gaacaaagtagagcttctggaggaacagaattgtcccttctagatcaactgagg aaactccaggccatggtgattgagatCtcaaaaaaccagcagcagcagcac ctgcatttggctctGctagtctccttctgcctcctcctgtacctgctatgtactct ctgacacaagggggagcctgccagctgagcatggagtgtgtcccgcagctt cgtgccctcccagtgaggacccttaccagctggagctgctgcccctgcagtc gaagtgccgaaagacagcacacaccagtggttgacggctcagactgtgtact ccaggccctggcaacacttctgctgctgattacatgcctcaggctcccagtc gcagagcctcccctggagtggccCttccctgaccttctcagagcctctctgcc gaggtcccatctcccctgcaggcaaatctcacaaggaaggaggatggcttct ctactggtagcccctctgtcattttgcaggacagatactcaggc	218
52 (кодирующая)	atggagctggaattggatgctggtgaccaagacctgctggccttctgtagag gaaagtggagatttggggacggcaccgatgaggccgtgagggccccactgg	220

Конструкция	Последовательность	SEQ ID NO
	actgggcgctgccgctttctgaggtGccgagcgactgggaagtagatgattgc tgtgctccctgctgagtcacccagcgtcgtgaacattctcagctcctccaacccc tgcttgtccaccatgaccacacactactccctccacgggaaactgtctctatgga tctagagagttagagctgtagaaaagaggggacccagatgactccacagcata tggaggagctggcagagcaggagattgctaggctagtactgacagatgaggag aagagtctattggagaaggaggggcttattctgcctgagacacttcctctactaa gacagaggaacaaattctgaaacgtgtgcggCTCGAACCAGGTGA AAAACCTTACAAATGTCCTGAATGTGGGAAATC ATTCAGTCGCAGCGACAACCTGGTGAGACATCA ACGCACCCATACAGGAGAAAAACCTTATAAATG TCCAGAATGTGGAAAGTCCTTCTCACGAGAGGAT AACTTGCACACTCATCAACGAACACATACTGGTG AAAAACCATACAAGTGTCCCGAATGTGGTAAAA GTTTTAGCCGGAGCGATGAACTTGTCCGACACCA ACGAACCCATACAGGCGAGAAGCCTTACAAATG TCCCGAGTGTGGCAAGAGCTTCTCACAATCAGGG AATCTGACTGAGCATCAACGAACCTCATACCGGG GAAAAACCTTACAAGTGTCCAGAGTGTGGGAAG AGCTTTTCCACAAGTGGACATCTGGTACGCCACC AGAGGACACATACAGGGGAGAAGCCCTACAAAT GCCCCGAATGCGGTAAAAGTTTCTCTCAGAATAG TACCCTGACCGAACACCAGCGAACACACACTGG GAAAAAAACGAGTgtgtaCgttgggggtagagagcCgggtctt gaaatacacagcccagaatatggagcttcagaacaaagtacagcttctggagga acagaattgtcccttctagatcaactgaggaaactccaggccatggtgattgaga tatca	
53 (кодирующая)	atggagctggaattggatgctggtgaccaagacctgctggccttctgctagag gaaagtggagatttggggacggcaccgatgaggccgtgagggcccccactgg actgggcgctgccgctttctgaggtGccgagcgactgggaagtagatgattgc tgtgctccctgctgagtcacccagcgtcgtgaacattctcagctcctccaacccc tgcttgtccaccatgaccacacactactccctccacgggaaactgtctctatgga tctagagagttagagctgtagaaaagaggggacccagatgactccacagcata tggaggagctggcagagcaggagattgctaggctagtactgacagatgaggag aagagtctattggagaaggaggggcttattctgcctgagacacttcctctactaa gacagaggaacaaattctgaaacgtgtgcggcgcccttacgcttgcccagtgga gtcctgtgatcgccgcttctccCGCAGCGACAACCTGGTGAG AcacatccgcatccacacaggccagaagcccttcagtgccgcatctgcatgA GAaacttcagcCGAGAGGATAACTTGCACACTcacatccg caccacacaggcgaaaagcccttcgcctgcgacatctgtggaagaaagtttgc cCGGAGCGATGAACTTGTCCGAcataccaagatccacttgcg gcagaaggaccgccccttacgcttgcccagtgaggctctgtgatcgccgcttctcc CAATCAGGGAATCTGACTGAGcacatccgcatccacacagg ccagaagcccttcagtgccgcatctgcatgAGAaacttcagcACAAGT GGACATCTGGTACGCGacacatccgacccacacaggcgaaaagcc cttcgctgcgacatctgtggaagaaagtttcccCAGAATAGTACCC TGACCGAAcataccaagatccacttgcggcagaaggacgtgtaCgttg ggggttagagagcCgggtcttgaaatacacagcccagaatatggagcttcag aacaagtacagcttctggaggaacagaattgtcccttctagatcaactgagga aactccaggccatggtgattgagatCtca	222

Таблица 8. Последовательности нуклеиновых кислот для иллюстративных сайтов связывания микроРНК и микроРНК.

Описание	Последовательность	SEQ ID NO
Сайт связывания M1	aaagagaccggttcactgtgacagtaaaagagaccggttcactgtgagaatgaaagagaccggttcactgtgatcggaagagaccggttcactgtgagcggccttgaaaccagcagacaatgtagctcagtagaaaccagcagacaatgtagctgaatggaaaccagcagacaatgtagcttcggagaaaccagcagacaatgtagct	7
Последовательность miR128	UCACAGUGAACCGGUCUCUUU	8
Сайт связывания miR128	AAAGAGACCGGTTCCTGTGA	9
Последовательность miR221	AGCUACAUUGUCUGCUGGGUUUC	10
Сайт связывания miR221	GAAACCCAGCAGACAATGTAGCT	11
Последовательность miR222	AGCUACAUCUGGCUACUGGGUCU	12
Сайт связывания miR222	AGACCCAGTAGCCAGATGTAGCT	13
Сайт связывания M2	GAAACCCAGCAGACAATGTAGCTAGACCCAGTAGCCAGATGTAGCTAAAGAGACCGGTTCCTGTGA	14
Сайт связывания M3	GAAACCCAGCAGACAATGTAGCTAGACCCAGTAGCCAGATGTAGCTAAAGAGACCGGTTCCTGTGAGAAACCCAGCAGACAATGTAGCTAGACCCAGTAGCCAGATGTAGCTAAAGAGACCGGTTCCTGTGA	15

Таблица 9. Различные типы структур с «цинковыми пальцами» и иллюстративные белки типа «цинковые пальцы» для производства eTF.

Название типа ZF	SEQ ID NO	Структура ZF (причем каждый x может независимо быть любым остатком)	Иллюстративные белки, которые могут служить в качестве белковой платформы для eTF или ДНК-связывающего домена eTF, раскрытых в настоящем документе
«Цинковые пальцы» C2H2-типа (ZNF)	136	C-x-C-x-H-x-H	KLF4, KLF5, EGR3, ZFP637, SLUG, ZNF750, ZNF281, ZFP.89, GLIS1, GLIS3
Белки типа «пальцы Ring» (RNF)	137	C-x-C-x-C-x-H-xxx-C-x-C-x-C-x-C	MDM2, BRCA1, ZNF179
Белки типа «пальцы PHD» (PHF)	138	C-x-C-x-C-x-C-xxx-H-x-C-x-C-x-C	KDM2A, PHF1, ING1

Название типа ZF	SEQ ID NO	Структура ZF (причем каждый х может независимо быть любым остатком)	Иллюстративные белки, которые могут служить в качестве белковой платформы для eTF или ДНК-связывающего домена eTF, раскрытых в настоящем документе
Содержащие домен LIM	139	C-x-C-x-H-x-C-x-C-x-C-x-C-x-(C,H,D)	ZNF185, LIMK1, PXN
Ядерные гормональные рецепторы (NR)	140	C-x-C-x-C-x-C-xxx-C-x-C-x-C-x-C	VDR, ESR1, NR4A1
«Цинковые пальцы» CCCH-типа (ZC3H)	141	C-x-C-x-C-x-H	RC3H1, HELZ, MBNL1, ZFP36, ZFP36L1
«Цинковые пальцы» FYVE-типа (ZFYVE)	140	C-x-C-x-C-x-C-xxx-C-x-C-x-C-x-C	EEA1, HGS, PIKFYVE
«Цинковые пальцы» CCHC-типа (ZCCHC)	142	C-x-C-x-H-x-C	CNPI.H., SF1, LIN28A
«Цинковые пальцы» DHHC-типа (ZDHHC)	143	C-x-C-x-H-x-C-xxx-C-x-C-x-H-x-C	ZDHHC2, ZDHHC8, ZDHHC9
«Цинковые пальцы» MYND-типа (ZMYND)	144	C-x-C-x-C-x-C-xxx-C-x-C-x-H-x-C	PDCD2, RUNX1T1, SMYD2, SMYD1
«Цинковые пальцы» RANBP2-типа (ZRANB)	145	C-x-C-x-C-x-C	YAF2, SHARPIN, EWSR1
«Цинковые пальцы» ZZ-типа (ZZZ)	145	C-x-C-x-C-x-C	HERC2, NBR1, CREBPI.H.
«Цинковые пальцы» C2HC-типа (ZC2HC)	142	C-x-C-x-H-x-C	IKBKG, L3MBTL1, ZNF746
Содержащ. домен «цинковые пальцы» GATA (GATAD)	145	C-x-C-x-C-x-C	GATA4, GATA6, MTA1
ZF класс гомеобоксы и псевдогены	136	C-x-C-x-H-x-H	ADNP, ZEB1, ZHX1
Содержащ. домен THAP (THAP)	141	C-x-C-x-C-x-H	THAP1, THAP4, THAP11

Название типа ZF	SEQ ID NO	Структура ZF (причем каждый х может независимо быть любым остатком)	Иллюстративные белки, которые могут служить в качестве белковой платформы для eTF или ДНК-связывающего домена eTF, раскрытых в настоящем документе
«Цинковые пальцы» CXXC-типа (CXXC)	140	C-x-C-x-C-x-C-xxx-C-x-C-x-C-x-C	CXXC1, CXXC5, MBD1, DNMT1
«Цинковые пальцы» SWIM-типа (ZSWIM)	141	C-x-C-x-C-x-H	MAP3K1, ZSWIM5, ZSWIM6
«Цинковые пальцы» AN1-типа (ZFAND)	146	C-x-C-x-C-x-C-xxx-C-x-H-x-H-x-C	ZFAND3, ZFAND6, IGHMPLH.2
«Цинковые пальцы» 3CxxC-типа (Z3CXXC)	142	C-x-C-x-H-x-C	ZAR1, RTP1, RTP4
«Цинковые пальцы» CW-типа (ZCW)	145	C-x-C-x-C-x-C	MORC1, ZCWPW1, KDM1B
«Цинковые пальцы» GRF-типа (ZGRF)	145	C-x-C-x-C-x-C	TTF2, NEIL3, TOP3A
«Цинковые пальцы» MIZ-типа (ZMIZ)	142	C-x-C-x-H-x-C	PIAS1, PIAS3, PIAS4
«Цинковые пальцы» BED-типа (ZBED)	136	C-x-C-x-H-x-H	ZBED1, ZBED4, ZBED6
«Цинковые пальцы» HIT-типа (ZNHIT)	144	C-x-C-x-C-x-C-xxx-C-x-C-x-H-x-C	ZNHIT3, DDX59, INO80B
«Цинковые пальцы» MYM-типа (ZMYM)	145	C-x-C-x-C-x-C	ZMYM2, ZMYM3, ZMYM4
«Цинковые пальцы» matrin-типа (ZMAT)	136	C-x-C-x-H-x-H	ZNF638, ZMAT1, ZMAT3, ZMAT5
«Цинковые пальцы» C2H2C-типа	136	C-x-C-x-H-x-H	MYT1, MYT1L, ST18
«Цинковые пальцы» DBF-типа (ZDBF)	136	C-x-C-x-H-x-H	DBF4, DBF4B, ZDBF2
«Цинковые пальцы» PARP-типа	142	C-x-C-x-H-x-C	LIG3, PARP1

Таблица 10. Аминокислотные последовательности иллюстративных ДНК-связывающих доменов типа «цинковые пальцы».

DBD/целевой сайт	Последовательность	SEQ ID NO
eZF	LEPGKRP – [YKCPECCKSFS X HQRTH TGEKP] _n - YKCPECCKSFS X HQRTH – TGKKTS, где n - целое число от 1 до 15 и каждый X - это последовательность распознавания, способная связываться с 3 п.н. целевой последовательности	147
Целевой сайт Z1	RSDNLVR x REDNLHT x RSEDLVR x QSGNLTE x TSGHLVR x QNSTLTE, где каждый x представляет собой линкер, содержащий 1-50 аминокислотных остатков	148
Целевой сайт Z13	RSDNLVR x HRTTLTN x REDNLHT x TSHSLTE x QSSSLVR x REDNLHT, где каждый x представляет собой линкер, содержащий 1-50 аминокислотных остатков	149
Целевой сайт Z14	DPGALVR x RSDNLVR x QSGDLRR x THLDLIR x TSGNLVR x RSDNLVR, где каждый x представляет собой линкер, содержащий 1-50 аминокислотных остатков	150
Целевой сайт Z15	RRDELNV x RSDHLTN x RSDDLVR x RSDNLVR x HRTTLTN x REDNLHT x TSHSLTE x QSSSLVR x REDNLHT, где каждый x представляет собой линкер, содержащий 1-50 аминокислотных остатков	151

Таблица 11. Аминокислотные последовательности для раскрытых в настоящем документе иллюстративных последовательностей распознавания типа «цинковые пальцы».

Последовательность	SEQ ID NO
RSDNLVR	152
REDNLHT	153
RSEDLVR	154
QSGNLTE	155
TSGHLVR	156
QNSTLTE	157
DPGALVR	158
HRTTLTN	159
QSGDLRR	160
TSHSLTE	161
THLDLIR	162
QSSSLVR	163
TSGNLVR	164
RRDELNV	165
RSDDLVR	166
RSDHLTN	167

Таблица 12. Другие раскрытые в настоящем документе нуклеотидные и аминокислотные последовательности.

Описание	Последовательность	SEQ ID NO
Домен EGR1 NLS	LIKPSRMRKYPNRPSK	168
SV40 NLS	PKKKRKV	169
Нуклеоплазмический NLS	KRPAATKKAGQAKKKK	170
Тэг HA	YPYDVPDYA	171
spA (синтетический полиА)	AATAAAAGATCTTTATTTTCATTAGATCTGTGTGTTGGTTTTTGTGTGCGGACCGCACGTG	16
hGH (полиА гормона роста человека)	GGGTGGCATCCCTGTGACCCCTCCCCAGTGCCTCTCCTGGCCCTGGAAGTTGCCACTCCAGTGCCCACCAGCCTTGTCCTAATAAAATTAAGTTGCATCATTTTGTCTGACTAGGTGTCCTTCTATAATATTATGGGGTGGAGGGGGGTGTATGGAGCAAGGGGCAAGTTGGGAAGACAACCTGTAGGGCCTGCGGGGTCTATTGGGAACCAAGCTGGAGTGCAGTGGCACAATCTTGGCTCACTGCAATCTCCGCCTCTGGGTTCAAGCGATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCGAGTTGTTGGGATTCCAGGCATGCATGACCAGGCTCAGCTAATTTTGTTTTTTTGGTAGAGACGGGGTTTCACCATATTGGCCAGGCTGGTCTCCAATCTCAATCTCAGGTGATCTACCCACCTTGGCCTCCCAAATTGCTGGGATTACAGGCGTGAACCACTGCTCCCTTCCCTGTCCTT	17
Белок SCN1A	MEQTVLVPPGPDSENFFTRESLAAIERRIAEKAKNP KPDKKDDDENGPKPNSDLEAGKNLPFIYGDIPPEMVSEPLEDLPYYINKKTFIVLNKGKAI FRFSATSALYILTPFNPLRKIAIKILVHSLFSMLIMCTILTNCVFMTMSNPPDWTKNVEYTFGTGIYTFESLIKIIARGFCLEDFTLRDPWNWLDFTVITFAVYVTEFVDLGNVSALRTRFVLRALKTISVIPGLKTIVGALIQSVKKLSDVMILTVFCLSVFALIGLQLFMGNLRNKKCIQWPPTNASLEEHSIEKNITVNYNGTLINETVFEFDWKS YIQDSRYHYFLEGFLDALLCGNSSDAGQCPEGYMCVKAGRNPNYGYTSFDTFSWAFSLFRLMTQDFWENLYQLTLRAAGKTYMIFVFLVIFLGSFYLINLILAVVAMAYEEQNQATLEAEQKEAEFQQMIEQLKKQOEAAQQAATATASEHSREPSAAGRLSDSSSEASKLSSKSAKERRNRRKKRKQKEQSGGEEKDEDEFQKSESEDSIRRKGFRRFSIEGNRLTYEKRYSSPHQSLLSIRGSLFSPRRNSRTSLFSFRGRAKDVGSENFADDEHSTFEDNESRRDSLFVPRRHGERRNSNLSQTSRSSRMLAVFPANGKMHSTVDCNGVVSLVGGPSVPTSPVGQLLEVIIDK PATDDNGTTTETEMRKRRSSSFHVSMDFLEDPSQRQRAMSIA SILTNTVEELEESRQKCPPCWYKFSNIFLIWDCSPYWLKVKHVVNLVVMDFVLAITICIVLNTLFMAMEHYPMTDHFNNVLTVGNLVFTGIFTAEMFLKIIAMDPYY YFQEGWNIFDGFIVTSLSLVELGLANVEGLSVLRSFRLLRVFKLAKSWPTLNM LIKIIGNSVGALGNLTLVLAIVFIFAVVGMQLFGKSYKDCVCKIASDCQLPRWHMNDFFHSFLIVFRVLCGEWIETMWDCMEVAGQAMCLTVFMMVMVIGNLVVLNLF LALLSSFSADNLAATDDDNEMNNLQIAVDRMHKGVAYVKRKIYEFIQQS FIRKQKILDEIKPLDDLNNKKDSCMSNHTAEIGKDL DYLKDVNGTTSIGITGSSVEKYIIDE SDYMSFINNP SLTVTVPIAVGESDFENLNTEDFSSESDLEE	172

Описание	Последовательность	SEQ ID NO
	SKEKLNSSSSSEGSTVDIGAPVEEQPVVEPEETLEPEACF TEGCVQRFKCCQINVEEGRGKQWWNLRRTCFRIVEHNW FETFIVFMILLSSGALAFEDIYIDQRKTIKTMLEYADKVFT YIFILEMLLKWVAYGYQTYFTNAWCWLDLFLVDVSLVS LTANALGYSELGAIKSLRTLRLRPLRLALSRFEGMRVVV NALLGAIPSIMNVLLVCLIFWLIFSIMGVNLFAGKFYHCI NTTTGDRFDIEDVNNHTDCLKLIERNETARWKNVKVNF DNVGFGYLSLLQVATFKGWMDIMYAAVDSRNVELQPK YEESLYMYLYFVIFIIFGSFFTLNLFIVIIDNFNQKKKFG GQDIFMTEEQKKYYNAMKKLGSKKPQKPIPRPGNKFQG MVDFDVTRQVFDISIMILICLNMVTMMVETDDQSEYVTT ILSRINLVFIVLFTGECVLKLISLRHYFYFTIGWNIFDFVVI LSIVGMFLAELIEKYFVSPTLFRVIRLARIGRILRLIKGAK GIRTLLFALMMSLPALFNIGLLLFLVMFIYAIFGMSNFAY VKREVGIDDMFNFETFGNSMICLFQITTSAGWDGLLAPIL NSKPPDCDPNKVNPVGSSVKGDCGNPSVGIFFFVSYIIISFL VVVNMYIAVILENFSVATEESAEPLEDDFEMFYEVWEK FDPDATQFMEFEKLSQFAAALEPPLNLPQPNKLQLIAMD LPMVSGDRIHCLDILFAFTKRVLGESGEMDALRIQMEER FMASNPSKVSYPITTTTLKRKQEEVSAVIIQRAYRRHLLK RTVKQASFTYNKNKIKGGANLLIKEDMIIDRINENSITEK TDLTMSTAACPPSYDRVTKPIVEKHEQEGKDEKAKGK	
Белок dCAS	KRNYILGLAIGITSVGYGIIDYETRDVIDAGVRLFKEANV ENNEGRRSKRGARRLKRRRRHRIQRVKLLFDYNLLTD HSELGINPYEARVKGLSQKLSEEEFSAALLHLAKRRGV HNVNEVEEDTGNELSTKEQISRNSKALEEKYVAELQLER LKKDGEVRGSINRFKTSYVKEAKQLLKVKQKAYHQLDQ SFIDTYIDLLETRRTYYEGPGEGSPFGWKDIKEWYEMLM GHCTYFPEELRSVKYAYNADLYNALNDLNNLVITRDEN EKLEYEKFQIENVFQKQKKPTLKQIAKEILVNEEDIKG YRVTSTGKPEFTNLKVYHDIKDITARKEIENAELLDQIA KILTIYQSSEDIQEELTNLNSLTQEEIEQISNLKGYTGTH NLSLKAINLILDELWHTNDNQIAIFNRLKLVKKVDLSQQ KEIPTTLVDDFILSPVVKRSFIQSIKVINAIKKYGLPNDIIE LAREKNSKDAQKMINEMQKRNRTNERIEEIIRTTGKEN AKYLIEKIKLHDMQEGKCLYSLEAIPLEDLLNNPFNYEV DHIIIPRSVSFDNSFNKVLVKQEEASKKGNRTPFQYLSSS DSKISYETFKKHILNLA KGKGRISKTKKEYLLEERDINRF SVQKDFINRNLVDTRYATRGLMNLRLSYFRVNNLDVKV KSINGGFTSFLRRKWKFKKERNKGYKHHAEALIIANAD FIFKEWKKLDKAKKVMENQMFEKQAESMPEIETEYQY KEIFITPHQIKHIKDFKDYKYSHRVDKKNRELINDTLYS TRKDDKGNTLIVNNLNGLYDKDNDKLKLINKSPEKLL MYHHDPQTYQKLKLIMEQYGDEKNPLYKYEEETGNYL TKYSKKDNGPVIIKKIKYYGNKLNALHDITDDYPNSRNK VVKLSLKPYPYRFDVYLDNGVYKFVTVKNLDVIKKENYYE VNSKCYEEAKKKKISNQAEFIASFYNNDLIKINGELYRV IGVNNDLLNRIEVMIDITYREYLENMNDKRPPRIIKTIAS KTQSIKKYSTDILGNLYEVKSKKHPQIIKKG	173

Описание	Последовательность	SEQ ID NO
Конструкция dCAS9-VP64	MAPKKKRKVGIHGVPAAKRNYILGLAIGITSVGYGIIDYE TRDVIDAGVRLFKEANVENNEGRRSKRGARRLKRRRRH RIQRVKKLLFDYNLLTDHSELSGINPYEARVKGLSQKLSE EEFSAALLHLAKRRGVHNVNEVEEDTGNELSTKEQISRN SKALEEKYVAELQLERLKKDGEVRGSINRFKTSYVKEA KQLLKVQKAYHQLDQSFIDTYIDLLETRRTYYEGPGEGS PFGWKDIKEWYEMLMGHCTYFPEELRSVKYAYNADLY NALNDLNNLVITRDENEKLEYEYEFQIENVFKQKKKPT LKQIAKEILVNEEDIKGYRVTSTGKPEFTNLKVYHDIKDI TARKEIENAELLDQIAKILTIYQSSEDIQEELTNLNSLTQ EEIEQISNLKGYTGTHNLSLKAINLILDELWHTNDNQIAIF NRLKLVPPKVDLSQQKEIPTTLVDDFILSPVVKRSFIQSIK VINAIKKYGLPNDIIELAREKNSKDAQKMINEMQKRN QTNERIEEIIRTTGKENAKYLIEKIKLHDMQEGKCLYSLE AIPLEDLLNPNFYEVVDHIIPRSVSFDNSFNKVLVKQEE ASKKGNRTPFQYLSSSDSKISYETFKKHILNLAKGKGRIS KTKKEYLLEERDINRFSVQKDFINRNLVDTRYATRGLMN LLRSYFRVNNLDVKVKSINGGFTSFLRRKWKFKKERNK GYKHAEDALIINANADFIFKEWKKLDKAKKVMENQMFE EKQAESMPEIETEQEYKEIFITPHQIKHIKDFKDYKYSHR VDKKPNRELINDTLYSTRKDDKGNTLIVNNLNGLYDKD NDKLKLINKSPEKLLMYHHPQTYQKLKLIMEQYGD KNPLYKYYEETGNYLTKYSKKDNGPVIKKIKYYGNKLN AHLDTDDYPNSRNKVVKLSLKPYRFDVYLDNGVYKFV TVKNLDVIKKENYYEVNSKCYEEAKKLKKISNQAEFIAS FYNNDLIKINGELYRVIGVNNDLLNRIEVMIDITYREYL ENMNDKRPPRIIKTIASKTQSIKKYSTDILGNLYEVKSKK HPQIIKKGKRPAATKAGQAKKKKGSYPYDVPDYALED ALDDFDLDMLGSDALDDFDLDMLGSDALDDFDLDMLG SDALDDFDLDMLG	174
Белок EGR3 (человека) WT	MTGKLAEKLPVTMSSLLNQLPDNLYPEEIPSALNLFSGSS DSVVHYNQMATENVMIDIGLTNEKPNPELSYSGSFQAP GNKTVTYLGKFAFDSPSNWCQDNIISLMSAGILGVPPAS GALSTQTSTASMVQPPQGDVEAMYPALPPYSNCGDLYS EPVSFHDPPQGNPGLAYSPQDYQSAKPAALDSNLFPMIPDY NLYHHPNDMGSIPEHKPFQGMPIRVNPPPIPTLETIKAF KDKQIHPGFGSLPQPPLTLKPIRPRKYPNRPSKTPLHERPH ACPAEGCDRRFSRDELTRHLRIHTGHKPFQCRICMRSFS RSDHLTTHIRTHTEKPFACEFCGRKFARSDEKRRHAKI HLKQKEKKAEEKGGAPSASSAPPVSLAPVVTTC	175
Белок EGR1 (человека) WT	maaakaemqlmsplqisdpgsfphsptmdnypkleemmlsngapqflgaagap egsgsnsssssssgggggggsgnssssstfnpqadtgeqpyehltaesfpdislnnek vlvetsypsqttrlpitygrfslpapnsgntlwpeplfslvsglvsmtnppasssap spaassasasqspplscavpsndsspiysaaptfptpntdifpepqsqafpgsagtalqy pppaypaakggfqvpmipdyfppqqgdlglgtpdqkpfqglesrtqqpsltplstik afatqsgsqdlkalntsyqsqlikpsrmrkypnrpsktppherpyacpvescdrrfsrs deltrhrihtgqkpfqcrimrnsrsdhlththrtgekpfacdicgrkfarsderkrht kihlrqdkdkadksvassatsslsypspvatsypspvttsypspattsyvspvtsfs spgsstypspvhsgfppspvattyssvppafpaqvssfpssavtnsfstglsdmtatf sptieic	176

Описание	Последовательность	SEQ ID NO
Линкер	GGSGGGSG	177
Линкер	GGSGGGSGGGSGGGSG	178
Линкер	[GGGS]n	179
Линкер	[GGGS]n	180
Линкер	[GGSG]n	181
Сайт распознавания для WT EGR1 или EGR3	GCG(T/G)GGGCG	182
Каркас sgRNA	GTTTTAGTACTCTGGAAACAGAATCTACTAAAACAAG GCAAAATGCCGTGTTTATCTCGTCAACTTGTGGCGAG A	183
Кодирующая последовательность CREB3 человека	atggagctggaattggatgctggtgaccaagacctgctggccttctgctagaggaaagt ggagattggggacggcacccgatgaggccgtgagggcccccactggactggcgctg ccgctttctgaggtGccgagcgactgggaagtagatgattgctgtgctccctgctgagtc ccccagcgtcgtgaacattctcagctcctccaacccctgccttgccaccatgaccacac ctactcctccacgggaaactgtctctatggatctagagagtgagagctgtagaaaaga ggggaccagatgactccacagcatatggaggagctggcagagcaggagattgctagg ctagtactgacagatgaggagaagagtctattggagaaggaggggcttattctgcctgag acacttctcactaagacagaggaacaaattctgaaacgtgtgcggaggaagattcga aataaaagatctgctcaagagagccgcaggaaaaaagaggtgtCgttgggggttaga gagcGgggtcttgaaatacacagcccagaatatggagcttcagaacaaagtacagcttct ggaggaacagaatttgcccttctagatcaactgaggaaactccaggccatggtgattgag atCtaaaaaaacagcagcagcagcacctgcatcttggtcctGctagtctccttctgc ctcctcctgtacctgctatgtactcctctgacacaagggggagcctgccagctgagcatg gagtgtgtcccgccagcttctgcccctcccagtgaggacccttaccagctggagctgc ctgccctgcagtcagaagtgccgaaagacagcacacaccagtggttgacggctcaga ctgtgtactccaggccctggcaacacttctgctgctgcattacatgcctcaggctccca gtgcagagcctcccctggagtggccCttccctgaccttctcagagcctctctgccgag gtcccatcctccccctgcaggcaaatctcacaaggaggaggatggcttctactggtgta gcccctctgtcatttgcaggacagatactcaggc	210
Последовательность AA CREB3 человека	MELELDAGDQDLLAFLLEESGDLGTAPDEAVRAPLDWA LPLSEVPSDWEVDDLLCSLLSPASLNILSSSNPCLVHHD HTYSLPRETVSMDLESESCRKEGTQMTPQHMEELAEQEI ARLVLTDEEKSLLEKEGLIPETLPLTKTEEQILKRVRRI RNKRSAQESRRKKKVYVGGLESRLKYTAQNMELQNK VQLLEEQNLSLLDQLRKLQAMVIEISNKTSSSSTCILVLL VSFCLLLVPAMYSSDTRGSLPAEHGVL SRQLRALPSEDP YQLELPALQSEVPKDS THQWLDGSDCVLQAPGNTSCLL HYMPQAPSAEPPLWPFDFSEPLCRGPILPLQANLTRK GGWLPTGSPSVILQDRYSG	211
Человеческий С-концевой домен CREB3 с трансмембранной областью	VYVGGLESRLKYTAQNMELQNKVQLLEEQNLSLLDQL RKLQAMVIEISNKTSSSSTCILVLLVSFCLLLVPAMYSSD TRGSLPAEHGVL SRQLRALPSEDPYQLELPALQSEVPK DSTHQWLDGSDCVLQAPGNTSCLLHYMPQAPSAEPPLW PFDFSEPLCRGPILPLQANLTRKGGWLPTGSPSVILQD RYSG	225
Человеческий С-концевой	VYVGGLESRLKYTAQNMELQNKVQLLEEQNLSLLDQL RKLQAMVIEIS	226

Описание	Последовательность	SEQ ID NO
домен CREB3 без трансмембранной области		
Кодирующая последовательность CREB3-TRE	atggagctggaattggatgctggtgaccaagacctgctggccttcctgctagaggaaagt ggagattggggacggcacccgatgaggccgtgagggccccactggactggcgctg ccgctttctgaggtGccgagcgactgggaagtagatgattgctgtgctccctgctgagtc ccccagcgtcgttgaacattctcagctcctccaacccctgccttgccaccatgaccacac ctactcctccacgggaaactgtctctatggatctagagagtgagagctgtagaaaaga ggggaccagatgactccacagcatatggaggagctggcagagcaggagattgctagg ctagtactgacagatgaggagaagagtctattggagaaggaggggcttattctgcctgag acacttctcactaagacagaggaacaaattctgaaacgtgtgcggCTTGAGCC CGGAGAGAAGCCGTACAAGTGCCCTGAGTGCGGCAA GTCTTTTAGCAGAAGAGACGAACCTTAATGTCCACCAG CGAACGCATACTGGTGAAAAGCCCTATAAATGTCCTG AATGTGGGAAATCATTCTCCAGCCGCAGAACCTGTAG GGCTCACCAGCGAACACACACCGGCGAAAAACCATA CAAATGTCCAGAATGCGGGAAATCCTTTTCTCAGTCAT CCAACCTTGGTGAGACATCAACGCACGCACACTGGAGA AAAGCCTTACAAATGCCCCGGAATGTGGAAAGTCTTTT TCCCAATTGGCCCATTGCGAGCCCATCAGAGGACTC ACACGGGCGAGAAACCTTACAAATGCCCGGAATGCGG GAAATCTTTTTCAACGAGTGGCAACCTCGTAAGACAC CAAAGAACGCATACAGGCGAAAAGCCATATAAGTGTC CTGAGTGTGGTAAATCATTCTCACACAGGACCACCCT GACAAATCACCAGCGCACGCACACCGGCAAGAAGAC AAGCgtgtaCgttgggggttagagagcCgggtcttgaaatacacagcccagaatat ggagcttcagaacaaagtacagcttctggaggaacagaatttgcccttctagatcaactg aggaaactccaggccatggtgattgagatCtcaacaaaaccagcagcagcacct gcatcttggtcctGctagtctccttgcctcctcctgtacctgctatgtactcctgacac aagggggagcctgccagctgagcatggagtgtgtcccgccagcttctgcccctccca gtgaggacccttaccagctggagctgcctgcctgcagtcagaagtgccgaaagacagc acacaccagtgggtggacggctcagactgtgtactccaggccctggcaacacttctgc ctgctgcattacatgcctcaggtccagtgagagcctccccctggagtggccCttccct gaccttctcagagcctctctgccgaggtcccatcctccccctgcaggcaaatctcaca ggaaggaggatggcttctactggtagcccctctgtcattttgcaggacagatactcagg c	214
CREB3-TRE	MELELDAGDQDLLAFLLEESGDLGTAPDEAVRAPLDWA LPLSEVPSDWEVDDLLCSLLSPPASLNILSSSNPCLVHHD HTYSLPRETVSMDLESESCRKEGTQMTPQHMEELAEQEI ARLVLTDEEKSLLEKEGLILPETLPLTKTEEQILKRVRLP GEKPYKCPECCKSFSRRDELNVHQRTHTGEKPYKCPEC GKSFSRRRTCRAHQRTHTGEKPYKCPECCKSFSQSSNLV RHQRTHTGEKPYKCPECCKSFSQLAHLRAHQRTHTGEK PYKCPECCKSFSSTGNLVRHQRTHTGEKPYKCPECCKSFS SHRTTLTNHQRTHTGKKTSVYVGGLESRLKYTAQNME LQNKVQLLEEQLNLSLLDQLRKLQAMVIEISNKTSSSTCI LVLLVSFCLLLVPAMYSSDTRGSLPAEHGVLRSRLRALP SEDPYQLELPALQSEVPKDSHQWLDGSDCVLQAPGNTS	215

Описание	Последовательность	SEQ ID NO
	CLLHYMPQAPSAEPPLEWPFDPDLFSEPLCRGPILPLQANL TRKGGWLPTGSPSVILQDRYSG	

ПРИМЕРЫ

[317] Следующие ниже примеры включены для дальнейшего описания некоторых аспектов настоящего раскрытия и не должны использоваться для ограничения объема настоящего изобретения.

ПРИМЕР 1

Идентификация целевых областей, способных активировать SCN1A, с использованием SCN1A-специфических активаторов транскрипции

[318] Чтобы идентифицировать области генома, способные повышать экспрессию эндогенного SCN1A, разрабатывали различные сконструированные факторы транскрипции (либо нуклеазы типа «цинковые пальцы», либо конструкции gRNA/daCas9), которые нацелены на различные области генома, как указано в **таблицах 4 и 13** выше. Для конструкций gRNA/daCas9 эта gRNA имела ту же последовательность, что и целевая область, потому что gRNA разрабатывали для нацеливания на комплементарную геномную цепь. Белок dCas9 представлял собой конструкцию dCAS9-VP64 (SEQ ID NO: 174).

[319] Клетки HEK293 культивировали стандартными способами и трансфицировали (FugeneHD, Promega) 3 мкг плазмиды, несущей сконструированный фактор транскрипции или контрольную конструкцию, на лунку 6-луночного планшета. Клетки трансфицировали плазмидами, экспрессирующими конструкции, указанные в **таблице 13** ниже. Через 48 часов после трансфекции клетки собирали, выделяли РНК (набор Qiagen RNeasy Mini) и обрабатывали ДНКазой. РНК (3 мкг) подвергали обратной транскрипции с использованием праймеров OligoDT (Superscript IV, Invitrogen). Образцы кДНК анализировали с помощью кПЦР с использованием Phusion Polymerase (New England Biolabs) и SYBR Green I: (30 секунд при температуре 98°C, 40-кратно [10 секунд при температуре 98°C, 15 секунд при температуре 66°C, 15 секунд при температуре 72°C]). Праймеры против SCN1A (5'-TGTCTCGGCATTGAGAACATTC-3' (SEQ ID NO: 185); 5'-ATTGGTGGGAGGCCATTGTAT-3' (SEQ ID NO: 186)) использовали для количественной оценки уровней эндогенного транскрипта SCN1A, а относительные уровни экспрессии SCN1A определяли способом дельта-дельта Ct с GAPDH в качестве эталонного гена (5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC'-3' (SEQ ID NO: 187); 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3' (SEQ ID NO: 188)). Данные представлены в виде кратных изменений относительно контрольного условия.

[320] Результаты показаны на **фиг. 1** и в **таблице 13** ниже в виде кратного изменения транскрипции SCN1A относительно контрольных условий (например, репортерная конструкция EGFP-KASH). В **таблице 13** приведены значения для конструкций, которые привели по меньшей мере к 1,5-кратному увеличению транскрипции по сравнению с контрольными условиями.

Таблица 13. Влияние различных целевых сайтов генома и соответствующих eTF на транскрипцию. CON указывает на конструкцию типа «цинковые пальцы», которая использовалась в эксперименте (смотрите **таблицу 1**). Для конструкций gRNA целевой сайт и последовательность gRNA являются одинаковыми, поскольку gRNA разрабатывали для нацеливания на комплементарную цепь ДНК.

CO N	Начальн. положени е в хромосоме 2	Целевая последовательность	Целево й сайт с фиг. 1	SEQ ID NO для целевог о сайта	Среднее	Т- значение
4	166149168	ctaggctcaagtgtaggag	z1	18	5,12090848	0,0096628
28	166149165	GGTCAAGTGTAGGAGACA	z8	25	1,52068773	0,62403349
3	166128025	taggtaccatagagttag	z13	30	25,4730028	0,14942042
29	166127991	gaggatactgcagaggtc	z14	31	8,6766618	0,16432794
	166149176	aaggctgtctaggctcaagtgt	g9	35	1,36378425	0,18753821
	166149118	tggtcctccagattaacactt	g10	36	1,63040825	0,46710683
	166128002	gatgaagccgagaggatactg	g11	37	18,7579211	0,13148732
	166128037	gctgatttgatttaggtacca	g12	38	22,4892633	0,09291316
	166177299	AGAAAGCTGATACAGATACA A	g15	39	1,7542842	0,34519408
	166178880	ggtacgggcaaagatttcttg	g17	40	1,36801947	0,48762102
	166177299	AGAAAGCTGATACAGATACA A	g19	41	1,45636874	0,44464045
	166177369	ACACAATGAGCCACCTACAAG	g20	42	1,31187425	0,42605224
	166177362	GTGGCTCATTGTGTGTGTGCC	g22	43	1,25217773	0,26572657
	166155264	CATATCCCTGCAGGTTTCAGAA	g24	44	1,75688991	0,28984533
	166155099	agagagagagagagagagaga	g25	45	2,05701745	0,42409102
	166155393	TTCTCAGTTTTGAAATTA AAA	g26	46	1,64498972	0,21705582
	166155255	TGGATTCTCTTCTGAACCTGC	g27	47	2,27026665	0,43195546
	166148361	TGCTGAGGCAGGACACAGTGT	g29	48	2,4290169	0,30364553
	166148843	ATCATCTGTAACCATCAAGGA	g30	49	2,58328006	0,0748197
	166148565	TCCTGCCTACTTAGTTTCAAG	g31	50	1,97097781	0,25980859
	166148953	ATTACAGTTCTGTCAGCATGC	g32	51	1,34500323	0,32186367
	166149373	TGGTCTCATTCTTTTTGTGGG	g33	52	1,71471378	0,32104302
	166142239	CGATATTTTCATGGATTTCCTT	g34	53	1,7735976	0,21954265

CO N	Начальн. положени е в хромосоме 2	Целевая последовательность	Целево й сайт с фиг. 1	SEQ ID NO для целевог о сайта	Среднее	Т- значение
	166142391	CTGACACTTACTTTGTCTAAA	g35	54	1,95513108	0,02069095
	166142219	AAAACCTGGAACCGCATTCCTCA	g36	55	2,08698135	0,0454403
	166142396	ACAAAGTAAGTGTCTAGTGTGG	g37	56	1,30739959	0,72725347
	166142344	ATAATAGTTGTGTCTTTATAA	g38	57	1,55783618	0,29846459
	166141162	TGTACAAGCAGGGCTGCAAA G	g39	58	1,4663605	0,02946062
	166140590	GTTAACAAATACACTAAACAC	g40	59	1,37399196	0,33638238
	166140928	ttcaacaagctcccaagaagt	g42	60	1,46929899	0,24465271
	166141090	ATGTTCAAGGTGCAGAAGGA A	g43	61	2,04547409	0,09880194
	165990246	TGTTTGCTCAAACGTGCACCA	g44	62	2,13402102	0,25583999
	165989684	AAATAAGACATGAAAACAAG A	g45	63	1,27016182	0,32368695
	165990193	AAATATGTACCACAAGAAATG	g46	64	2,29522738	0,41829497
	165990076	TATCTGGTTTCTCTCACTGCT	g47	65	1,44542116	0,0947106
	165989571	ATTGCAAAGCATAATTGGAT	g48	66	1,42246971	0,18117243

ПРИМЕР 2

Активация эндогенного SCN1A в клетках HEK293 с использованием специфических для SCN1A факторов транскрипции

[321] Клетки HEK293 культивировали стандартными способами и высевали в 6-луночные планшеты. Клетки в каждой лунке трансфицировали (FugeneHD, Promega) 3 мкг плазмиды, несущей либо единственную сконструированную конструкцию фактора транскрипции, CREB3 WT человека (SEQ ID NO: 211), либо контрольную конструкцию EGFP. Исследуемые сконструированные конструкции фактора транскрипции включали в себя: конструкции 1-27 и 46-53 (таблица 1) и плазмиду, экспрессирующую CREB3-TRE (SEQ ID NO: 215; CREB3 с ДНК-связывающим доменом bZIP, замененным синтетическим доменом ZF, нацеленным на промотор TET) (каждый исследовали отдельно). Через 48 часов после трансфекции клетки собирали и выделяли РНК (набор Qiagen RNeasy Mini) и обрабатывали ДНКазой. РНК (3 мкг) подвергали обратной транскрипции с использованием праймеров OligoDT (Superscript IV, Invitrogen). Образцы кДНК анализировали с помощью кПЦР с использованием Phusion Polymerase (New England Biolabs) и SYBR Green I: (30 секунд при температуре 98°C, 40-кратно [10 секунд при температуре 98°C, 15 секунд при температуре 66°C, 15 секунд при температуре 72°C]). Праймеры против SCN1A (5'-TGTCTCGGCATTGAGAACATTC-3' (SEQ ID NO: 185); 5'-ATTGGTGGGAGGCCATTGTAT-3' (SEQ ID NO: 186)) использовали для количественной

оценки уровней эндогенного транскрипта SCN1A, и относительные уровни экспрессии SCN1A определяли способом дельта-дельта Ct с GAPDH в качестве эталонного гена (5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC'3' (SEQ ID NO: 187); 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3' (SEQ ID NO: 188)). Данные представлены в виде кратных изменений относительно контрольного условия (смотрите **фиг. 2А**, **фиг. 2В** и **фиг. 2С**). Контрольная конструкция состояла из EGFP, экспрессированного под контролем RE 1 (SEQ ID NO: 1). Доставка сконструированных факторов транскрипции индуцировала различную степень активации эндогенного транскрипта SCN1A по отношению к состоянию EGFP.

ПРИМЕР 3

Активация эндогенного SCN1A в ГАМК-нейронах с использованием специфических для SCN1A факторов транскрипции

[322] ГАМК-нейроны iCell (Cellular Dynamics) помещали в 6-луночный планшет (~1Е6 клеток/луночку) и поддерживали в соответствии с протоколом, рекомендованным производителем. Через 72 часа после посева рекомбинантный AAV (серотип AAV-DJ), экспрессирующий EGFP, или конструкцию активатора 30 на **фиг. 3А**, или конструкцию 25, или конструкцию 16 на **фиг. 3В** под контролем универсального промотора (промотор СВА) добавляли в культуральную среду приблизительно в количестве 2Е11 копий генома на луночку. Через одну неделю (**фиг. 3А**) или две недели (**фиг. 3В**) после инфицирования РНК выделяли из культивированных клеток (набор Qiagen RNeasy Mini) и обрабатывали ДНКазой. Восстановленную РНК подвергали обратной транскрипции с использованием праймеров OligoDT (Superscript IV, Invitrogen). Образцы кДНК анализировали с помощью кПЦР с использованием Phusion Polymerase (New England Biolabs) и SYBR Green I: (30 секунд при температуре 98°C, 40-кратно [10 секунд при температуре 98°C, 15 секунд при температуре 66°C, 15 секунд при температуре 72°C]). Праймеры против SCN1A (5'-TGTCTCGGCATTGAGAACATTC-3' (SEQ ID NO: 185); 5'-ATTGGTGGGAGGCCATTGTAT-3' (SEQ ID NO: 186)) использовали для количественной оценки уровней эндогенного транскрипта SCN1A, а относительные уровни экспрессии SCN1A определяли способом дельта-дельта Ct с GAPDH в качестве контрольного гена (5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC'3' (SEQ ID NO: 187); 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3' (SEQ ID NO: 188)). Данные представлены в виде кратных изменений относительно контрольного условия (смотрите **фиг. 3А** и **3В**). Управляемая AAV экспрессия сконструированных факторов транскрипции вызывала значительную активацию эндогенного транскрипта SCN1A в культивируемых полученных из iPS ГАМК-нейронах.

ПРИМЕР 4

Специфическая активация эндогенного SCN1A в ГАМК-нейронах с использованием специфического для SCN1A фактора транскрипции

[323] ГАМК-нейроны iCell (Cellular Dynamics) помещали в 6-луночный планшет (~1Е6 клеток/лунку) и поддерживали в соответствии с протоколом, рекомендованным производителем. Через 72 часа после посева в культуральную среду добавляли рекомбинантный AAV (серотип AAV-DJ), экспрессирующий EGFP или активатор (конструкция 30), который содержит DBD типа «цинковые пальцы», слитый с VPR TAD, управляемый промотором CBA под контролем промотора CBA приблизительно в количестве 2Е11 копиях генома на лунку.

[324] Через неделю после инфицирования РНК выделяли из культивированных клеток (набор Qiagen RNeasy Mini) и обрабатывали ДНКазой. Библиотеки RNAseq получали из восстановленной РНК с использованием набора библиотек TruSeq Stranded mRNA (Illumina) и секвенировали на Illumina NextSeq (секвенирование парных концов 2 × 75 циклов). Считанные данные секвенирования сопоставляли с геномом человека (RNASTAR), и анализ дифференциальной экспрессии выполняли с помощью DESeq2. Данные представлены в виде кратного изменения относительно контрольных (AAVDJ-CBA-EGFP) образцов (смотрите **фиг. 4**). Результаты показаны в **таблице 14**, а на **фиг. 4** показана относительная экспрессия эндогенного SCN1A и транскриптов 40 ближайших соседних генов, представленная в виде кратных изменений относительно контрольного условия. Конструкция 30, как описано в **таблице 1**, была способна специфически увеличивать экспрессию гена SCN1A или белка Nav1.1 по сравнению с другими исследованными генами. Это указывает на то, что целевой сайт, распознаваемый активатором транскрипции конструкции 30, специфичен для гена SCN1A, что приводит к увеличению экспрессии гена SCN1A в нейронах ГАМК.

Таблица 14. Влияние на транскрипцию эндогенного SCN1A и 40 ближайших соседних генов в ГАМК-нейронах, обработанных специфическим для SCN1A фактором транскрипции (конструкция 30).

Название гена	Начало хром. 2	Конец хром. 2	Нить хромос.	Кратность изменения против контроля
PLA2R1	160788518	160919121	-	0,16367458
ITGB6	160956176	161128399	-	0,20679884
RBMS1	161128661	161350305	-	1,63514667

Название гена	Начало хром. 2	Конец хром. 2	Нить хромос.	Кратность изменения против контроля
TANK	161993418	162092732	+	0,90946407
PSMD14	162164548	162268228	+	0,92699237
TBR1	162272604	162282381	+	0,53199642
SLC4A10	162280842	162841792	+	1,89407328
DPP4	162848750	162931052	-	2,82345284
FAP	163027193	163101661	-	2,26977379
IFIH1	163123588	163175213	-	1,46146481
GCA	163175349	163228105	+	2,58702426
FIGN	164449905	164592522	-	0,46785861
GRB14	165349321	165478358	-	0,5631965
COBLL1	165510133	165700189	-	0,43199257
SLC38A11	165752695	165812035	-	4,06730119
SCN3A	165944031	166060577	-	1,0807866
SCN2A	166095911	166248818	+	1,24475196
CSRNP3	166326156	166545917	+	0,82971233
GALNT3	166604100	166651192	-	0,33804418
TTC21B	166713984	166810353	-	1,58661143
SCN1A	166845669	166984523	-	62,9552975
SCN9A	167051694	167232503	-	1,71659087
SCN7A	167260082	167350757	-	0,29331967
B3GALT1	168675181	168730551	+	0,64436013
STK39	168810529	169104651	-	1,19821739
CERS6	169312371	169631644	+	0,86828378
NOSTRIN	169643048	169722024	+	1,82142718
SPC25	169690641	169769881	-	0,86880697
ABCB11	169779447	169887832	-	3,1441368
DHRS9	169921298	169952677	+	1,10381777
BBS5	170335687	170382432	+	0,65476347
KLHL41	170366211	170382772	+	0,87373377
FASTKD1	170386258	170430385	-	1,02786927
PPIG	170440849	170497916	+	1,09866236

Название гена	Начало хром. 2	Конец хром. 2	Нить хромос.	Кратность изменения против контроля
CCDC173	170501934	170550943	-	0,67290779
PHOSPHO2	170550974	170558218	+	0,91339152
KLHL23	170550997	170633499	+	0,73926347
SSB	170648442	170668574	+	1,00631994
METTL5	170666590	170681441	-	1,21271497
UBR3	170683967	170940641	+	1,21350908
MYO3B	171034654	171511681	+	0,52839217

ПРИМЕР 5

Экспрессия SCN1A из кассеты экспрессии *in vivo*

[325] Чтобы проверить экспрессию активаторов транскрипции SCN1A *in vivo*, создавали рекомбинантные векторы AAV9 компанией Vector Biolabs (Malvern, PA). Самцам мышей C57Bl/6 (N=5 на группу, возраст 7-8 недель) проводили двустороннюю инфузию 1,5 мкл очищенного вектора AAV в дорсальный гиппокамп (AP -2,0 мм, латерально $\pm$ 1,5, DV -1,4 мм от твердой мозговой оболочки) и вентральный гиппокамп (AP -3,1 мм, латерально $\pm$ 2,8, DV -3,8 мм от твердой мозговой оболочки), всего 4 места инъекции. AAV доставляли со скоростью 0,3 мкл/мин с периодом отдыха 4 мин после каждой инъекции. Через четыре недели после воздействия мышей умерщвляли и иссекали ткань гиппокампа. Для каждой группы ткань левого и правого гиппокампа собирали вместе для гомогенизации у большинства животных (N=4), за исключением одного животного, у которого собирали и гомогенизировали только левый гиппокамп. РНК выделяли из гомогената (набор Qiagen RNeasy Mini) и обрабатывали ДНКазой. РНК (3 мкг) подвергали обратной транскрипции с использованием праймеров OligoDT (Superscript IV, Invitrogen). Образцы кДНК анализировали с помощью кПЦР на экспрессию мышинного SCN1A с использованием Phusion Polymerase (New England Biolabs) и SYBR Green I: 30 секунд при температуре 98°C, 40-кратно [10 секунд при температуре 98°C, 15 секунд при температуре 64°C, 15 секунд при температуре 72°C]. Праймеры против SCN1A мыши (5'-CAAAAAAGCCACAAAAGCCT-3' (SEQ ID NO: 189); 5'-TTAGCTCCGCAAGAAACATC-3' (SEQ ID NO: 190)) использовали для количественной оценки уровней эндогенного транскрипта SCN1A, а относительные уровни экспрессии SCN1A *in vivo* определяли способом дельта-дельта Ct с GAPDH в

качестве эталонного гена (5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC'3' (SEQ ID NO: 187); 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3' (SEQ ID NO: 188))

[326] На **фиг. 5А** и **фиг. 5В** показаны средние результаты для пяти животных, каждому из которых вводили конструкцию AAV9. Контрольная конструкция eGFP содержала репортерный трансген eGFP. Конструкция 4 (смотрите **таблицу 1**) содержала активатор транскрипции, который распознавал целевую последовательность, содержащую SEQ ID NO: 18, как описано в **таблице 1** выше. На **фиг. 5А** показана относительная экспрессия SCN1A *in vivo*. На **фиг. 5В** показано изменение экспрессии SCN1A *in vivo* в процентах от средней экспрессии eGFP. Эти результаты показали, что активатор транскрипции SCN1A экспрессионной кассеты А приводил к усилению экспрессии SCN1A приблизительно на 20-30% *in vivo*.

[327] Такие кассеты экспрессии могут быть адаптированы для применения на людях для лечения синдрома Драве, эпилепсии, судорог, болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона и/или любых других заболеваний или состояний, связанных с дефицитом и/или нарушением активности SCN1A.

ПРИМЕР 6

Анализ гипертермических припадков (HTS) на мышах с синдромом Драве

[328] А. Гетерозиготная модель мыши с нокаутом Scn1a.

[329] Лечение синдрома Драве и/или его симптомов с использованием кассет экспрессии исследовали на линии мышей Scn1a^{tm1Koa}. Эта линия мышей представляет собой признанную мышиную модель для синдрома Драве. Линии мыши Scn1a^{tm1Koa} не требуют рекомбиназы CRE. Мышь Scn1a^{tm1Koa} (доступная из лаборатории the Jackson Laboratory; описанная в Hawkins et al., Scientific Reports, vol. 7: 15327 (2017)) содержит делецию первого кодирующего экзона SCN1A. Мыши, гомозиготные по аллелю нокаута SCN1A, характеризуются тремором, атаксией, припадками и умирают к 16-му дню после рождения. У гетерозиготных мышей на фоне C57BL/6 развиваются спонтанные припадки, и большая часть их умирает в течение нескольких недель. Такая линия мышей может быть использована для изучения безопасности и эффективности лечения эпилепсии и синдрома Драве. Смотрите Miller et al., Genes Brain Behav. 2014 Feb;13(2):163-72 для дополнительной информации.

[330] Чтобы исследовать эффективность активаторов транскрипции в линии мышей Scn1a^{tm1Koa}, в пометы детенышей, полученных от самцов Scn1a +/-, скрещенных с самками C57Bl/6J, вводили вектор AAV посредством двусторонней ICV в точке P1. Мышам вводили дозы конструкций 31-34 (**таблица 1**). Мышей оставляли без воздействий вместе с их матерью до отлучения в P18, а затем снова не трогали до P26-P28, когда начинали анализ

гипертермического припадка (HTS). Отдельные пометы мышей, которым вводили дозу в P1, отсеивали на P18 и ежедневно наблюдали за смертностью. Индукцию гипертермического припадка проводили у гетерозиготных (HET) мышей и мышей WT Scn1a на смешанном фоне 129Stac X C57BL/6 в P26-P28. Перед исследованием мышам вставляли смазанный ректальный датчик температуры (Ret-4) и подсоединяли к модулю контроля температуры (TCAT 2DF, Physitemp), который был последовательно соединен с нагревательной лампой (HL-1). Затем мышей помещали в большой стеклянный стакан и на короткое время давали уравновеситься с окружающей средой. После этого температура тела повышалась на $\sim 0,5^{\circ}\text{C}$ каждые 2 минуты до начала первого тонико-клонического припадка, сопровождающегося потерей положения стоя или до достижения температуры 43°C . Если у мыши случался припадок с потерей положения тела, эксперимент заканчивали и регистрировали внутреннюю температуру тела мыши. Если в течение всего эксперимента не было обнаружено приступов с потерей положения тела, эта мышь считалась без припадков, и анализ завершали. Образцы тканей получали от мышей в точке P1, а генотипирование мышей выполняли в ходе эксперимента с использованием ПЦР в реальном времени. После завершения анализа генотипирование было неслепым, и статус мышей как HET или WT коррелировал с полученными данными. Данные наносили на кривую выживаемости Каплана-Мейера, а значимость определяли с помощью теста Мантеля-Кокса. Результаты показаны в **таблице 15** и **16** и на **фиг. 6А-Е**.

Таблица 15. Обобщение условий, использованных в примере 6.

Конструкция	Дозировка (копии генов/мышь)
Конструкция 31 (фиг. 6А и 6Е))	6,0E+10
Конструкция 32 (фиг. 6В, 6D, 6Е)	3,1E+11
Конструкция 33 (фиг. 6С)	5,8E+10
Конструкция 34 (фиг. 6D)	4,9E+13

Таблица 16. Обобщение результатов анализа на гипертермические припадки.

Конструкция eTF (FIG.)	Кол-во контрольных животных (обработ. PBS)	Кол-во обработанных животных	% без припадков при темп. $42,6^{\circ}\text{C}$	P-значение
Репортер EGFP	16	N/A	44%	
Конструкция 31 (фиг. 6А и 6Е))	16	18	95	P<0,0001
Конструкция 32 (фиг. 6В, 6D, 6Е)	16	21	76	P<0,05
Конструкция 33 (фиг. 6С)	16	14	93	P<0,001
Конструкция 34 (фиг. 6D)	16	12	83	P<0,05

[331] Дополнительные эксперименты проводили на мышах *Scn1a^{tm1Kex}*, как описано выше, чтобы проверить влияние конструкций 42 и 43 на припадки в анализе HTS. В этих экспериментах конструкцию 42 вводили в дозе 9×10^{10} копий генома/мышь посредством двусторонней ICV в P1, а конструкцию 43 вводили в дозе 6×10^{10} копий генома/мышь посредством двусторонней ICV в P1 или P5. Результаты показаны на **фиг. 6F** (конструкция 42) и **фиг. 6G** (конструкция 43). Обе конструкции показали значительное снижение припадков по сравнению с контрольными EGFP ($P < 0,0001$ как для конструкции 42, так и для конструкции 43).

[332] В. Гетерозиготная мутантная модель мыши *Scn1a^{RX}*.

[333] Лечение синдрома Драве и/или его симптомов с использованием кассеты экспрессии по настоящему раскрытию исследовали на линии мышей *Scn1a^{RX}*. Эта линия мышей представляет собой признанную модель мышей для синдрома Драве. Линии мыши *Scn1a^{RX}* не требуют рекомбиназы CRE. Мышь *Scn1a^{RX}* (доступная из лаборатории Jackson Laboratory; описанная в Ogiwara et al., J. Neuroscience, vol. 27: 5903-5914 (2007)), содержит нонсенс-мутацию с потерей функции в экзоне 21 гена SCN1A (CgG на TgA; R1407X). У гетерозиготных мышей на фоне C57BL/6 развиваются спонтанные припадки, и большой процент мышей умирает в течение нескольких недель.

[334] Для проверки эффективности активаторов транскрипции в линии мышей *Scn1a^{RX}* в пометы детенышей, полученных от скрещивания посредством ЭКО сперматозоидов самцов *Scn1a^{RX/+}* с яйцеклеткой C57Bl/6J с эмбрионами, имплантированными самкам CD-1, вводили вектор AAV (конструкция 31) в дозе $5,1 \times 10^{10}$ копий генома (gc)/мышь или контроль PBS посредством двусторонней ICV в P1. Мышей оставляли без воздействий вместе с их матерью до отлучения в P18, а затем снова оставляли без воздействий до P26-P28, когда начинали анализ HTS. Отдельные пометы мышей, которым вводили дозу в P1, осматривали в P18 и ежедневно наблюдали за смертностью. Индукцию гипертермического припадка проводили у гетерозиготных (HET) мышей P26-P28 и мышей WT *Scn1a* на фоне C57BL/6. Перед исследованием мышам вставляли смазанный ректальный датчик температуры (Ret-4) и подсоединяли к модулю контроля температуры (TCAT 2DF, Physitemp), который был последовательно соединен с нагревательной лампой (HL-1). Затем мышей помещали в большой стеклянный стакан и на короткое время давали уравновеситься с окружающей средой. После этого температура тела повышалась на $\sim 0,5^\circ\text{C}$ каждые 2 минуты до начала первого тонико-клонического припадка, сопровождающегося потерей положения тела, или до достижения температуры 43°C . Если у мыши случался припадок с потерей положения тела, эксперимент заканчивали и регистрировали

внутреннюю температуру тела мыши. Если в течение всего эксперимента не было обнаружено припадков с потерей положения тела, эта мышь считалась без припадков, и анализ завершался. Образцы тканей получали от мышей в точке P1, и генотипирование мышей выполняли в ходе эксперимента с использованием ПЦР в реальном времени. После завершения анализа генотипирование было неслепым, и статус мышей как HET или WT коррелировал с полученными данными. Ни у одной из исследованных мышей WT Scn1a не было припадка. Данные для мышей HET, обработанных конструкцией 31 (n=13) и обработанных PBS контролем (n=14), наносили на кривую выживаемости Каплана-Мейера, и значимость определяли с помощью критерия Кокса-Мантеля. Как показано на **фиг. 6H**, мыши HET, обработанные конструкцией 31, показывают значительное снижение индукции гипертермического припадка по сравнению с мышами HET, получавшими контрольный PBS ($P < 0,01$).

ПРИМЕР 7

Анализ выживаемости на мышинной модели синдрома Драве

[335] А. Гетерозиготная модель мыши с нокаутом Scn1a.

[336] Для проверки эффективности активаторов транскрипции в линии мышей Scn1a^{tm1Koa} в пометы детенышей, полученных от самцов Scn1a +/-, скрещенных с самками C57Bl/6J, вводили вектор AAV посредством двусторонней ICV в точке P1. Мышей не оставляли без воздействия с их матерью до отлучения. Наблюдение за состоянием здоровья мышей Scn1a +/- проводили ежедневно после отлучения в P18. Мышам, которые были найдены мертвыми в своей домашней клетке по любой причине, была записана дата. Данные наносили на кривую выживаемости Каплана-Мейера, а значимость определяли с помощью критерия Кокса-Мантеля.

[337] Результаты показаны в **таблице 17** и на **фиг. 7A-D**.

Таблица 17. Обобщение условий и результатов анализа выживаемости.

SEQ ID	Дозировка (гс/мышь)	Кол-во контрольных животных (обработ. PBS)	Кол-во обработанных животных	% выживших в P100 (*в P83)	P-значение
PBS	N/A	53	N/A	49%	
Конструкция 33 (фиг. 7C и 7D)	5,8E+10	53	29	76%	P<0,05
Конструкция 31 (фиг. 7B и 7D)	6,0E+10	53	34	97%	P<0,0001

[338] В. Гетерозиготная модель мутантной мыши $Scn1a^{RX}$.

[339] Чтобы проверить эффективность активаторов транскрипции в линии мышей $Scn1a^{RX}$, в пометы детенышей, полученных от самцов и скрещивания ЭКО сперматозоидов $Scn1a^{RX/+}$ с яйцеклетками C57Bl/6J, в эмбрионы, имплантированных самками CD-1, вводили вектор AAV (конструкция 31) при $5,1 \times 10^{10}$ копий генома (gc)/мышь или контроль PBS посредством двусторонней ICV в P1. Мышей оставляли без воздействия с их матерью до отлучения. Наблюдение за состоянием здоровья мышей $Scn1a^{RX/+}$ проводили ежедневно после отлучения в P18. Мышам, которые были найдены мертвыми в своей домашней клетке по любой причине, была записана дата. Данные для обработанных конструкцией 31 ($n=27$) и обработанных контролем ($n=18$) наносили на кривую выживаемости Каплана-Мейера, а значимость определяли с помощью критерия Кокса-Мантеля.

[340] Как показано на **фиг. 7Е**, мыши $Scn1a^{RX/+}$, получившие конструкцию 31, характеризовались повышенной выживаемостью по сравнению с мышами $Scn1a^{RX/+}$, получавшими контрольный PBS ($P < 0,0001$).

ПРИМЕР 8

Уровни транскрипции SCN1A у отличных от человека приматов после лечения AAV, кодирующим специфический фактор транскрипции SCN1A

[341] В исследовании использовали самцов яванского макака (*Macaca fascicularis*) в возрасте от 2 до 3 лет. Животных перед включением в исследование предварительно проверяли на наличие перекрестно-реактивных антител к AAV9 с помощью клеточного анализа нейтрализующих антител. AAV9, экспрессирующий фактор транскрипции, специфический для SCN1A (конструкция 33), или контроль разводили в PBS и вводили интрапаренхимально в концентрации $1,2 \times 10^{12}$ gc/животное. Для инъекций определяли три различных стереотаксических координаты в каждом полушарии, шесть участков инъекции на животное. В каждую точку вводили объем 10 мкл. Инъекции в правое полушарие были симметричны левым. Два необработанных животных использовали в качестве контроля.

[342] Для оценки экспрессии мРНК $Scn1a$ проводили обратную транскрипцию с последующим способом кПЦР. При вскрытии трупа через 28 дней после введения дозы срезы тканей из различных областей головного мозга (лобная кора, теменная кора, височная кора, затылочная кора, гиппокамп, продолговатый мозг, мозжечок; по 200 мг каждого) от контрольных и обработанных животных собирали в RNeasy, а затем замораживали. Вкратце, иссекали 30 мг ткани, экстрагировали РНК (с помощью мини-набора для ткани

Qiagen Rneasy Lipid, номер по каталогу 1023539), преобразовывали в кДНК путем обратной транскрипции (с использованием набора для обратной транскрипции кДНК высокой емкости Applied Biosystems, номер по каталогу 4368814) и проводили кПЦР с использованием набора праймеров/зондов для Scn1A и гена домашнего хозяйства GAPDH (Applied Biosystems, номер по каталогу Rh02621745-gI FAM).

[343] Наборы праймеров/зондов для SCN1A приведены ниже.

Таблица 18. Последовательности праймеров, использованные в примере 8.

Ген	SEQ ID NO	Последовательность (5'-3')	Примечание
Scn1A	191	CCATGGAAGCTGGCTCGATTTCAC	Ф-праймер
	192	ATTGGTGGGAGGCCACTGTAT	Р-праймер
	193	AGGCCTGAAAACCATTTGTGGGAGCCCT	Зонд (FAM)

[344] Экспрессию гена Scn1A в каждом исследуемом образце определяли относительным количественным анализом (RQ) с использованием способа сравнительного Ct (Δ Ct). Этот способ измеряет разность Ct (Δ Ct) между целевым геном и геном домашнего хозяйства, а затем сравнивает значения Δ Ct образцов для лечения с контрольными образцами.

[345] Δ Ct = среднее Ct целевого гена - среднее Ct гена домашнего хозяйства.

[346] $\Delta\Delta$ Ct = Δ Ct образца лечения - Δ Ct контрольного образца.

[347] Относительная экспрессия (образец лечения) = $2^{-\Delta\Delta$ Ct

[348] Данные представлены в виде нормализованной экспрессии целевой мРНК в различных тканях головного мозга (смотрите **фиг. 8**). Как показано на **фиг. 8**, участки головного мозга, проксимальные к участкам интрапаренхиматозных инъекций, показали самые высокие уровни экспрессии транскрипта SCN1A.

ПРИМЕР 9

Селективная экспрессия трансгена в PV-содержащих нейронах у отличных от человека приматов после лечения AAV, имеющего селективный в отношении PV промотор и сайт связывания микроРНК

[349] В исследовании использовали шесть мартышек (*Callithrix jacchus*), которых предварительно проверяли на перекрестно-реактивные антитела к AAV9 перед включением в исследование. Двум обезьянам вводили AAV9, содержащий трансген EGFP под контролем промотора EF1alpha, двум обезьянам вводили AAV9, содержащий трансген

EGFP, под контролем RE 2 (SEQ ID NO: 2), и двум обезьянам вводили AAV9, содержащий трансген EGFP под контролем RE 2 (SEQ ID NO: 2), а также содержащий сайт связывания микроРНК (SEQ ID NO: 7), расположенный между кодирующей областью EGFP и полиА-хвостом. Векторы AAV9 разводили в PBS и животным вводили три внутримозговые инъекции (2 мкл каждая) в гиппокамп/энторинальную кору каждого полушария, всего 6 участков инъекции на животное. Два животных получали вектор AAV9, содержащий EF1alpha-EGFP, каждое получило общую дозу $5,8E+11$ копий генома/животное, два животных получали вектор AAV9, содержащий RE 2-EGFP, каждое получило общую дозу $3,0E+11$ копий генома/животное, и два животных получали вектор AAV9, содержащий RE 2 + m1-EGFP, каждое получило общую дозу $2,3E+11$ копий генома/животное.

[350] Иммуногистохимию использовали для оценки селективной экспрессии парвальбумина (PV). При вскрытии трупа, через 28 дней после введения дозы, собирали срезы тканей из различных областей головного мозга. Плавающие срезы головного мозга мартышек (35 мкм) фиксировали в 4% параформальдегиде, блокировали буфером (PBS, 3% BSA, 3% ослиная сыворотка, 0,3% Triton-X 100, 0,2% Tween-20), а затем окрашивали анти-GFP (Abcam ab290), а затем вторичным антителом, конъюгированным с Alexa-488 (Thermo A21206). За этим последовали антитело к PV (Swant) и вторичное антитело, конъюгированное с Alexa-647 (Thermo A31571) и 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI). Срезы монтировали и визуализировали с помощью PerkinElmer Vectra3.

[351] Результаты показаны на **фиг. 9A-F** и **10A-L**.

ПРИМЕР 10

Биораспространение eTF^{SCN1A}

[352] Целью этого исследования было сравнить биораспределение eTF^{SCN1A} в центральной нервной системе (ЦНС) молодых обезьян яванского макака при введении в дозе $4,8E+13$ посредством односторонней интрацеребровентрикулярной (ICV) инъекции. Каждому животному инъецировали AAV9, содержащий кассету экспрессии, кодирующую eTF^{SCN1A}, под контролем селективного регуляторного элемента ГАМК (GABA) (RE^{GABA}-eTF^{SCN1A}). Частицы AAV9 составляли в PBS + 0,001% плюроновой кислоты и вводили в дозе $4,8E+13$ или $8E+13$ vg/животное. Каждому животному вводили 2 мл приготовленных вирусных частиц. Дизайн исследования представлен в **таблице 19**.

[353] Яванских макаков в возрасте двадцать четыре месяца группировали, как указано в таблице 19. Перед началом исследования образцы крови животных исследовали на уровне титра нейтрализующих антител к AAV9 с использованием анализа титра NAb, описанного выше. Для исследования выбирали животных с низкими или отрицательными результатами на антитела. Образцы вводили посредством инъекции ICV с использованием стандартных

хирургических процедур. Размороженный дозируемый материал ненадолго хранили на влажном льду и нагревали до комнатной температуры непосредственно перед дозированием. Животных анестезировали, готовили к операции и помещали в стереотаксическую рамку, совместимую с МРТ (Корф). Для определения координат цели выполняли базовую МРТ. Делали разрез и просверливали одно отверстие в черепе над целевым участком. Шприц BD объемом 3 мл, прикрепленный к набору удлинителей с микроканальным отверстием длиной 36 дюймов, подготавливали с образцом и помещали в инфузионный насос. Линию экстензии примировали. Твердую мозговую оболочку открывали, и дозирующую иглу продвигали на глубину от 13,0 до 18,1 мм от мягкой мозговой оболочки. Инъекцию контрастного вещества и рентгеноскопию использовали для подтверждения введения спинномозговой иглы в правый боковой желудочек. В иглу Quinke BD размером 3,0 дюйма 22 г для спинномозговой хирургии добавляли контраст, чтобы определить ее расположение, перед тем, как прикрепить запровадленную линию экстензии и шприц. Настройки насоса составляли 0,1 мл/мин в течение 19–20 минут. Буфер вводили вручную после введения дозы, чтобы очистить линию экстензии. Иглу оставляли на месте в течение 1-2 минут после завершения инфузии, а затем иглу извлекали. Носитель и исследуемое вещество вводили один раз в день 1, и субъектов поддерживали в течение 27- или 29-дневного периода восстановления.

Таблица 19. Дизайн исследования биораспределения

Группа	Пол	ID	Доза (VG/животное)
Группа 1 (контроль-буфер)	М	21001	
	Ж	11501	
Группа 2 (RE ^{GABA} -eTF ^{SCN1A})	М	2001	4,8E+13
	Ж	2501	4,8E+13
	М	3001	4,8E+13
	М	3002	8E+13

[354] После введения дозы за животными регулярно наблюдали на протяжении всего исследования, и периодически отбирали образцы крови. Введение eTF^{SCN1A} не было связано с неожиданной смертностью, клиническими данными или макроскопическими наблюдениями. Животные, получившие AAV9-RE^{GABA}-eTF^{SCN1A}, выживали до запланированного вскрытия трупа на 28 ± 2 дня. Никаких клинических или поведенческих признаков, повышения температуры тела или снижения массы тела во время ежедневных или еженедельных медицинских осмотров не наблюдалось. Временное повышение печеночных трансаминаз (АЛТ и АСТ) у животных, получавших AAV9-RE^{GABA}-eTF^{SCN1A},

наблюдалось, но полностью исчезало к концу исследования без иммуномодуляции, и не было отмечено сопутствующего повышения сывороточного билирубина или щелочной фосфатазы. Ни один из других измеренных результатов клинической химии не был выдающимся. В гистопатологических исследованиях печени не сообщалось о микроскопических наблюдениях. Лейкоциты CSF были повышены при окончательном сборе по сравнению со значениями до воздействия, но сравнимы между контрольными животными и животными, получившими AAV9-RE^{GABA}-eTF^{SCN1A}. Плеоцитоза, связанного с AAV9-RE^{GABA}-eTF^{SCN1A}, не наблюдалось. Макрообследование и подробное микрогистопатологическое исследование ненейрональных тканей у всех животных не было примечательным. Ткани включали в себя основные периферические органы (например, сердце, легкие, селезенку, печень и гонады). Макрообследования и подробная микрогистопатология нейрональных тканей не показали каких-либо заметных результатов. Ткани включали в себя головной, спинной мозг и связанные с ним межпозвонковые узлы (из шейного, грудного и поясничного отделов). Исследования проводились тремя независимыми патологами, в том числе одним в специализированном центре невропатологии.

[355] ICV введение AAV9 не предотвращало постдозовый иммунный ответ в сыворотке, поскольку через четыре недели после введения дозы наблюдались нейтрализующие антитела к капсиду AAV9. Однако уровни нейтрализующих антител к AAV9 в CSF оставались неизменными и сравнимыми с уровнями до введения дозы (таблица 20).

Таблица 20. Титр сывороточных NAb к AAV9

Номер субъекта	Титр сывороточных NAb к AAV9			Титр NAb CSF к AAV9	
	До скрининга	При инъекциях.	Через 4 недели после инъекций.	При инъекциях.	Через 4 недели после инъекций.
21001	1:5	< 1:5	< 1:5	< 1:5	< 1:5
11501	< 1:5	< 1:5	< 1:5	< 1:5	< 1:5
2001	< 1:5	< 1:5	1:405	< 1:5	1:5
2501	< 1:5	< 1:5	1:135	< 1:5	1:5
3001	< 1:5	< 1:5	1:1215	< 1:5	< 1:5
3002	< 1:5	< 1:5	1:135	< 1:5	< 1:5

[356] Образцы собирали через 27-29 дней после введения дозы из основных органов (желудочков сердца, долей печени, долей сердца легких, почек, селезенки, поджелудочной железы и шейных лимфатических узлов) во время плановой некроскопии. Прицельную биопсию собирали с помощью восьмимиллиметровых биопсийных щипцов и обрабатывали, как описано ниже.

ПРИМЕР 11

Биораспределение eTF^{SCN1A} в головном мозге

[357] ddPCR использовали для измерения биораспределения eTF^{SCN1A} в головном мозге. Образцы из различных областей ткани головного мозга яванского макака (FC: лобная кора; PC: теменная кора; TC: височная кора; Hip: гиппокамп; Med: продолговатый мозг; OC: затылочная кора) измеряли на количество копий вектора для оценки биораспределения eTF^{SCN1A} под контроле селективного регуляторного элемента ГАМК (RE^{GABA}-eTF^{SCN1A}) при введении AAV9 посредством односторонней ICV. Тканевую ДНК выделяли с помощью наборов DNeasy Blood & Tissues (Qiagen). Количество ДНК определяли и нормализовали с помощью УФ-спектрофотометра. 20 нанограмм тканевой ДНК добавляли к реакционной смеси объемом 20 микролитров вместе с ddPCR Super Mix for Probes (без dUTP) (Bio-Rad) и праймерами TaqMan и зондами, направленными против областей последовательности eTF^{SCN1A}. Создавали капли и амплифицировали шаблоны с использованием автоматического генератора капель и термоциклера (Bio-Rad). После этапа ПЦР планшеты загружали и считывали с помощью QX2000 Droplet Reader для определения числа копий вектора в тканях. Ген обезьяньего альбумина (MfAlb) служил внутренним контролем для нормализации содержания геномной ДНК и был амплифицирован в той же реакции. Праймеры и зонды для eTF^{SCN1A} и MfAlb представлены в **таблице 21**.

Таблица 21. Праймеры и зонды для eTF^{SCN1A} и MfAlb

Название праймеров/зонда		Последовательность (5'-3')
eTF ^{SCN1A}	Прямой праймер eTF ^{SCN1A}	GAATGTGGGAAATCATTCAGTCGC (SEQ ID NO: 194)
	Обратный праймер eTF ^{SCN1A}	GCAAGTTATCCTCTCGTGAGAAGG (SEQ ID NO: 195)
	Зонд eTF ^{SCN1A}	GCGACAACCTGGTGAGACATCAACGCACC (SEQ ID NO: 196)
MfAlbumin	Прямой праймер MfAlb	GCTGTTATCTCTTGTGGGCTGT (SEQ ID NO: 197)
	Обратный праймер MfAlb	AAACTCATGGGAGCTGCCGGTT (SEQ ID NO: 198)

	Зонд MfAlb	CCACACAAATCTCTCCCTGGCATTG (SEQ ID NO: 199)
--	------------	--

[358] eTF^{SCN1A} широко распределялся по всему головному мозгу при дозировке $4,8E+13$ вирусных геномов на животное со средним значением 1,3-3,5 вирусных геномов/диплоидный геном (**фиг. 11**). Кроме того, при сравнении переноса гена по всему головному мозгу $RE^{GABA}-eTF^{SCN1A}$, после дозированного введения $4,8E+13$ вирусных геномов на животное, с переносом гена через головной мозг $eGFP$, введенного посредством ICV в различных дозах, увеличение вирусного генома/диплоидного генома наблюдалось с увеличением дозы. Это указывает на то, что перенос гена в головном мозге происходит дозозависимым образом при введении в AAV9 через ICV.

ПРИМЕР 12

Транскрипция eTF^{SCN1A} в головном мозге

[359] Транскрипцию eTF^{SCN1A} под контролем селективного регуляторного элемента ГАМК, RE^{GABA} ($RE^{GABA}-eTF^{SCN1A}$), оценивали путем измерения мРНК eTF^{SCN1A} с использованием анализа экспрессии генов на основе ddPCR. Тканевую РНК выделяли с помощью наборов RNeasy Plus Mini (Qiagen) или RNeasy Lipid Tissue Mini (Qiagen) для тканей головного мозга. Количество РНК определяли и нормализовали с помощью УФ-спектрофотометра, а качество РНК (RIN) проверяли с помощью Bioanalyzer RNA Chip. Один микрограмм тканевой РНК использовали для обработки ДНКазой и синтеза кДНК с помощью набора для синтеза кДНК SuperScript VILO с наборами ферментов ezDNase™ (Thermo Fisher). 50 микрограммов РНК преобразовывали в кДНК. кДНК добавляли в реакционную смесь объемом 20 микролитров вместе с ddPCR Super Mix for Probes (без dUTP) (Bio-Rad) и праймерами и зондами TaqMan, направленными против областей последовательности eTF^{SCN1A} (**таблица 22**). Создавали капли и амплифицировали шаблоны с использованием автоматического генератора капель и термоциклера (Bio-Rad). После ПЦР-амплификации планшет загружали и считывали с помощью QX2000 Droplet Reader, чтобы получить уровни экспрессии генов в тканях. Ген обезьяны *ARFGAP2* (*MfARFGAP2*) (Thermo Fisher Scientific) служил эндогенным контролем для нормализации уровней экспрессии гена и был амплифицирован в той же реакции. Среднее количество транскриптов для *ARFGAP2* составляло $1,85E+6$ мкг РНК (**фиг. 12**, верхняя граница). Предел обнаружения обозначен нижней границей.

[360] мРНК eTF^{SCN1A} наблюдалась по всему головному мозгу у всех животных, что указывает на то, что ГАМК-селективный промотор, RE^{GABA} , был транскрипционно активен в ткани головного мозга для всех макаков, получивших AAV9- $RE^{GABA}-eTF^{SCN1A}$ (**фиг. 12**). FC:

лобная кора; РС: теменная кора; ТС: височная кора; Нір: гиппокамп; Med: продолговатый мозг; ОС: затылочная кора.

Таблица 22. Праймеры и зонды TaqMan, направленные против областей последовательности eTF^{SCN1A}

Название праймеров/зонда	Описание	Последовательность (5'-3')
eTF^{SCN1A}	Прямой праймер eTF^{SCN1A}	GAATGTGGGAAATCATTTCAGTCGC (SEQ ID NO: 200)
	Обратный праймер eTF^{SCN1A}	GCAAGTTATCCTCTCGTGAGAAGG (SEQ ID NO: 201)
	Зонд eTF^{SCN1A}	GCGACAACCTGGTGAGACATCAACGCACC (SEQ ID NO: 202)
$MfARFGAP2$	Прямой, обратный праймеры, зонд	Thermo Fisher (номер в каталоге: 4448491)

ПРИМЕР 13

Биораспределение и транскрипция eTF^{SCN1A} в периферических тканях

[361] Число копий вектора дополнительно измеряли в различных органах для оценки трансдукции $RE^{GABA}-eTF^{SCN1A}$ в тканях по всему организму при введении AAV9 посредством односторонней ICV. Уровни транскрипции eTF^{SCN1A} также измеряли с помощью ddPCR для оценки транскрипционной активности eTF^{SCN1A} под контролем GABA-селективного регуляторного элемента RE^{GABA} в тканях по всему организму при введении в AAV9 посредством односторонней ICV. Оба способа выполняли, как в общем описано выше. Трансдукция $RE^{GABA}-eTF^{SCN1A}$ и транскрипция eTF^{SCN1A} в спинном мозге (SC) и межпозвонковом узле (DRG) были сопоставимы с уровнями, наблюдаемыми в головном мозге. За исключением печени, трансдукция $RE^{GABA}-eTF^{SCN1A}$ была ниже в периферических тканях за пределами головного мозга (**фиг. 13**). Трансдукция $RE^{GABA}-eTF^{SCN1A}$ в печени была выше, чем в головном мозге. Транскрипция eTF^{SCN1A} не была обнаружена в периферических тканях, включая в себя сердце, легкие и гонады. Однако уровни транскрипта eTF^{SCN1A} в печени были сопоставимы с уровнями eTF^{SCN1A} , измеренными в головном мозге. Кроме того, транскрипция eTF^{SCN1A} в печени является чрезвычайно низкой, если ее нормализовать по количеству присутствующих копий вектора (приблизительно в 1000 раз ниже по сравнению с транскрипцией eTF^{SCN1A} в головном мозге). В целом это продемонстрировало, что транскрипция eTF^{SCN1A} под контролем ГАМК-селективного регуляторного элемента RE^{GABA} ограничена ЦНС.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Кассета экспрессии, содержащая последовательность, кодирующую не встречающийся в природе фактор транскрипции, который увеличивает экспрессию гена SCN1A в клетке, причем не встречающийся в природе фактор транскрипции содержит ДНК-связывающий домен (DBD), функционально связанный по меньшей мере с двумя активирующими транскрипцию доменами (TAD) следующим образом: TAD1-TAD2-DBD, DBD-TAD3-TAD4 или TAD1-TAD2-DBD-TAD3-TAD4.
2. Кассета экспрессии по п. 1, в которой TAD1, TAD2, TAD3 и TAD4 независимо выбраны из VP16, VP64, Viper, CITED2, CITED4, CREB3 или их функциональных фрагментов.
3. Кассета экспрессии по п. 1 или 2, в которой TAD1 и TAD2 представляют собой один и тот же TAD.
4. Кассета экспрессии по п. 3, в которой TAD1 и TAD2 представляют собой CITED2 или его функциональный фрагмент.
5. Кассета экспрессии по п. 3, в которой TAD1 и TAD2 представляют собой CITED4 или его функциональный фрагмент.
6. Кассета экспрессии по любому из пп. 1-5, в которой TAD3 и TAD4 представляют собой один и тот же TAD.
7. Кассета экспрессии по п. 6, в которой TAD3 и TAD4 представляют собой CITED2 или его функциональный фрагмент.
8. Кассета экспрессии по п. 6, в которой TAD3 и TAD4 представляют собой CITED4 или его функциональный фрагмент.
9. Кассета экспрессии по п. 1 или 2, в которой TAD1, TAD2, TAD3 и TAD4 представляют собой один и тот же TAD.

10. Кассета экспрессии по п. 9, в которой TAD1, TAD2, TAD3 и TAD4 представляют собой CITED2 или его функциональный фрагмент.
11. Кассета экспрессии по п. 9, в которой TAD1, TAD2, TAD3 и TAD4 представляют собой CITED4 или его функциональный фрагмент.
12. Кассета экспрессии по любому из пп. 1-11, в которой отсутствует линкер между по меньшей мере двумя доменами TAD.
13. Кассета экспрессии по любому из пп. 1-11, в которой имеется линкер между по меньшей мере двумя доменами TAD.
14. Кассета экспрессии по п. 13, в которой линкер представляет собой GGSGGGSG (SEQ ID NO: 177) или GGSGGGSGGGSGGGSG (SEQ ID NO: 178).
15. Кассета экспрессии по любому из пп. 1-14, в которой DBD связывается с областью генома, содержащей 18-27 нуклеотидов.
16. Кассета экспрессии по любому из пп. 1-15, в которой DBD характеризуется идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 80%, по отношению к его ближайшему человеческому аналогу.
17. Кассета экспрессии по п. 16, в которой DBD характеризуется идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 90%, по отношению к его ближайшему человеческому аналогу.
18. Кассета экспрессии по любому из пп. 1-15, в которой каждый из DBD и по меньшей мере двух TAD характеризуются идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 80%, по отношению к их ближайшим человеческим аналогам.
19. Кассета экспрессии по п. 18, в которой каждый из DBD и по меньшей мере двух TAD характеризуются идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 90%, по отношению к их ближайшим человеческим аналогам.

20. Кассета экспрессии по любому из пп. 1-15, в которой DBD содержит направляющую РНК и инактивированный нуклеазой белок Cas.
21. Кассета экспрессии по п. 20, в которой инактивированный нуклеазой белок Cas представляет собой инактивированный нуклеазой белок Cas9.
22. Кассета экспрессии по любому из пп. 1-19, в которой DBD содержит домен типа «цинковые пальцы».
23. Кассета экспрессии по п. 22, в которой DBD содержит от шести до девяти доменов типа «цинковые пальцы».
24. Кассета экспрессии по п. 23, в которой DBD содержит шесть «цинковых пальцев».
25. Кассета экспрессии по п. 24, в которой DBD связывается с областью генома, содержащей 18 нуклеотидов.
26. Кассета экспрессии по п. 23, в которой DBD содержит девять «цинковых пальцев».
27. Кассета экспрессии по п. 26, в которой DBD связывается с областью генома, содержащей 27 нуклеотидов.
28. Кассета экспрессии по любому из пп. 1-19 или 22-27, в которой DBD содержит последовательность, характеризующуюся идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 95%, по отношению к любой из SEQ ID NO: 148-151.
29. Кассета экспрессии по п. 28, в которой DBD содержит последовательность, имеющую любую из SEQ ID NO: 148-151.
30. Кассета экспрессии по любому из пп. 1-19 или 22-29, в которой DBD получен из EGR1 человека или EGR3 человека.
31. Кассета экспрессии по любому из пп. 1-19 или 22-30, в которой DBD содержит последовательность, характеризующуюся идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 90%, по отношению к любой из SEQ ID NO: 77-98.

32. Кассета экспрессии по п. 31, в которой DBD содержит SEQ ID NO: 77-98.
33. Кассета экспрессии по п. 1, в которой DBD содержит последовательность, характеризующуюся идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 90%, по отношению к SEQ ID NO: 92.
34. Кассета экспрессии по п. 33, в которой DBD содержит SEQ ID NO: 92.
35. Кассета экспрессии по п. 1, в которой не встречающийся в природе фактор транскрипции содержит последовательность, характеризующуюся идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 90%, по отношению к SEQ ID NO: 130 или 131.
36. Кассета экспрессии по п. 35, в которой не встречающийся в природе фактор транскрипции содержит SEQ ID NO: 130 или 131.
37. Кассета экспрессии по п. 1, содержащая нуклеотидную последовательность, характеризующуюся идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 90%, по отношению к любой из SEQ ID NO: 72 или 73.
38. Кассета экспрессии по п. 37, содержащая нуклеотидную последовательность любой из SEQ ID NO: 72 или 73.
39. Кассета экспрессии по любому из пп. 1-38, причем кассета экспрессии дополнительно содержит регуляторный элемент, который управляет экспрессией фактора транскрипции на более высоком уровне в PV-содержащих нейронах, чем в других типах клеток.
40. Кассета экспрессии по п. 39, в которой регуляторный элемент содержит любую из SEQ ID NO: 1-4.
41. Кассета экспрессии по п. 40, в которой регуляторный элемент содержит SEQ ID NO: 2 или 3.

42. Кассета экспрессии по любому из пп. 1-41, причем кассета экспрессии дополнительно содержит селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК.
43. Кассета экспрессии по п. 42, в которой селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК характеризуется идентичностью, составляющей по меньшей мере 90%, по отношению к любой из SEQ ID NO: 7, 14 или 15.
44. Кассета экспрессии по п. 43, в которой селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК содержит любую из SEQ ID NO: 7, 14 или 15.
45. Кассета экспрессии по любому из пп. 1-44, причем кассета экспрессии представляет собой часть вирусного вектора.
46. Кассета экспрессии по п. 45, в которой вирусный вектор представляет собой вирус AAV.
47. Кассета экспрессии по п. 46, в которой вирус AAV представляет собой вирус AAV9 или вирус scAAV9.
48. Кассета экспрессии по п. 45, в которой вирусный вектор представляет собой лентивирус.
49. Кассета экспрессии, содержащая последовательность, кодирующую не встречающийся в природе фактор транскрипции, который увеличивает экспрессию гена SCN1A в клетке, причем не встречающийся в природе фактор транскрипции содержит ДНК-связывающий домен, функционально связанный с активирующим транскрипцию доменом, причем ДНК-связывающий домен представляет собой белок типа «цинковые пальцы», содержащий последовательность LEPGEKP – [YKCPGKSF X HQRTH TGEKP]_n - YKCPGKSF X HQRTH – TGKKTS (SEQ ID NO: 147), и в котором отсутствует тег HA (SEQ ID NO: 171) между ДНК-связывающим доменом и активирующим транскрипцию доменом.
50. Кассета экспрессии по п. 49, в которой активирующий транскрипцию домен содержит последовательность VP16, VPR или VP64 или их функциональный фрагмент.

51. Кассета экспрессии по п. 50, в которой активирующий транскрипцию домен содержит VP64.
52. Кассета экспрессии по любому из пп. 49-51, в которой ДНК-связывающий домен связывается с геномной областью, содержащей 18-27 нуклеотидов.
53. Кассета экспрессии по любому из пп. 49-52, в которой $n = 6-9$.
54. Кассета экспрессии по п. 53, в которой $n = 6$.
55. Кассета экспрессии по п. 54, в которой ДНК-связывающий домен связывается с областью генома, содержащей 18 нуклеотидов.
56. Кассета экспрессии по п. 53, в которой $n = 9$.
57. Кассета экспрессии по п. 56, в которой ДНК-связывающий домен связывается с геномной областью, содержащей 27 нуклеотидов.
58. Кассета экспрессии по любому из пп. 49-57, в которой ДНК-связывающий домен содержит последовательность, характеризующуюся идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 95%, по отношению к любой из SEQ ID NO: 148-151.
59. Кассета экспрессии по п. 58, в которой ДНК-связывающий домен содержит последовательность, содержащую любую из SEQ ID NO: 148-151.
60. Кассета экспрессии по любому из пп. 49-59, в которой ДНК-связывающий домен содержит последовательность, характеризующуюся идентичностью, составляющей по меньшей мере 90%, по отношению к любой из SEQ ID NO: 77-91.
61. Кассета экспрессии по п. 60, в которой ДНК-связывающий домен содержит любую из SEQ ID NO: 77-91.
62. Кассета экспрессии по любому из пп. 49-61, причем кассета экспрессии дополнительно содержит регуляторный элемент, который управляет экспрессией фактора

транскрипции на более высоком уровне в PV-содержащих нейронах, чем в других типах клеток.

63. Кассета экспрессии по п. 62, в которой регуляторный элемент содержит любую из SEQ ID NO: 1-4.

64. Кассета экспрессии по п. 63, в которой регуляторный элемент содержит SEQ ID NO: 2 или 3.

65. Кассета экспрессии по п. 49, в которой не встречающийся в природе фактор транскрипции содержит последовательность, характеризующуюся идентичностью, составляющей по меньшей мере 90%, по отношению к SEQ ID NO: 127.

66. Кассета экспрессии по п. 65, в которой не встречающийся в природе фактор транскрипции содержит SEQ ID NO: 127.

67. Кассета экспрессии по п. 49, содержащая нуклеотидную последовательность, характеризующуюся идентичностью, составляющей по меньшей мере 90%, по отношению к любой из SEQ ID NO: 70 или 71.

68. Кассета экспрессии по п. 67, содержащая нуклеотидную последовательность любой из SEQ ID NO: 70 или 71.

69. Кассета экспрессии по любому из пп. 1-68, причем кассета экспрессии дополнительно содержит селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК.

70. Кассета экспрессии по п. 69, в которой селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК характеризуется идентичностью, составляющей по меньшей мере 90%, по отношению к любой из SEQ ID NO: 7, 14 или 15.

71. Кассета экспрессии по п. 70, в которой селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК содержит любую из SEQ ID NO: 7, 14 или 15.

72. Кассета экспрессии по любому из пп. 49-71, причем кассета экспрессии представляет собой часть вирусного вектора.

73. Кассета экспрессии по п. 72, в которой вирусный вектор представляет собой вирус AAV.
74. Кассета экспрессии по п. 73, в которой вирус AAV представляет собой вирус AAV9 или вирус scAAV9.
75. Кассета экспрессии по п. 72, в которой вирусный вектор представляет собой лентивирус.
76. Полинуклеотид, содержащий селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК, содержащий последовательность, характеризующуюся идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 80%, по отношению к SEQ ID NO: 14 или 15, причем сайт связывания микроРНК снижает экспрессию трансгена в возбуждающих нейронах.
77. Полинуклеотид по п. 76, в котором селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК содержит SEQ ID NO: 14.
78. Полинуклеотид по п. 76, в котором селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК содержит SEQ ID NO: 15.
79. Кассета экспрессии, содержащая селективный в отношении PV сайт связывания микроРНК по любому из пп. 76-78 и промотор и/или энхансер.
80. Кассета экспрессии по п. 79, в которой промотор и/или энхансер представляет собой селективный в отношении PV регуляторный элемент, который управляет экспрессией трансгена на более высоком уровне в парвальбумин-содержащих (PV) нейронах, чем в других типах клеток.
81. Кассета экспрессии по п. 80, в которой селективный в отношении PV регуляторный элемент функционально связан с трансгеном.
82. Кассета экспрессии, содержащая регуляторный элемент, функционально связанный с трансгеном, и по меньшей мере один сайт связывания микроРНК, причем регуляторный

элемент управляет экспрессией трансгена на более высоком уровне в парвальбумин-содержащих (PV) нейронах, чем в других типах клеток, причем сайт связывания микроРНК снижает экспрессию трансгена в возбуждающих нейронах и причем кассета экспрессии не содержит SEQ ID NO: 67.

83. Кассета экспрессии по п. 82, в которой сайт связывания микроРНК содержит по меньшей мере один сайт связывания для MIR128 (SEQ ID NO: 9).

84. Кассета экспрессии по п. 82 или 83, в которой сайт связывания микроРНК содержит по меньшей мере один сайт связывания для MIR221 (SEQ ID NO: 11).

85. Кассета экспрессии по любому из пп. 82-84, в которой сайт связывания микроРНК содержит по меньшей мере один сайт связывания для MIR222 (SEQ ID NO: 13).

86. Кассета экспрессии по п. 82, в которой сайт связывания микроРНК содержит по меньшей мере один сайт связывания для MIR128 (SEQ ID NO: 9) и по меньшей мере один сайт связывания для MIR221 (SEQ ID NO: 11).

87. Кассета экспрессии по п. 82, в которой сайт связывания микроРНК содержит по меньшей мере один сайт связывания для MIR128 (SEQ ID NO: 9), по меньшей мере, один сайт связывания для MIR221 (SEQ ID NO: 11) и по меньшей мере один сайт связывания для MIR222 (SEQ ID NO: 13).

88. Кассета экспрессии по любому из пп. 82-84, в которой сайт связывания микроРНК содержит последовательность, характеризующуюся идентичностью, составляющей по меньшей мере 90%, по отношению к любой из SEQ ID NO: 7, 14 или 15.

89. Кассета экспрессии по п. 88, в которой сайт связывания микроРНК содержит SEQ ID NO: 7.

90. Кассета экспрессии по п. 89, в которой сайт связывания микроРНК содержит SEQ ID NO: 14.

91. Кассета экспрессии по п. 89, в которой сайт связывания микроРНК содержит SEQ ID NO: 15.

92. Кассета экспрессии по любому из пп. 81-91, в которой трансген кодирует полипептид, содержащий не встречающийся в природе фактор транскрипции, который увеличивает экспрессию гена SCN1A в клетке.
93. Кассета экспрессии по п. 92, в которой фактор транскрипции связывается с геномной областью, содержащей 18-27 нуклеотидов.
94. Кассета экспрессии по любому из пп. 92 или 93, в которой фактор транскрипции содержит ДНК-связывающий домен.
95. Кассета экспрессии по любому из пп. 92-94, в которой фактор транскрипции содержит ДНК-связывающий домен и активирующий транскрипцию домен.
96. Кассета экспрессии по любому из пп. 92-95, в которой ДНК-связывающий домен характеризуется идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 80%, по отношению к его ближайшему человеческому аналогу.
97. Кассета экспрессии по п. 96, в которой ДНК-связывающий домен характеризуется идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 90%, по отношению к его ближайшему человеческому аналогу.
98. Кассета экспрессии по любому из пп. 92-96, в которой как ДНК-связывающий домен, так и активирующий транскрипцию домен характеризуются идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 90%, по отношению к их ближайшим человеческим аналогам.
99. Кассета экспрессии по п. 98, в которой как ДНК-связывающий домен, так и активирующий транскрипцию домен характеризуются идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 90%, по отношению к их ближайшим человеческим аналогам.
100. Кассета экспрессии по любому из пп. 92-95, в которой ДНК-связывающий домен содержит направляющую РНК и инактивированный нуклеазой белок Cas.

101. Кассета экспрессии по п. 100, в которой инактивированный нуклеазой белок Cas представляет собой инактивированный нуклеазой белок Cas9.
102. Кассета экспрессии по любому из пп. 92-99, в которой ДНК-связывающий домен содержит домен типа «цинковые пальцы».
103. Кассета экспрессии по п. 102, в которой ДНК-связывающий домен содержит от шести до девяти доменов типа «цинковые пальцы».
104. Кассета экспрессии по п. 103, в которой ДНК-связывающий домен содержит шесть «цинковых пальцев».
105. Кассета экспрессии по п. 104, в которой ДНК-связывающий домен связывается с областью генома, содержащей 18 нуклеотидов.
106. Кассета экспрессии по п. 103, в которой ДНК-связывающий домен содержит девять «цинковых пальцев».
107. Кассета экспрессии по п. 106, в которой ДНК-связывающий домен связывается с областью генома, содержащей 27 нуклеотидов.
108. Кассета экспрессии по любому из пп. 92-99 или 102-107, в которой ДНК-связывающий домен содержит последовательность, характеризующуюся идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 95%, по отношению к любой из SEQ ID NO: 148-151.
109. Кассета экспрессии по п. 108, в которой ДНК-связывающий домен содержит последовательность, имеющую любую из SEQ ID NO: 148-151.
110. Кассета экспрессии по любому из пп. 92-99 или 102-109, в которой ДНК-связывающий домен содержит последовательность, характеризующуюся идентичностью, составляющей по меньшей мере 95%, по отношению к любой из SEQ ID NO: 92-98.
111. Кассета экспрессии по п. 110, в которой ДНК-связывающий домен содержит любую из SEQ ID NO: 92-98.

112. Кассета экспрессии по любому из пп. 92-99 или 102-111, в которой ДНК-связывающий домен представляет собой белок типа «цинковые пальцы», содержащий последовательность LEPGEKP – [YKCPECGKSFS X HQRTH TGEKP]_n - YKCPECGKSFS X HQRTH – TGKKTS (SEQ ID NO: 147).

113. Кассета экспрессии по п. 111 или 112, в которой ДНК-связывающий домен содержит последовательность, характеризующуюся идентичностью, составляющей по меньшей мере 90%, по отношению к любой из SEQ ID NO: 77-91.

114. Кассета экспрессии по любому из пп. 113, в которой ДНК-связывающий домен содержит любую из SEQ ID NO: 77-91.

115. Кассета экспрессии по любому из пп. 92-99 или 102-111, в которой ДНК-связывающий домен получен из EGR1 человека или EGR3 человека.

116. Кассета экспрессии по любому из пп. 95-99, в которой активирующий транскрипцию домен содержит последовательность VP16, VPR, VP64, CITED2, CITED4 или CREB3 или их функциональный фрагмент.

117. Кассета экспрессии по любому из пп. 92-99, в которой активирующий транскрипцию домен содержит последовательность CITED2, CITED4 или CREB3 человека или их функциональный фрагмент.

118. Кассета экспрессии по любому из пп. 81-117, в которой регуляторный элемент содержит последовательность, имеющую любую из SEQ ID NO: 1-4.

119. Кассета экспрессии по п. 118, в которой регуляторный элемент содержит последовательность, имеющую SEQ ID NO: 2 или 3.

120. Кассета экспрессии по п. 81 или 82, в которой не встречающийся в природе фактор транскрипции содержит последовательность, характеризующуюся идентичностью, составляющей по меньшей мере 90%, по отношению к любой из SEQ ID NO: 105, 106 и 127-129.

121. Кассета экспрессии по п. 120, в которой не встречающийся в природе фактор транскрипции содержит любую из SEQ ID NO: 105, 106 и 127-129.
122. Кассета экспрессии по пп. 81, 82 или 120, в которой трансген содержит нуклеотидную последовательность, характеризующуюся идентичностью, составляющей по меньшей мере 90%, по отношению к любой из SEQ ID NO: 71, 74, 75, 76 или 184.
123. Кассета экспрессии по п. 122, в которой трансген содержит любую из SEQ ID NO: 71, 74, 75, 76 или 184.
124. Кассета экспрессии по любому из пп. 81-123, причем кассета экспрессии представляет собой часть вирусного вектора.
125. Кассета экспрессии по п. 124, в которой вирусный вектор представляет собой вирус AAV.
126. Кассета экспрессии по п. 125, в которой вирус AAV представляет собой вирус AAV9 или вирус scAAV9.
127. Кассета экспрессии по п. 124, в которой вирусный вектор представляет собой лентивирус.
128. Способ селективной экспрессии трансгена в парвальбумин-содержащих (PV) нейронах приматов, предусматривающий введение примату вирусного вектора, содержащего трансген и по меньшей мере один сайт связывания микроРНК, причем сайт связывания микроРНК снижает экспрессию трансгена в возбуждающих нейронах.
129. Способ по п. 128, при котором вирусный вектор дополнительно содержит регуляторный элемент, функционально связанный с трансгеном, причем регуляторный элемент управляет экспрессией трансгена на более высоком уровне в парвальбумин-содержащих (PV) нейронах, чем в других типах клеток.
130. Способ по пп. 128 или 129, при котором сайт связывания микроРНК содержит по меньшей мере один сайт связывания для MIR128 (SEQ ID NO: 9).

131. Способ по любому из пп. 128-130, при котором сайт связывания микроРНК содержит по меньшей мере один сайт связывания для MIR221 (SEQ ID NO: 11).
132. Способ по любому из пп. 128-131, при котором сайт связывания микроРНК содержит по меньшей мере один сайт связывания для MIR222 (SEQ ID NO: 13).
133. Способ по п. 128, при котором сайт связывания микроРНК содержит по меньшей мере один сайт связывания для MIR128 (SEQ ID NO: 9) и по меньшей мере один сайт связывания для MIR221 (SEQ ID NO: 11).
134. Способ по п. 128, при котором сайт связывания микроРНК содержит по меньшей мере один сайт связывания для MIR128 (SEQ ID NO: 9), по меньшей мере один сайт связывания для MIR221 (SEQ ID NO: 11) и по меньшей мере один сайт связывания для MIR222 (SEQ ID NO: 13).
135. Способ по любому из пп. 128-134, при котором сайт связывания микроРНК содержит последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична любой из SEQ ID NO: 7, 14 или 15.
136. Способ по п. 135, при котором сайт связывания микроРНК содержит SEQ ID NO: 7.
137. Способ по п. 135, при котором сайт связывания микроРНК содержит SEQ ID NO: 14.
138. Способ по п. 135, при котором сайт связывания микроРНК содержит SEQ ID NO: 15.
139. Способ по любому из пп. 128-138, при котором трансген содержит последовательность, кодирующую не встречающийся в природе фактор транскрипции, который увеличивает экспрессию гена SCN1A в клетке.
140. Способ по п. 139, при котором фактор транскрипции связывается с областью генома, содержащей 18-27 нуклеотидов.
141. Способ по любому из пп. 139 или 140, при котором фактор транскрипции содержит ДНК-связывающий домен.

142. Способ по любому из пп. 139-141, при котором фактор транскрипции содержит ДНК-связывающий домен и активирующий транскрипцию домен.

143. Способ по любому из пп. 139-142, при котором ДНК-связывающий домен характеризуется идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 80%, по отношению к его ближайшему человеческому аналогу.

144. Способ по п. 143, при котором ДНК-связывающий домен характеризуется идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 90%, по отношению к его ближайшему человеческому аналогу.

145. Способ по любому из пп. 142 или 143, при котором как ДНК-связывающий домен, так и активирующий транскрипцию домен характеризуются идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 80%, по отношению к их ближайшим человеческим аналогам.

146. Способ по п. 145, при котором как ДНК-связывающий домен, так и активирующий транскрипцию домен характеризуются идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 90%, по отношению к их ближайшим человеческим аналогам.

147. Способ по любому из пп. 139-142, при котором ДНК-связывающий домен содержит направляющую РНК и инактивированный нуклеазой белок Cas.

148. Способ по п. 147, при котором инактивированный нуклеазой белок Cas представляет собой инактивированный нуклеазой белок Cas9.

149. Способ по любому из пп. 139-146, при котором ДНК-связывающий домен содержит домен типа «цинковые пальцы».

150. Способ по п. 149, при котором ДНК-связывающий домен содержит от шести до девяти доменов типа «цинковые пальцы».

151. Способ по п. 150, при котором ДНК-связывающий домен содержит шесть «цинковых пальцев».

152. Способ по п. 151, при котором ДНК-связывающий домен связывается с геномной областью, содержащей 18 нуклеотидов.
153. Способ по п. 150, при котором ДНК-связывающий домен содержит девять «цинковых пальцев».
154. Способ по п. 153, при котором ДНК-связывающий домен связывается с геномной областью, содержащей 27 нуклеотидов.
155. Способ по любому из пп. 139-146 или 149-154, при котором ДНК-связывающий домен содержит последовательность, характеризующуюся идентичностью последовательности, составляющей по меньшей мере 95%, по отношению к любой из 148-151.
156. Способ по п. 155, при котором ДНК-связывающий домен содержит последовательность, имеющую любую из SEQ ID NO: 148-151.
157. Способ по любому из пп. 139-146 или 149-156, при котором ДНК-связывающий домен получен из EGR1 человека или EGR3 человека.
158. Способ по любому из пп. 139-146 или 149-157, при котором ДНК-связывающий домен содержит последовательность, характеризующуюся идентичностью, составляющей по меньшей мере 90%, по отношению к любой из SEQ ID NO: 92-98.
159. Способ по п. 158, при котором ДНК-связывающий домен содержит любую из SEQ ID NO: 92-98.
160. Способ по любому из пп. 139-146 или 149-156, при котором ДНК-связывающий домен представляет собой белок типа «цинковые пальцы», содержащий последовательность LEPGEKP – [YKCPGCKSFS X HQRTH TGEKP]_n - YKCPGCKSFS X HQRTH – TGKKTS (SEQ ID NO: 147).
161. Способ по любому из пп. 160, при котором ДНК-связывающий домен содержит последовательность, характеризующуюся идентичностью, составляющей по меньшей мере 90%, по отношению к любой из SEQ ID NO: 77-91.

162. Способ по любому из пп. 161, при котором ДНК-связывающий домен содержит любую из SEQ ID NO: 77-91.

163. Способ по любому из пп. 142-162, при котором активирующий транскрипцию домен содержит последовательность VP16, VPR, VP64, CITED2, CITED4 или CREB3 или их функциональный фрагмент.

164. Способ по п. 163, при котором активирующий транскрипцию домен содержит последовательность CITED2, CITED4 или CREB3 человека или их функциональный фрагмент.

165. Способ по любому из пп. 128-164, при котором регуляторный элемент содержит последовательность, имеющую любую из SEQ ID NO: 1-4.

166. Способ по п. 165, при котором регуляторный элемент содержит последовательность, имеющую SEQ ID NO: 2 или 3.

167. Способ по п. 139, при котором не встречающийся в природе фактор транскрипции содержит последовательность, характеризующуюся идентичностью, составляющей по меньшей мере 90%, по отношению к любой из SEQ ID NO: 105, 106 и 127-129.

168. Способ по п. 167, при котором не встречающийся в природе фактор транскрипции содержит любую из SEQ ID NO: 105, 106 и 127-129.

169. Способ по п. 139, при котором трансген содержит нуклеотидную последовательность, характеризующуюся идентичностью, составляющей по меньшей мере 90%, по отношению к любой из SEQ ID NO: 71, 74, 75, 76 или 184.

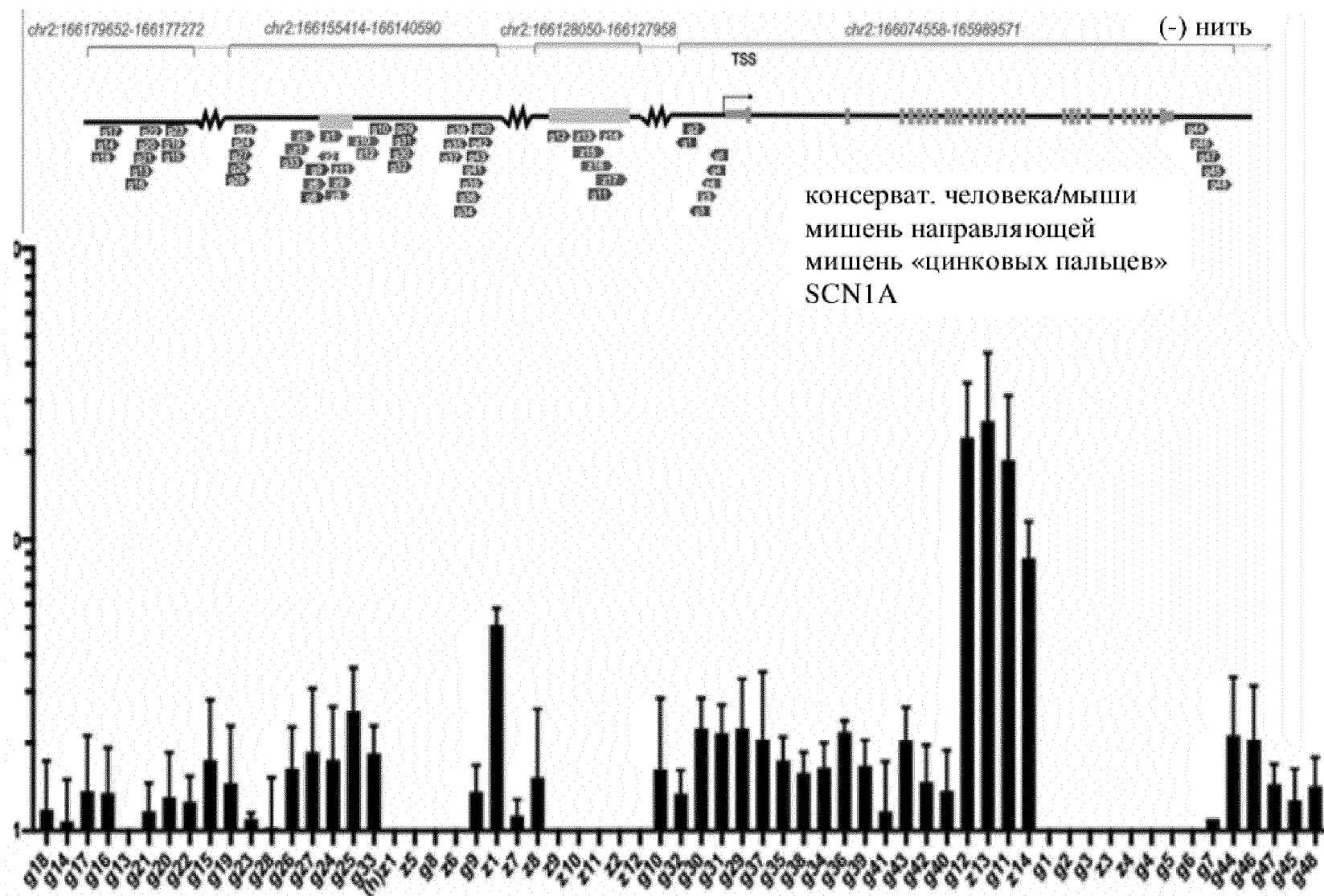
170. Способ по п. 169, при котором трансген содержит любую из SEQ ID NO: 71, 74, 75, 76 или 184.

171. Способ по любому из пп. 128-170, при котором вирусный вектор представляет собой вирус AAV.

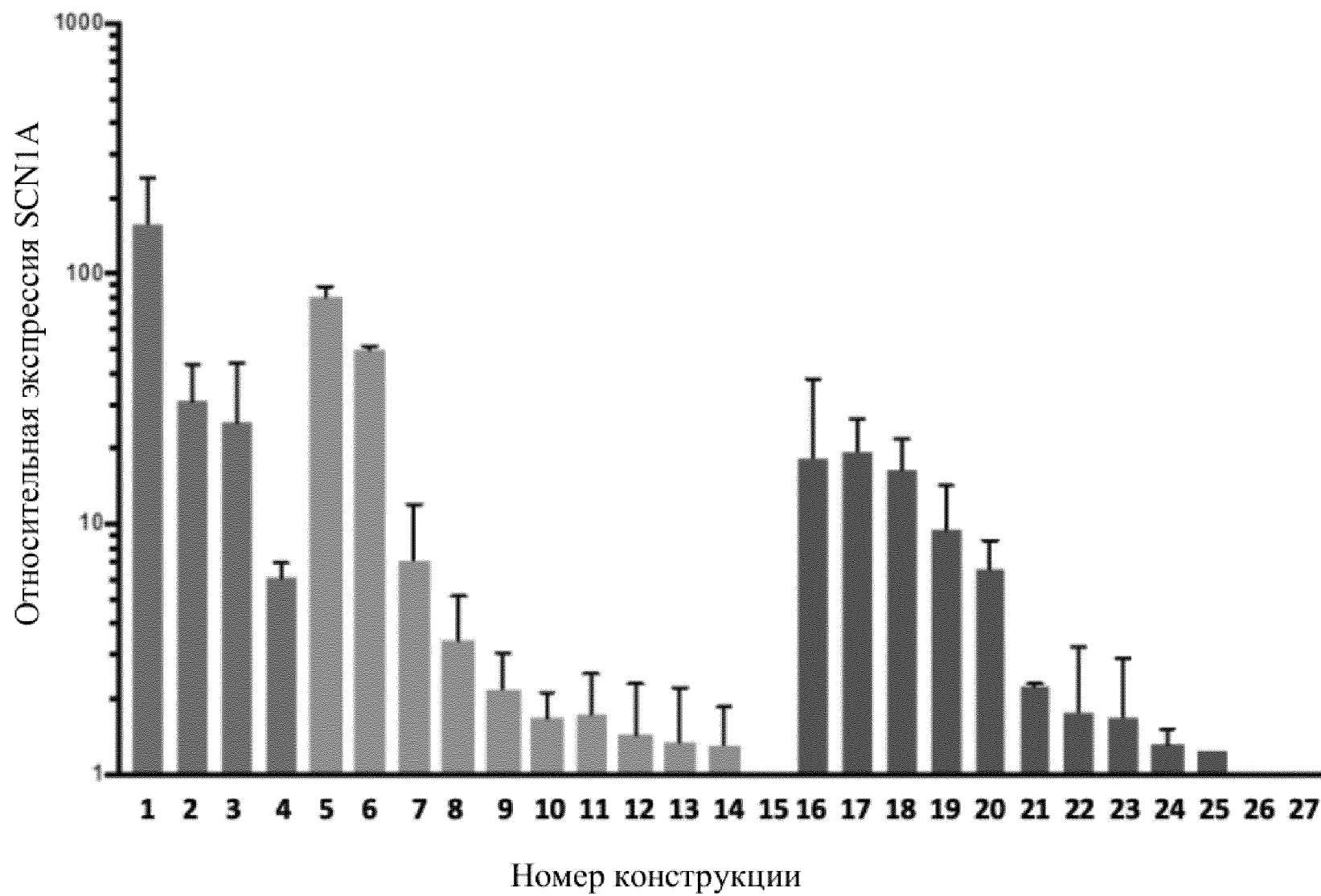
172. Способ по п. 171, при котором вирус AAV представляет собой вирус AAV9 или вирус scAAV9.
173. Способ по любому из пп. 128-170, при котором вирусный вектор представляет собой лентивирус.
174. Способ по любому из пп. 128-173, при котором примат представляет собой человека.
175. Способ по любому из пп. 128-173, при котором примат представляет собой отличного от человека примата.
176. Способ по п. 175, при котором отличный от человека примат представляет собой обезьяну старого мира, орангутана, гориллу, шимпанзе, мартышку, яванского макака, макака-резуса или свинохвостого макака.
177. Кассета экспрессии, содержащая последовательность, кодирующую не встречающийся в природе фактор транскрипции, который увеличивает экспрессию гена SCN1A в клетке, причем не встречающийся в природе фактор транскрипции содержит последовательность, характеризующуюся идентичностью, составляющей по меньшей мере 90%, по отношению к SEQ ID NO: 128 или 129.
178. Кассета экспрессии по п. 177, в которой не встречающийся в природе фактор транскрипции содержит SEQ ID NO: 128 или 129.
179. Способ увеличения экспрессии SCN1A в клетке путем введения кассеты экспрессии по любому из пп. 1-127 или 177-178.
180. Способ по п. 179, при котором клетка представляет собой PV-содержащий нейрон.
181. Способ по любому из пп. 179 или 180, при котором клетка находится внутри субъекта.
182. Способ по п. 181, при котором субъект представляет собой млекопитающее.
183. Способ по п. 182, при котором субъект представляет собой человека.

184. Способ по любому из пп. 179-183, при котором увеличение экспрессии SCN1A лечит заболевание, нарушение или симптом.
185. Способ по п. 184, при котором нарушение представляет собой нарушение центральной нервной системы.
186. Способ по п. 185, при котором заболевание представляет собой эпилепсию, связанную с гаплонедостаточностью SCN1A.
187. Способ по п. 186, при котором гаплонедостаточность представляет собой результат того, что субъект является гетерозиготным по мутации потери функции гена SCN1A.
188. Способ по п. 187, при котором нарушение представляет собой эпилепсию, связанную со вставкой, делецией, инверсией или заменой в гене SCN1A.
189. Способ по п. 188, при котором нарушение представляет собой эпилепсию, связанную с точечной мутацией в гене SCN1A.
190. Способ по любому из пп. 186-189, при котором нарушение представляет собой синдром Драве.
191. Способ по любому из пп. 185-190, при котором симптомом нарушения центральной нервной системы является гиперактивность нейронов.
192. Способ по п. 191, при котором лечение нарушения центральной нервной системы предусматривает снижение гиперактивности нейронов.
193. Способ по любому из пп. 185-190, при котором симптомом нарушения центральной нервной системы являются припадки.
194. Способ по п. 193, при котором лечение нарушения центральной нервной системы предусматривает снижение частоты припадков.

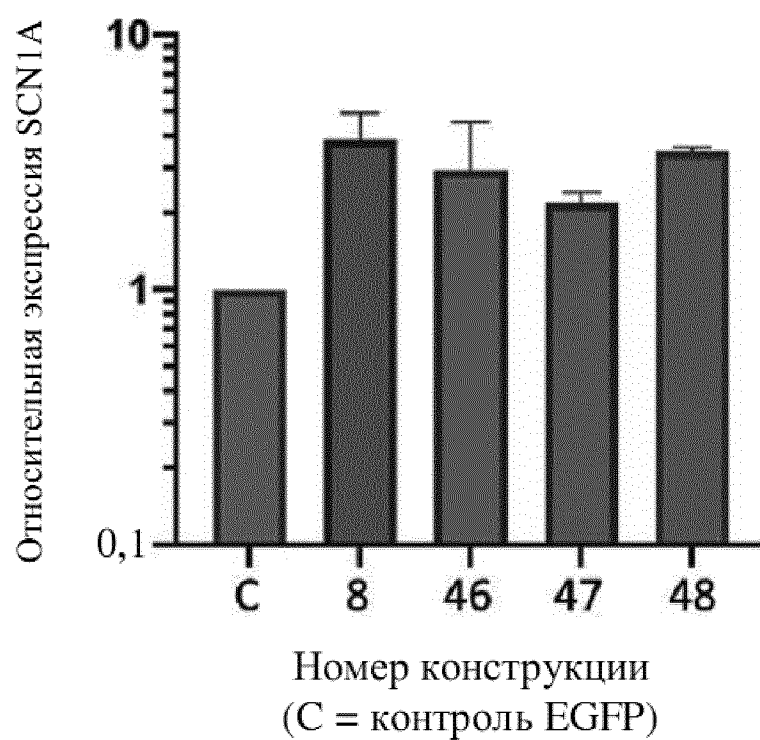
195. Способ по любому из пп. 193 или 194, при котором лечение нарушения центральной нервной системы предусматривает уменьшение тяжести припадков.
196. Способ по п. 179, при котором клетка представляет собой нервную клетку.
197. Способ по п. 196, при котором нервная клетка выбрана из группы, состоящей из униполярных, биполярных, мультиполярных или псевдоуниполярных нейронов.
198. Способ по п. 196, при котором клетка представляет собой ГАМКергический нейрон.
199. Способ по п. 179, при котором клетка не представляет собой нервную клетку.
200. Способ по п. 199, при котором клетка представляет собой глиальную клетку.
201. Способ по п. 200, при котором глиальная клетка выбрана из группы, состоящей из астроцитов, олигодендроцитов, эпендимальных клеток, шванновских клеток и сателлитных клеток.
202. Способ увеличения экспрессии SCN1A в ЦНС путем введения кассеты экспрессии по любому из пп. 1-127 или 177-178.
203. Способ по любому из пп. 202, при котором повышенная экспрессия SCN1A происходит в головном мозге.
204. Способ по п. 203, при котором повышенная экспрессия SCN1A происходит во фронтальной коре, теменной коре, височной коре, гиппокампе, продолговатом мозге и/или затылочной коре.
205. Способ по любому из пп. 202, при котором повышенная экспрессия SCN1A происходит в позвоночнике.
206. Способ по п. 205, при котором повышенная экспрессия SCN1A происходит в спинном мозге и/или межпозвоночном узле.



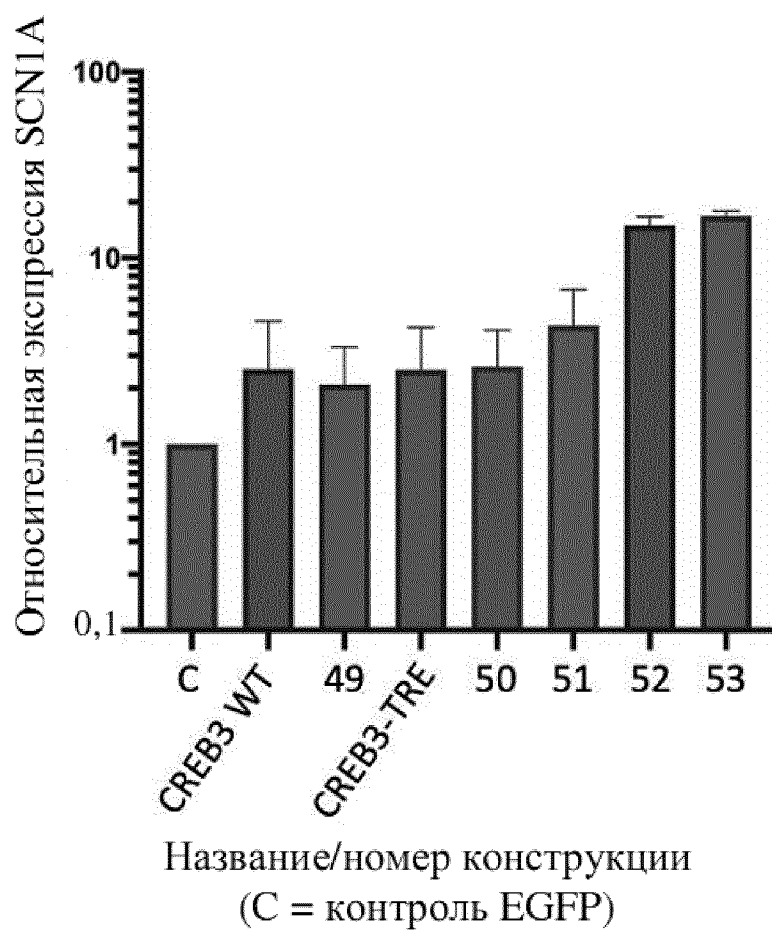
Фиг. 1



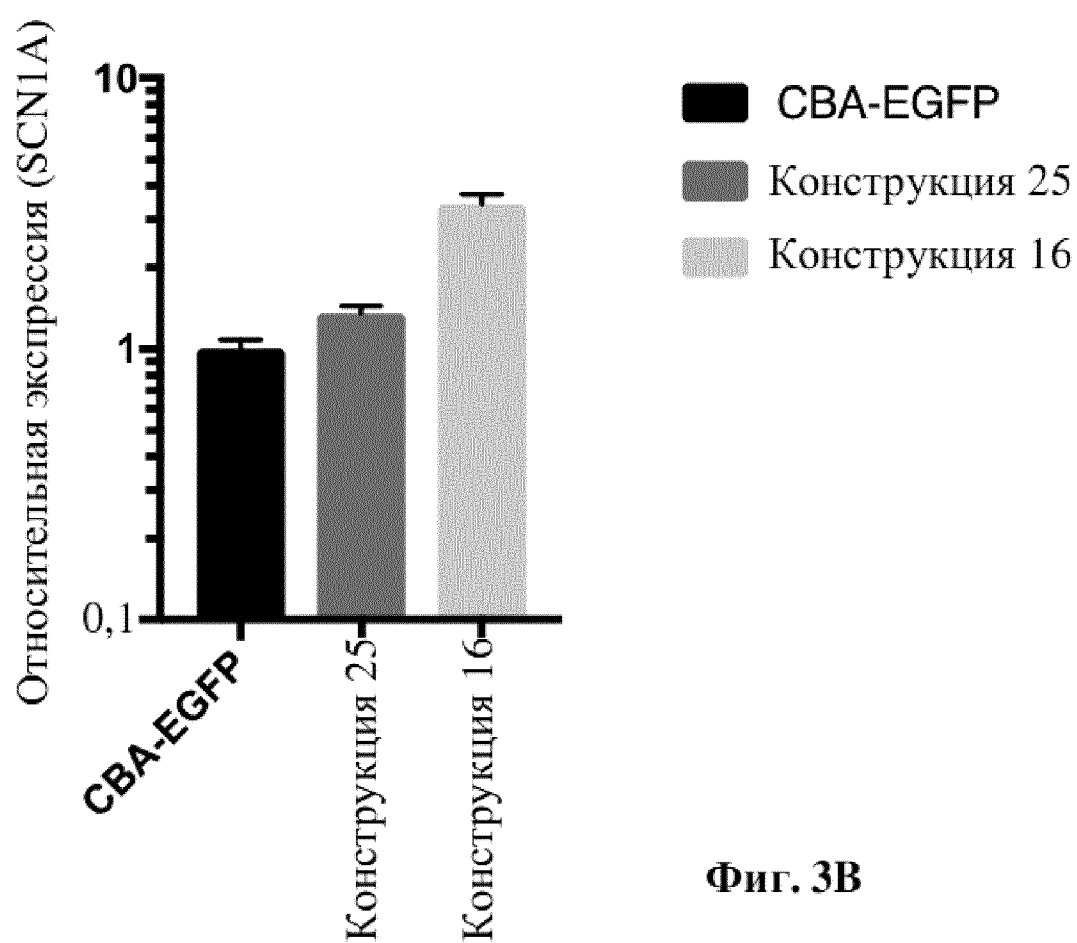
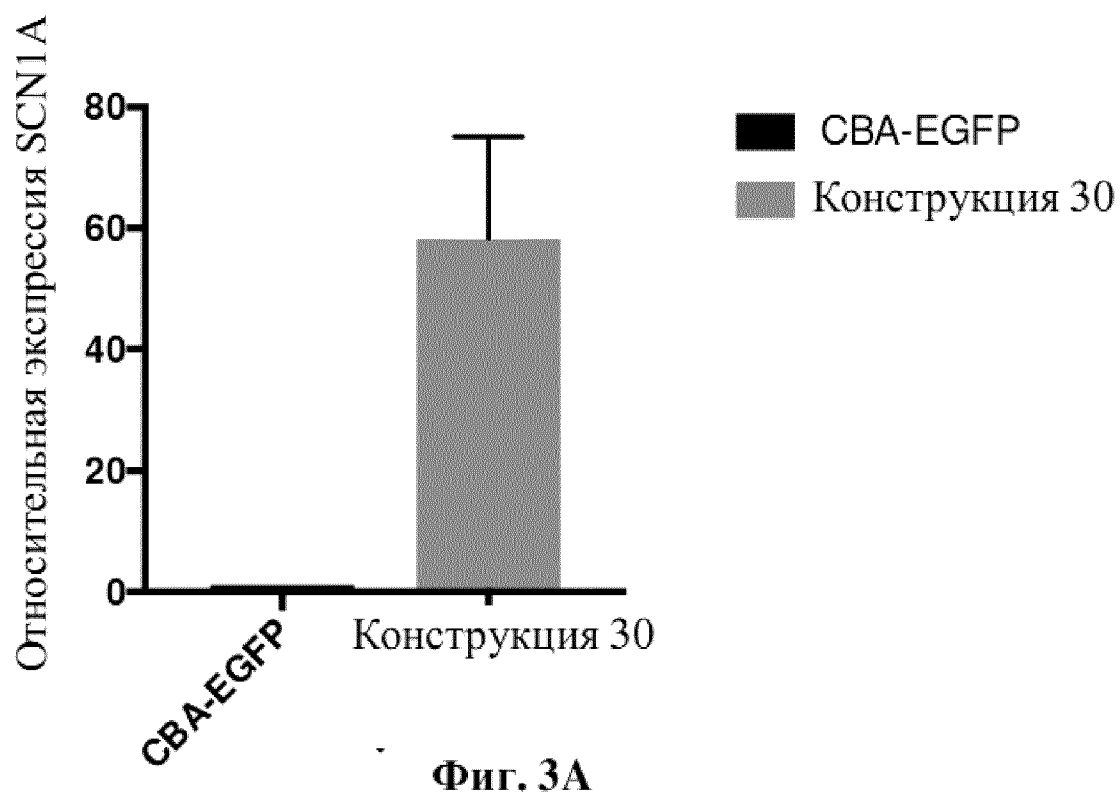
Фиг. 2А

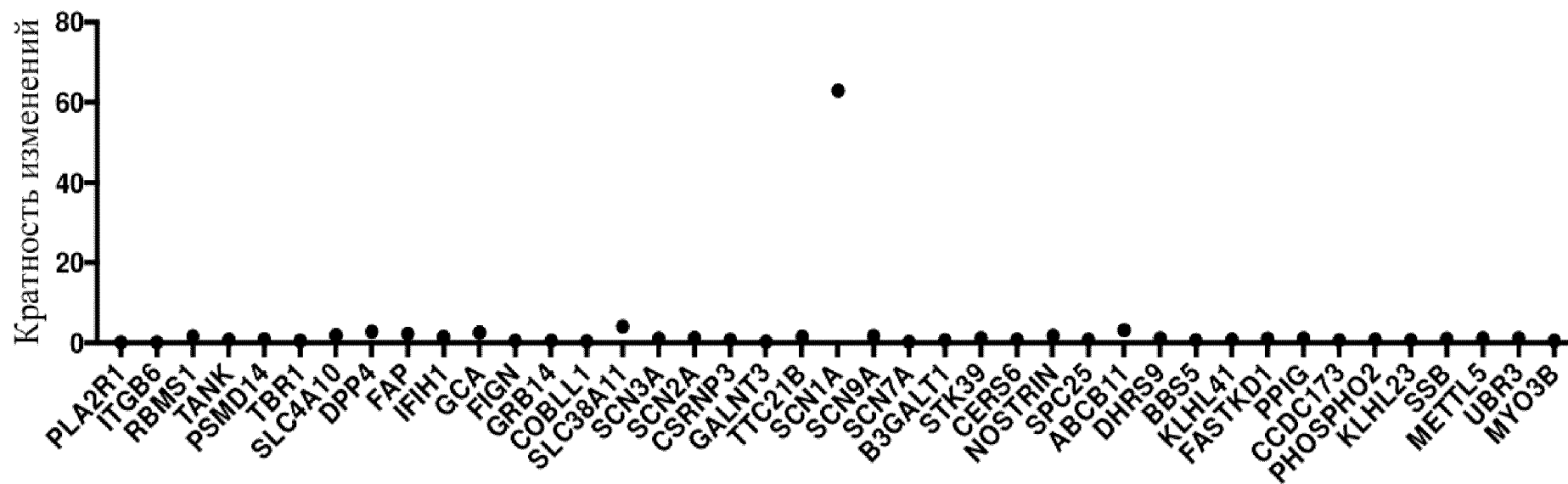


Фиг. 2В

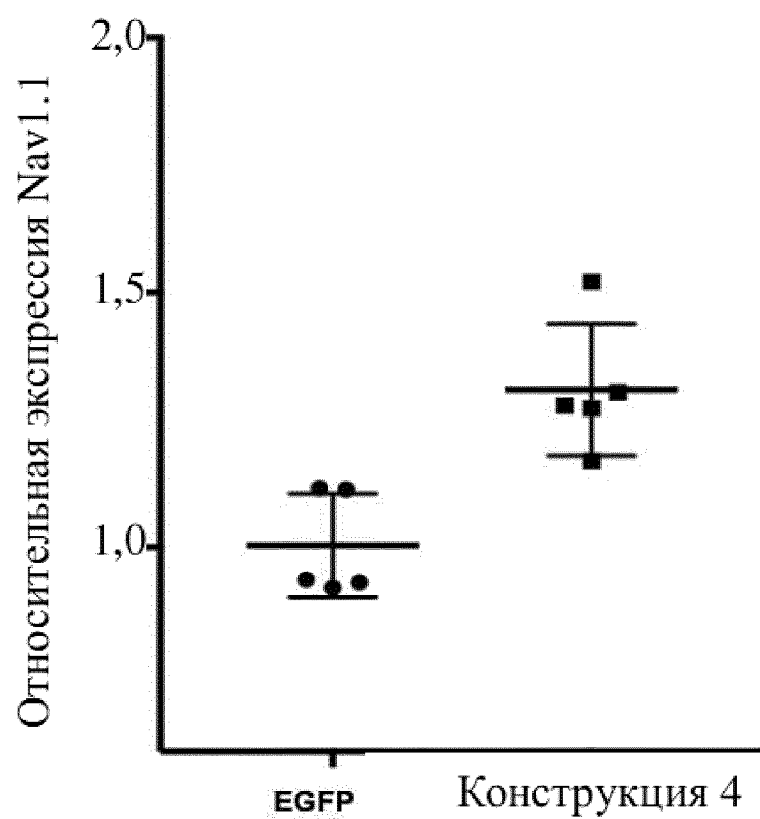


Фиг. 2С

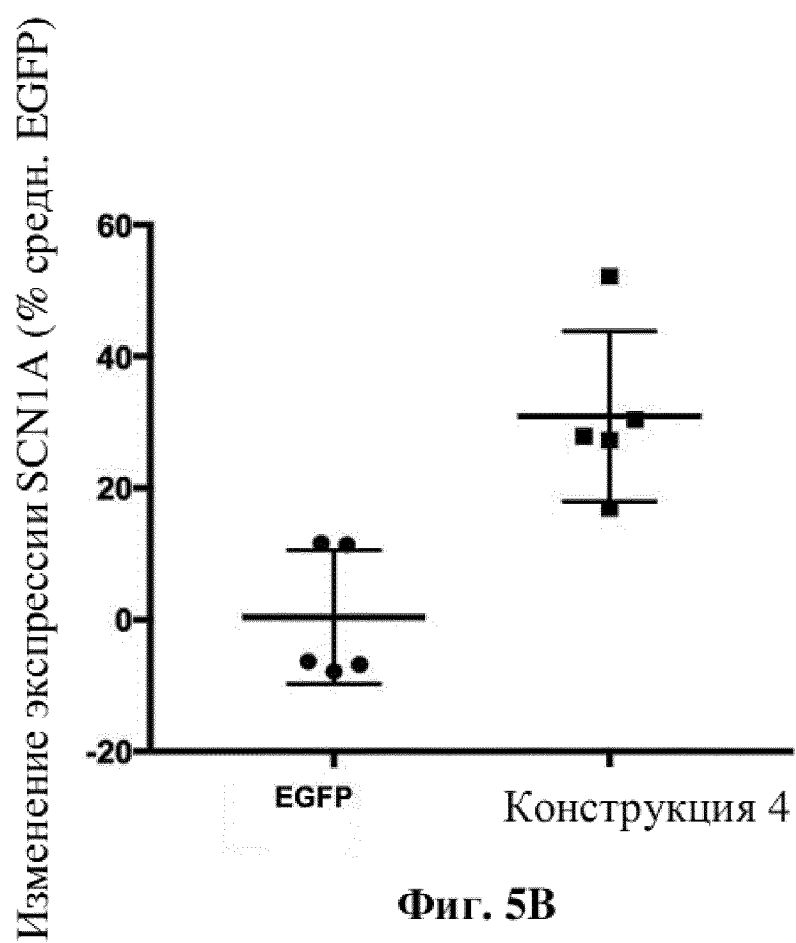




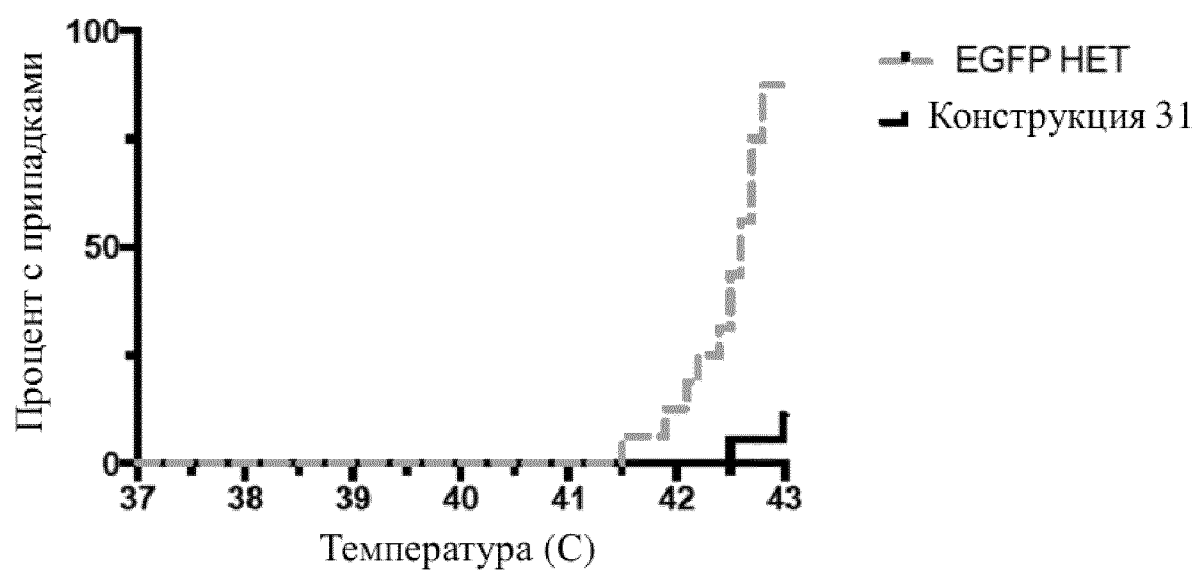
Фиг. 4



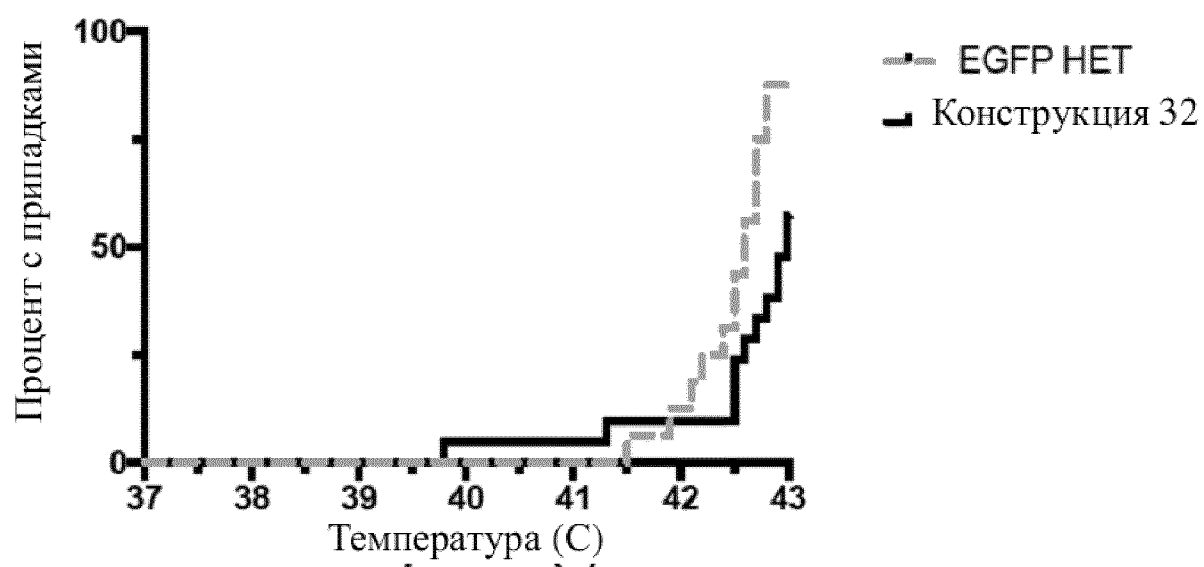
Фиг. 5А



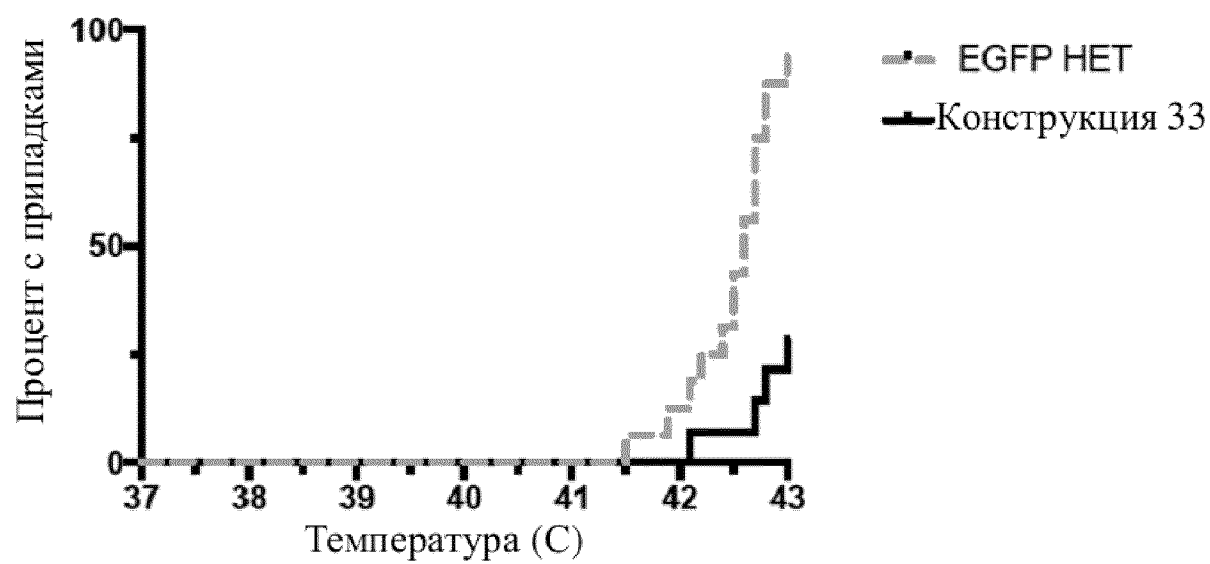
Фиг. 5В



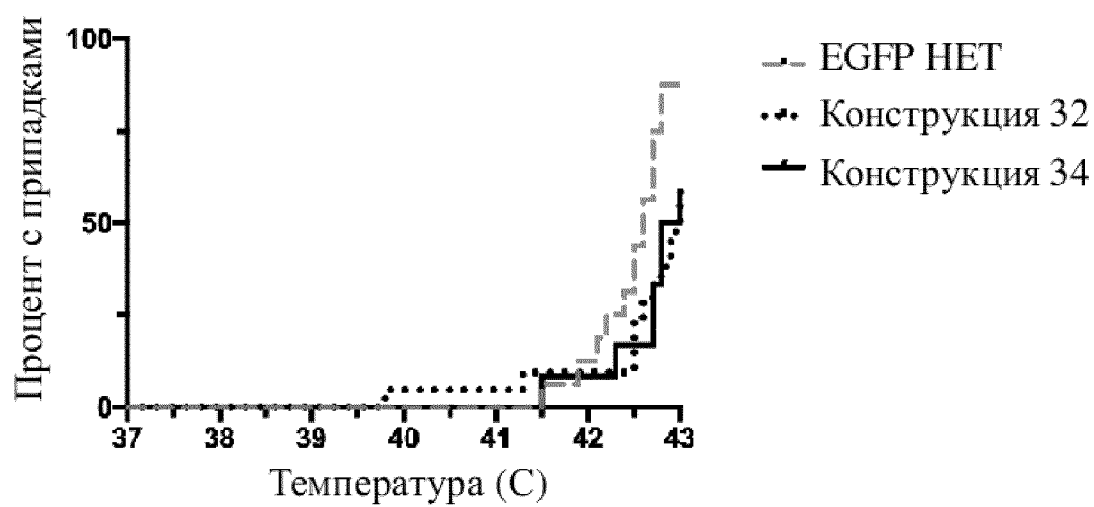
Фиг. 6А



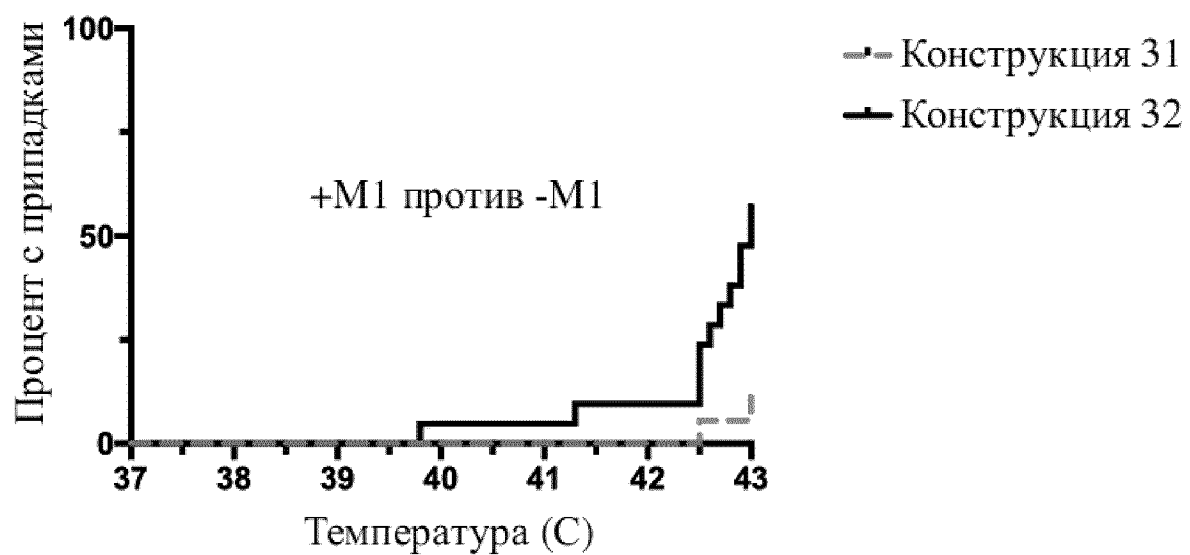
Фиг. 6В



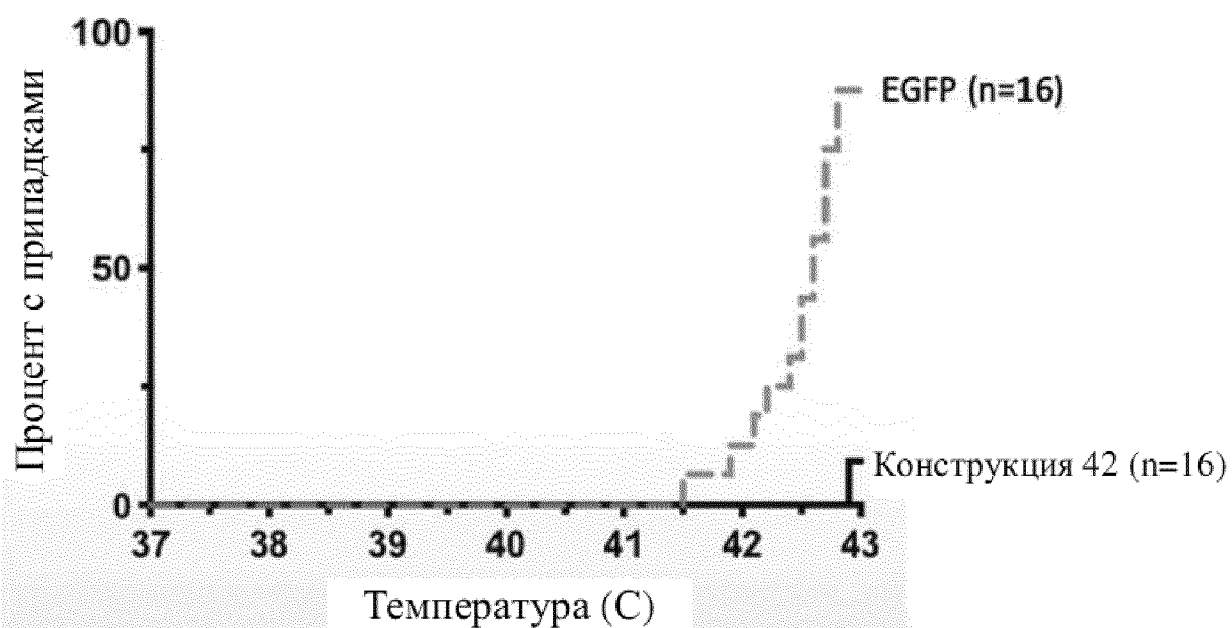
Фиг. 6C



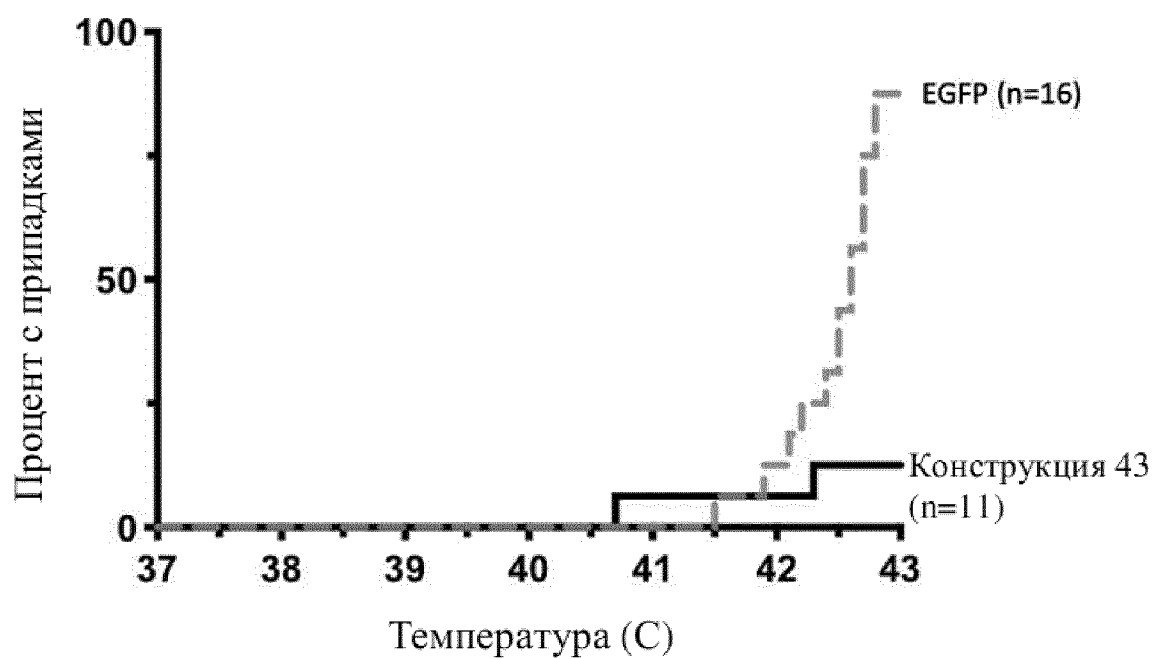
Фиг. 6D



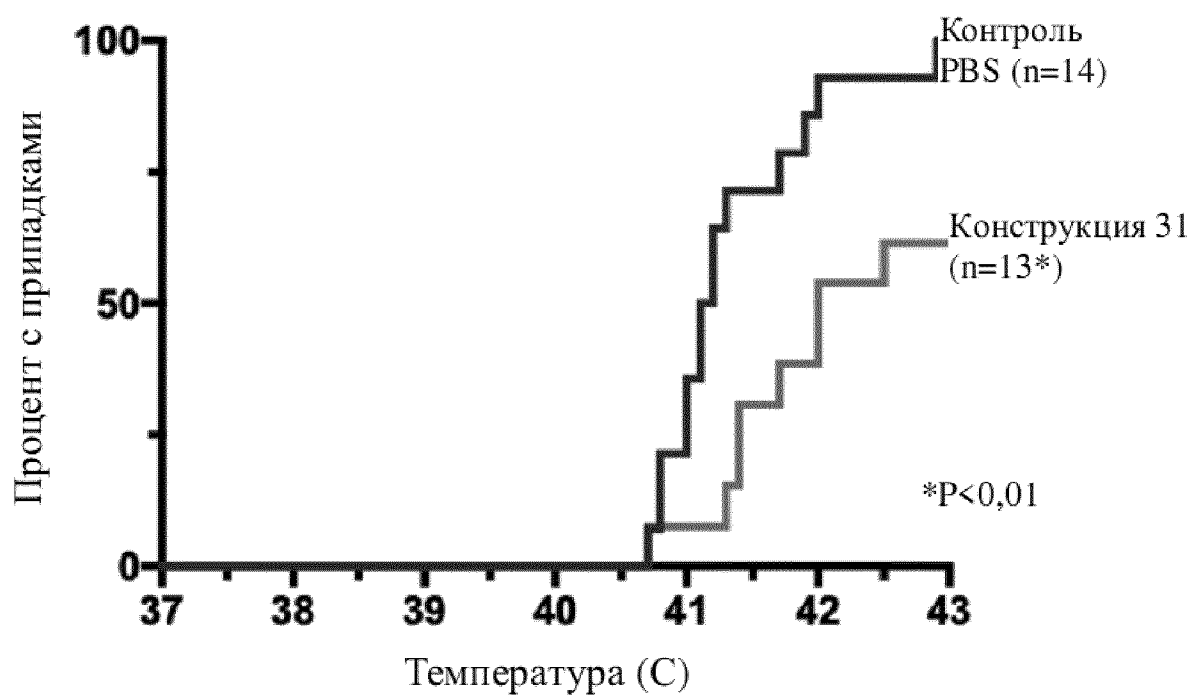
Фиг. 6Е



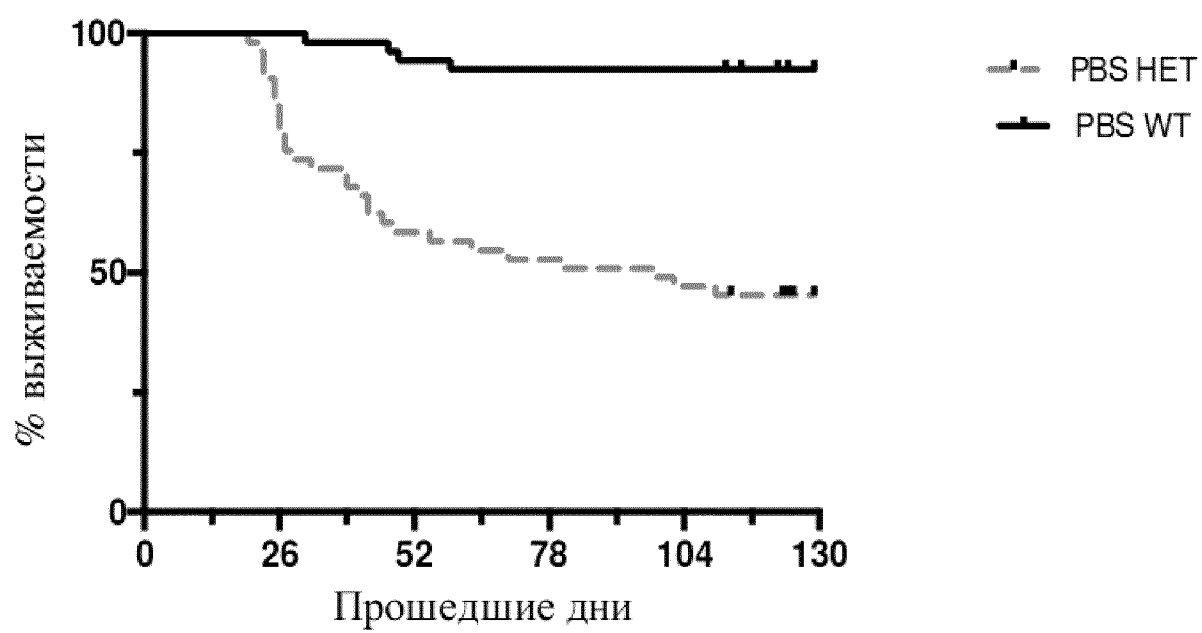
Фиг. 6F



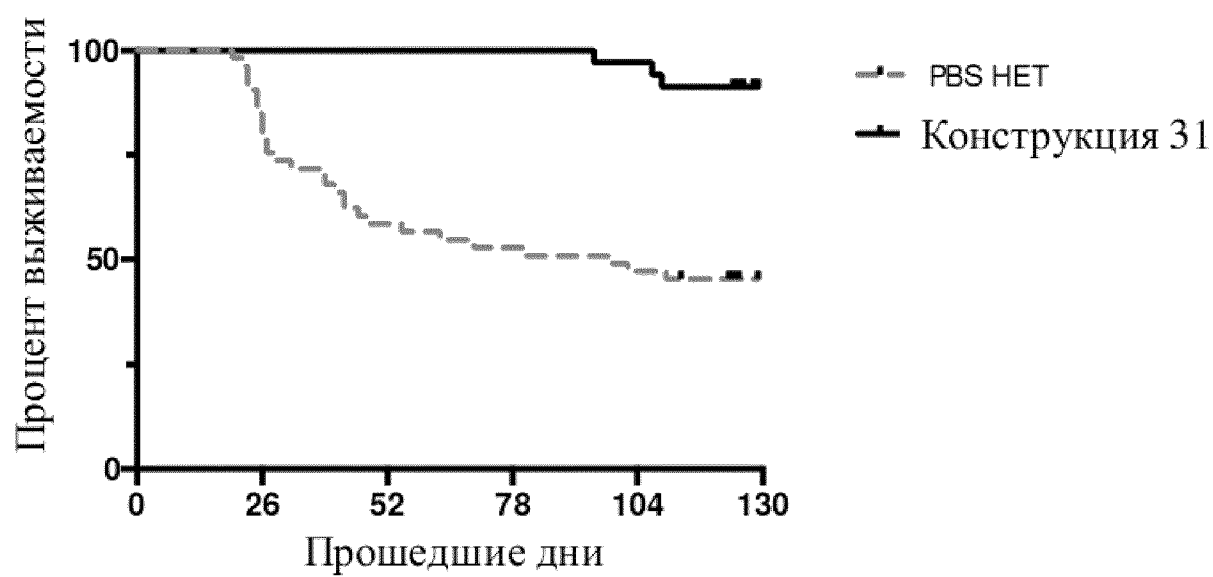
Фиг. 6G



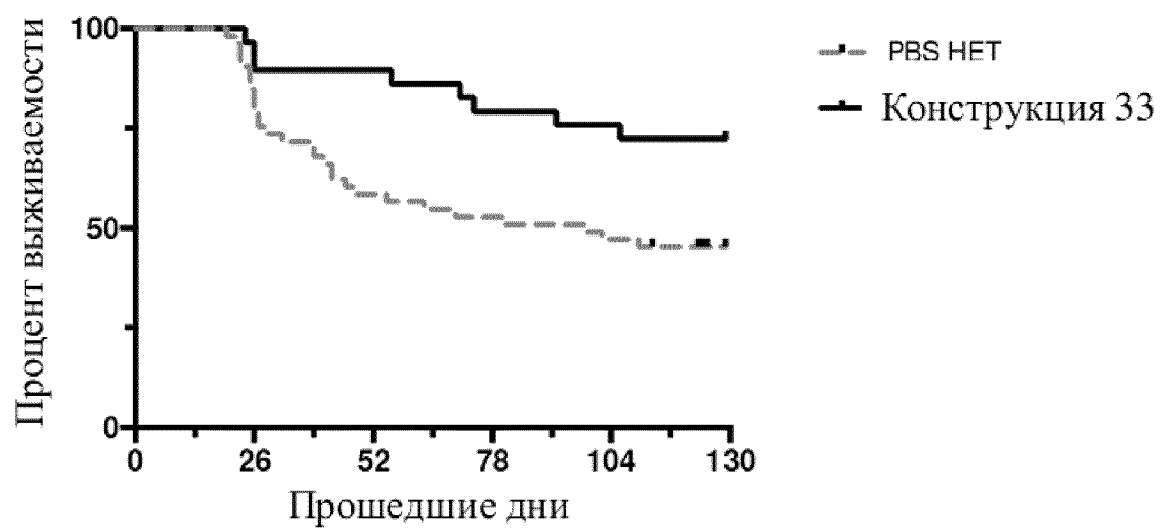
Фиг. 6H



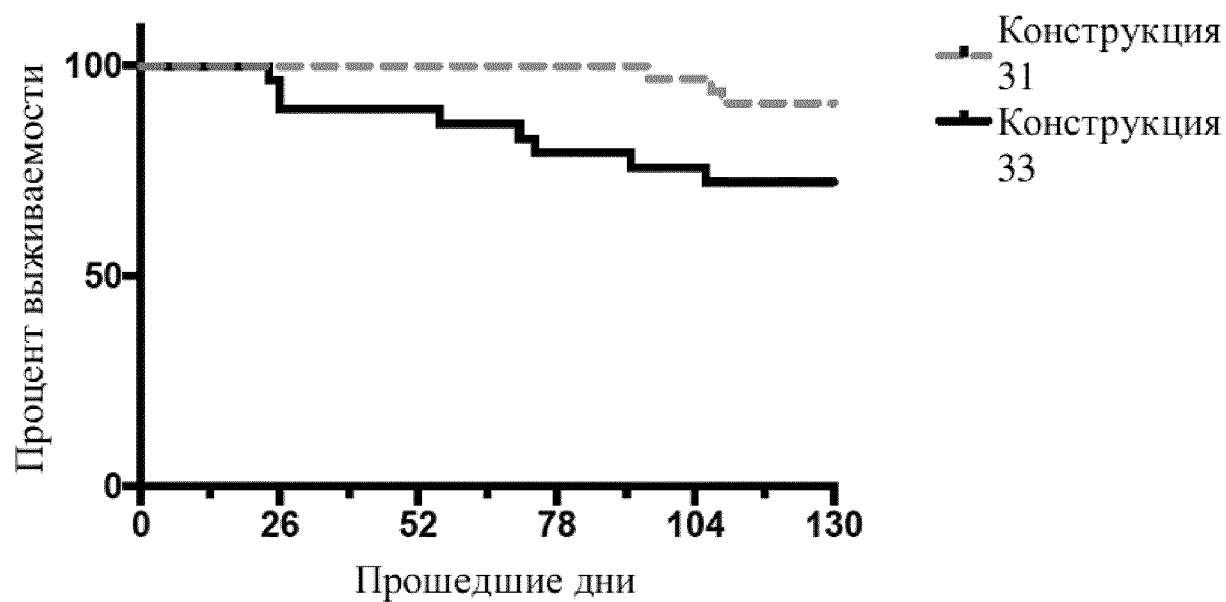
Фиг. 7А



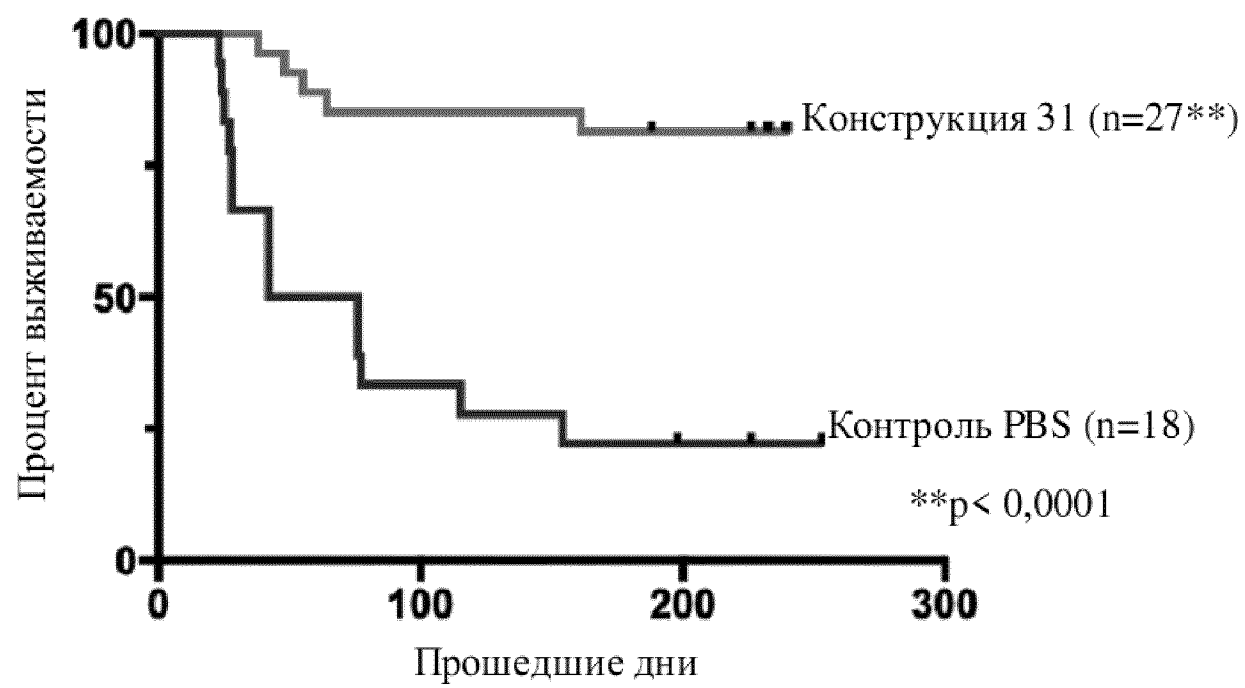
Фиг. 7В



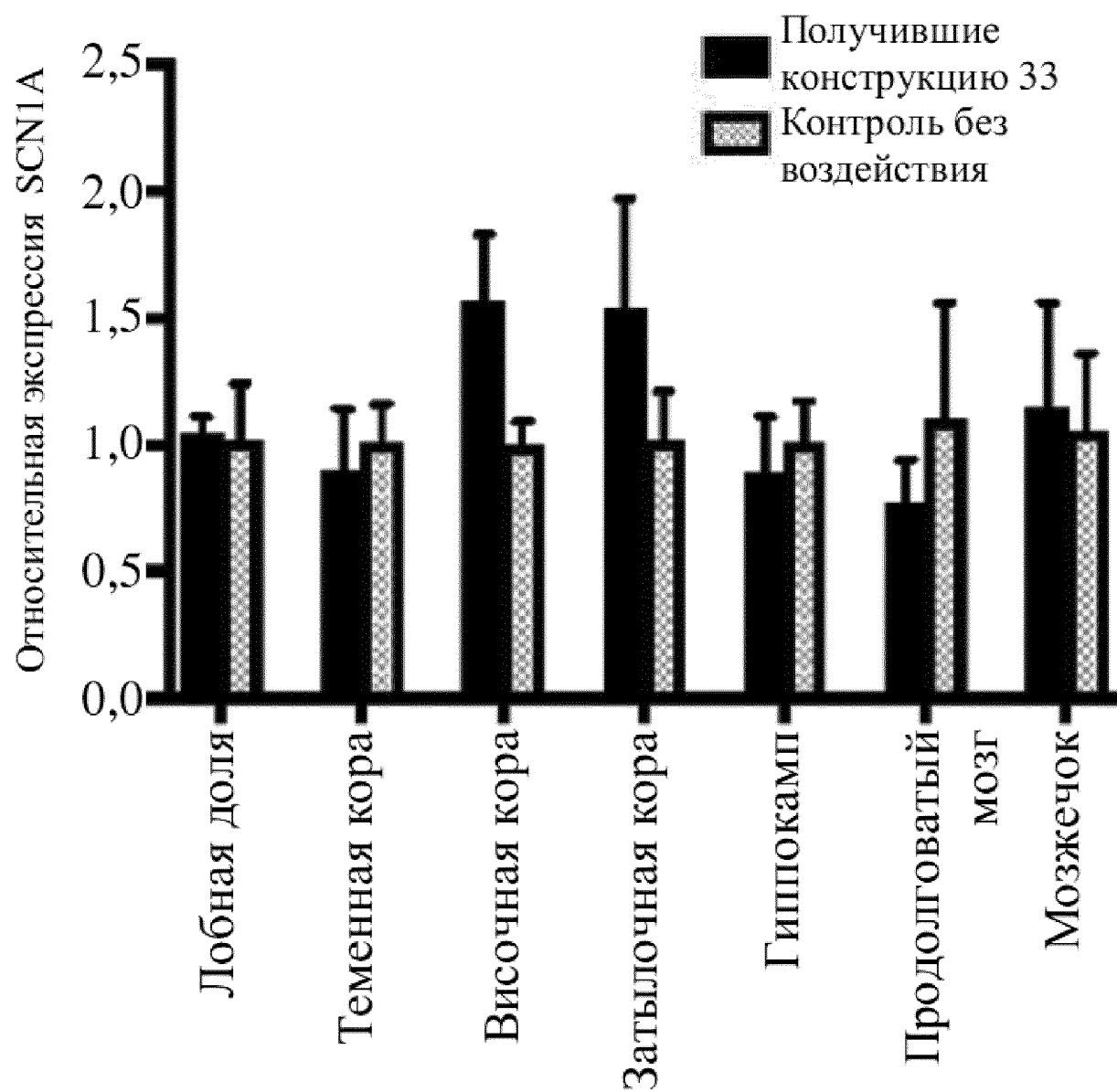
Фиг. 7C



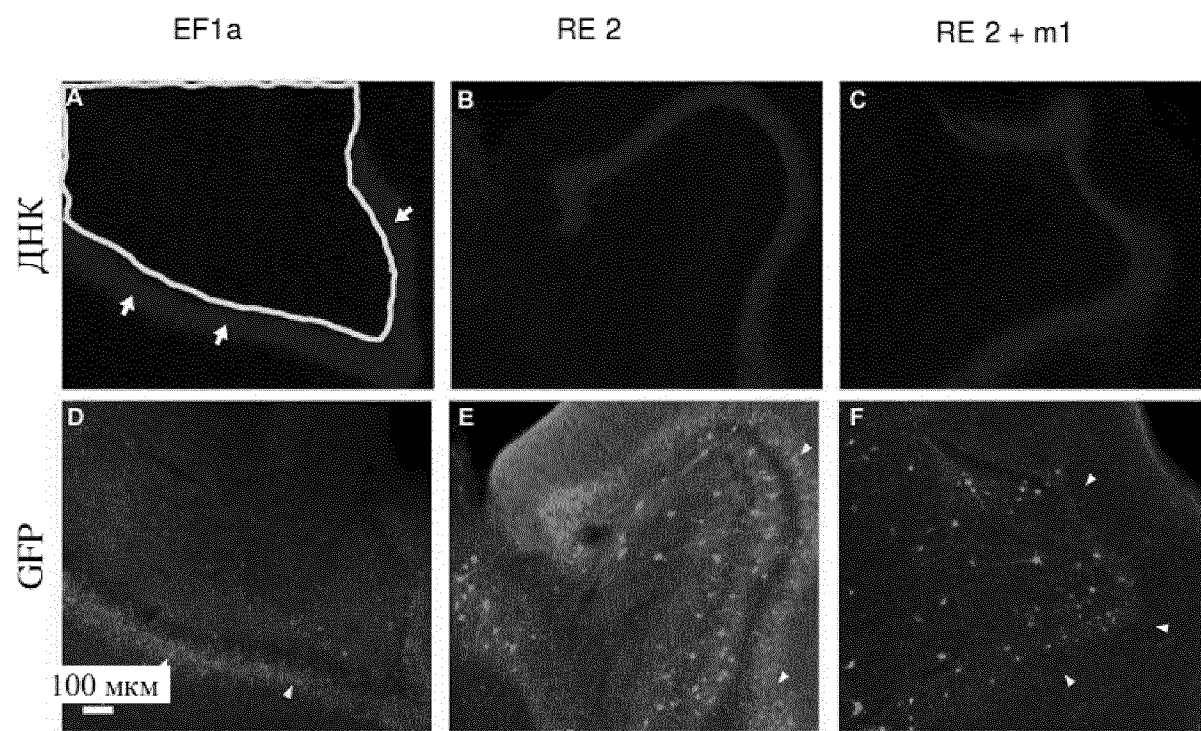
Фиг. 7D



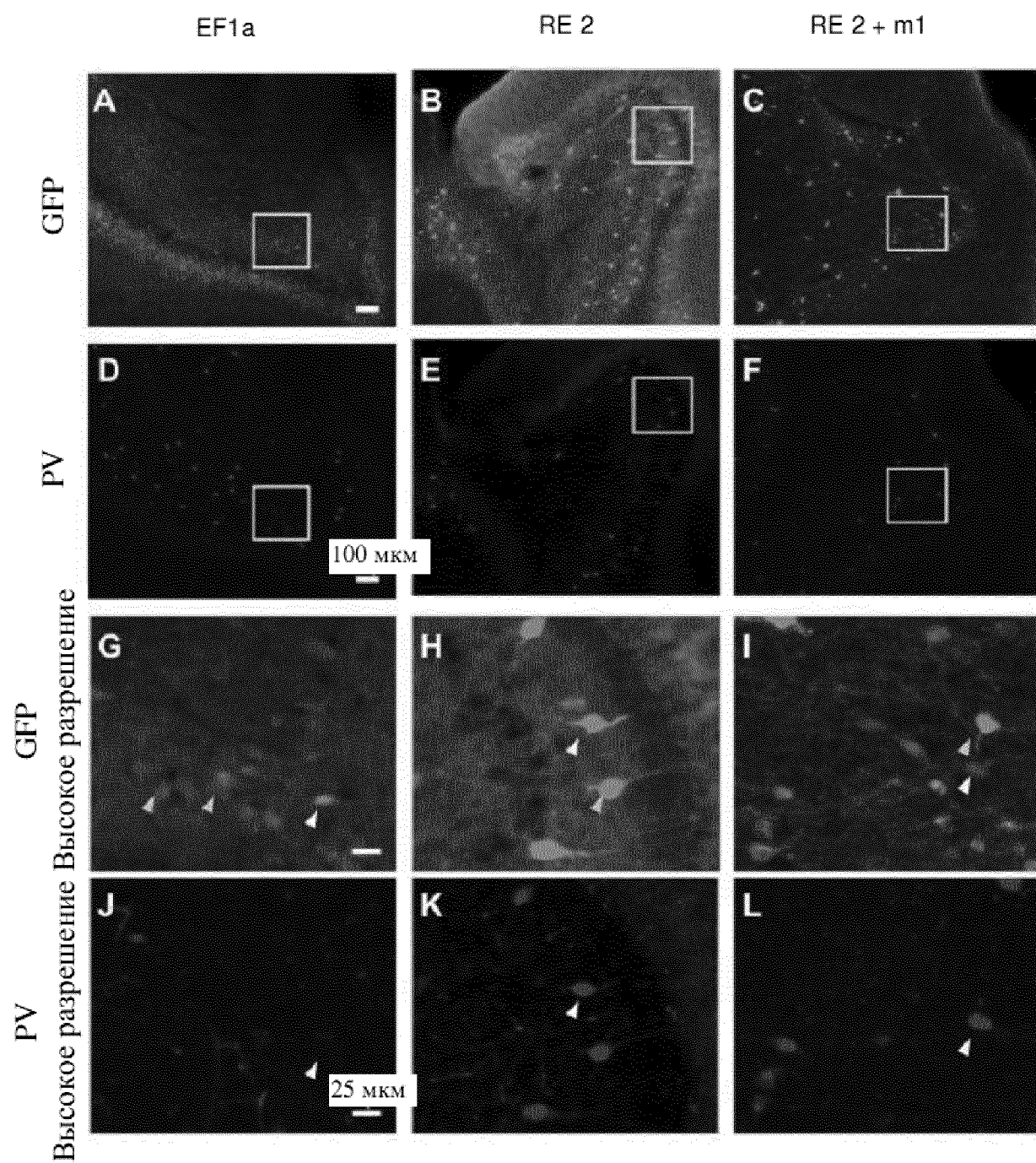
Фиг. 7Е



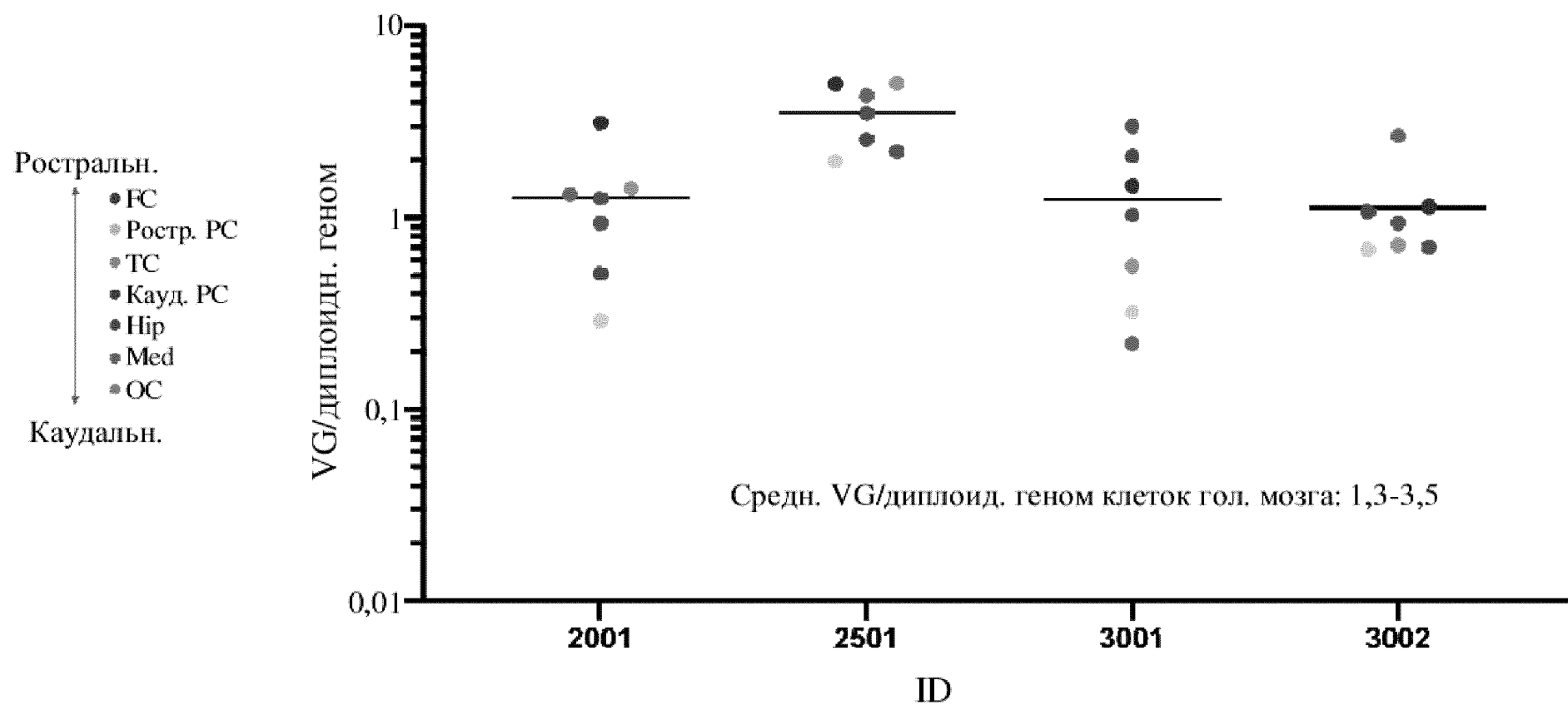
Фиг. 8



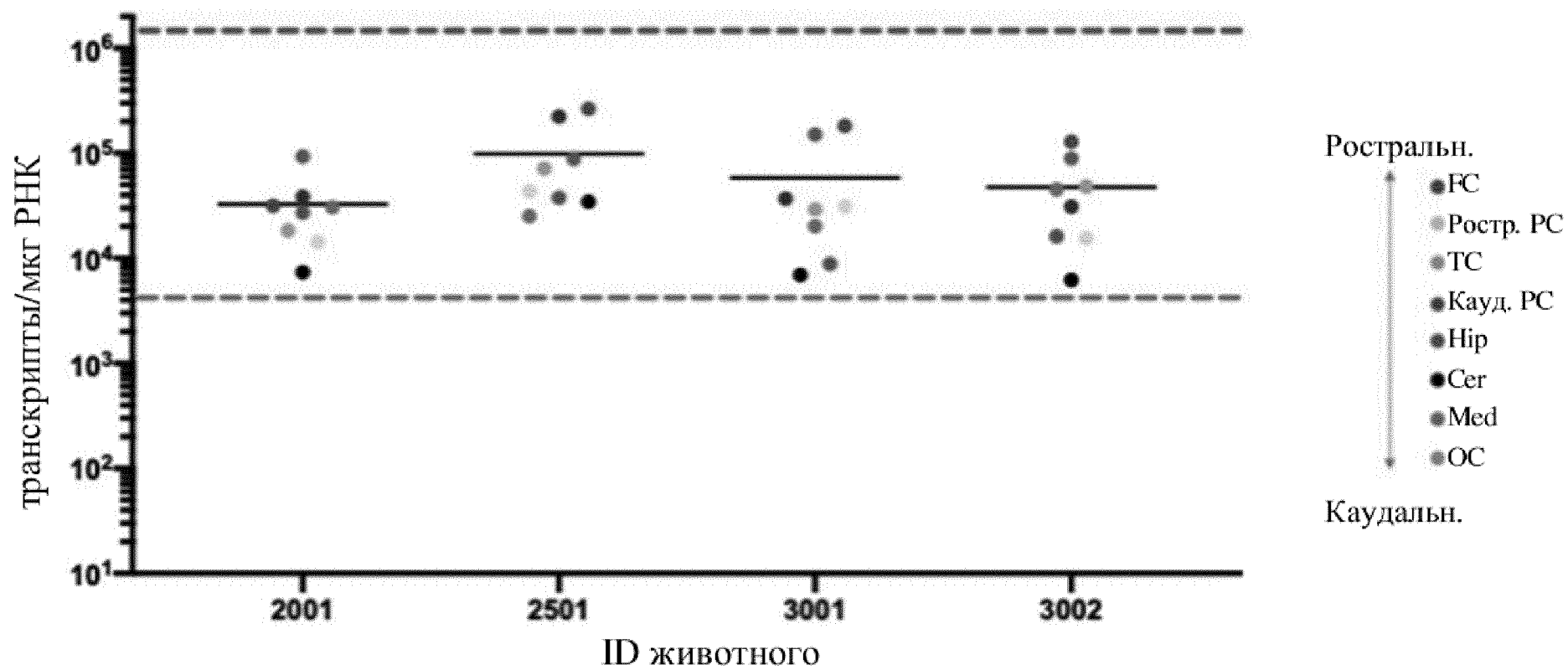
Фиг. 9



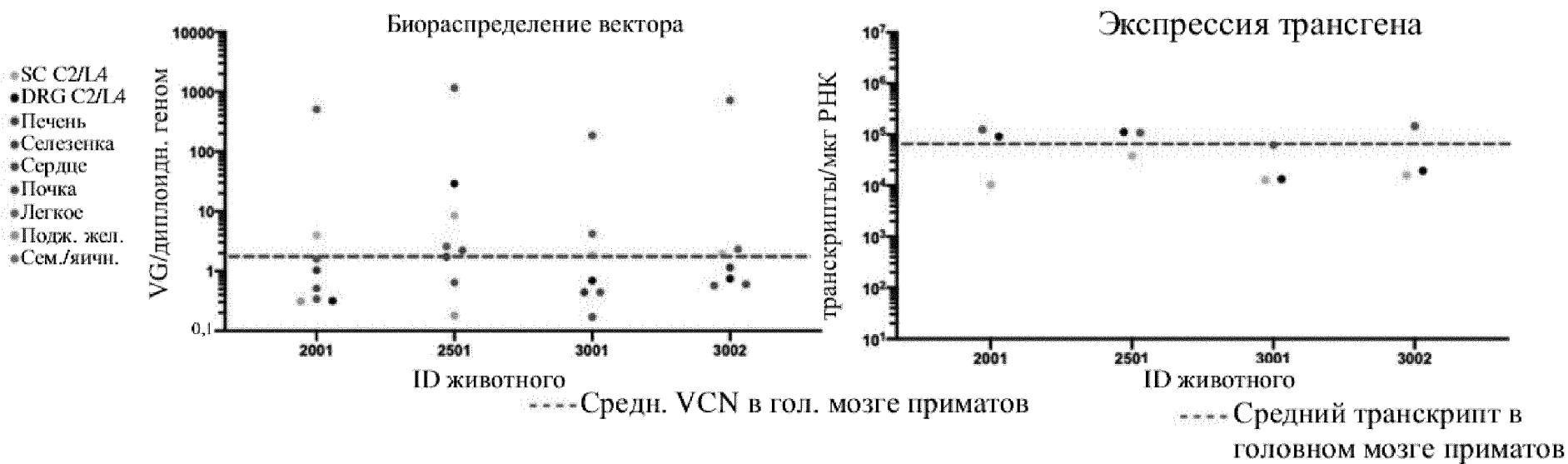
Фиг. 10



Фиг. 11



Фиг. 12



Фиг. 13